

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

ADRIANA ALVES BATISTA DE SOUZA

**NANOPARTÍCULAS DE ZnO E DE CuO: EFEITOS FISIOLÓGICOS
EM PLANTAS DE FEIJÃO-CAUPI
(*Vigna unguiculata*)**

**RECIFE
2018**

Adriana Alves Batista de Souza
Engenheira Agrônoma

Nanopartículas de ZnO e de CuO: efeitos fisiológicos em plantas de feijão-caupi
(Vigna unguiculata)

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora Ciência do Solo.

Orientador: Prof. Dr. Clístenes Williams
Araújo do Nascimento

RECIFE
2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

S729n Souza, Adriana Alves Batista de.
Nanopartículas de ZnO e de CuO: efeitos fisiológicos em plantas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) / Adriana Alves Batista de Souza. – Recife, 2018.
89 f.: il.

Orientador(a): Clístenes Williams Araújo do Nascimento.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo Recife, BR-PE, 2018.
Inclui referências.

1. Nanotecnologia 2. Óxido de zinco 3. Adubos e fertilizantes
4. Fluorescência de clorofila I. Nascimento, Clístenes Williams Araújo do, orient. II. Título

CDD 631.4

ADRIANA ALVES BATISTA DE SOUZA

**Nanopartículas de ZnO e de CuO: efeitos fisiológicos em plantas de feijão-caupi
(*Vigna unguiculata*)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Ciência do Solo.

Aprovada em 31 de Agosto de 2018

Prof. Dr. Clístenes Williams Araújo do Nascimento
Orientador
Universidade Federal Rural de Pernambuco

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Caroline Miranda Biondi
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Profa. Dra. Karina Patrícia Vieira da Cunha
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Dra. Simone Aparecida Lins
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dr. Fernando Bruno Vieira da Silva
Universidade Federal Rural de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e ao teu glorioso filho Jesus Cristo, por ter me dado essa oportunidade de ampliar meus conhecimentos, e por me sustentar e encorajar nos dias difíceis.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, pela oportunidade.

Ao meu orientador Clístenes Williams Araújo do Nascimento, por toda confiança, dedicação, e por partilhar seus conhecimentos comigo.

A toda minha família pelo incentivo aos estudos, principalmente aos meus pais, José Carlos e Edna; e ao meu maridão Romildo, sempre muito amigo, companheiro e paciente.

As minhas amigas, Janyelle, Stephany, Greiele e Rita, que tornaram a caminhada mais alegre. E aos amigos e parceiros de trabalho do grupo de Química Ambiental de Solos: Josângela, Caroline Biondi, Simone, Bruno, Paula, Ygor, Rayanna, William, Aline, Franklone, Luiz, Arthur, Diogo, Marina, Katerin, Paula Carol, Djenifer e a Taciana (meu anjo), pelo apoio em todas as fases dessa caminhada.

A Dr^o Antônio Félix do Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA) pela concessão de sementes para os experimentos, e pela amizade.

À equipe de docentes do Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo, especialmente a professora Caroline Biondi, que esteve comigo na defesa de projeto, na qualificação e na defesa de tese, as etapas mais difíceis da caminhada.

Aos funcionários da UFRPE, em especial a Maria do Socorro por todo apoio administrativo e principalmente pela amizade, carinho e dedicação.

Aos membros da banca examinadora, pelas contribuições na melhoria do trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram com este trabalho, minha eterna gratidão.

Nanopartículas de ZnO e de CuO: efeitos fisiológicos em plantas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*)

RESUMO

Os óxidos de zinco (ZnO-NP) e de cobre (CuO-NP) nanoparticulados vêm sendo amplamente utilizados em diversos setores industriais, com possibilidade de uso como nanofertilizantes. Este estudo teve o objetivo de avaliar o potencial de ZnO-NP e de CuO-NP em suprir Zn e Cu para plantas de feijão-caupi cultivadas em solução nutritiva, além de avaliar o potencial fertilizante do ZnO-NP no cultivo em solo. Para separar o efeito do metal e da nanopartícula, foram utilizados óxidos comuns dos metais para comparação (ZnO e CuO). O efeito dos óxidos sobre as plantas foi avaliado em experimentos independentes, em solução nutritiva. Duas fontes de Zn (ZnO-NP e ZnO) foram testadas nas doses 0, 5, 20, 80 e 400 mg L⁻¹ e duas fontes de Cu (CuO-NP e CuO) nas doses 0, 40, 400, 1000 e 2000 mg L⁻¹. Avaliou-se a capacidade de dissolução dos óxidos em diferentes matrizes aquosas e seus efeitos sobre a germinação, a produção de biomassa, a composição mineral, o teor de pigmentos e o aparato fotossintético das plantas. Nas condições desse estudo, os óxidos não promoveram inibição da germinação nas doses testadas. Doses elevadas dos metais causaram redução na produção de biomassa, no conteúdo dos nutrientes, no teor de clorofila e mudanças na conformação e estrutura do aparato fotossintético. No entanto, nas doses mais baixas dos óxidos não houve sintomas de fitotoxicidade, diminuição de biomassa ou alteração da composição mineral. Em solo, na dose de 100 mg kg⁻¹ o ZnO-NP estimulou a produção de biomassa, mostrando potencial fertilizante para esta cultura.

Palavras-chave: Óxido de zinco. Óxido de cobre. Nanofertilizante. Fluorescência de clorofila.

Nanoparticles of ZnO and of CuO: physiological effects on cowpea plants (*Vigna unguiculata*)

ABSTRACT

Nanoparticulate zinc (ZnO-NP) and copper (CuO-NP) oxides have been widely used in several industrial sectors, with the possibility of being used as nanofertilizers. The objective of this study was to evaluate the potential of ZnO-NP and CuO-NP in supplying Zn and Cu to cowpea plants grown in nutrient solution, as well as to evaluate the ZnO-NP fertilizer potential in soil cultivation. To separate the effect of metal and nanoparticle, common metal oxides were used for comparison (ZnO and CuO). The effect of oxides on plants was evaluated in independent experiments in nutrient solution. Two sources of Zn (ZnO-NP and ZnO) were tested at doses 0, 5, 20, 80 and 400 mg L⁻¹ and two sources of Cu (CuO-NP and CuO) at doses 0, 40, 400, 1000 and 2000 mg L⁻¹. The dissolution capacity of the oxides in different aqueous matrices and their effects on the germination, the biomass production, the mineral composition, the pigment content and the photosynthetic apparatus of the plants were evaluated. Under the conditions of this study, the oxides did not promote inhibition of germination at the doses tested. High doses of the metals caused a reduction in biomass production, nutrient content, chlorophyll content and changes in the structure and structure of the photosynthetic apparatus. However, at lower doses of oxides there were no symptoms of phytotoxicity, biomass decrease or alteration of mineral composition. In soil, at the dose of 100 mg kg⁻¹ ZnO-NP stimulated the production of biomass, showing potential fertilizer for this crop.

Keywords: Zinc oxide. Copper oxide. Nanofertilizers. Chlorophyll fluorescence.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	13
1.1 Hipóteses	14
1.2 Objetivo Geral.....	14
1.3 Objetivos Específicos	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 Desenvolvimento da Nanotecnologia.....	15
2.2 Nanopartículas de ZnO e de CuO	16
2.3 Agregação e taxa de dissolução de nanopartículas	17
2.4 Possíveis mecanismos de absorção de NP e transporte pela planta.....	20
2.5 Efeitos de nanopartículas sobre as plantas	22
Referências	26
3 DISSOLUÇÃO DE ZnO E DE CuO NANOPARTICULADO E SEUS EFEITOS FISIOLÓGICOS SOBRE <i>Vigna unguiculata</i> CULTIVADA EM SOLUÇÃO NUTRITIVA	35
RESUMO	36
ABSTRACT	37
3.1 Introdução.....	38
3.2 Materiais e Métodos.....	39
3.2.1 Teste de dissolução dos óxidos	39
3.2.2 Efeito de ZnO e de CuO sobre a germinação	40
3.2.3 Cultivo em solução nutritiva.....	40
3.2.4 Análise estatística.....	43
3.3 Resultados e Discussões	43
3.3.1 Teste de dissolução dos óxidos	43
3.3.2 Efeito de ZnO e CuO sobre a germinação	47
3.3.3 Produção de biomassa	49
3.3.4 Teor de Zn e de Cu no tecido vegetal.....	53
3.3.5 Composição mineral das plantas.....	56
3.3.6 Teor de pigmentos.....	59
3.3.7 Fluorescência de clorofila.....	61
3.4 Conclusões.....	63
Referências	63

4 INFLUÊNCIA DE NANOPARTÍCULAS DE ZnO SOBRE PARÂMETROS DE PRODUÇÃO, STATUS NUTRICIONAL E APARATO FOTOSSINTÉTICO DE PLANTAS DE FEIJÃO-CAUPI (<i>Vigna unguiculata</i>).....	71
RESUMO	72
ABSTRACT	73
4.1 Introdução.....	74
4.2 Material e Métodos	76
4.3 Resultados e Discussão	78
4.3.1 Crescimento e produção de biomassa	78
4.3.2 Absorção de Zn pelas plantas	80
4.3.3 Composição mineral das plantas.....	81
4.3.4 Fluorescência de clorofila e pigmentos	82
4.4 Conclusões.....	84
Referências	85
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	89

1 INTRODUÇÃO GERAL

Nanopartículas são materiais com pelo menos duas dimensões inferiores a 100 nm; nessa escala, apresentam propriedades físicas e químicas distintas do material correspondente em tamanho comum. As nanopartículas de ZnO e de CuO são amplamente utilizadas em diversos setores industriais, com possibilidades de serem utilizadas como nanofertilizantes, os quais apresentam características favoráveis a fertilização do solo e nutrição de plantas. Acredita-se que os nanofertilizantes possam ser mais eficientes que os fertilizantes convencionais, promovendo melhorias no rendimento das culturas e reduzindo o impacto ambiental.

A crescente necessidade de produção de alimentos e o risco de esgotamento das reservas minerais de fertilizantes, estão impulsionando a pesquisa por novos produtos para otimizar a nutrição de plantas e reduzir as perdas por lixiviação e volatilização, que encarecem o sistema de produção, além de contaminar os recursos naturais. O ZnO e o CuO nanoparticulados possuem potencial para uso como fertilizantes, pois apresentam menor solubilização que a fonte convencional (sais de sulfato), reduzindo as perdas por fixação ao solo e liberando de forma gradativa o nutriente para a planta.

O comportamento do ZnO e do CuO nanoparticulados no solo e seus efeitos sobre a planta devem ser melhor compreendidos, a fim de se verificar a viabilidade desses óxidos como fertilizantes. Para tanto, estudos em solução nutritiva permitem identificar o potencial de dissolução do óxido e de liberação do metal para absorção pelas plantas; em solo, esse comportamento não pode ser observado, devido as cargas existentes que adsorvem o metal e atenua o efeito. Contudo, experimentos em solos são imprescindíveis para identificar a dose ideal para o crescimento e desenvolvimento da planta.

Os efeitos das nanopartículas, ou de seus metais, sobre as plantas variam em função de fatores relacionados à própria planta, ao produto e ao tipo de cultivo como, por exemplo, tolerância da espécie, composição química da nanopartícula, dose utilizada, meio de cultivo, além do período de exposição e das condições ambientais. Para avaliação desses efeitos, a análise da produção de biomassa das plantas é fundamental para verificação do potencial fertilizante dos óxidos nanoparticulados. Contudo, nem sempre esse efeito é expressado com aumento na produção de biomassa, tendo em vista que o requerimento das plantas por Zn e Cu é relativamente baixo, razão pela qual são considerados micronutrientes.

A análise de processos fisiológicos como, por exemplo, germinação, nutrição e fotossíntese são frequentemente utilizadas para compreensão dos efeitos dos metais, ou das

nanopartículas, sobre as plantas. Por exemplo, a determinação da composição mineral pode indicar se houve alterações no teor de outros nutrientes dentro da planta, ocasionado pelo excesso do metal, indicando quais processos metabólicos podem estar sendo prejudicados. O teor de pigmentos e a fluorescência de clorofila permitem inferir sobre o status do aparato fotossintético e, conseqüentemente, sobre a capacidade de assimilação de carbono, que explica o comportamento da variável produção de biomassa.

Assim, esse trabalho se propôs a avaliar o potencial de ZnO e de CuO nanoparticulado aplicados em solução nutritiva para suprir a demanda nutricional de Zn e Cu de plantas de feijão-caupi por meio da análise de processos fisiológicos. Adicionalmente, o potencial do ZnO como nanofertilizante para essa cultura foi testado em um ensaio com solo.

1.1 Hipóteses

Óxido de Zn e de Cu nanoparticulado suprem a demanda nutricional de Zn e Cu de plantas de feijão-caupi de forma mais eficiente que o óxido convencional, em solução nutritiva;

Óxido de Zn nanoparticulado melhora a produção de biomassa e pode ser considerado um nanofertilizante para a cultura do feijão-caupi;

1.2 Objetivo Geral

Avaliar o efeito de ZnO e de CuO nanoparticulado sobre o crescimento e desenvolvimento de plantas de feijão-caupi, por meio da análise da germinação, da nutrição mineral e do aparato fotossintético.

1.3 Objetivos Específicos

Avaliar o potencial de dissolução de ZnO e de CuO nanoparticulado em diferentes matrizes aquosas;

Avaliar o potencial de toxicidade de ZnO e de CuO nanoparticulado sobre a germinação de sementes de feijão-caupi;

Avaliar o efeito de doses de ZnO e de CuO nanoparticulado, comparativamente aos óxidos comuns, no crescimento, na composição mineral, no teor de pigmentos e no aparato fotossintético de plantas de feijão-caupi;

Avaliar o potencial fertilizante de ZnO nanoparticulado em plantas de feijão-caupi cultivada em solo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Desenvolvimento da Nanotecnologia

A possibilidade de manipulação da matéria em escala nanométrica foi inicialmente aventada pelo físico norte-americano Richard Feynman no ano de 1959, durante a reunião anual da Sociedade Americana de Físicos. Em sua palestra intitulada “Há mais espaço lá embaixo”, Feynman vislumbrou a criação de diferentes objetos e de novas áreas de pesquisa, que poderiam ser otimizadas com o desenvolvimento da tecnologia em nanoescala, tais como computadores mais rápidos e avanços nas ciências biológicas (FEYNMAN, 1960).

Na década de 80, a previsão de Feynman começou a se concretizar com a criação do microscópio de varredura por sonda e do microscópio eletrônico de transmissão de alta resolução, que são capazes de visualizar átomos e detalhes em escala nanométrica, o que deu origem a nanociência (BINNIG; ROHRER, 1983; FERREIRA et al., 2008)

A nanociência estuda os fenômenos e a manipulação de materiais na escala atômica, molecular e macromolecular (THE SOCIETY ROYAL, 2004). Na faixa de tamanho em torno de 0,2 nm até cerca de 100 nm (nível atômico e molecular), os materiais apresentam propriedades físicas e químicas distintas, ausentes no mesmo material quando de tamanho microscópico ou macroscópico. O valor superior de 100 nm não deve ser rigidamente definido, pois pode variar de acordo com o tipo de material (BUZEA et al., 2007).

Na verdade, as propriedades físicas típicas e particulares de cada material só se manifestam a partir de um determinado tamanho, chamado tamanho crítico (ZARBIN, 2007). Materiais em uma escala nanométrica e abaixo do tamanho crítico, passam a apresentar propriedades físicas (ópticas, elétricas, magnéticas, de transporte, catalíticas etc.) distintas, que estão estreitamente relacionadas ao tamanho das partículas.

Nessas dimensões nanométricas, os efeitos quânticos se manifestam de maneira mais evidente e os efeitos de superfície tornam-se mais importantes, pois os átomos situados na superfície de um material em nanoescala têm menos vizinhos do que os átomos na superfície de um material em tamanho comum, resultando em menor energia de ligação e, conseqüentemente, as propriedades físicas do material são alteradas. Por exemplo, o ponto de fusão do ouro (Au) reduz de 1064°C para 500°C quando as partículas de Au apresentam de 1,5 a 2 nm de diâmetro (SHIMID; CORAIN, 2003), mostrando o efeito da menor energia de ligação entre as nanopartículas (NPs). Nessa faixa de tamanho, o Au também apresenta mudança na coloração. Em suspensão coloidal de NPs de Au foi observado o crescimento de nanoestruturas em membranas de policarbonatos; os autores reportaram que, em menor tempo de douração, a

membrana se apresentava vermelha, mas em período de tempo maior, a cor desaparecia devido a formação de agregados maiores (PEREIRA; ZANONI; UGO, 2007). Esse fenômeno é resultante da ressonância plasmática de superfície que ocorre em NPs de metais nobres como o ouro, a prata e o cobre; a diversidade de cores observada está relacionada às oscilações dos elétrons de condução em ressonância com a luz incidente (EUSTIS; EL-SAYED, 2005; MELO JR et al., 2012).

As distintas propriedades dos nanomateriais (NMs) e a diversidade de possibilidade de uso vem impulsionando as pesquisas e investimentos em nanotecnologia. Um grande volume de pesquisa foi desenvolvido nessas últimas décadas, com o intuito de criar materiais mais eficientes, resistentes e com melhor desempenho que os produtos atualmente encontrados no mercado. Por exemplo, os nanotubos de carbono, que são formados por uma ou mais folhas de grafeno (alótropo de carbono), possuem 1/6 da densidade do aço, sendo cinco vezes mais rígidos, com alta flexibilidade e que podem ser usados como isolante, semicondutor ou condutor, a depender do arranjo dos átomos (ABDALLA et al., 2015).

Os dendrímeros, são polímeros nanométricos com múltiplos grupos funcionais, que podem carregar e liberar moléculas de medicamentos em locais específicos. Muitos fármacos de tamanho molecular reduzido, com atividade anticancerígena, anti-inflamatória e antimicrobiana têm sido conjugados com êxito a esses polímeros mediante interações físicas ou ligação química (SVENSON, 2009; SEMWAL et al., 2010; SHEERJE et al., 2018).

Nanopartículas de metais e óxidos de metal vêm sendo amplamente produzidas e destinadas a vários setores industriais. Nanopartículas de Ag e TiO₂, por exemplo, apresentam maior eficiência antibacteriana e antifúngica do que em tamanho convencional, com alto potencial de uso em desinfecção de instrumentos cirúrgicos, implantes dentários e ortopédicos, e de tecidos para confecção de roupas hospitalares, diminuindo significativamente os riscos de infecção e de contaminação (XU et al., 2017; ASSIS et al., 2017; BOUTINGUIZA et al., 2018; GUNPUTH et al., 2018).

É vasta a possibilidade de utilização de nanopartículas em produtos e em processos industriais. Estima-se que no ano de 2020 o mercado de nanotecnologia movimentará dez trilhões de dólares em todo o mundo.

2.2 Nanopartículas de ZnO e de CuO

Em um estudo de mercado feito para os dez NMs mais produzidos globalmente (KELLER et al., 2013), foi estimado para o ano de 2010 que o óxido de Zn nanoparticulado (ZnO-NP) e o óxido de Cu nanoparticulado (CuO-NP) ocupariam a 5^a e a 10^a posição,

respectivamente. O ZnO-NP é muito utilizado em filtros solares, tecidos, revestimentos industriais, agentes antibacterianos e materiais eletrônicos (WANG et al., 2013). O CuO-NP, por sua vez, tem sido utilizado como agente antimicrobiano, em catálise química e em produtos como tintas, cerâmicas, lubrificantes e eletrônicos (LEE et al., 2008).

A diversidade de usos aumenta as chances dessas NPs entrarem no ambiente. Estudos revelam que o solo é o maior receptor do ZnO-NP e do CuO-NP no ambiente (KELLER et al., 2013). É provável que boa parte das NPs sejam transformadas em partículas maiores, oxidados, reduzidos, ou dissolvidos no ambiente, contudo, uma fração pode se manter inalterada e ser absorvida pela fauna do solo e pelas plantas, entrando na cadeia trófica.

Em teoria, ZnO-NP e CuO-NP podem ser designados como nanofertilizantes por apresentarem em sua composição elementos essenciais para plantas. O Zn está associado ao metabolismo de carboidratos, a integridade da membrana, a proteínas envolvidas na replicação do DNA e a expressão de genes, além de executar função estrutural e catalítica em enzimas como superóxido dismutase, álcool desidrogenase e anidrase carbônica (BROADLEY et al., 2012). O Cu participa de reações de oxirredução, protege as plantas contra estresses oxidativos, atua no metabolismo do carbono e do nitrogênio e na fotossíntese (MARSCHNER, 2012).

O excesso desses micronutrientes, no entanto, pode induzir sintomas de fitotoxicidade como clorose nas folhas, inibição do crescimento das raízes e alterações no fotossistema II (BROADLEY et al., 2012). As faixas de concentração crítica de deficiência e toxicidade para o Zn são 15 a 20 mg kg⁻¹ e 100 a 300 mg kg⁻¹, respectivamente; para o Cu, variam de 1 a 5 mg kg⁻¹ e 20 a 30 mg kg⁻¹, respectivamente (EPSTEIN, 1965; EPSTEIN; BLOOM, 2005).

Os estudos sobre os possíveis impactos dessas NPs no ambiente não têm acompanhado o rápido crescimento dos estudos sobre as possíveis aplicação tecnológicas. Portanto, ainda é pouco conhecido o comportamento desses NMs no solo, na água e no ar, bem como seus efeitos sobre a microbiota do solo, as plantas e os animais.

2.3 Agregação e taxa de dissolução de nanopartículas

A presença de cargas na superfície das NPs pode proporcionar aglomeração e agregação em solução aquosa, pela interação com outros íons na solução (GUZMAN; FINNEGAN; BANFIELD, 2006). As NPs também podem se atrair por força de Van der Waals (WANG et al., 2013), causando agregação e sedimentação, com consequente dificuldade para dissolução do produto. O ZnO e o CuO são considerados quimicamente insolúveis em água, contudo, uma pequena parte do produto se mantém dispersa na solução e

pode interagir com o meio e dissolver liberando seus metais (BIAN et al., 2011; ADELEY et al., 2014).

Nos estudos de avaliação da toxicidade de óxidos em plantas, algumas estratégias vêm sendo adotadas para minimizar a agregação de partículas como, por exemplo, o uso de ultrassom para dispersão das partículas na solução, embora maior parte do produto permaneça agregado mesmo após esse tratamento (LING; XING, 2008; LEE et al., 2008; CONWAY et al., 2015). O cultivo de plantas em meio ágar é outra estratégia utilizada para impedir a aglomeração, mas nesse meio físico a difusão dos elementos até a raiz torna-se dificultada (LEE et al., 2010, SCHWABE et al., 2015), limitando o conhecimento do potencial tóxico do produto. Além do mais, essas duas estratégias criam uma condição que não é possível de ocorrer em condições naturais do solo.

Fatores como a força iônica e o pH da solução também são capazes de influenciar significativamente o comportamento das partículas no ambiente, podendo potencializar ou minimizar a agregação das nanopartículas. A formação de agregados de NPs de TiO_2 foi visualizada pela técnica de espalhamento dinâmico da luz (Dynamic Light Scattering, DLS) em soluções com diferentes forças iônicas (usando NaCl ou CaCl_2), em uma faixa de pH comum em solos (4 a 8). A pH 4,5 em suspensão de NaCl $0,0045 \text{ mol L}^{-1}$, o diâmetro médio das partículas foi de 50-60 nm, aumentando para mais de 1000 nm quando a força iônica foi elevada para $0,0165 \text{ mol L}^{-1}$. Nos valores mais alto de pH, assim como na suspensão com CaCl_2 , a agregação das NPs na suspensão foi muito maior, atingindo a faixa de 10^3 a 10^4 nm (FRENCH et al., 2009). Estes resultados demonstram que as condições do ambiente podem influenciar na agregação das NPs e, conseqüentemente, na sua capacidade de dissolução e liberação dos metais, para absorção pelas plantas.

O comportamento de agregação e sedimentação de NPs de TiO_2 , CeO_2 e ZnO foi avaliado em algumas matrizes aquosas (ex. água do mar, lagoa, rio, entre outras) com diferentes teores de carbono orgânico dissolvido (COD) e de força iônica (KELLER et al., 2010). Nas amostras de água com baixo teor de COD e alta força iônica, como a água do mar, o tamanho dos agregados aumentou significativamente, variando de 300 nm a 1200 nm, em comparação a água doce (300 a 350 nm), resultando em maior sedimentação. Em amostra de água doce, com alto teor de COD e baixa força iônica, o tamanho dos agregados permaneceu estável (300 nm); isto ocorreu, segundo os autores, porque o COD funcionou como uma barreira para a agregação, adsorvendo as partículas sobre sua superfície.

Em um ensaio de dissolução de NPs de ZnO foi avaliado o efeito da interação do tamanho das partículas com o pH da solução (ODZACK et al., 2014). Nanopartículas com

tamanho de 4,5 e 27 nm, em solução com pH ajustado para 6,1 e 7,6, foram verificadas por espalhamento dinâmico de luz (DLS, Dynamic Light Scattering). O tamanho médio das nanopartículas de ZnO-NP em solução com pH 6,1 e 7,6 estava em torno de 1900 e 1800 nm, respectivamente. O maior valor a pH 6,1 foi atribuído a uma maior dissolução das partículas menores neste pH. Não houve diferença na concentração de Zn em solução em função do tamanho das partículas, mas o pH influenciou na taxa de dissolução do ZnO-NP, com maiores valores quando o valor de pH foi 6,1. Nesse estudo, a taxa de dissolução foi superior a 50% do ZnO-NP; essa alta taxa pode ser explicada pela baixa concentração do produto em solução, 1 mg L⁻¹ (ODZACK et al., 2014).

Em um teste de dissolução de ZnO e ZnO-NP na concentração de 400 e 4000 mg L⁻¹ em meio de cultivo, Murashige e Skoog com ágar a pH 5,8, a concentração de Zn solúvel foi, respectivamente, 14,6 e 96,9 mg L⁻¹ (4,6 e 3,0% do total de Zn) para o ZnO-NP e de 12,89 e 32,74 mg L⁻¹ (4,0 e 1,0% do total de Zn) para ZnO (LEE et al., 2010). Na dose mais alta, o ZnO-NP proporcionou uma dissolução até 3 vezes maior que a fonte convencional, pois é mais reativo, desde que a agregação seja mínima. Os autores sugeriram que o baixo teor de Zn dissolvido na dose mais alta está relacionado ao curto período de tempo para dissolução do óxido.

A dissolução do CuO e do ZnO comum e nanoparticulado em areia lavada foi dependente do tempo (0, 1, 7 e 14 dias). No tempo 0 a solubilidade do CuO-NP foi maior que o CuO convencional, e estatisticamente igual nos demais períodos. A concentração não excedeu a 3 mg L⁻¹ de Cu do total de 500 mg kg⁻¹. A solubilidade do ZnO foi maior após 24 h para ZnO-NP (5 mg L⁻¹ de Zn) e imediatamente após a suspensão para o ZnO (7 mg L⁻¹ de Zn), com redução do teor de Zn para menos que 3 mg L⁻¹ após 7 e 14 dias para o ZnO-NP e ZnO-C, respectivamente (DIMKPA et al., 2012). Os autores atribuem essa redução a formação de agregados maiores que precipitaram com o maior período de tempo.

A presença de ânions como H₂PO₄⁻¹, HPO₄⁻² e PO₄⁻³ na solução do solo ou em solução nutritiva pode reduzir de forma significativa a concentração de Zn²⁺ na solução, devido a formação de precipitado de ZnPO₄. A cinética de dissolução de ZnO-NP na presença e ausência de íon PO₄⁻³ foi estudado por Lv et al. (2012); nesse estudo, a concentração de Zn²⁺ na solução foi de 10,68 mg L⁻¹ quando na ausência de PO₄⁻³ e, na razão molar P/Zn de 0,2 e 0,5, a concentração foi de 0,84 e 0,22 mg L⁻¹. Essa ligação do metal (Zn ou Cu) ao íon fosfato pode reduzir a concentração disponível dos nutrientes para absorção pelas plantas e inibir os possíveis efeitos negativos desses metais sobre as plantas.

Se por um lado a subestimação da concentração do metal dissolvido do óxido pode ocorrer pela precipitação com ânions em solução, por outro lado pode haver superestimação desta concentração se algumas medidas não são tomadas antes da determinação do metal, como a centrifugação e filtração em membrana porosa (LEE et al., 2010; WANG et al., 2012).

A presença de NPs foi relatada por Lin e Xing (2007), pela observação em microscópio de força atômica, no sobrenadante de uma suspensão de NPs de ZnO após centrifugação (3000 g por 1 h) e filtração em membrana de vidro (0,7 µm). Existe ainda a possibilidade de utilização da ultrafiltração. Nanopartículas de ZnO foram removidas do sobrenadante após centrifugação à 20000 g por 40 min e filtração em membrana com 0,025 µm de tamanho de poro. A confirmação foi obtida por imagem de microscopia eletrônica de transmissão (LV et al., 2012). Contudo, o alto custo dessas membranas torna o ensaio muito oneroso. Grande parte dos estudos de dissolução dos óxidos de metais nanoparticulados, tem adotado a microfiltração em membrana com 0,22 µm de tamanho de poro (LEE et al., 2010; KELLER et al., 2010; ZHOU et al., 2010), para minimizar a superestimação do valor do metal.

2.4 Possíveis mecanismos de absorção de NP e transporte pela planta

Após dissolução das NPs de metais e de óxidos de metais no solo, o metal liberado na solução pode passar por diferentes processos como precipitação, adsorção aos minerais, imobilização em microrganismos, complexação pela matéria orgânica, lixiviação e absorção pelas plantas (ALLOWAY, 2012).

Absorção via sistema radicular

O tamanho dos poros de entrada da parede celular da raiz restringe severamente a absorção de partículas superiores a 5 nm (MARSCHENER, 2012). Contudo, alguns trabalhos apontam a presença de NPs no interior das plantas, indicando que por algum mecanismo as plantas absorvem estas partículas. Por exemplo, em raízes de azevém (*Lolium perenne*) expostas a ZnO-NP (19 nm) foi observado por microscopia eletrônica de transmissão partículas de ZnO na endoderme e nas células vasculares, indicando que a NP foi absorvida pela raiz e que podia ser translocada para toda planta por meio do xilema. Os autores explicam que o ZnO-NP pode ter penetrado na célula por possíveis buracos na parede celular e se translocado via simplástica (40 nm diâmetro) (LIN et al., 2008).

Absorção via foliar

Outra rota de absorção de NPs é por meio da penetração na cutícula e na abertura estomática das folhas. A absorção foliar de NPs magnéticas revestidas de carbono foi relatada

em plantas de abobrinha (*Cucurbita pepo*) pulverizadas com estas partículas em suspensão, após penetração o material foi translocado pela planta (CORREDOR et al., 2009). Os riscos associados a ingestão humana de frutos contendo NPs são desconhecidos.

Em um experimento com alface pulverizada com solução de nanopartículas de Ag, foi observado absorção via abertura estomática (LARUE et al., 2014). Os autores acreditam que, após penetração na folha, o material pode ser transformado em sua forma iônica. Para comprovar a capacidade de plantas de pepino (*Cucumis sativus*) absorverem CeO₂-NP via foliar, Hong et al. (2014) pulverizaram as plantas tanto com a suspensão do óxido (20-320 mg L⁻¹) quanto com o próprio CeO₂ em pó, para simular um caso de contaminação atmosférica. Houve absorção e translocação via floema das NP para outras partes da planta, por imagens de MET foi observado nanopartículas do óxido no tecido das folhas e da raiz, comprovando que a contaminação das plantas com NPs via atmosfera é possível.

Absorção por endocitose

Sugere-se também que as NPs podem ser absorvidas pelo processo de endocitose, processo ativo pelo qual material extracelular é transportado para o protoplasma por invaginações da membrana plasmática. Por exemplo, em mudas de pepino (*Cucumis sativus* L.) cultivadas em solução nutritiva com NPs de cinza de pneu (< 50 nm), foi observado uma possível invaginação destas partículas no citoplasma de células da raiz. O processo de endocitose é favorecido quando as partículas não possuem carga em sua superfície e são muito pequenas (MOGHADDASI et al., 2015).

A taxa de absorção dos metais e das NPs, além de ser dependente do tamanho da partícula, é função de muitos outros fatores como espécie química e concentração do metal, espécie e fase de desenvolvimento da planta, tempo de exposição das raízes e condições físicas e químicas do meio de cultivo (RICO et al., 2011; MISRA et al., 2012; ANJUM et al., 2015).

A grande maioria dos trabalhos apontam os metais liberados das NPs como causadores dos efeitos positivos e negativos sobre o crescimento e desenvolvimento das plantas, deduzido pelo aumento do teor do metal no tecido da planta. Em plantas de alfafa (*Medicago sativa*) cultivadas em solo com doses crescentes de ZnO-NP (250 a 750 mg kg⁻¹), o conteúdo de Zn nas plantas aumentou de forma linear, sendo a raiz o compartimento com maior teor do metal (BANDYOPADHYAY et al., 2015). Em plantas de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) expostas a Cu na forma NP e CuCl₂ na presença e ausência de cinetina (hormônio vegetal), o tecido radicular também apresentou os maiores teores de Cu, mas houve aumento do teor de Cu no tecido foliar quando as fontes foram combinadas ao hormônio, resultando em danos a fotossíntese (APODACA et al., 2017).

Em tomateiro (*Solanum lycopersicum*) cultivado em substrato com CeO₂-NP (1,3 a 130 mg kg⁻¹), o conteúdo de Ce também aumentou linearmente à dose aplicada, com maior acúmulo na raiz, seguida pelas folhas, caule e fruto, mostrando que o Ce uma vez absorvido é translocado por toda a planta (WANG et al., 2012). No entanto, em soja (*Glycine max*) cultivada em solução nutritiva adicionada de ZnO-NP (500 a 4000 mg L⁻¹), a absorção de Zn pelas raízes foi maior na dose mais baixa do produto; os autores atribuem esse comportamento a uma maior aglomeração e agregação das NPs nas doses mais altas, dificultando a absorção destas partículas (LOPEZ-MORENO et al., 2010). Em plantas de alface (*Lactuca sativa*) cultivado em meio ágar adicionado de CeO₂-NP (2 a 2000 mg L⁻¹), o teor de Ce na planta aumentou linearmente à dose aplicada, com maior teor na raiz do que na parte aérea (CUI et al., 2013).

A exposição das plantas a nanopartículas de metais e de metais na forma de óxido via sistema radicular contribui com uma maior acumulação destes metais e NPs neste compartimento, pois na maioria das plantas as raízes impedem que o excesso de metal seja translocado para parte aérea, evitando danos ao aparato fotossintético e prejuízos ao desenvolvimento da planta (RODRIGUES et al., 2016).

2.5 Efeitos de nanopartículas sobre as plantas

Como resultado da propagação dos produtos e dispositivos que empregam NMs em sua composição, crescem as chances de entrada de NMs no solo e, conseqüentemente, nas plantas, base da cadeia alimentar. Os efeitos sobre as plantas ainda são poucos conhecidos e podem variar de forma positiva ou negativa, a depender de fatores como espécie de planta, via de exposição (radicular ou foliar), composição química e concentração da NP (STAMPOULI, SINHA; WHITE, et al., 2009; WANG et al., 2013; LIU; ZHANG; LAL, et al., 2016)

Os efeitos negativos sobre o crescimento das plantas, na maioria das vezes, têm sido atribuídos ao excesso de metal solubilizado dos óxidos e não a um efeito específico da nanopartícula. Por exemplo, em batata doce (*Ipomoea batatas*) cultivada na presença de Zn, Cu e Ce na forma de óxido nanoparticulado e na forma iônica (sais de sulfato), não foram encontradas diferenças significativas no acúmulo dos metais entre as duas fontes analisadas, e nos parâmetros de produção, sugerindo que o efeito sobre a planta estava relacionado ao metal em si e não a nanopartícula (BRADFIELD et al., 2017). Da mesma forma, Wang et al. (2013) verificaram que nanopartículas de ZnO não constituem risco específico para plantas de caupi (*Vigna unguiculata*), cultivadas em solução nutritiva e em solo com ZnO-NP e ZnCl₂ (500 mg kg⁻¹). Tendo em vista que houve similaridade de efeitos entre as duas fontes, ou seja, o efeito

fitotóxico foi devido ao Zn oriundo da dissolução do ZnO-NP e não da absorção das nanopartículas. Nas raízes de plantas de trigo cultivadas em areia lavada e expostas a CuO-NP ($> 10 \text{ mg kg}^{-1}$) houve efeito negativo sobre o crescimento, atribuído aos íons de Cu^{2+} liberados da dissolução do óxido, pois o efeito foi similar ao da fonte iônica nas doses acima de 6 mg kg^{-1} (ADAMS et al., 2017).

No entanto, existem relatos de prováveis efeitos específicos das NPs em plantas. Por exemplo, Stampoulis, Sinha e White et al. (2009) verificaram que plantas de pepino (*Cucurbita pepo*) cultivadas em solução nutritiva com NPs de Cu ($0\text{-}1000 \text{ mg L}^{-1}$) após centrifugação, para remoção das nanopartículas do sobrenadante, tiveram aumento significativo de biomassa comparadas as plantas cultivadas em solução não centrifugada, sugerindo efeito fitotóxico das nanopartículas.

Em condição hidropônica, plantas de *Elsholtzia splendens* (tolerante a Cu) foram expostas a CuO-NP e CuSO_4 . O conteúdo de Cu na parte aérea das plantas expostas a CuO-NP (1000 mg L^{-1}) foi muito maior do que nas plantas expostas a fonte solúvel na dose de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$, concentração escolhida com base na concentração de Cu dissolvido na dose de 1000 mg L^{-1} de CuO-NP. Os autores relataram formação de depósitos de CuO-NP nas células da raiz e em células foliares, comprovando por análise de absorção de raio X em XANES (X-ray K-absorption near edge structure), que a espécie de Cu no tecido da planta predominava como CuO-NP. Este dado sugere que as NPs foram absorvidas e translocadas para parte aérea (SHI et al., 2013).

Na dose de 400 mg L^{-1} ZnO-NP ($14,6 \text{ mg L}^{-1}$ de Zn solúvel), cerca de 94% das sementes de *Arabidopsis thaliana* não germinaram. Em contraste, a exposição das sementes a Zn adicionado como ZnCl_2 , só resultou fitotoxicidade a partir da dose de 250 mg L^{-1} , chegando a 100% de inibição na dose de 500 mg L^{-1} . Este resultado indica que a fitotoxicidade com ZnO-NP não pode ser atribuída somente ao metal dissolvido e que as partículas também contribuem para a fitotoxicidade (LEE et al., 2010).

Semelhantemente aos fertilizantes tradicionais, os nanofertilizantes (NFs) que contém micronutrientes podem agir de forma ambígua, a depender da concentração do metal solubilizado e do requerimento e tolerância da planta. Nesse sentido, NFs contendo micronutrientes se destacam nos estudos de nutrição e toxicidade em plantas (MAHAJAN; DHOKE; KHANNA, 2011; PRADHAN et al., 2013; WANG et al., 2013; RAO; SHEKHAWAT, 2014), pois podem rapidamente passar de um nível adequado para tóxico ao crescimento das plantas.

Estudos comparativos entre NFs e fertilizantes tradicionais são importantes para assegurar um manejo adequado dos NFs para cada cultura de importância econômica a fim de se obter os melhores índices de produção com menor risco a saúde e ao ambiente. Por exemplo, plântulas de grão de bico (*Cicer arietinum L.*) expostas a ZnO-NP via foliar (1,5 ou 10 mg L⁻¹) aumentaram a produção de biomassa na concentração mais baixa do óxido (1,5 mg L⁻¹), em comparação ao ZnO-C e ao ZnSO₄; a partir dessa dose, o excesso do metal causou efeito adverso ao crescimento radicular das plântulas (BURMAN; SAINI; PRAVEEN-KUMAR., 2013). Sementes de amendoim (*Arachis hypogaea L.*) tratadas com 1000 mg L⁻¹ de ZnO-NP não tiveram a germinação inibida pelo óxido; as plântulas cresceram mais vigorosas, o teor de clorofila aumentou, o florescimento foi antecipado e a produção de vagens foi 34% maior em comparação com ZnSO₄ convencional. Dose superior provocou efeito inibitório no crescimento e rendimento do amendoim (PRASAD et al., 2012).

Experimentos que avaliem os efeitos dos NFs sobre o ciclo de vida da cultura são importantes para definir a dose adequada ao maior rendimento. Plantas de milho (*Pennisetum americanum*) foram fertilizadas com Zn-NP biossintetizado apresentaram efeito positivo nos parâmetros de crescimento (comprimento do colmo, comprimento de raízes, área da raiz), no teor de clorofila, proteínas e no rendimento dos grãos (38%), em relação ao controle (TARAFDAR et al. 2014). Plantas de soja (*Glycine max L.*) cultivadas em solução nutritiva com FeO-NP nas doses 0, 0,25, 0,5, 0,75 e 1 g L⁻¹, apresentaram maior produção de biomassa de folhas e vagem na dose 0,75 g L⁻¹, mas o maior rendimento de grãos foi obtido na dose de 0,5 g L⁻¹ (SHEYKHBAGLOU et al., 2010).

O excesso de metal absorvido pela planta causa uma série de desordens nutricionais e bioquímicas que comprometem o desenvolvimento. Plantas de mostarda da Índia (*Brassica juncea L.*) expostas a CuO-NP (20 a 500 mg L⁻¹) apresentaram redução do teor de clorofila à medida que o teor de Cu na planta aumentou; o excesso de Cu ocorreu logo na primeira dose do CuO-NP (NAIR; CHUNG, 2015). Em estudo para investigar o efeito de CuO-NP (10-800 mg L⁻¹) sobre a resposta fisiológica e bioquímica de plântulas de trigo (*Triticum spp*) cultivadas em solução nutritiva, Sharma et al. (2017), reportaram redução significativas no teor de clorofila e na fluorescência de clorofila das plântulas, que atribuíram ao dano oxidativo na membrana dos cloroplastos causado pela interação direta com as nanopartícula, ou ainda, aos íons de Cu²⁺ liberados pela dissolução do CuO nanoparticulado.

Em um estudo com nove cultivares de arroz (*Oryza sativa*) cultivadas em solução nutritiva com 200 mg L⁻¹ de ZnO-NP, não foi verificado efeito tóxico do Zn sobre a produção de clorofila a, b e carotenoides e xantofilas. Os autores atribuíram esse efeito à ação das enzimas

antioxidantes catalase e peroxidase que controlaram os níveis de espécies reativas de oxigênio na planta, evitando danos aos pigmentos (SAMART; CHUTIPAIJIT; PHAKAMAS, 2017). Plantas de pepino (*Cucumis sativus*) cultivadas em solo com ZnO NP (400 e 800 mg kg⁻¹) também não apresentaram redução no teor de clorofila, nem alterações nas trocas gasosas (ZHAO et al., 2013). A ausência de fitotoxicidade nessa dose pode estar relacionada a tolerância da planta ao metal e a capacidade de adsorção do solo, tanto das NPs quanto do Zn²⁺ liberado da dissolução do óxido, que limita a absorção pelas plantas. Em plantas de trigo (*Triticum spp.*) cultivadas em areia lavada com 500 mg kg⁻¹ de CuO-NP ou ZnO-NP foi constatado uma redução de quase 40% no teor de clorofila das plantas (DIMKPA et al., 2012), a similaridade de efeito entre os dois óxidos é algo interessante, tendo em vista que as plantas têm menor tolerância ao Cu, fato confirmado pela redução do crescimento radicular e da biomassa somente das plantas expostas ao Cu.

A redução do teor de clorofila pode estar associada à redução da biossíntese desse pigmento pela inibição da enzima δ -aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D), que participa na formação de precursores da clorofila (KLEIN et al., 1975; OUZOUNIDOU; LANNOYE; KARATAGLIS, 1993), e ao aumento da degradação da clorofila, por meio da desintegração da membrana do cloroplasto, que ocorre via ação de espécies reativas de oxigênio que promovem a peroxidação dos lipídeos que compõe a membrana (SANDAMANN; BOGER, 1980).

Outra variável utilizada com frequência para detecção de problemas na fotossíntese, quando as plantas estão em condições de estresse abiótico, é a fluorescência de clorofila (VIEIRA et al., 2010; ZUREK et al., 2014; KALAJI et al., 2016; MARQUES et al., 2017; YADAV et al., 2018). Na fase fotoquímica os elétrons ejetados da desexcitação da clorofila, e que não foram utilizados na produção de ATP e NADPH através do fotossistema II (FSII) e fotossistema I (FSI), são liberados na forma de calor e fluorescência (MAXWELL; JOHNSON, 2000; BAKER; ROSENQVIST, 2004).

A análise de fluorescência de clorofila tem inúmeras vantagens como, por exemplo, possibilidade de avaliação das plantas em campo, é uma técnica não destrutiva, rápida e que fornece dados confiáveis sobre o nível de estresse da planta. Na literatura os trabalhos que avaliam o efeito de nanopartículas de metais, e de óxido de metais nas plantas são escassos (FALCO et al., 2015; QUEIROZ et al., 2016). Essa técnica pode contribuir com o entendimento dos efeitos dos nanofertilizantes sobre a fisiologia da fotossíntese das plantas tratadas com esses produtos.

REFERÊNCIAS

ABDALLA, S.; AL-MARZOUKI, F.; AL-GHAMDI, A. A.; ABDEL-DAIEM, A. Different technical applications of carbon nanotubes. **Nanoscale Research Letters**, New v. 10, n. 358, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s11671-015-1056-3>>.

ANJUM, N. A.; ADAM, V.; KIZEK, R.; DUARTE, A. C.; PEREIRA, E.; IQBAL, M.; LUKATKIN, A. S.; AHMAD, I. Nanoscale copper in the soil–plant system–toxicity and underlying potential mechanisms. **Environmental research**, San Diego, v. 138, p. 306-325, 2015.

ADAMS, J.; WRIGHT, M.; WAGNER, H.; VALIENTE, J.; DAVID, B.; ANDERSON, A. Cu from dissolution of CuO nanoparticles signals changes in root morphology. **Plant Physiology and Biochemistry**, Issy-Les-Moulineaux, v. 110, p. 108-117, 2017.

ADELEYE, A. S.; CONWAY, J. R.; PEREZ, T.; RUTEN, P.; KELLER, A. A. Influence of extracellular polymeric substances on the long-term fate, dissolution, and speciation of copper-based nanoparticles. **Environmental Science Technology**, Washington, v. 48, n. 21, p. 12561–12568, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/es5033426>>.

ALLOWAY, B. J. **Heavy metals in soils: trace metals and metalloids in soils and their bioavailability**, Environmental Pollution. 3ed, eBook, Dordrecht Springer, 2013.

APODACA, S. A.; WENJUAN, T.; DOMINGUEZ, O. E.; HERNANDEZ-VIEZCAS, J. A.; PERALTA-VIDEA, J. R.; GARDEA-TORRESDEY, J. L. Physiological and biochemical effects of nanoparticulate copper, bulk copper, copper chloride, and kinetin in kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) plants. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 599, p. 2085–2094, 2017.

ASSIS, M.; CORDONCILLO, E.; TORRES-MENDIETA, R.; BELTRÁN-MIR, H.; MINGUEZ-VEGA, G.; OLIVEIRA, R.; LEITE, E. R.; FOGGI, C. C.; VERGANI, C. E.; LONGO, E.; ANDRÉS, J. Towards the scale-up of the formation of nanoparticles on α -Ag₂WO₄ with bactericidal properties by femtosecond laser irradiation. **Scientific Reports**, London, v. 8, n. 1884, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-018-19270-9>>.

BAKER, N. R.; ROSENQVIST, E. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: An examination of future possibilities. **Journal of Experimental Botany**, United Kingdom, v. 55, p. 1607–1621, 2004.

BANDYOPADHYAY, S.; PLASCENCIA-VILLA, G.; MUKHERJEE, A.; RICO, C. M.; JOSÉ-YACAMÁN, M.; PERALTA-VIDEA, J. R.; GARDEA-TORRESDEY, J. L. Comparative phytotoxicity of ZnO NPs bulk ZnO, and ionic zinc onto the alfalfa plants symbiotically associated with *Sinorhizobium meliloti* in soil. **Science Total Environmental**, Amsterdam, v. 515-516, p. 60–69, 2015. Disponível em: <<http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.02.014>>.

BOUTINGUIZA, M.; FERNÁNDEZ-ARIAS, M.; DEL VAL, J.; BUXADERA-PALOMERO, J.; RODRÍGUEZ, D.; LUSQUIÑOS, F.; GIL, F. J.; POU, J. Synthesis and deposition of silver nanoparticles on cp Ti by laser ablation in open air for antibacterial effect in dental implants. **Materials Letters**, Amsterdam, v. 231, p. 126-129, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.matlet.2018.07.134>>.

BRADFIELD, S.; KUMAR, P.; WHITE, J.C.; EBBS, S. D. Zinc, copper, or cerium accumulation from metal oxide nanoparticles or ions in sweet potato: Yield effects and projected dietary intake from consumption. **Plant Physiology and Biochemistry**, Issy-Les-Moulineaux, v. 110, p. 128-137, 2017.

BROADLEY, M.; BROWN, P.; CAKMAK, I.; RENGEL, Z.; ZHAO, F. Function of Nutrients: Micronutrients. In: **Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants**. 3 ed., p. 191-248, 2012.

BURMAN, U.; SAINI, M.; PRAVEEN- KUMAR. Effect of zinc oxide nanoparticles on growth and antioxidant system of chickpea seedlings. **Environmental Pollution**, Oxford, v. 150, n. 2, p. 243-250, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/02772248.2013.803796>>.

BUZEA, C.; IVAN, I.; BLANDINO, P.; ROBBIE, K. Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity, **Biointerphases**, New York, v. 2, n. 4, p. MR17–MR71, 2007.

BINNIG, G.; ROHRER, H. Scanning Tunneling Microscopy. **Surface Science**, Amsterdam, v. 126, p. 236-244, 1983.

CORREDOR, E.; TESTILLANO, P. S.; CORONADO, M. J.; GONZÁLEZ-MELENDI, P.; FERNÁNDEZ-PACHECO, R.; MARQUINA, C.; IBARRA, M. R.; FUENTE, J. M.; RUBIALES, D.; LUQUE, A. P; RISUEÑO, M. C. Nanoparticle penetration and transport in living pumpkin plants: *in situ* subcellular identification. **BMC Plant Biology**, London, v. 9, n. 45, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/1471-2229-9-45>>.

CONWAY, J. R.; ADELEYE, A. S.; GARDEA-TORRESDEY, J.; KELLER, A. A. Aggregation, dissolution, and transformation of copper nanoparticles in natural waters. **Environmental Science & Technology**, Washington, v. 49, p. 2749–2756, 2015.

CUI, D.; ZHANG, P.; MA, Y.; HE, X.; LI, Y.; ZHANG, J.; ZHAO, Y; ZHANG, Z. Effect of cerium oxide nanoparticles on asparagus lettuce cultured in an agar medium. **Environmental Science: Nano**, Virgínia, v. 1, n. 5, p. 459-465, 2014. Disponível em:< <http://dx.doi.org/10.1039/C8EN00712H>>.

DIMKPA, C. O.; MCLEAN, J. E.; LATTA, D. E.; MANANGÓN, E.; BRITT, D. W.; JOHNSON, W. P.; BOYANOV, M. I.; ANDERSON, A. J. CuO and ZnO nanoparticles: phytotoxicity, metal speciation, and induction of oxidative stress in sand-grown wheat. **Journal of Nanoparticle Research**, Dordrecht, v. 14, n. 1125, p. 3-15, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11051-012-1125-9>>.

EPSTEIN, E. Mineral metabolism. In: Bonner, J. and Varner, J. E. (Eds). **Plant Biochemistry** London and Orlando: Academic Press, 1965. p. 438–466.

EPSTEIN, E.; BLOOM, A. **Mineral Nutrition of Plants: Principles and Perspectives**, 2 ed., Sinauer Associates Inc. Publishers, 2005. p. 400.

EUSTIS, S.; EL-SAYED, M. A. Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: Noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes. **Chemical Society Reviews**, Cambridge, v. 35, p. 209-217, 2006. Disponível em: <<http://doi.org/10.1039/B514191E>>.

FALCO, W. F.; QUEIROZ, A. M.; FERNANDES, J.; BOTERO, E. R.; FALCÃO, E. A.; GUIMARÃES, F. E. G.; M'PEKO, J. C.; OLIVEIRA, S. L.; COLBECK, I.; CAIRES, A. R. L. Interaction between chlorophyll and silver nanoparticles: A close analysis of chlorophyll fluorescence quenching. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, Lausanne, v. 299, p. 203–209, 2015.

FEYNMAN, R. P. There's Plenty of Room at the Bottom. **Engineering and Science**, v. 23, n. 5, p. 22-36, 1960. Disponível em: <<http://www.phy.pku.edu.cn/~qhcao/resources/class/QM/Feynman's-Talk.pdf>>.

FRENCH, R.; JACOBSON, A. R.; KIM, B.; ISLEY, S. L.; PENN, R. L.; BAVEYE, P. C. Influence of Ionic Strength, pH, and Cation Valence on Aggregation Kinetics of Titanium Dioxide Nanoparticles. **Environmental Science & Technology**, Washington, v. 43, p.1354–1359, 2009.

GUNPUTHA, U. F.; LE, H.; HANDY, R. D.; TREDWIN, C. Anodised TiO₂ nanotubes as a scaffold for antibacterial silver nanoparticles on titanium implants. **Materials Science & Engineering C**, Amsterdam, v. 91, p. 638–644, 2018.

GUZMAN, K. A.; FINNEGAN, M. P.; BANFIELD, J. F. Influence of surface potential on aggregation and transport of titania nanoparticles. **Environ Science & Technology**, Washington, v. 40, n. 24, p. 7688-7693, 2006.

HONG, J.; PERALTA-VIDEA, J. R.; RICO, C.; SAHI, S.; VIVEROS, M. N.; BARTONJO, J.; ZHAO, L.; GARDEA-TORRESDEY, J. L. Evidence of translocation and physiological impacts of foliar applied CeO₂ nanoparticles on cucumber (*Cucumis sativus*) plants. **Environmental Science & Technology**, Washington, v. 48, p. 4376-4385, 2014.

KALAJI, H. M.; JAJOO, A.; OUKARROUM, A.; BRESTIC, M.; ZIVCAK, M.; SAMBORSKA, I. A.; CETNER, M. D.; ŁUKASIK, I.; GOLTSEV, V.; LADLE, R. J. Chlorophyll a fluorescence as a tool to monitor physiological status of plants under abiotic stress conditions. **Acta Physiologiae Plantarum**, Heidelberg, v. 38, n. 102, p. 1-11, 2016. Disponível em: <<http://doi.org/10.1007/s11738-016-2113-y>>.

KELLER, A. A.; WANG, H.; ZHOU, D.; LENIHAN, H. S.; CHERR, G.; CARDINALE, B. J.; MILLER, R.; JI, Z. Stability and aggregation of metal oxide nanoparticles in natural aqueous matrices. **Environmental Science & Technology**, Washington, v. 44, p. 1962–1967, 2010.

KELLER, A. A.; MCFERRAN, S.; LAZAREVA, A.; SUH, S. Global life cycle releases of engineered nanomaterials. **Journal of Nanoparticle Research**, Dordrecht, v. 15, n. 6, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11051-013-1692-4>>.

KLEIN, S.; HAREL, E.; NE'EMAN, E.; KATZ, E.; MELLER, E. Accumulation of aminolevulinic acid and its relation to chlorophyll synthesis and development of plastid structure in greening leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v. 56, p. 486-496, 1975.

LARUE, C.; CASTILLO-MICHEL, H.; SOBANSKAC, S.; CÉCILLON, L.; BUREAU, S.; BARTHÈS, V.; OUERDANE, L.; CARRIÈRE, M.; SARRETA, G. Foliar exposure of the crop *Lactuca sativa* to silver nanoparticles: Evidence for internalization and changes in Ag speciation. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 264, p. 98– 106, 2014.

LEE, W.; AN, Y.; YOON, H.; KWEON, H. Toxicity and bioavailability of copper nanoparticles to the terrestrial plants mung bean (*Phaseolus radiatus*) and wheat (*Triticum aestivum*): plant agar test for water insoluble nanoparticles. **Environmental Toxicology & Chemistry**. Hoboken, v. 27, n. 9, p. 1915–1921, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1897/07-481.1>>.

LEE C. W.; MAHENDRA, S.; ZODROW, K.; LI, D.; TSAI, Y.C.; BRAAM, J.; ALVAREZ, P.J. Developmental phytotoxicity of metal oxide nanoparticles to *Arabidopsis thaliana*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Hoboken, v. 29, n. 3, p. 669–675, 2010.

LIN, D.; XING, B. Phytotoxicity of nanoparticles: Inhibition of seed germination and root growth. **Environmental Pollution**, Oxford, v.150. p 243-250, 2007.

LIN, D; XING, B. Root uptake and phytotoxicity of ZnO nanoparticles. **Environmental Science & Technology**, Washington, v. 42, p. 5580–5585, 2008.

LÓPEZ-MORENO, M. L.; GUADALUPE, de la ROSA; HERNÁNDEZ-VIEZCAS, J. A.; CASTILLO-MICHEL, H.; BOTEZ, C. E.; PERALTA-VIDEA, J. R.; GARDEA-TORRESDEY, J. L. Evidence of the differential biotransformation and genotoxicity of ZnO and CeO₂ nanoparticles on soybean (*Glycine max*) plants. **Environmental Science & Technology**, Washington, v. 44, n. 19, p. 7315–7320, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/es903891g>>.

LV, I.; ZHANG, S.; LUO, L.; HAN, W.; ZHANG, J.; YANG, K.; CHRISTIE, P. Dissolution and microstructural transformation of zno nanoparticles under the influence of phosphate. **Environmental Science & Technology**, Washington, v. 6, p. 7215–7221, 2012. Disponível em:< <http://doi.org/10.1021/es301027a>>.

LIU, R.; ZHANG, H.; LAL, R. Effects of stabilized nanoparticles of copper, zinc, manganese, and iron oxides in low concentrations on lettuce (*Lactuca sativa*) seed germination: nanotoxicants or nanonutrients?. **Water, Air, & Soil Pollution**, Dordrecht, v. 227, n. 1, p. 42, 2016.

MAHAJAN, P.; DHOKE, S. K.; KHANNA. A. S. Effect of nano-zno particle suspension on growth of mung (*Vigna radiata*) and gram (*Cicer arietinum*) seedlings using plant agar method. **Journal of Nanotechnology**, Cairo, v. 2011, n. 696535, 2011. Disponível em: <<https://doi:10.1155/2011/696535>>.

- MARQUES, M. C.; NASCIMENTO, C. W. A; SILVA, A. J.; GOUVEIA-NETO, A. S. Tolerance of an energy crop (*Jatropha curcas* L.) to zinc and lead assessed by chlorophyll fluorescence and enzyme activity. **South African Journal of Botany**, Amsterdam, v.112, p. 275–282, 2017.
- MARSCHNER, P. **Mineral Nutrition of Higher Plants**. 3ed. London: Academic Press, 2012. p 651.
- MAXWELL, K.; JOHNSON, G. N. Chlorophyll fluorescence-a practical guide. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.51, p.659–668, 2000.
- MELO JR, M. A.; SANTOS, L. S. S.; GONÇALVES, M. C; NOGUEIRA, A. F. Preparação de nanopartículas de prata e ouro: um método simples para a introdução da nanociência em laboratório de ensino. **Química Nova**, São Paulo, v. 35, n. 9, p. 1872-1878, 2012.
- MISRA, S. K.; DYBOWSKA, A.; BERHANU, D.; LUOMA, S.N.; VALSAMI-JONES, E. The complexity of nanoparticle dissolution and its importance in nanotoxicological studies. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 438, p. 225-232, 2012.
- MOGHADDASI, S.; KHOSHGOFTARMANESH, A. H.; KARIMZADEH, F.; CHANEY, R. Fate and effect of tire rubber ash nanoparticles (RANPs) in cucumber. **Ecotoxicology and Environmental & Safety**, San Diego, v. 115, p. 137–143, 2015.
- NAIR, P. M. G.; CHUNG, M. Study on the correlation between copper oxide nanoparticles induced growth suppression and enhanced lignification in Indian mustard (*Brassica juncea* L.). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San Diego, v. 113, p. 302–313, 2015.
- ODZAK, N.; KISTLER, D.; BEHRA, R.; SIGG, L. Dissolution of metal and metal oxide nanoparticles in aqueous media. **Environmental Pollution**, Oxford, v. 191, p. 132-138, 2014.
- OUZOUNIDOU, G.; LANNOYE, R.; KARATAGLIS, S. Photoacoustic measurements of photosynthetic activities in intact leaves under copper stress. **Plant Science**, Clare, v. 89, p. 221–226, 1993.
- PEREIRA, F.; ZANONI, M.; UGO, L. Características ópticas e morfológicas de nanoestruturas de ouro. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 7, p. 1550-1554, 2007.
- PRADHAN, S.; PATRA, P.; DAS, S.; CHANDRA, S.; MITRA, S.; DEY, K. K.; AKBAR, S.; PALIT, P.; GOSWAMI, A. Photochemical modulation of biosafe manganese nanoparticles on *Vigna radiata*: a detailed molecular, biochemical, and biophysical study. **Environmental Science & Technology**, Washington, v. 47, p. 13122–13131, 2013.
- RICO, C. M.; MAJUMDAR, S.; DUARTE-GARDEA, M.; PERALTA-VIDEA, J. R.; GARDEA-TORRESDEY J. L. Interaction of nanoparticles with edible plants and their possible implications in the food chain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 201159, n. 8, p. 3485–3498, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/jf104517j>>.

PRASAD, T. N. V. K. V.; SUDHAKAR, P.; SREENIVASULU, Y.; LATHA, P.; MUNASWAMY, V.; REDDY, K. R.; SREEPRASAD, T. S.; SAJANLAL, P. R.; PRADEEP, T. Effect of nanoscale zinc oxide particles on the germination, growth and yield of peanut. **Journal of Plant Nutrition**, Philadelphia, v. 35, n. 6, p. 905-927, 2012.

QUEIROZ, A. M.; MEZACASA, A. V.; GRACIANO, D. E.; FALCO, W. F.; M'PEKO, J.-C.; GUIMARÃES, F. E. G; LAWSON, T.; COLBECK, I.; OLIVEIRA, S. L.; CAIRES, A. R. L. Quenching of chlorophyll fluorescence induced by silver nanoparticles. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Oxford, v. 168, p. 73–77, 2016.

RAO, S; SHEKHAWAT, GS. Toxicity of zinc oxide engineered nano-particles and evaluation of their effect on growth, metabolism and tissue specific accumulation in *Brassica juncea*. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, Oxford, v. 2, n. 1, p. 105-114, 2014.

RICO, C. M.; MAJUMDAR, S.; DUARTE-GARDEA, M.; PERALTA-VIDEA, J. R.; GARDEA-TORRESDEY J. L. Interaction of nanoparticles with edible plants and their possible implications in the food chain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 201159, n. 8, p. 3485–3498, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/jf104517j>>.

RODRIGUES, A. C. D.; SANTOS, A. M.; SANTOS, F. S.; PEREIRA, A. C. C.; SOBRINHO, N. M. B. A. Mecanismos de respostas das plantas à poluição por metais pesados: possibilidade de uso de macrófitas para remediação de ambientes aquáticos contaminados. **Revista Virtual de Química**, Niterói, v. 8, n. 1, p. 262-276, 2016.

SAMART, S.; CHUTIPAIJIT, S.; PHAKAMAS, N. Evaluating the effect of zinc oxide nanoparticles on the physiological responses of nine non-photoperiod sensitive rice cultivars. **Materials Today: Proceedings**, Oxford, v. 4, p. 6430–6435, 2017.

SANDMANN, G.; BOGER, P. Copper-mediated lipid peroxidation processes in photosynthetic membranes. **Plant Physiology**, Rockville, v. 66, p. 797-800, 1980.

SHARMA, S.; UTTAM, K. N. Rapid analyses of stress of copper oxide nanoparticles on wheat plants at an early stage by laser induced fluorescence and attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy**, Amsterdam, v. 92, p. 135–150, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vibspec.2017.06.004>>.

SEMWALA, R.; SEMWAL, D. K.; MADAN, A.K.; PAULA, P.; MUJAFFERA, F; BADONIB, R. Dendrimers: Anovel approach for drug targeting. **Journal of Pharmacy Research**, Mohali, v. 3, n. 9, p. 2238-2247, 2010. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/215528063_Dendrimers_A_novel_approach_for_drug_targeting>.

SHERJE, A.; JADHAV, M.; DRAVYAKAR, B. R; KADAM, D. Dendrimers: A versatile nanocarrier for drug delivery and targeting. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 548, p.707–720, 2018.

SHEYKHBAGLOU, R.; SEDGHI, M.; TAJBAKHSI, S. M.; SEYED, S. R. Effect of nanoparticles iron on agronomic traits of soybean. **Notulae Scientia Biologicae**, Cluj-Napoca, v. 2, n. 2, p. 112–113, 2010. Disponível em: <<http://doi.org/10.15835/nsb.2.2.4667>>.

SHI, J.; ABID, A.D.; KENNEDY, I. M. B.; HRISTOVA, K. R.; SILK, W. K. To duckweeds (*Landoltia punctata*), nanoparticulate copper oxide is more inhibitory than the soluble copper in the bulk solution. **Environmental Pollution**, Oxford, v. 159, p.1277-1282, 2011.

SHIMIDT, G.; CORAIN, B. Nanoparticulated Gold: Syntheses, structures, electronics, and reactivities. **European Journal of Inorganic Chemistry**, Weinheim, p. 3081-3098, 2003. Disponível em: <<http://doi.org/10.1002/ejic.200300187>>.

STAMPOULIS, D.; SINHA, S. K.; WHITE, J. C. Assay-dependent phytotoxicity of nanoparticles to plants. **Environmental Science & Technology**. Washington, v. 43, p. 9473–9479, 2009. Disponível em: <<http://doi.org/10.1021/es901695c>>.

SVENSON, S. Dendrimers as versatile platform in drug delivery applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Amsterdam, v. 71, p. 445–462, 2009.

TARAFDAR, J.; RALIYA, R.; MAHAWAR, H.; RATHORE, I. Development of zinc nanofertilizer to enhance crop production in pearl millet (*Pennisetum americanum*). **Agricultural Research**, New Delhi, v. 3, p. 257–262, 2014. Disponível em: <<http://doi.org/10.1007/s40003-014-0113-y>>.

THE ROYAL SOCIETY & THE ROYAL ACADEMY OF ENGINEERING. **Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties**. Nanoscience and nanotechnologies, 2004. Disponível em: <https://royalsociety.org/~media/royal_society_content/policy/publications/2004/9693.pdf>.

VIEIRA, D. A. P.; PORTES, T. A.; STACCIARINI-SERAPHIN, E.; TEIXEIRA, J. B. Fluorescência e teores de clorofilas em abacaxizeiro cv. Pérola submetido a diferentes concentrações de sulfato de amônio. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 32, n. 2, p. 360-368, 2010.

WANG, C.; SONG, H. Z.; WANG, P. F.; HOU, J.; ZHANG, W. J.; WEI, L.; LIN, Z. P. The effect of excess Zn on mineral nutrition and antioxidative response in rapeseed seedlings. **Chemosphere**, Oxford, v. 75, p. 1468–1476, 2009.

WANG, Q.; MA, X.; ZHANG, W.; PEI, H.; CHEN, Y. The impact of cerium oxide nanoparticles on tomato (*Solanum lycopersicum* L.) and its implications for food safety. **Metallomics**, Cambridge, v. 4, p. 1105–1112, 2012.

WANG, P.; MENZIES, N. W.; LOMBI, E.; MCKENNA, B.; JOHANNESSEN, B.; GLOVER, C. J.; KAPPEN, P.; KOPITTKER, P. M. Fate of ZnO Nanoparticles in Soils and Cowpea (*Vigna unguiculata*). **Environmental Science & Technology**, Oxford, v. 47, p. 13822–13830, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/es403466p>>.

XU, Q. B.; XIE, L.; DIAO, H.; LI, F.; ZHANG, Y. Y.; FU, F. Y.; LIU, X. D. Antibacterial cotton fabric with enhanced durability prepared using silver nanoparticles and carboxymethyl chitosan. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 177, p. 187–193, 2017.

ZARBIN, A. J. G. Química de nanomateriais. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 6, p.1469-1479, 2007.

ZHAO, L., SUN, Y., HERNANDEZ-VIEZCAS, J. A., SERVIN, A. D., HONG, J., NIU, G.; PERALTA-VIDEA, J.R.; DUARTE-GARDEA, M. & GARDEA-TORRESDEY, J. L. Influence of CeO₂ and ZnO nanoparticles on cucumber physiological markers and bioaccumulation of Ce and Zn: a life cycle study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 61, n. 49, p. 11945-11951, 2013.

ZHOU, D.; KELLER, A. Role of morphology in the aggregation kinetics of ZnO nanoparticles. **Water research**, Prague, v. 44, p. 2948 – 2956, 2010.

ZUREK, G.; RYBKA, K.; POGRZEBA, M.; KRZYZAK, J.; PROKOPIUK, K. Chlorophyll a fluorescence in evaluation of the effect of heavy metal soil contamination on perennial grasses. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 3, e91475. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091475>>.

**3 DISSOLUÇÃO DE ZnO E DE CuO NANOPARTICULADO E SEUS EFEITOS
FISIOLÓGICOS SOBRE *Vigna unguiculata* CULTIVADA EM SOLUÇÃO
NUTRITIVA**

Dissolução de ZnO e de CuO nanoparticulado e seus efeitos fisiológicos sobre *Vigna unguiculata* cultivada em solução nutritiva

RESUMO

Os óxidos de zinco (ZnO-NP) e de cobre (CuO-NP) nanoparticulados vêm sendo amplamente utilizados em diversos setores industriais, com possíveis chances de serem adotados como nanofertilizantes no setor agrícola. Este estudo teve o objetivo de avaliar o potencial de ZnO-NP e CuO-NP em suprir Zn e Cu, respectivamente, para plantas de feijão-caupi e verificar o potencial de toxicidade sobre a germinação, a composição mineral e a fotossíntese. Para separar o efeito do metal e da nanopartícula, foram utilizados óxidos comuns dos metais para comparação (ZnO-C e CuO-C). A germinação das sementes foi testada em placa de Petri com papel filtro umedecido com suspensão dos óxidos. O efeito dos óxidos sobre as plantas foi avaliado em solução nutritiva, sendo testadas duas fontes de Zn (ZnO-NP e ZnO-C) nas doses 0, 5, 20, 80 e 400 mg L⁻¹ e duas fontes de Cu (CuO-NP e Cu-C) nas doses 0, 40, 400, 1000 e 2000 mg L⁻¹. Não houve diferença entre as fontes de Zn e Cu para comprimento radicular, teor do micronutriente, produção de biomassa e conteúdo de nutrientes. O teor de clorofila a e b foi superior para as fontes de Zn e de Cu nanoparticuladas. Para todas as variáveis, exceto teor de pigmentos, houve similaridade de efeito entre o controle e a dose mínima dos óxidos (ZnO = 5 mg L⁻¹ e CuO = 40mg L⁻¹), indicando ausência de toxicidade. A partir dessas doses o excesso de Zn e de Cu nas plantas resultou em redução na produção de biomassa, no conteúdo de macro e micronutrientes, principalmente no tecido foliar, e no teor de pigmentos. A medida da fluorescência de clorofila inicial indicou dano fotoinibitório mesmo na dose mais baixa dos óxidos. Não houve diferença entre as fontes comum e nanoparticulada na capacidade de suprir Zn e Cu para as plantas de feijoeiro.

Palavras-chave: Óxido de zinco. Nanofertilizante. *Vigna unguiculata*. Aparato fotossintético.

Dissolution of ZnO and CuO nanoparticles and their effects on the physiology of *Vigna unguiculata* grown in nutrient solution

ABSTRACT

Nanoparticulate zinc oxides (ZnO-NP) and nanoparticulate copper oxide (CuO-NP) have been widely used in several industrial sectors, with a perspective of being adopted as nanofertilizers in agriculture. The objective of this study was to evaluate the potential of ZnO-NP and CuO-NP in supplying Zn and Cu for cowpea plants as well as to assess the potential toxicity on germination, mineral composition and photosynthesis. To separate the effect of metal and nanoparticle, common metal oxides were used for comparison (ZnO-C and CuO-C). Seed germination was tested in Petri dish with filter paper moistened with oxides suspension. The effect of the oxides on the plants was evaluated in nutrient solution, being tested two sources of Zn (ZnO-NP and ZnO-C) in doses 0, 5, 20, 80 and 400 mg L⁻¹ and two sources of Cu (CuO-NP and CuO-C) at doses 0, 40, 400, 1000 and 2000 mg L⁻¹. There was no difference between Zn and Cu sources for root length, micronutrient content, biomass production and nutrient content. The chlorophyll content a and b was higher for the nanoparticulate Zn and Cu sources. For all variables other than pigment content, there was a similarity of effect between the control and the minimum dose of oxides (ZnO = 5 mg L⁻¹ and CuO = 40mg L⁻¹), indicating absence of toxicity. From these doses the excess of Zn and Cu in the plants resulted in reduction in the biomass production, in the macro and micronutrients content, mainly in the foliar tissue, and in the pigment content. The initial chlorophyll fluorescence, F₀, indicated photoinhibitory damage even at the lowest dose of the oxides. There was no difference between the common and nanoparticulated sources in the ability to supply Zn and Cu for common bean plants.

Keywords: Zinc oxide. Nanofertilizer. *Vigna unguiculata*. Photosynthetic apparatus.

3.1 Introdução

O ZnO e o CuO nanoparticulado (NP) ocupavam a 5ª e a 10ª posição, respectivamente, dentre os dez nanomateriais mais utilizados globalmente no ano de 2010 (KELLER et al., 2013). O ZnO-NP é comumente utilizado como aditivo em tintas e revestimentos, filtro de radiação UV em cosméticos e agente antimicrobiano (GIRIGOSWAMI et al., 2015; ALVES et al., 2017). O CuO-NP é usado como catalisador, sensor químico, agente antimicrobiano e pesticida (KHAN et al., 2012; CRUZ; PEREZ; DEL HIERRO, 2016; AMIRI et al., 2017; KELLER et al., 2017). A diversidade de usos destes produtos aumenta o potencial de entrada nos compartimentos ambientais, sendo as plantas parte fundamental do ecossistema, pois estão na base da cadeia trófica que pode conduzir NPs aos seres humanos, com possíveis riscos à saúde pela ingestão desses materiais (XIA et al., 2009; SHVEDOVA et al., 2010; RUTTKAY-NEDECKY et al., 2017).

As NPs que contém algum elemento essencial as plantas são classificadas como nanofertilizantes, os quais são alegadamente mais eficientes que os fertilizantes tradicionais (MORALES-DÍAZ et al., 2017). Contudo, para uso na agricultura, é imprescindível conhecer não apenas a sua eficiência como fertilizante, mas também os possíveis efeitos destes produtos sobre as plantas e seu comportamento no ambiente. Nesse sentido, estudos em solução nutritiva são adequados para avaliar o potencial de liberação do metal em solução e a absorção pelas plantas (MAJUMDAR et al., 2014; SAMREEN et al., 2017; ZLOBIN; KARTASHOV; SHPAKOVSKI, 2017). Respostas fisiológicas das plantas expostas a NPs são frequentemente utilizadas visando elucidar os seus efeitos sobre crescimento, desenvolvimento e toxicidade de NPs (ZHAO et al., 2013; WANG et al., 2016; LIU; ZHANG; LAL, 2016).

O processo fisiológico da germinação e o crescimento radicular são indicadores de toxicidade muitos utilizados em estudos da interação entre NPs e plantas (LIN; XING, 2007; WU et al., 2012; LIU; ZHANG; LAL, 2016). Por exemplo, redução de 50% na germinação de sementes de rabanete (*Raphanus sativus*), colza (*Brassica napus*) e azevém (*Lolium multiflorum*) tratadas com Zn-NP e ZnO-NP foi obtida na dose de 50, 20 e 20 mg L⁻¹, respectivamente, evidenciando o efeito tóxico e a diferença de tolerância entre as culturas (LIN; XING, 2007). Além da inibição do processo germinativo, mudanças estruturais nas células primárias e redução do crescimento radicular podem ocorrer após exposição a NPs, efeito atribuído à liberação do metal e absorção pela semente, sugerindo danos potenciais ao crescimento da planta (POKHREL et al., 2013). Sementes de abobrinha (*Cucurbita pepo*) expostas a 1000 mg L⁻¹ de Cu-NP, ZnO e outros nanomateriais germinaram normalmente, embora o crescimento radicular tenha sido comprometido (STAMPOULIS; SINHA; WHITE,

2009). Portanto, o acúmulo de NPs no solo pode prejudicar a germinação e/ou o crescimento radicular, gerando plântulas menos vigorosas.

A composição mineral do tecido vegetal é usada para avaliar se o excesso de um elemento interfere na homeostase dos outros nutrientes, o que resultaria em disfunção fisiológica. Por exemplo, em plantas de feijão (*Phaseolus* sp) cultivadas em solo contaminado com Zn, o excesso do metal provocou redução no teor de Mg, Fe e Mn, os quais estão estreitamente relacionados à fotossíntese (VASSILEV et al., 2011). Em plantas de maracujazeiro (*Passiflora* sp) expostas a doses crescentes de Zn, observou-se redução do teor de macro e micronutrientes no tecido radicular a partir da dose de 4 mg dm⁻³, resultando em redução da área foliar e da biomassa (NATALE et al., 2004).

O efeito sobre o crescimento também varia em função da dose e da tolerância da cultura. Plantas de ervilha (*Pisum sativum*) fertilizadas com ZnO-NP (125 mg kg⁻¹) apresentaram estímulo no crescimento, em comparação ao controle (sem ZnO), embora o teor de clorofila tenha sido reduzido, o que demonstra a sensibilidade dessa medida para avaliação do estresse (MUKHERJEE et al., 2014). Plântulas de trigo (*Triticum* sp) cultivadas em areia lavada apresentaram redução do teor de clorofila quando expostas a 500 mg kg⁻¹ de ZnO-NP ou CuO-NP, com redução no crescimento das plântulas (DIMKPA et al., 2012). Em excesso, tanto o Zn quanto o Cu competem com o Fe e o Mg nos cloroplastos, podendo prejudicar a síntese e aumentar a degradação de clorofilas (ALLOWAY, 2012). Aliada ao teor de pigmentos, a técnica de fluorescência de clorofila tem se mostrado uma ferramenta útil para avaliação de plantas expostas a micronutrientes (VASSILEV et al., 2011; MARQUES et al., 2014) ou elementos tóxicos (JINHUA et al., 2009; SILVA et al., 2012).

O presente trabalho se propõe a investigar comparativamente os efeitos de fontes nanoparticuladas e comuns de óxidos de Zn e Cu sobre a germinação, biomassa, composição mineral, fluorescência de clorofila e teores de pigmentos (clorofila a, clorofila b, carotenoides e xantofilas) a fim de avaliar a eficiência dessas fontes como supridoras dos micronutrientes para feijão-caupi (*Vigna unguiculata*).

3.2 Materiais e Métodos

3.2.1 Teste de dissolução dos óxidos

Para avaliar a capacidade de dissolução dos óxidos e, conseqüentemente, de liberação dos metais, foi montado um ensaio em laboratório no arranjo fatorial 2 x 3 x 6. Os tratamentos

foram dois óxidos (ZnO-NP e ZnO-C), em três matrizes aquosas (água ultra pura, solução nutritiva modificada a 50% e a 100% da força iônica) e em seis concentrações: 0, 40, 80, 400, 1000 e 2000 mg L⁻¹, em duplicata. Para testar a capacidade de dissolução do CuO (CuO-NP e CuO-C) outro ensaio no mesmo arranjo fatorial foi montado em laboratório. Para o ensaio com Zn, a solução nutritiva foi isenta de Zn em sua constituição, o mesmo procedimento foi adotado para o ensaio com Cu.

O óxido foi pesado diretamente em tubo Falcon para evitar perdas do material, no qual foi adicionado 25 mL de cada solução aquosa. O conjunto foi vigorosamente agitado em vortex por 15 s e o pH ajustado para 5,6 com solução diluída de NaOH ou HCl, o mesmo procedimento foi realizado após 24 h. Com 48 h, as suspensões foram centrifugadas a 5000 rpm durante 30 min, e em seguida filtradas a vácuo em filtro de membrana de nylon com porosidade de 0,22 µm (LEE et al., 2010; WU et al., 2012; WANG et al., 2012), para evitar a passagem de nanopartículas e a superestimação da concentração do metal. A determinação do metal nos extratos foi feita por espectrometria de emissão óptica com plasma - ICP OES.

3.2.2 Efeito de ZnO e de CuO sobre a germinação

Para avaliar o efeito dos óxidos sobre o processo fisiológico da germinação, foi montado um ensaio em placas de Petri forradas com duas folhas de papel filtro qualitativo (WU et al., 2012; POKHREL et al., 2013), umedecida com 10 mL de solução nutritiva modificada a 50% da força iônica, com adição de ZnO-NP ou ZnO-C nas doses 10, 30, 50, 80 e 400 mg L⁻¹ do produto. Antes da aplicação, as soluções foram vigorosamente agitadas e o pH foi ajustado para 5,6. Um tratamento somente com SN a 50% da força iônica foi adotado como controle. Para o CuO-NP e CuO-C foi adotada as seguintes concentrações: 40, 80, 400, 1000 e 2000 mg L⁻¹.

Dez sementes selecionadas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp. – variedade Miranda IPA 207) foram distribuídas na placa de Petri de forma equidistante (YANG; WATTS, 2005), previamente foi feito a desinfestação das sementes com solução de NaHClO 5% por 10 min (USEPA, 1996). Após 24 h e 48 h foi avaliado a taxa de sementes germinadas; a emissão da radícula com pelo menos 1mm foi o critério adotado para confirmação da germinação (LEE et al., 2010). Ao término das 48 h foi medido o comprimento da raiz (zona de crescimento + pilífera).

3.2.3 Cultivo em solução nutritiva

O experimento foi realizado em casa de vegetação, a unidade experimental foi composta por 1 planta por vaso. Sementes selecionadas de feijão-caupi foram cultivadas em areia lavada

e irrigadas com água destilada em dias alternados até a queda dos cotilédones, quando irrigação das plântulas foi realizada com solução nutritiva 25% da força iônica até a formação do primeiro folíolo completamente desenvolvido. Quinze dias após a emergência, as plântulas foram transferidas para vasos plásticos contendo 2 L de solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) a 50% da força iônica para diminuir as interações dos nutrientes com o Zn e o Cu oriundos dos óxidos avaliados. Após 7 dias de adaptação à solução nutritiva, os óxidos de Zn e Cu foram aplicados a solução.

O delineamento experimental foi o de blocos casualizados, no arranjo fatorial 2 x 5. Os tratamentos compreenderam duas fontes de Zn (ZnO-NP e ZnO-C) aplicadas em cinco doses (0, 5, 20, 80 e 400 mg L⁻¹), com três repetições. Outro experimento no mesmo esquema fatorial foi montado com fontes de Cu (CuO-NP e CuO-C) nas doses de 0, 40, 400, 1000 e 2000 mg L⁻¹, com três repetições; doses mais altas foram escolhidas para o Cu devido à baixa dissolução do óxido deste elemento comparado ao óxido de zinco. A dose 0 mg L⁻¹ consistiu no controle, composto somente por SN a 50% da força iônica. Nos tratamentos com adição de ZnO ou CuO, a SN foi isenta de Zn ou Cu. Após dez dias de exposição aos metais, as plantas foram coletadas, separadas em raiz, caule e folha, lavadas em água de torneira seguida de água destilada e secadas a 65°C por 72h em estufa com circulação forçada de ar. Posteriormente, o material vegetal foi pesado para obtenção da biomassa, e moído em moinho de facas tipo Willey com peneira de 1 mm acoplada.

A digestão nitroperclórica do material foi realizada conforme Embrapa (2009) e a determinação de Zn, Cu, Fe, Mn, Ca e Mg foi realizada em espectrometria de absorção atômica, modalidade chama (EAA/chama). Para validação do método e controle de qualidade foi utilizado o material de referência certificado 1570a da NIST. O teor de P e S foi determinado no extrato de digestão por colorimetria e turbidimetria, respectivamente; K em fotômetro de chama e N por titulação após digestão sulfúrica do material (EMBRAPA, 2009).

Para avaliar os danos ocasionados pelo Zn ou Cu ao aparato fotossintético, foram utilizados a emissão de fluorescência de clorofila e o teor de clorofila a, clorofila b, carotenoides e xantofilas. As avaliações foram realizadas no folíolo central da terceira folha superior totalmente expandida, 7 dias após exposição aos óxidos. Em folhas adaptadas ao escuro, foi analisada a fluorescência da clorofila *a* através de fluorômetro manual (FluorPen, model FP100, Photon Systems Instruments); os parâmetros de fluorescência do teste OJIP (STRASSER; SRIVASTAVA; TSIMILLI-MICHAEL, 2000) encontram-se no quadro 1.

Quadro 1. Descrição de parâmetros de fluorescência de clorofila

F ₀	Fluorescência mínima, quando todos os centros de reação (CR) do FSII estão abertos;
F _m	Fluorescência máxima registrada quando todos os CR estão fechados;
F _v	Diferença entre F _m e F ₀ ;
F _v /F _m	Eficiência fotoquímica máxima do FSII;
ABS/RC	Fluxo de absorção de elétrons por CR, corresponde ao tamanho da antena - razão entre a clorofila (Cl) na antena e a Cl no CR;
TRo/RC	Fluxo de captura de elétrons por CR, levando a redução da QA;
DIo/RC	Fluxo de energia dissipada por CR no momento inicial da medição;
Phi_Eo	Rendimento quântico para transporte de elétrons da quinona A (QA) para plastoquinona (PQ);
Pi_Abs	Índice de performance do FSII, baseado na absorção de elétrons;
γRC	Probabilidade de que uma molécula de clorofila no FSII funcione como CR.

A mesma folha utilizada para determinação da fluorescência foi usada para determinação dos pigmentos - clorofila a, clorofila b, carotenoides e xantofilas (LICHTENTHALER; BUSCHMANN, 2001). A extração foi realizada em acetona 80% por 24h, a leitura da absorvância foi realizada em espectrofotômetro, sendo o teor de clorofilas determinado após aplicação das seguintes equações:

$$Cla = 2,25A_{663,2} - 2,79A_{646,8}$$

em que,

Cla – clorofila a, $\mu\text{g mL}^{-1}$;

A_{663,2} – absorvância no comprimento de onda de 663,2 nm;

A_{646,8} - absorvância no comprimento de onda de 646,8 nm.

$$Clb = 21,50.A_{646,8} - 5,10.A_{663,2}$$

em que,

Clb – clorofila b, $\mu\text{g mL}^{-1}$;

A_{646,8} – absorvância no comprimento de onda de 646,8 nm;

A_{663,2} - absorvância no comprimento de onda de 663,2 nm.

$$C + X = \left(\frac{1000.A_{470} - 1,82.Cla - 85,02.Clb}{198} \right)$$

Em que,

C+X – carotenoides e xantofilas, $\mu\text{g mL}^{-1}$;

A470 – absorvância no comprimento de onda de 470 nm;

Cla – clorofila a, $\mu\text{g mL}^{-1}$;

Clb - clorofila b, $\mu\text{g mL}^{-1}$.

3.2.4 Análise estatística

Os resultados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) a 5% de significância. Modelos de regressão linear e não linear foram ajustados as variáveis analisadas em função dos tratamentos. O coeficiente de determinação (R^2) foi utilizado como critério de melhor ajuste, ao nível de significância de 5% de probabilidade. Os valores médios das variáveis foram comparados pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) em função dos tipos de óxidos (comum e nanoparticulado). Todo procedimento estatístico foi realizado utilizando o software Sisvar (versão 5.3).

3.3 Resultados e Discussões

3.3.1 Teste de dissolução dos óxidos

Óxido de Zinco

Pela análise de variância dos dados de concentração de Zn^{2+} no sobrenadante, a interação entre o tipo de óxido, a dose e a matriz aquosa foi significativa pelo teste F, a nível de 5% de significância (Tabela 1).

Tabela 1. Análise de variância contendo as causas de variação, o número de graus de liberdade, valores de soma dos quadrados, quadrados médios, o valor de Fc e da probabilidade, para a variável concentração de Zn, obtida no teste de dissolução dos óxidos

Causas de variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr > Fc
Dose (D)	4	92123,97	237809,74	267,22	0,000
Fonte (F)	1	401,40	401,40	0,45	0,507
Matriz aquosa (M)	2	50938,17	254569,08	286,05	0,000
D x F	4	3707,03	926,76	1,04	0,402
D x M	8	713409,76	88176,22	100,21	0,000
F x M	2	28393,61	14196,80	15,95	0,000
D x F x M	8	59498,73	7437,34	8,36	0,000
erro	30	26697,98	889,93		
CV (%)	25,03				

Embora o ZnO apresente um produto de solubilidade muito baixo, $ZnO_{Kps} = 2,2 \times 10^{-17}$ (MAHAN; MYERS, 1995), nas condições físicas e químicas desse estudo (pH ajustado a 5,6; 48h de dissolução, 23°C), foi observada uma dissolução considerável do óxido.

A concentração de Zn^{2+} na solução aumentou linearmente em função das doses do ZnO comum ou nanoparticulado, nas diferentes matrizes aquosas avaliadas (Figura 1). Entre os óxidos de Zn, a taxa de dissolução, e liberação de Zn^{2+} , foi similar até a dose 400 mg L⁻¹. Esse comportamento tem sido descrito na literatura em diferentes condições físicas e químicas e de concentração do óxido (MORTIMER; KASEMETS; KAHRU, 2010; FRANKLIN et al., 2007). Em concentrações altas, a aglomeração e agregação das nanopartículas, reduz a capacidade de dissolução do óxido, por exemplo, na dose de 40 mg L⁻¹ de ZnO cerca de 72% (água), 36% (SN50%) e 30% (SN100%) do Zn total foi liberado em solução; na dose de 2000 mg L⁻¹ a taxa de liberação foi de 48% (água), 9%(SN50%) e 9%(SN100%).

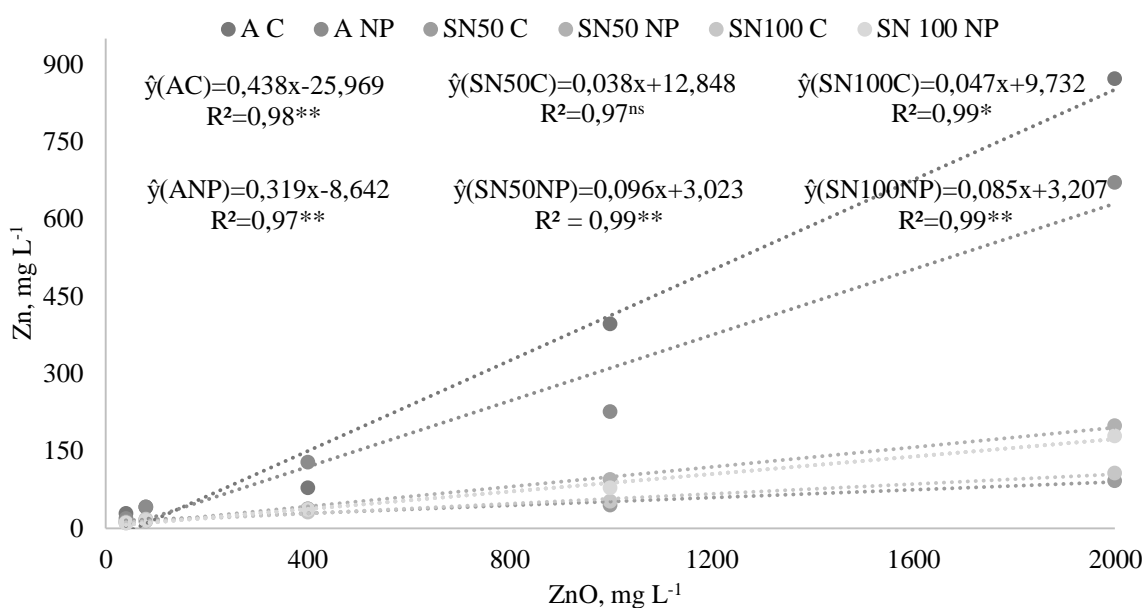


Figura 1. Concentração de Zn no sobrenadante de três matrizes aquosas (água ultrapura, solução nutritiva 50% e solução nutritiva 100% da força iônica) após dissolução de dois tipos de ZnO (comum e nanoparticulado), em diferentes doses. AC, dissolução de ZnO comum em água ultrapura; ANP, dissolução de ZnO nanoparticulado em água; SN50C, dissolução de ZnO comum em solução nutritiva a 50%; SN50NP, dissolução de ZnO nanoparticulado em solução nutritiva a 50%; SN100C, dissolução de ZnO comum em solução nutritiva a 100%; SN100NP, dissolução de ZnO nanoparticulado em solução nutritiva a 100%. ^{ns}, * e ** = não significativo, significativo a 5% e significativo a 1%, respectivamente

Até a dose de 400 mg L⁻¹ dos óxidos não houve diferença entre as matrizes aquosas na concentração de Zn^{2+} solúvel. Contudo, a partir dessa dose, houve maior concentração de Zn na água ultrapura (Figura 1). Nessa condição, a maior atividade das moléculas de água deve ter permitido que uma quantidade maior de óxido fosse dissolvida, liberando Zn^{2+} e OH^- na

solução. A adição de íons H^+ à solução, devido ao ajuste do pH, certamente contribuiu com a dissolução do óxido (MAHAN; MYERS, 1995).

Na SN, a presença dos nutrientes ionizados na solução diminui a água livre, conseqüentemente, reduz a capacidade de dissolução do óxido. Entre os óxidos de Zn, na solução nutritiva, a fonte nanoparticulada proporcionou maiores concentrações de Zn em solução, considerando as doses acima de 400 mg L^{-1} (Figura 1), é provável que o menor tamanho das partículas e maior área superficial específica, em comparação ao ZnO comum, tenha favorecido a dissolução por proporcionar maior interação com a solução.

Óxido de Cobre

Pela análise de variância dos dados de concentração de Cu^{2+} solúvel, verifica-se que não houve interação tripla entre o tipo de óxido, a dose e a matriz aquosa avaliada, pelo teste F, a nível de 5% de significância (Tabela 2).

Tabela 2. Análise de variância contendo as causas de variação, o número de graus de liberdade, valores da soma dos quadrados, quadrados médios, o valor de Fc e da probabilidade, para a variável concentração de Cu, obtida no teste de dissolução dos óxidos

Variável	GL	SQ	QM	Fc	Pr > Fc
Dose (D)	4	23,08	5,771	55,99	0,000
Fonte (F)	1	13,78	13,783	133,734	0,000
Matriz aquosa (M)	2	66,72	33,362	323,711	0,000
D x F	4	0,66	0,165	1,60	0,196
D x M	8	15,33	1,916	18,59	0,000
F x M	2	7,35	3,674	35,65	0,000
D x F x M	8	0,96	0,119	1,16	0,355
erro	30	3,09	0,103		
CV (%)	15,54				

Ao contrário do ZnO, para o CuO, não houve efeito de doses na solubilização do CuO na água ultrapura (Figura 2); mas, na SN, a concentração do Cu na solução aumentou de forma significativa (Figura 2). O modelo de equação quadrática foi o que melhor se ajustou aos dados obtidos.

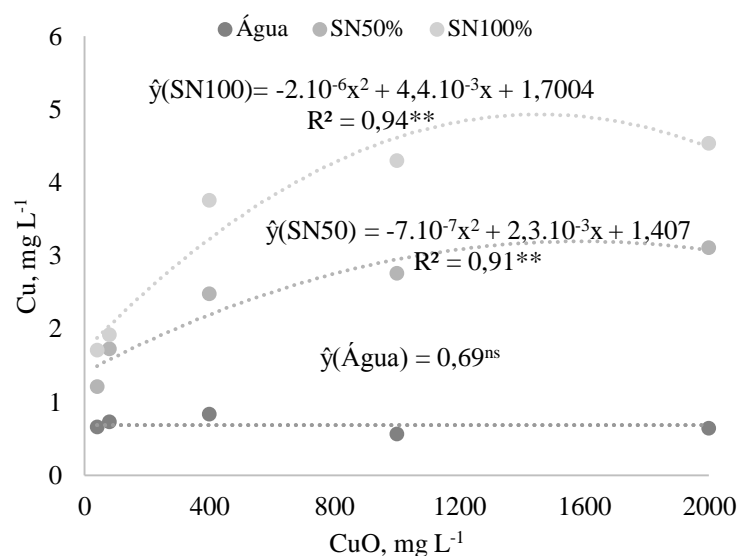


Figura 2. Concentração de Cu no sobrenadante de três matrizes aquosas (água ultra pura, solução nutritiva 50% e solução nutritiva 100% da força iônica) após dissolução de CuO, em diferentes doses. ^{ns}, * e ** = não significativo, significativo a 5% e significativo a 1%, respectivamente

A constante de solubilidade do CuO ($4,5 \times 10^{-21}$, 25°C) é aproximadamente 10.000 vezes menor que a do ZnO. Desta forma, é provável que na primeira dose do CuO (40 mg L^{-1}), na água ultrapura, a solução saturou, que explica a falta de diferença na concentração de Cu nas doses subsequentes (Figura 2).

Para o CuO, a matriz aquosa que proporcionou maior dissolução do óxido foi a solução nutritiva (Figura 2). Presume-se, que íons complexantes na solução nutritiva tenham contribuído com a dissolução deste óxido; o Cu^{2+} liberado na solução pode ter sido complexado com H_2PO_4^- , SO_4^{2-} e NO_3^- que favoreceram a dissolução do óxido. Em um estudo da dissolução de CuO-NP, em soluções com diferentes características químicas (ex. pH, carbono orgânico dissolvido e força iônica), foi reportado uma maior dissolução do óxido na solução com maior força iônica (ADELEYE et al., 2014). Os autores atribuíram esse efeito a complexação do Cu^{2+} com o cloreto (Cl^-). A capacidade de interação do íon PO_4^{3-} com o Zn^{2+} foi observada em um estudo da cinética de dissolução de ZnO-NP, na presença e ausência de íon PO_4^{3-} , onde foi observado complexação do Zn^{2+} (LV et al., 2012), mostrando a capacidade que esse ânion tem de interagir com metais pesados livres na solução.

A maior taxa de dissolução foi obtida com a SN100% da força iônica; nessa matriz aquosa, na dose 40 e 2000 mg L^{-1} de CuO houve liberação de 5% ($1,7 \text{ mg L}^{-1}$) e 0,3% ($4,5 \text{ mg L}^{-1}$) do Cu, respectivamente (Figura 2). Acredita-se que a maior taxa de dissolução do óxido, nas concentrações mais baixas, é devido a menor agregação entre as partículas (BAEK; NA, 2011). Nas doses mais altas a dissolução dos óxidos foi semelhante (Figura 2), indicando que

o limite de dissolução pode ter sido atingido. Em SN a 25% da força iônica, 100 mg L⁻¹ de CuO-NP liberou somente 0,13% de Cu²⁺ no sobrenadante (WANG et al., 2012), valor inferior ao obtido nesse estudo; que demonstra a influência da força iônica da solução na dissolução do óxido de Cu. Em areia lavada (pH 7,9) tratada com 500 mg kg⁻¹ de ZnO e CuO, comum e nanoparticulado, Dimkpa et al. (2012) relataram concentração média de Cu de 3 mg L⁻¹, a concentração de Zn não ultrapassou 7 mg L⁻¹. Neste caso, a baixa concentração dos metais em solução pode ser devido ao alto valor de pH, que pode ter limitado a dissolução do produto.

Na água ultrapura, não houve diferença entre o CuO-NP e o CuO comum na capacidade de dissolução e liberação de Cu²⁺, mas na SN50% e na SN100% da força iônica, a fonte NP liberou 63% e 73% mais Cu²⁺ que a fonte comum, respectivamente (Figura 3).

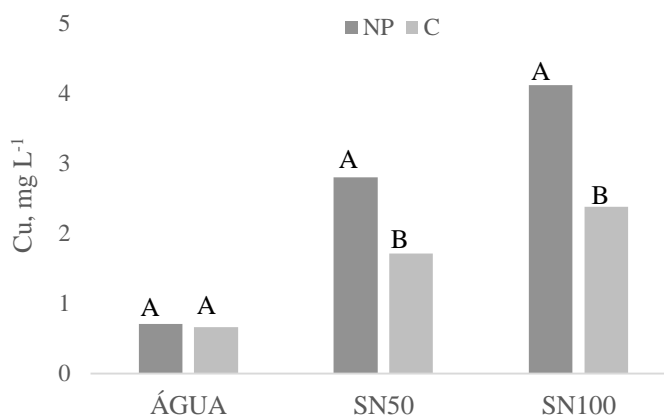


Figura 3. Concentração de Cu²⁺ em três matrizes aquosas (água ultrapura, solução nutritiva a 50% e 100% da força iônica) após dissolução de CuO, comum (C) e nanoparticulado (NP). Médias seguidas pela mesma letra, em cada matriz aquosa, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de significância

A principal propriedade física que afeta a dissolução de NPs é o tamanho da partícula. Contudo, outros parâmetros como, por exemplo, área da superfície, morfologia da superfície, cristalinidade e a estrutura cristalina também devem ser considerados; pois, a força das ligações superficiais podem influenciar a dissolução das NPs (MISRA et al., 2012). Estudos mostram que a dissolução de NPs de CuO é favorecida com a redução no tamanho da partícula (MORTIMER; KASEMETS; KAHRU, 2010).

3.3.2 Efeito de ZnO e CuO sobre a germinação

Os óxidos de Zn e de Cu não inibiram o processo germinativo e o crescimento radicular das sementes de feijão-caupi. Após 24 h, em média, 80% das sementes germinaram na presença dos óxidos (dados não apresentados). Com 48h de germinação, observou-se que todas as

sementes emitiram radícula, ou seja, os óxidos (ZnO-C, ZnO-NP, CuO-C e CuO-NP) e seus respectivos metais não prejudicaram a germinação. Nesse mesmo período foi medido o comprimento da raiz (zona de crescimento + pilífera) e não houve diferença entre os produtos e as doses testadas (Tabela 4). Em média, o comprimento radicular das sementes germinadas em suspensão de ZnO foi de 4,6 cm, e para o CuO-C e CuO-NP, 4,9 e 4,4 cm, respectivamente.

Tabela 4. Comprimento radicular após 48 de germinação de sementes de feijão-caupi expostas a doses de óxidos de Zn e de Cu, na forma nanoparticulada (NP) e comum (C)

ZnO (mg L ⁻¹)	Comprimento radicular (cm)					
	0	10	30	50	80	400
NP	4,45	4,20	4,69	4,30	4,38	5,52
C	4,45	4,29	4,59	4,77	4,95	4,54
<i>p</i> -valor	Dose: 0,778		Fonte: 0,858		Interação: 0,769	
CuO (mg L ⁻¹)	Comprimento radicular (cm)					
	0	40	80	400	1000	2000
NP	4,45	4,99	4,67	4,33	4,18	3,95
C	4,45	5,05	6,04	5,11	4,97	4,06
<i>p</i> -valor	Dose: 0,218		Fonte: 0,112		Interação: 0,843	

Nanopartículas de ZnO (0,01-1000 mg L⁻¹) não inibiram a germinação de sementes de milho, mas sementes de repolho (*Brassica oleracea*) apresentaram baixa taxa de germinação (POKHREL et al., 2013). Nanopartículas de Cu também não prejudicaram a germinação de sementes de feijão-mungo e trigo à 1000 mg L⁻¹, mas reduziram o crescimento da raiz (Lee et al, 2008). Sementes de soja (*Glycine max*) e grão de bico (*Cicer arietinum* L.) expostas a suspensão de CuO –NP (0 - 2000 mg L⁻¹) em ensaio de germinação em placa de Petri, também não apresentaram efeito inibitório sobre a germinação (radícula > 1mm), embora o crescimento radicular tenha sido completamente inibido (ADHIKARI et al., 2012).

Nanopartículas de CuO não inibiram a germinação de sementes de tomate (*Solanum lycopersicum*) nas doses testadas (10-500 mg L⁻¹), mas as sementes de couve-flor foram sensíveis ao óxido. O comprimento radicular do tomate reduziu somente a partir da dose de 50 mg L⁻¹, enquanto que para o couve-flor (*Brassica oleracea* var. botrytis) aconteceu na dose de 10 mg L⁻¹ (SINGH et al., 2017). Culturas menos tolerantes como alface, rabanete e pepino, tratadas com suspensão de CuO-NP em água, tiveram redução de 50% na germinação quando a concentração na suspensão atingiu 13, 398 e 175 mg L⁻¹ de CuO, respectivamente (WU et al., 2012).

Em sementes de milho tratadas com 100 mg L⁻¹ de CuO-NP, apesar da ausência de efeito sobre a germinação, houve inibição do crescimento das plântulas, em comparação a fonte

de Cu iônica e ao CuO-C (WANG et al., 2012), sugerindo um efeito específico da nanopartícula. Da mesma forma, em sementes de trigo expostas a ZnO-NP (400 – 4000 mg L⁻¹), o efeito sobre a redução severa na germinação, em relação ao ZnO-C, não foi atribuído somente ao metal dissolvido, mas a algum efeito específico da nanopartícula; contudo, os autores não mencionam um provável efeito sobre a germinação.

3.3.3 Produção de biomassa

O aumento das doses dos ZnO influenciou negativamente a produção de biomassa das plantas de feijão-caupi (Figura 4). Não houve diferença entre o ZnO-NP e o ZnO-C para o valor médio da biomassa da folha e do caule; no entanto, as raízes supridas com ZnO-NP apresentaram biomassa 15% maior (Figura 4C), é provável que o menor teor de Zn no tecido radicular destas plantas tenha condicionado um melhor crescimento.

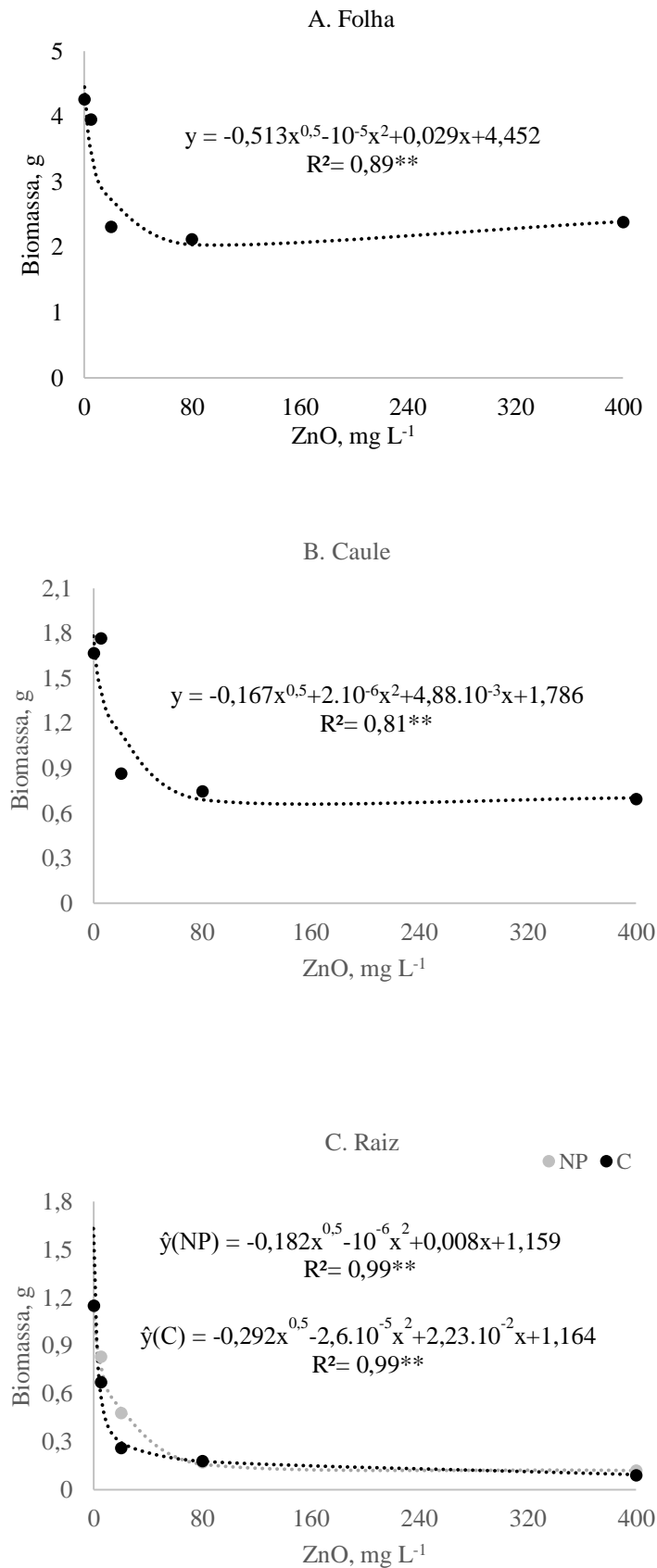


Figura 4. Produção de biomassa da folha (A), do caule (B) e da raiz (C) de plantas de feijão-caupi cultivadas em solução nutritiva sob doses de ZnO, nanoparticulado (NP) e comum (C). ^{ns}, * e ** = não significativo, significativo a 5% e significativo a 1%, respectivamente

Na dose mais baixa de ZnO (5 mg L^{-1}), a produção de biomassa foliar e caulinar foi semelhante a obtida no controle (Figura 4), indicando ausência de efeito tóxico. De forma semelhante, plantas de trigo sarraceno (*Fagopyrum esculentum*) expostas a ZnO-NP e ZnO-C em SN não apresentaram redução da biomassa na dose de 5 mg L^{-1} do produto, contudo, a partir dessa dose houve reduções significativas na biomassa em comparação ao controle (LEE et al., 2013).

Na dose de 20 mg L^{-1} de ZnO, a biomassa das plantas foi reduzida à quase metade da biomassa do controle; essa dose, portanto, pode ser considerada a concentração de efeito tóxico que reduz em 50% o crescimento da planta (CE50) (BRITO et al., 2009), podendo ser utilizada como dose máxima nos estudos de fitotoxicidade de ZnO sobre plantas de feijão-caupi. Plantas de beterraba (*Beta vulgaris* L.) cultivadas em solução nutritiva com excesso de Zn ($3\text{-}20 \text{ mg L}^{-1}$ Zn, ZnSO_4) apresentaram redução de quase 50% na produção de biomassa na dose de 3 mg L^{-1} de Zn (SAGARDOY et al., 2009); esse valor é específico pra cada cultura e está relacionado com a necessidade, ou tolerância, da espécie pelo metal.

A biomassa radicular das plantas tratadas com ZnO-NP foi 19% e 46% maior que o ZnO na dose de 5 e 20 mg L^{-1} , respectivamente (Figura 4C); o menor teor de Zn no tecido radicular nessas doses pode ter sido a causa dessa maior biomassa. Plantas de feijão-mungo (*Vigna radiata* L.) cultivadas em meio ágar com ZnO-NP (20 mg L^{-1}) também apresentaram efeito positivo sobre a biomassa radicular (41%) em relação ao controle, o que demonstra o potencial fertilizante dessa nanopartícula (MAHAJAN; DHOKE; KHANNA, 2011).

Nos tratamentos com Cu, de forma geral, a produção de biomassa da planta foi reduzida com o aumento da dose dos óxidos (Figura 5), sendo a fonte de Cu nanoparticulada aquela que proporcionou menores valores de biomassa foliar e caulinar, em relação ao CuO comum ($p < 0,01$), Figura 5A e B; nas raízes, não houve diferença entre os óxidos quanto a produção de biomassa (Figura 5C).

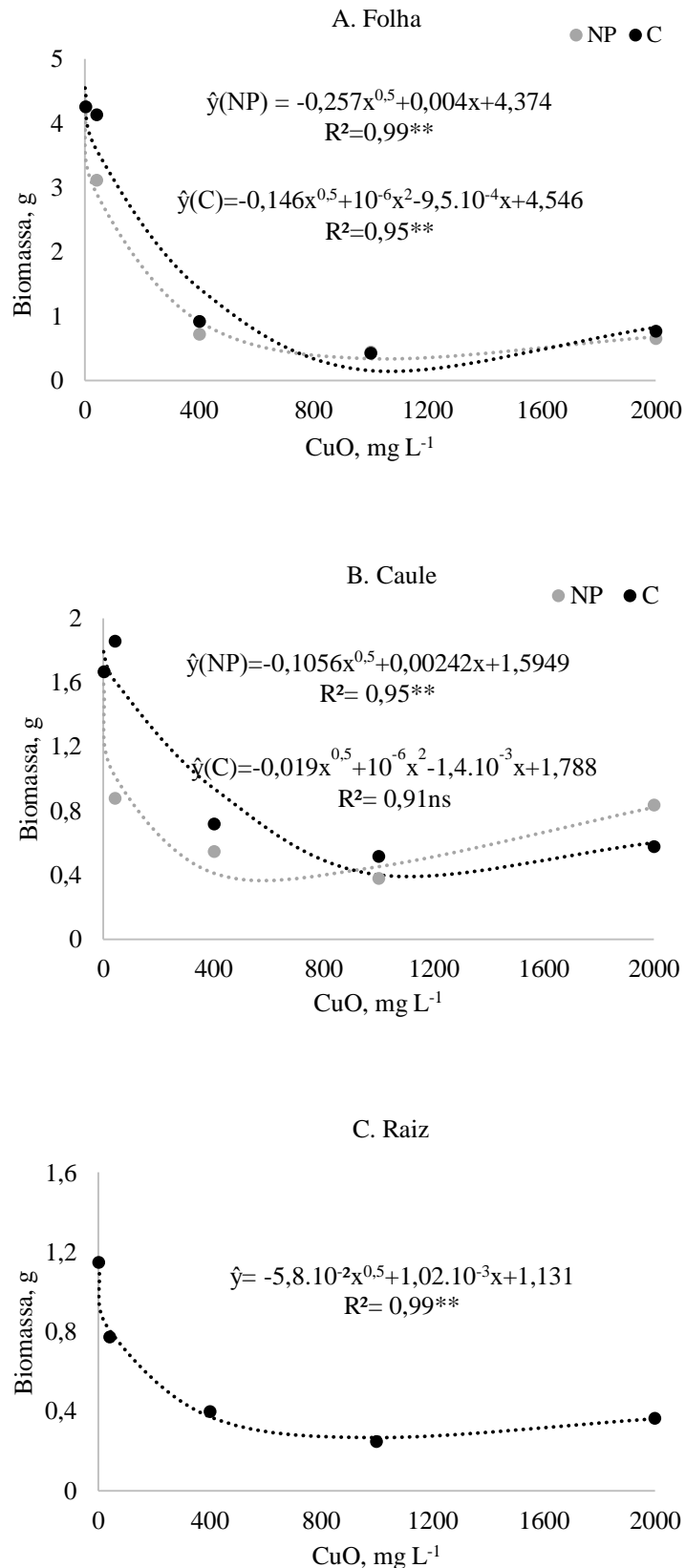


Figura 5. Produção de biomassa de folha (A), caule (B) e raiz (C) de plantas de feijão-caupi cultivadas em solução nutritiva sob doses de ZnO, nanoparticulado (NP) e comum (C). ns, * e ** = não significativo, significativo a 5% e significativo a 1%, respectivamente

Na dose de 40 mg L⁻¹ a produção de biomassa foliar com CuO foi semelhante ao controle, evidenciando ausência de efeito tóxico (Figura 5). O CuO-NP reduziu a biomassa em 27% em relação ao controle e em 25% em relação ao CuO comum. Essa diferença entre os produtos se deve ao maior teor de Cu no tecido foliar das plantas tratadas com CuO-NP (45 mg kg⁻¹), em comparação ao controle (14 mg L⁻¹) e ao CuO-C (26 mg kg⁻¹).

Plantas jovens de tomate (*Solanum lycopersicum*) e couve-flor (*Brassica oleracea*) cultivadas em SN adicionada de CuO- NP (10-500 mg L⁻¹), também apresentaram redução da biomassa da parte aérea e radicular na dose de 50 mg L⁻¹ (SINGH et al., 2017), dose próxima à adotada nesse estudo. Por outro lado, na dose de 10 mg L⁻¹ não contataram efeitos deletérios sobre a biomassa das plantas; que indica ausência de excesso de Cu²⁺ liberado na SN para estas culturas. Portanto, o uso CuO-NP como nanofertilizante é algo que deve ser visto com maiores critérios, tendo em vista que a alta taxa de dissolução do produto e a baixa necessidade desse elemento pelas plantas pode resultar em fitotoxicidade, mesmo em doses baixas. Contudo, estudos em solo podem viabilizar a utilização desse óxido como nanofertilizante, pois o solo apresenta capacidade de estocar o metal, liberando gradativamente para a planta.

3.3.4 Teor de Zn e de Cu no tecido vegetal

O aumento da dose dos óxidos de Zn e de Cu na solução nutritiva resultou em aumento do teor dos metais no tecido da folha, caule e raiz das plantas ($p < 0,05$), Figuras 6 e 7, o modelo de regressão que melhor se ajustou aos dados foi o quadrático e raiz quadrática. Em ordem, para o ZnO, o tecido radicular apresentou maior teor dos metais, seguido pelo tecido caulinar (Figura 6B e 6C); para o CuO o maior teor foi encontrado na raiz, seguida pela folha (Figura 6A e 6C).

O menor acúmulo de Zn e de Cu na folha é geralmente observado na grande maioria das plantas, esse mecanismo é adotado para evitar toxicidade. Não houve diferença significativa no teor do metal nos diferentes tecidos da planta, comparando a fonte nanoparticulada do Zn e do Cu com a fonte comum, exceto para o teor de Cu no tecido do caule. Mas, houve interação significativa entre a fonte de Cu e a dose no teor desse micronutriente no tecido foliar, caulinar e radicular.

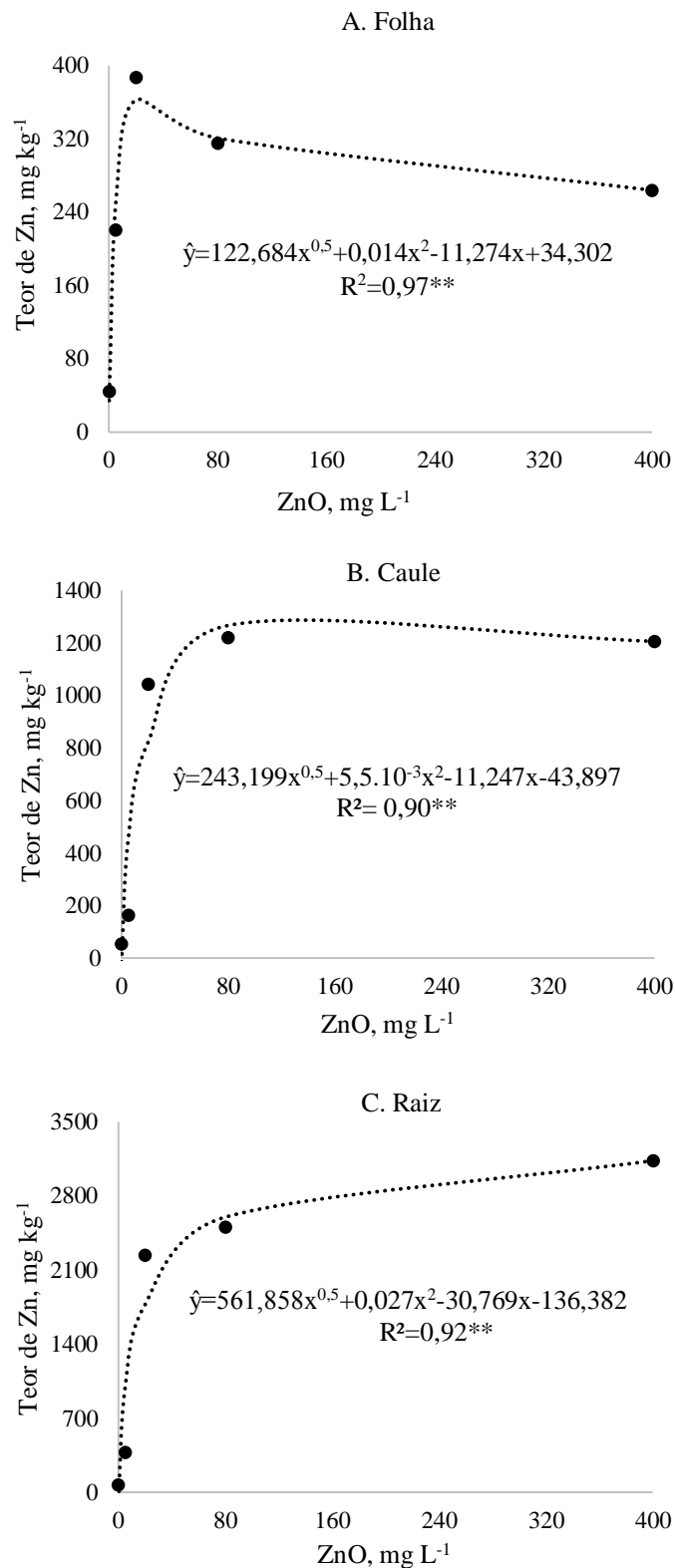


Figura 6. Teor de Zn no tecido da folha (A), caule (B) e raiz (C) de plantas de feijão-caupi cultivadas em solução nutritiva sob doses de ZnO. ^{ns}, * e ** = não significativo, significativo a 5% e significativo a 1%, respectivamente

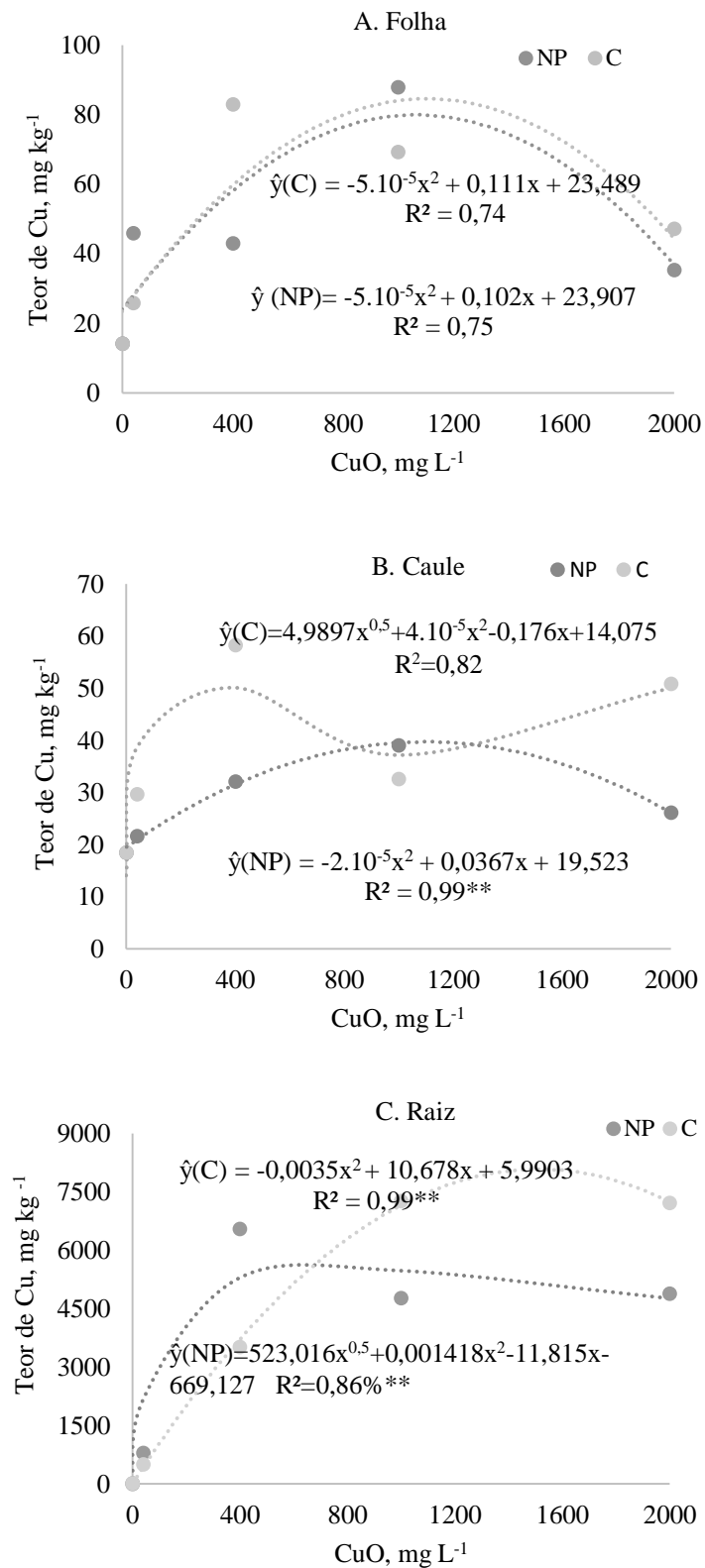


Figura 7. Teor de Cu no tecido da folha (A), caule (B) e raiz (C) de plantas de feijão-caupi cultivadas em solução nutritiva sob doses de CuO. ^{ns}, * e ** = não significativo, significativo a 5% e significativo a 1%, respectivamente

O teor de Zn e Cu no tecido foliar, caulinar e radicular nas plantas do controle (sem adição de óxido) foi de 45, 55 e 72 mg kg⁻¹ de Zn e 14, 18 e 16 mg kg⁻¹ de Cu, respectivamente (Figuras 6 e 7). Na dose de 5 mg L⁻¹ de ZnO o teor de Zn na folha (222 mg kg⁻¹) foi 5 vezes maior que no controle, sem diferença entre as fontes. Para o CuO-NP e CuO convencional, na dose de 40 mg L⁻¹, o teor de Cu na folha foi de 46 e 25 mg kg⁻¹, respectivamente, mostrando que o CuO-NP possui capacidade de dissolução maior. Com base no teor adequado de Zn e Cu para plantas de feijão-caupi, descrito por Cavalcante (2008), o teor de Zn na folha encontra-se 10 vezes maior, e o teor de Cu 9 (CuO-NP) e 5 (CuO) vezes maior.

Esse aumento do teor de Zn e de Cu nas plantas pode provocar sintomas de toxidez, como inibição da absorção de nutrientes, alteração em processos fisiológicos e bioquímicos e danos na estrutura do sistema radicular, prejudicando o crescimento e o desenvolvimento das plantas (AMBROSINI et al., 2016).

A distribuição de Zn e de Cu dentro da planta não aumentou na mesma proporção que a dose aplicada. Para o ZnO na dose de 5 mg L⁻¹, apesar do alto teor de Zn na planta, a proporção do metal nos diferentes tecidos avaliados foi similar ao do controle, indicando ausência de efeito tóxico. Nas doses subsequentes, a maior proporção de Zn na planta foi detectada nas raízes (63%). Essa tendência também foi observada nas plantas tratadas com o CuO. Na dose mínima (40 mg L⁻¹), a proporção de Cu não foi alterada na planta, mas nas doses superiores as raízes retiveram mais de 90% do Cu total. Plantas de trigo cultivadas em areia lavada com CuO e ZnO também apresentaram menor translocação dos metais para parte aérea, principalmente para o Cu (DIMKPA et al., 2012).

A compartimentalização de Zn e de Cu na raiz é um dos mecanismos de defesa adotados contra a toxicidade, que permite a sobrevivência das plantas em locais contaminados. Mas somente plantas que associam diferentes estratégias de defesa, como por exemplo complexação e translocação do metal no vacúolo foliar e aumento da atividade de enzimas antioxidantes, conseguem evitar distúrbios metabólicos e redução na produção de biomassa (FEIGL et al., 2015; FAYIGA; SAHA, 2016; RODRIGUES et al., 2016); desta forma, as plantas de feijão-caupi mostraram ter baixa tolerância ao Zn e, principalmente, ao Cu, que reforça a necessidade de mais estudos para determinação dos limites críticos da planta.

3.3.5 Composição mineral das plantas

Um dos efeitos do excesso de Zn e de Cu é a desordem nutricional na planta, que restringe o crescimento e desenvolvimento. Essa análise é frequentemente utilizada para verificar os efeitos da aplicação de fertilizantes na homeostase dos nutrientes na planta e em

estudos ambientais (NATALE et al., 2004; CARDOSO et al., 2013; LIMA et al., 2013; JUCOSKI et al., 2016).

O aumento da dose dos óxidos de Zn e de Cu promoveu redução significativa no conteúdo dos macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg e S) e dos micronutrientes (Fe, Mn, Zn e Cu) no tecido foliar das plantas (Tabela 5). Na Tabela 5 se encontra a equação de regressão ajustada (raiz quadrática) para o conteúdo dos macros e micronutrientes no tecido foliar das plantas de feijão-caupi.

Tabela 5. Equação de regressão ajustada do conteúdo dos nutrientes no tecido foliar das plantas de feijão-caupi (*Vigna uiguiculata*) tratadas com ZnO ou CuO

ZnO	Equação de regressão ajustada	R ²
N	$\hat{y} = -18,047x^{0,5} + 3,7 \cdot 10^{-5}x^2 + 0,620x + 140,745$	0,83**
P	$\hat{y} = -2,974x^{0,5} - 1,2 \cdot 10^{-5}x^2 + 0,112x + 22,673$	0,88**
K	$\hat{y} = -13,699x^{0,5} - 1,29 \cdot 10^{-4}x^2 + 0,547x + 120,964$	0,89**
Ca	$\hat{y} = -45,538x^{0,5} - 2,28 \cdot 10^{-3}x^2 + 2,701x + 309,321$	0,88**
Mg	$\hat{y} = -2,109x^{0,5} - 7,6 \cdot 10^{-5}x^2 + 0,111x + 13,577$	0,88**
S	$\hat{y} = -0,139x^{0,5} - 3 \cdot 10^{-6}x^2 + 6,5 \cdot 10^{-3}x + 1,227$	0,84**
Fe	$\hat{y} = -0,211x^{0,5} - 1,8 \cdot 10^{-5}x^2 + 0,016x + 0,896$	0,94**
Mn	$\hat{y} = -0,073x^{0,5} + 5 \cdot 10^{-6}x^2 + 3,16 \cdot 10^{-4}x + 0,730$	0,82**
Cu	$\hat{y} = -8 \cdot 10^{-3}x^{0,5} + 4,2 \cdot 10^{-4}x + 0,063$	0,86**
Zn	$\hat{y} = 0,3112x^{0,5} + 4,7 \cdot 10^{-5}x^2 - 0,03317x + 0,234$	0,93**
CuO	Equação de regressão ajustada	R ²
N NP	$\hat{y} = -6,083x^{0,5} + 1,6 \cdot 10^{-5}x^2 + 0,047x + 135,888$	0,97**
N C	$\hat{y} = -2,767x^{0,5} + 6 \cdot 10^{-5}x^2 - 0,116x + 143,201$	0,89**
P	$\hat{y} = -0,705x^{0,5} + 6 \cdot 10^{-6}x^2 - 5,04 \cdot 10^{-3}x + 22,566$	0,95**
K	$\hat{y} = -5,769x^{0,5} + 9 \cdot 10^{-6}x^2 + 0,062x + 19,223$	0,98**
Ca	$\hat{y} = -12,559x^{0,5} + 6 \cdot 10^{-5}x^2 + 0,026x + 312,812$	0,95**
Mg NP	$\hat{y} = -0,569x^{0,5} + 2 \cdot 10^{-6}x^2 + 3,03 \cdot 10^{-3}x + 13,622$	0,94**
Mg C	$\hat{y} = -0,228x^{0,5} + 6 \cdot 10^{-6}x^2 - 0,012x + 13,773$	0,93*
S NP	$\hat{y} = -0,0707x^{0,5} + 1,24 \cdot 10^{-3}x + 1,206$	0,98**
S C	$\hat{y} = -0,028x^{0,5} - 7,58 \cdot 10^{-4}x + 1,253$	0,93**
Fe NP	$\hat{y} = -0,085x^{0,5} + 2,39 \cdot 10^{-3}x + 0,816$	0,97**
Fe C	$\hat{y} = -0,065x^{0,5} + 1,42 \cdot 10^{-3}x + 0,865$	0,99**
Mn	$\hat{y} = -0,019x^{0,5} - 4,06 \cdot 10^{-4}x + 0,731$	0,91**
Cu	$\hat{y} = 6,43 \cdot 10^{-3}x^{0,5} - 3,44 \cdot 10^{-4}x + 0,073$	0,74**
Zn NP	$\hat{y} = -0,0156x^{0,5} + 3,88 \cdot 10^{-4}x + 0,193$	0,99**
Zn C	$\hat{y} = -5,7 \cdot 10^{-3}x^{0,5} - 4,7 \cdot 10^{-5}x + 0,199$	0,99*

NP, fonte nanoparticulada; C, fonte comum. * e **, significativo a 5% e 1%, respectivamente

Para o conteúdo de nutrientes na folha, não houve diferença estatística entre a fonte nanoparticulada e comum dos óxidos, exceto para N, P, Mg, S e Fe nas plantas tratadas com

cobre. Para esses nutrientes, o teor foliar nas plantas tratadas com a fonte nanoparticulada de Cu, foi inferior ao das plantas tratadas com o óxido de Cu comum. Esse efeito deve estar associado ao maior teor de Cu das plantas tratadas com CuO-NP, que reduziu a acumulação de nutrientes na folha, por efeito de toxicidade.

As plantas tratadas com 5 mg L⁻¹ de ZnO não apresentaram redução no conteúdo dos nutrientes na folha, exceção para o Fe que reduziu 27%, em relação ao controle. O mesmo comportamento foi observado nas plantas tratadas com CuO-NP (64%) e CuO-C (38%) na dose de 40 mg L⁻¹, que se explica pelo efeito de inibição competitiva entre o Zn e o Fe pelas proteínas transportadoras na membrana radicular (SILVA; TREVIZAM, 2015); nesse caso, o excesso de Zn na solução limitou a absorção do Fe pelas raízes. Em concordância, Marques et al. (2014) verificaram uma redução de 87% no conteúdo de Fe em plantas de mamona cultivada em SN com dose equivalente a 39,5 mg L⁻¹ de Zn, em relação ao controle (0,025 mg L⁻¹).

Em média, o conteúdo de N, P, K, Ca, Mg, S, Fe, Mn e Cu no tecido foliar das plantas tratadas com 400 mg L⁻¹ de ZnO reduziu entre 60 a 80%, em relação ao controle. Para o CuO, o conteúdo de N, P, K, Ca, Mg, S, Fe, Mn e Zn no tecido foliar reduziu entre 77 e 90%, comparando a dose de 2000 mg L⁻¹ com o controle.

A redução desses nutrientes na folha pode explicar a redução da biomassa da planta, pois estão estreitamente relacionados a estrutura e a ativação de enzimas que mediam reações vitais, como exemplo, a respiração e a fotossíntese. Por exemplo, o N faz parte da estrutura de aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos e da clorofila (MOHAMET; SOKKARY; TUCKER, 1987). Fósforo é essencial a formação de moléculas que armazenam e transferem energia para respiração, fotossíntese e absorção de nutrientes (MARUYAMA, 1991). O potássio controla as trocas gasosas por meio da abertura e fechamento estomático, além de funcionar como ativador enzimático (SHABALA, 2003); Ca, forma a estrutura da parede celular e ativa enzimas relacionadas ao crescimento (HEPLER, 2005); Mg, Está estreitamente relacionado a fotossíntese, pois constitui o átomo central da clorofila e participa da formação de ATP nos cloroplastos (Moreira et al., 2015); e o S participa da estrutura de aminoácidos, proteínas, peptídeos e enzimas (HELL; KHAN; WIRTZ 2010).

Em um ensaio em SN para avaliar a tolerância de variedades de videira ao Cu, comumente utilizado como fungicida, Cambrollé et al. (2015) reportaram desequilíbrio nutricional (N, P, S, Mg, Fe e Mn) a partir da dose de 2,5 mmol L⁻¹ de Cu. Os autores atribuem a redução da clorofila, da fotossíntese e da produção de biomassa a esse desequilíbrio nutricional. Plantas de beterraba cultivadas em SN com Zn (3-20 mg L⁻¹) também apresentaram alteração no teor de nutrientes na folha (N, P, K, Ca, Mg, Fe E Mn), que resultou em efeitos

negativos sobre o teor de pigmentos, condutância estomática, transpiração e parâmetros de fluorescência de clorofila (SAGARDOY et al., 2009).

3.3.6 Teor de pigmentos

O teor dos pigmentos reduziu significativamente quando as plantas foram supridas com Zn na forma de ZnO-NP ou ZnO-C (Tabela 6), e com Cu na forma de CuO-NP ou CuO-C (Tabela 7). Na dose mais baixa de ZnO-NP o teor de clorofila a, clorofila b e carotenoides reduziu 42%, 6% e 52%, respectivamente, em relação ao controle. Esses valores são inferiores as médias obtidas com a fonte de Zn convencional, que demonstra menor potencial tóxico que a fonte convencional. Em contraste, o CuO-NP na dose mais baixa apresentou maior redução no teor daqueles pigmentos que a fonte convencional, em ordem, 73, 71 e 65%, respectivamente, o efeito pode ser explicado pelo teor do metal no tecido foliar.

Tabela 6. Teor de clorofila a (Cla), clorofila b (Clb) e carotenoides e xantofilas (car+xant), mg g⁻¹, em folhas de plantas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) cultivadas em solução nutritiva, sob doses de ZnO nanoparticulado (NP) e comum (C)

ZnO (mg L ⁻¹)	Cla		Clb		Car+Xant	
	NP	C	NP	C	NP	C
0	1,95	1,95	0,77	0,77	0,48	0,48
5	1,13	0,94	0,72	0,31	0,23	0,21
20	0,54	0,26	0,25	0,10	0,22	0,11
80	0,61	0,42	0,18	0,20	0,15	0,17
400	0,12	0,18	0,09	0,13	0,08	0,12
DOSE (D)	0,000		0,000		0,000	
FONTE(F)	0,000		0,000		0,347	
D X F	0,001		0,000		0,065	

Tabela 7. Teor de clorofila a (Cla), clorofila b (Clb) e carotenoides e xantofilas (car+xant), mg g⁻¹, em folhas de plantas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) cultivadas em solução nutritiva, sob doses de CuO nanoparticulado (NP) e comum (C)

CuO (mg L ⁻¹)	Cla		Clb		Car+Xant	
	NP	C	NP	C	NP	C
0	1,95	1,95	0,77	0,77	0,48	0,48
40	0,53	1,37	0,22	0,65	0,17	0,27
400	0,67	1,47	0,30	0,57	0,17	0,36
1000	0,26	0,91	0,07	0,42	0,09	0,21
2000	0,60	0,81	0,28	0,31	0,19	0,20
DOSE (D)	0,000		0,000		0,000	
FONTE (F)	0,000		0,000		0,347	
D X F	0,019		0,000		0,035	

O teor de pigmentos tem sido utilizado com frequência em estudos bioquímicos para avaliar o estresse em plantas expostas a metais (DIMKPA et al., 2012; TIECHER et al., 2016;

MARQUES et al., 2017), uma vez que excesso de metais pesados prejudica o transporte de elétrons na fotossíntese, causando diminuição da biossíntese ou aumento da degradação de pigmentos; além disso, o Zn e o Cu podem substituir o Mg e o Fe das moléculas de clorofila, prejudicando o seu funcionamento (KUPER et al., 2009; CAMBROLLÉ et al., 2012; MARQUES et al., 2017).

Diferentemente das outras variáveis, o efeito tóxico do excesso de Zn e Cu sobre o teor dos pigmentos ocorreu desde a dose mais baixa dos óxidos (5 mg L⁻¹ de ZnO e 40 mg L⁻¹ de CuO), embora sem sintomas de clorose. Semelhantemente, Marques et al. (2014) também verificaram redução do teor de clorofila e ausência de sintoma de clorose em plantas de mamona (*Ricinus communis* L.) na dose equivalente a 13 mg L⁻¹, mas a redução da biomassa nessa dose pode ser um indicativo do efeito tóxico sobre o aparato fotossintético.

Em *Arabidopsis*, na dose de 100 mg L⁻¹ de ZnO, não houve efeito sobre a biomassa da planta nem sobre o teor de clorofila, mas redução de 50% no teor do pigmento foi observada na concentração de 300 mg L⁻¹ do óxido (WANG et al., 2015). Em um estudo para investigar o efeito de CuO-NP (10-800 mg L⁻¹) sobre a resposta fisiológica e bioquímica de plântulas de trigo (*Triticum* spp.) cultivadas em solução nutritiva, Sharma et al. (2017), também reportaram redução no teor de clorofila a (5-37%), clorofila b (14-48%) e carotenoides (8 - 38%), sugerindo danos oxidativos na membrana do cloroplasto devido ao metal. Em plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) e couve-flor (*Brassica oleracea*) cultivadas em areia lavada com NPs de CuO biologicamente sintetizadas, Singh et al. (2017), relataram redução de 46% para o couve-flor e 31% para o tomate na dose de 500 mg L⁻¹; na dose mais baixa (10 mg L⁻¹), as plantas de tomate continham 14% a mais de clorofila total que as plantas do controle (SINGH et al., 2017), o que indica o potencial fertilizante desse óxido quando utilizado na dose adequada.

A redução do teor de pigmentos é provavelmente uma estratégia de defesa da planta para diminuir a captação de energia, não havendo a necessidade da dissipação da mesma através de outros mecanismos (AMBROSINI et al., 2016). Contudo, nem sempre a redução do teor de clorofila implica em redução na fotossíntese. Por exemplo, plantas de beterraba (*Beta vulgaris*) expostas a uma dose equivalente a 3 mg L⁻¹ de Zn apresentaram redução significativa no teor de clorofila a, clorofila b e carotenoides, mas os danos sobre o aparato fotossintético só foram detectados na dose equivalente a 20 mg L⁻¹ de Zn (SAGARDOY et al., 2009). Então, é possível que a redução no teor de clorofila observada nesse estudo, nas doses mais baixas dos óxidos, não represente início de danos ao aparato fotossintético nessas doses.

3.3.7 Fluorescência de clorofila

A fluorescência de clorofila foi utilizada para avaliar possíveis danos ao aparato fotossintético das plantas de feijão-caupi expostas aos óxidos. Com o aumento das doses dos óxidos houve comprometimento dos parâmetros da fluorescência de clorofila ($p < 0,01$), sem diferença entre a fonte nanoparticulada e comum (Tabelas 8 e 9).

Tabela 8. Parâmetros de fluorescência de clorofila de folhas de feijão-caupi cultivadas em solução nutritiva com ZnO

ZnO (mg L ⁻¹)	F ₀	F _m	F _v	F _v /F _m	ABS/RC	TRo/RC	DIo/RC	Phi_Eo	Pi_Abs	yRC
0	7109	27353	20244	0,74	2,81	2,07	0,64	0,34	0,90	0,26
5	7017	32527	25510	0,79	2,52	1,98	0,55	0,39	1,50	0,28
20	8420	37908	29488	0,78	2,34	1,82	0,52	0,43	1,90	0,29
80	10753	43638	32885	0,75	2,70	2,03	0,68	0,38	1,15	0,26
400	12898	47718	34819	0,73	3,10	2,25	0,85	0,33	0,78	0,24
<i>p</i> -Valor	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-

Tabela 9. Parâmetros de fluorescência de clorofila de folhas de feijão-caupi cultivadas em solução nutritiva com CuO

CuO (mg L ⁻¹)	F ₀	F _m	F _v	F _v /F _m	ABS/RC	TRo/RC	DIo/RC	Phi_Eo	Pi_Abs	yRC
0	7109	27353	20244	0,74	2,81	2,07	0,64	0,34	0,90	0,26
40	7613	33177	25565	0,77	2,66	2,04	0,98	0,38	1,33	0,27
400	7106	34729	27623	0,79	2,41	1,91	0,40	0,48	2,67	0,31
1000	6561	35301	28740	0,81	2,22	1,81	0,47	0,53	3,65	0,30
2000	7261	35545	28284	0,80	2,34	1,86	0,49	0,47	2,43	0,30
<i>p</i> -Valor	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-

A fluorescência mínima (F₀), máxima (F_m) e variável (F_v) das plantas tratadas com ZnO ou CuO aumentou em função das doses dos óxidos, Tabelas 8 e 9 ($p < 0,05$).

A F₀ das plantas tratadas com Zn na dose de 5 mg L⁻¹ foi similar à do controle (Figura 8), mas na dose mais alta foi 81% maior; para o Cu o maior valor de F₀ foi obtido na dose de 40 mg L⁻¹ (Figura 9), esse comportamento indica comprometimento do aparato fotossintético. Em plantas de trigo (*Triticum* spp.) cultivadas em solução nutritiva com dose equivalente a 39 mg L⁻¹ de Zn houve redução de 33% na taxa de fotossíntese das plantas e alterações nos parâmetros fotossintéticos avaliados pela fluorescência de clorofila, que indicavam prejuízos as reações do fotossistema II (FS II) como, por exemplo, aumento da fluorescência inicial

(PAUNOV et al., 2018). Os mesmos, atribuíram o efeito a danos na estrutura dos complexos do centro de reação do FS II.

A F_0 é um dos parâmetros da fluorescência de clorofila utilizados para avaliar o estresse de plantas a fatores abióticos, por exemplo, metais tóxicos (YADAV et al., 2018). A F_0 é obtida quando os centros de reação do FS II estão abertos, ou seja, a receptora primária de elétrons, QA, está totalmente oxidada, situação iminente à ativação das reações fotoquímicas (MAXWELL; JOHNSON, 2000). O aumento de F_0 , que portanto é independente dos eventos fotoquímicos, reflete destruição do centro de reação do FS II ou diminuição na capacidade de transferência da energia de excitação da antena para o centro de reação, assim a energia passa a ser dissipada como fluorescência (BAKER; ROSENQVIST, 2004).

A tolerância de cultivares de café ao alumínio também foi determinada pela avaliação dos parâmetros de fluorescência de clorofila, os autores verificaram aumento da F_0 em quase duas vezes nas plantas expostas ao Al, além de um aumento de 22% na F_m , em comparação as plantas do controle (sem Al) (KONRAD et al., 2005). Nesse estudo, a F_m também apresentou aumento (74%, ZnO; 30%, CuO) em relação ao controle (Figuras 8 e 9). A F_m indica a intensidade máxima de fluorescência que ocorre quando praticamente toda QA está reduzida e os centros de reação são incapazes de aumentar as reações fotoquímicas, atingindo sua capacidade máxima (BAKER; ROSENQVIST, 2004). O acúmulo de QA reduzida é um indicativo de que a taxa de consumo dos produtos do FSII (ATP e NADPH) está baixa, provavelmente, devido à redução da assimilação de carbono pela planta. Konrad et al. (2005), além de verificarem aumento da F_0 e F_m nas mudas de cafeeiro, constataram alterações das trocas gasosas como, diminuição da taxa de assimilação de CO_2 , da condutância estomática e da taxa de carboxilação, que explicam a redução da eficiência fotoquímica (F_v/F_m).

A F_v/F_m para o ZnO teve seu melhor desempenho na dose de 5 mg L^{-1} (0,79), sendo superior ao controle (0,74); nas doses subsequentes houve declínio da F_v/F_m (Figura 8). As plantas expostas ao CuO não apresentaram coerência para esta variável, provavelmente, à ausência de aumento regular de F_0 nas doses superiores a 40 mg L^{-1} interferiu no resultado (Figura 9). Essa variável, F_v/F_m , é uma estimativa da eficiência quântica máxima da atividade fotoquímica do FS II, quando todos os centros de reação do FS II estão abertos (BAKER; ROSENQVIST, 2004).

O dano ao aparato fotossintético, nas doses maiores que 5 mg L^{-1} de ZnO, pode ser confirmado pela redução dos centros de reação ativos, como indicado pelo aumento dos parâmetros de fluxo de elétrons por centro de reação ativo (ABS/RC , TR_0/RC e DI_0/RC) e redução da Φ_{E_0} , do Pi_{ABS} e da γRC , nas doses mais altas (Figura 8). A diminuição dos

parâmetros de fluxo de energia nas doses mais baixas indica que o FS II é capaz de manter o equilíbrio dos fluxos de energia por meio de uma regulação dos centros de reações ativos do FS II (SINGH et al., 2018). Paunov et al. (2018), também constataram aumento no valor desses parâmetros de fluxo de energia em plantas de trigos sob estresse por Zn, efeito atribuído a inativação de parte dos centros de reação do FS II. Os autores também relataram redução na F_v/F_m , no P_i_{ABS} e da γRC .

Para as plantas tratadas com Cu houve um comportamento distinto, o aumento dos parâmetros de fluxo de energia por centro de reação ocorreu na dose de 40 mg L^{-1} , que está de acordo com a maior F_0 obtida nessa dose e baixos Φ_{E_0} , P_i_{ABS} e γRC (Figura 9).

Exceto para o controle e na dose mais baixa de ZnO houve danos ao aparato fotossintético das plantas; em contraste, as plantas tratadas com o CuO apresentaram maiores danos na dose mais baixa do óxido, indicando que a dose de 40 mg L^{-1} libera Cu além da necessidade da planta e do que a planta pode tolerar.

3.4 Conclusões

A dissolução do ZnO é favorecida em condições de maior atividade da água; para o CuO, ânions complexantes (ex, Cl^- , H_2PO_4^- e SO_4^{2-}) devem ser o fator preponderante, isso indica que esses óxidos apresentam comportamentos distintos no ambiente aquático;

A similaridade de efeito entre a fonte NP e comum dos óxidos testados indica ausência de efeito específico da NP sobre a germinação, a biomassa, o teor, a composição mineral e o aparato fotossintético;

A partir da dose de 5 mg L^{-1} de ZnO-NP e 40 mg L^{-1} de CuO-NP ocorreram danos ao aparato fotossintético (fotoinibição), que resulta em baixa assimilação de carbono e, consequentemente, redução na produção de biomassa de feijão-caupi;

O ZnO-NP e o CuO-NP apresentam potencial para serem utilizados como nanofertilizantes para o cultivo de plantas de feijão-caupi. No entanto, estudos em doses mais baixas e em tipos de solos diferentes devem ser conduzidos para constatação desse potencial.

Referências

ADELEYE, A. S.; CONWAY, J. R; PEREZ, T.; RUTTEN, P.; KELLER, A. A. Influence of extracellular polymeric substances on the long-term fate, dissolution, and speciation of copper-based nanoparticles. **Environmental Science & Technology**, Berkeley, v. 48, p. 12561–12568, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/es5033426>>.

ADHIKARI, T.; KUNDU, S.; BISWAS, A.K.; TARAFDAR, J. C.; RAO, A. S. Effect of copper oxide nano particle on seed germination of selected crops. **Journal of Agricultural Science and Technology A**, Tehran, v. 2, p. 815-823, 2012.

ALLOWAY, B. J. **Heavy Metals in Soils: Trace Metals and Metalloids in Soils and their Bioavailability (Environmental Pollution)**. 3ed. eBook. Dordrecht Springer, 2013.

ALVES, A. P. P.; AMORIM, V. S.; VIEIRA, D. S.; PEIXOTO, R. M.; OLIVEIRA, H. P.; COSTA, M. M. Soluções de óxido de zinco e de nitrato de prata como alternativa para antissepsia de tetos de bovinos (teste *in situ*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**. Rio de Janeiro, v. 37, n. 10, p. 1049-1056, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2017001000002>>.

AMBROSINI, V. G.; SORIANI, H. H.; ROSA, D. J.; TIECHER, T. L.; GIROTTO, E.; SIMÃO, D. G.; MELO, G. W. B.; ZALAMENA, J.; BRUNETTO, G. Impacto do excesso de cobre e zinco no solo sobre videiras e plantas de cobertura. Embrapa Uva e Vinho In: **Calagem, adubação e contaminação em solos cultivados com videiras**. p. 91-110, 2016.

AMIRI, M.; ETEMADIFAR, Z.; DANESHKAZEMI, A.; NATEGHI, M. Antimicrobial effect of copper oxide nanoparticles on some oral bacteria and candida species. **Journal of Dental Biomaterials**, Shiraz, v. 4, n. 1, p. 347-352, 2017.

BAEK, YONG-WOOK; AN, YOUN-JOO. Microbial toxicity of metal oxide nanoparticles (CuO, NiO, ZnO and Sb₂O₃) to *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, and *Streptococcus aureus*. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 409, p. 1603–1608, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.10.1016/j.scitotenv.2011.01.014>>.

BAKER, N. R.; ROSENQVIST, E. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: An examination of future possibilities. **Journal of Experimental Botany**, United Kingdom, v. 55, p. 1607–1621, 2004.

BRITO, D. Q.; MENEZES-OLIVEIRA, V.; AMORIM, M. J. B.; SOARES, A. M. V. M.; LOUREIRO, S. *Arabidopsis thaliana*: planta teste em estudos multidisciplinares. **Revista Captar: ciência e ambiente para todos**, Aveiro, v. 1, n. 2, p. 205-216, 2009. Disponível em: <<http://revistas.ua.pt/index.php/captar/article/view/2722>>.

BROADLEY, M.; BROWN, P.; CAKMAK, I.; RENGEL, Z.; ZHAO, F. Function of Nutrients: Micronutrients. In: **Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants**. 3 ed., p. 191-248, 2012.

CAMBROLLÉ, J.; GARCÍA, J. L.; FIGUEROA, M. E.; CANTOS, M. Evaluating wild grapevine tolerance to copper toxicity. **Chemosphere**, Oxford, v. 120, p. 171-178, 2015.

CAMBROLLÉ, J.; MANCILLA-LEYTÓN, J. M.; MUÑOZ-VALLÉS, S.; LUQUE, T.; FIGUEROA, M. E. Zinc tolerance and accumulation in the salt-marsh shrub *Halimione portulacoides*. **Chemosphere**, Oxford, v. 86, n. 9, p. 867-874, 2012.

CARDOSO, F. R.; GALANTE, A. H. A.; TEIXEIRA, I. R.; DA SILVA, A. G.; DOS REIS, E. F. Fontes e doses de zinco na nutrição e produção de feijão-comum e mamona em consórcio. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v.8, n.4, p. 602-609, 2013.

CAVALCANTI, F. J. de A. **Recomendações de adubação para o Estado de Pernambuco: 2a aproximação**. 3ed. Recife: IPA, 2008. 212 p.

CRUZ, P.; PEREZ, Y.; DEL HIERRO, I. Copper, copper oxide nanoparticles and copper complexes supported on mesoporous SBA-15 as catalysts in the selective oxidation of benzyl alcohol in aqueous phase. **Microporous and Mesoporous Materials**, Amsterdam, v. 220, p. 136-147, 2016.

DIMKPA, C. O.; MCLEAN, J. E.; LATTA, D. E.; MANANGÓN, E.; BRITT, D. W.; JOHNSON, W. P.; BOYANOV, M. I.; ANDERSON, A. J. CuO and ZnO nanoparticles: phytotoxicity, metal speciation, and induction of oxidative stress in sand-grown wheat. **Journal Nanoparticles Research**, Dordrecht, v.14, n.9, 2012.
<https://doi.org/10.1007/s11051-012-1125-9>.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2009.

FAYIGA A. O.; SAHA, U. K. Arsenic hyperaccumulating fern: Implications for remediation of arsenic contaminated soils, **Geoderma**, Amsterdam, v. 284, p. 132-143, 2016. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2016.09.003>.

FEIGL, G.; LEHOTAI, N.; MOLNÁR, Á.; ÖRDÖG, A.; RODRÍGUEZ-RUIZ, M.; PALMA, J. M.; CORPAS, F. J.; ERDEI, L.; KOLBERT, Z. S. Zinc induces distinct changes in the metabolism of reactive oxygen and nitrogen species (ROS and RNS) in the roots of two Brassica species with different sensitivity to zinc stress. **Annals of Botany**, Oxford, v. 116, p. 613–625, 2015. Disponível em <https://doi.org/10.1093/aob/mcu246>.

GIRIGOSWAMI, K.; VISWANATHAN, M.; MURUGESAN, R.; GIRIGOSWAMI, A. Studies on polymer-coated zinc oxide nanoparticles: UV-blocking efficacy and in vivo toxicity. **Materials Science and Engineering C**, Amsterdam, v.56, p. 501–510, 2015.

HELL, R.; KHAN, M. S.; WIRTZ, M. Cellular biology of sulfur and its functions in plants. In: HELL, R.; MENDEL, R. R. (Eds.). **Cell Biology of Metals and Nutrients**. Berlin: Springer, 2010. p. 243-279. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-642-10613-2_11.

HEPLER, P. K. Calcium: A Central Regulator of Plant Growth and Development. **The Plant Cell**, Rockville, v. 17, p. 2142–2155, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1105/tpc.105.032508>.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. L. **The water culture methods for growing plants without soil**. Berkeley: University of California, 1950. p. 32. (Circular 347)

JINHUA, Z.; KELI, Y.; ZHONGGUI, Z.; WUSHENG, J.; DONGHUA, L. Antioxidant response system and chlorophyll fluorescence in chromium (VI)- treated *Zea mays* L. seedlings. **Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica**, Warszawa, v. 51, n. 1, p. 23–33, 2009.

JUCOSKI, G. O.; CAMBRAIA, J.; RIBEIRO, C.; OLIVEIRA, J. A. Excesso de ferro sobre o crescimento e a composição mineral em *Eugenia uniflora* L. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 47, n. 4, p. 720-728, 2016.

KELLER, A.A., MCFERRAN, S., LAZAREVA, A., SUH, S. Global life cycle releases of engineered nanomaterials. **Journal of Nanoparticle Research**, Dordrecht, v. 15, n. 6, 2013. Disponível em <https://doi.org/10.1007/s11051-013-1692-4>.

KELLER, A. A.; ADELEYE, A. S.; CONWAY, J. R.; GARNER, K. L.; ZHAO, L.; CHERR, G.N.; HONG, J.; GARDEA-TORRESDEY, J.L.; GODWIN, H.A.; HANNA, S.; JI, Z.; KAWEETEERAWAT, C.; LIN, S.; LENIHAN, H. S.; MILLER, R. J.; NEL, A. E.; PERALTA-VIDEA, J. R.; WALKER, S. L.; ZUVERZA-MENA, N. Comparative environmental fate and toxicity of copper nanomaterials. **NanoImpact**, Beijing v.7, p 28-40, 2017.

KHAN S. B., RAHMAN, M. M., AKHTAR, K., ASIRI, A. M., ALAMRY, K. A., SEO, J., HAN, H. Copper oxide based polymer nanohybrid for chemical sensor applications. **International Journal of Electrochemical Science**, Belgrade, v. 7, p. 10965–10975, 2012.

KONRAD, M. L. F; SILVA, J. A. B; FURLANI, P. R; MACHADO, E. C. Trocas gasosas e fluorescência da clorofila em seis cultivares de cafeeiro sob estresse de alumínio. **Bragantia**, Campinas, v. 64, n. 3, p. 339-347, 2005.

KUPPER, H; GOTZ, B; MIJOVILOVICH, A; KUPPER, F. C; MEYER-KLAUCKE, W. Complexation and toxicity of copper in higher plants. I. Characterization of copper accumulation, speciation, and toxicity in *Crassula helmsii* as a new copper accumulator. **Plant Physiology**, Rockville, v. 151, p. 702–714, 2009.

LEE, W. M.; AN, Y. J; YOON, H; KWEON, H. S Toxicity and bioavailability of copper nanoparticles to the terrestrial plants mung bean (*Phaseolus radiatus*) and wheat (*Triticum aestivum*): plant agar test for water-insoluble nanoparticles. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Hoboken, v. 27, n. 9, p. 1915–1921, 2008.

LEE, C. W.; MAHENDRA, S.; ZODROW, K.; LI, D.; TSAI, Y.C.; BRAAM, J. Developmental phytotoxicity of metal oxide nanoparticles to *Arabidopsis thaliana*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Hoboken, v. 29, n. 3, p. 669–675, 2010.

LEE, S.; CHUNG, H.; KIM, S.; LEE, I. The genotoxic effect of ZnO and CuO nanoparticles on early growth of buckwheat, *Fagopyrum esculentum*. **Water Air Soil & Pollution**, Dordrecht, v. 224, n. 9, 2013. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s11270-013-1668-0>>.

LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMANN, C. Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, v. 1, n. 1, p. 1-8, 2001. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/0471142913.faf0403s01>>.

LIMA, F. S.; NASCIMENTO, C. W. A.; ACCIOLY, A. M. A.; SOUSA, C. S.; CUNHA FILHO, F. F. Bioconcentração de chumbo e micronutrientes em hortaliças cultivadas em solo contaminado. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 44, n. 2, p. 234-241, 2013.

LIN, D.; XING, B. Phytotoxicity of nanoparticles: Inhibition of seed germination and root growth. **Environmental Pollution**, Oxford, v. 150, p. 243-250, 2007.

LIU, R.; ZHANG, H.; LAL, R. Effects of stabilized nanoparticles of copper, zinc, manganese, and iron oxides in low concentrations on lettuce (*Lactuca sativa*) seed germination: nanotoxicants or nanonutrients? **Water Air Soil Pollution**, Dordrecht, v. 227, n. 42, 2016.

MAHAN, B. M.; MAYERS, R. J. Química: um curso universitário. 4 ed. São Paulo: Editora Blucher, 1995, p. 130.

MAHAJAN, P.; DHOKE, S. K.; KHANNA, A. S. Effect of nano-zno particle suspension on growth of mung (*Vigna radiata*) and gram (*Cicer arietinum*) seedlings using plant agar method. **Journal of Nanotechnology**, Cairo, v. 2011, n. 696535, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1155/2011/696535>>.

MAJUMDAR, S.; PERALTA-VIDEA, J. R.; BANDYOPADHYAY, S.; CASTILLO-MICHEL, H.; HERNANDEZ-VIEZCAS, J. A.; SAHI, S.; GARDEA-TORRESDEY, J. L. Exposure of cerium oxide nanoparticles to kidney bean shows disturbance in the plant defense mechanisms, **Journal Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 278, p. 279–287, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.06.009>>.

MARQUES, M. C.; NASCIMENTO, C. W. A. Tolerância de mamona a zinco avaliada por fluorescência de clorofila e nutrição das plantas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 38, p. 850-857, 2014.

MARQUES, M. C.; NASCIMENTO, C. W. A.; SILVA, A. J.; GOUVEIA-NETO, A. S. Tolerance of an energy crop (*Jatropha curcas* L.) to zinc and lead assessed by chlorophyll fluorescence and enzyme activity. **South African Journal of Botany**, Amsterdam, v.112, p. 275–282, 2017.

MARUYAMA, K. The discovery of adenosine triphosphate and the establishment of its structure. **Journal of the History of Biology**, Dordrecht, v. 24, n. 1, p. 145–154, 1991.

MARSCHNER, P. **Mineral Nutrition of Higher Plants**. 3ed. London: Academic Press, 2012. p 651.

MAXWELL, K.; JOHNSON, G. N. Chlorophyll fluorescence-a practical guide. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.51, p.659–668, 2000.

MOHAMED, A.; EL-SOKKARY, I.; TUCKER, T. Growth and chlorophyll, mineral and total amino acid composition of tomato and wheat plants in relation to nitrogen and iron nutrition. II. Chlorophyll content and total amino acid composition. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 10, p. 713-731, 1987.

- MORALES-DÍAZ, A. B. Application of nanoelements in plant nutrition and its impact in ecosystems. **Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology**, Bristol, v. 8, n. 013001, p. 13, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1088/2043-6254/8/1/013001>
- MOREIRA, W. R.; BISPO, W. M. S; RIOS, J. A; DEBONA, D; NASCIMENTO, C.W.A; RODRIGUES, F. A. Magnesium-induced alterations in the photosynthetic performance and resistance of rice plants infected with *Bipolaris oryzae*. **Scientia Agricola**. Piracicaba, v. 72, n. 4, p. 328-333, 2015.
- MORTIMER, M.; KASEMETS, K.; KAHRU, A. Toxicity of ZnO and CuO nanoparticles to ciliated protozoa *Tetrahymena thermophila*. **Toxicology**, Clare, v. 269, n. 2, p. 182-189, 2010
- MUKHERJEE, A.; PERALTA-VIDEA, J. R.; BANDYOPADHYAY, S.; RICO, C. M.; ZHAO, L. J.; GARDEA-TORRESDEY, J. L. Physiological effects of nanoparticulate ZnO in green peas (*Pisum sativum* L.) cultivated in soil. **Metallomics**, Cambridge, v.6, p.132—138, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1039/c3mt00064h>>.
- NATALE, W.; PRADO, R. M.; LEAL, R. M.; FRANCO, C. F. Efeitos da aplicação de zinco no desenvolvimento, no estado nutricional e na produção de matéria seca de mudas de maracujazeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 26, n. 2, p. 310-314, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452004000200031>>.
- PAUNOV, M.; KOLEVA, L.; VASSILEV, A.; VANGRONSVELD, J.; GOLTSEV, V. Effects of different metals on photosynthesis: cadmium and zinc affect chlorophyll fluorescence in durum wheat. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 19, n. 787, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/ijms19030787>>.
- POKHREL L, R.; DUBEY, B. Evaluation of developmental responses of two crop plants exposed to silver and zinc oxide nanoparticles. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, 452–453, p. 321–332, 2013.
- RODRIGUES, A. C. D.; SANTOS, A. M.; SANTOS, F. S.; PEREIRA, A. C. C.; SOBRINHO, N. M. B. A. Mecanismos de respostas das plantas à poluição por metais pesados: possibilidade de uso de macrófitas para remediação de ambientes aquáticos contaminados. **Revista Virtual de Química**. Niterói, v. 8, n. 1, p. 262-276, 2016.
- RUTTKAY-NEDECKY, B.; KRYSSTOFOVA, O.; NEJDL, L.; ADAM, V. Nanoparticles based on essential metals and their phytotoxicity. **Journal of Nanobiotechnology**, London, v. 15, n. 33, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12951-017-0268-3>>.
- SAGARDOY, R.; MORALES, F.; LÓPEZ-MILLÁN, A. F.; ABADIA, A.; ABADIA, J. Effects of zinc toxicity on sugar beet (*Beta vulgaris* L.) plants grown in hydroponics. **Plant Biology**, Hoboken, v. 11, p. 339–350, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2008.00153.x>>.
- SAMREEN, T.; HUMAIRA; SHAH, H. U; ULLAH, S.; MUHAMMAD, J. Zinc effect on growth rate, chlorophyll, protein and mineral contents of hydroponically grown mung beans plant (*Vigna radiata*). **Arabian Journal of Chemistry**, Amsterdam, v. 10, p. S1802–S1807, 2017. Disponível em:< <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.07.005>>.

SHABALA, S. Regulation of potassium transport in leaves: from molecular to tissue level. **Annals of Botany**, Oxford, v. 92, p. 627-634, 2003.

SHARMA, S.; UTTAM, K. N. Rapid analyses of stress of copper oxide nanoparticles on wheat plants at an early stage by laser induced fluorescence and attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy**, Amsterdam, v. 92, p. 135–150, 2017.

SILVA, M. L. S.; TREVIZAM, R. Interações iônicas e seus efeitos na nutrição das plantas. *Informações agronômicas*. n. 49, p. 16. 2015. Disponível em: <http://www.ipni.net/publication/ia-brasil.nsf/0/8C2796BCB76E0F9B83257E20006560E2/%24FILE/Page10-16-149.pdf>.

SILVA, A. J.; NASCIMENTO, C. W. A.; GOUVEIA-NETO, A. S.; SILVA-JR, E. A. LED-induced chlorophyll fluorescence spectral analysis for the early detection and monitoring of cadmium toxicity in maize plants. **Water Air Soil Pollution**, Dordrecht, v. 223, p. 3527-3533, 2012.

SINGH, A.; PRASAD, S. M.; SING, S. Impact of nano ZnO on metabolic attributes and fluorescence kinetics of rice seedlings. **Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management**, Amsterdam, v. 9, p. 42–49, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.enmm.2017.11.006>>.

STAMPOULIS, D.; SINHA, S. K.; WHITE, J. C. Assay-dependent phytotoxicity of nanoparticles to plants. **Environmental Science & Technology**, Washington, v. 43, p. 9473–9479, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/es901695c>>.

STRASSER R. J., SRIVASTAVA, A., TSIMILLI-MICHAEL, M. The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. In: YUNUS, M., PATHRE, U., MOHANTY, P. (eds.): **Probing Photosynthesis: Mechanisms, Regulation and Adaptation**. London: Taylor and Francis, p. 445–483, 2000.

TIECHER, T. L.; CERETTA, C. A.; FERREIRA, P. A. A.; NICOLOSO, F. T.; SORIANI, H. H.; TASSINARI, A.; PARANHOS, J. T.; CONTI, L.; BRUNETTO, G. Physiological and nutritional status of black oat (*Avena strigosa* Schreb.) grown in soil with interaction of high doses of copper and Zinc. **Plant Physiology and Biochemistry**, Issy-Les-Moulineaux, v.106, p.253-263, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.05.015>>.

USEPA –UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Ecological Test Guidelines OPPTS 850, 4200: Seed Germination/ Root elongation Toxicity Test. 1996.

VASSILEV A.; NIKOLOVA, A.; KOLEVA, L.; LIDON, F. Effects of excess Zn on growth and photosynthetic performance of young bean plants. **Journal of Phytology**, v.3, n.6, p. 58-62, 2011. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/285843931_Effects_of_excess_Zn_on_growth_and_photosynthetic_performance_of_young_bean_plants>.

WANG, Q.; MA, X.; ZHANG, W.; PEI, H.; CHEN, Y. The impact of cerium oxide nanoparticles on tomato (*Solanum lycopersicum* L.) and its implications for food safety. **Metallomics**, Cambridge, v. 4, p. 1105–1112, 2012.

WANG, X.; JIANG, P.; MA, Y.; GENG, S.; WANG, S.; SHI D. Physiological strategies of sunflower exposed to salt or alkali stresses: restriction of ion transport in the cotyledon node zone and solute accumulation. **Agronomy Journal**, Madison, v. 107, p. 2181–2192, 2015. Disponível em: < <https://doi.org/10.2134/agronj15.001210.2134/agronj15.0012>>.

WANG, X.; YANG, X.; CHEN, S.; LI, Q.; WANG, W.; HOU, C.; GAO, X.; WANG, L.; WANG, S. Zinc oxide nanoparticles affect biomass accumulation and photosynthesis in *Arabidopsis*. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 6, n. 1243, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01243>>.

WU, S. G.; HUANG, L.; HEAD, J.; CHEN, D.; KONG, I.; TANG, Y. J. Phytotoxicity of metal oxide nanoparticles is related to both dissolved metals ions and adsorption of particles on seed surfaces. **Journal of Petroleum and Environmental Biotechnology**, Beijing, v. 3, n. 126, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.4172/2157-7463.1000126>>.

XIA, T.; LI, N.; NEL, A. E. Potential health impact of nanoparticles. **Annual Review of Public Health**, Palo Alto, v. 30, p. 137–150, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1146/annurev.publhealth.031308.100155>>.

YADAV, S.; SHANKAR, A.; RAI, S.; RAI, R.; SINGH, S.; RAI, L.C. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis under abiotic stress. **Environment and Photosynthesis a Future Prospect**, India, p. 287-304, 2018.

ZHAO, L.; YOUPING, S.; HERNANDEZ-VIEZCAS, J. A.; SERVIN, A.; HONG, J.; GENHUA, N.; PERALTA-VIDEA, J. R.; DUARTE-GARDEA, M.; GARDEA-TORRESDEY, J.L. Influence of CeO₂ and ZnO nanoparticles on cucumber physiological markers and bioaccumulation of Ce and Zn: A life cycle study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 61, p. 11945–11951, 2013.

ZLOBIN, I. E.; KARTASHOV, A. V.; SHPAKOVSKI, G. V. Different roles of glutathione in copper and zinc chelation in *Brassica napus* roots. **Plant Physiology and Biochemistry**, Issy-Les-Moulineaux, v. 118, p. 333-341, 2017.

4 INFLUÊNCIA DE NANOPARTÍCULAS DE ZnO SOBRE PARÂMETROS DE PRODUÇÃO, STATUS NUTRICIONAL E APARATO FOTOSSINTÉTICO DE PLANTAS DE FEIJÃO-CAUPI (*Vigna unguiculata*)

Influência de nanopartículas de ZnO sobre parâmetros de produção, status nutricional e aparato fotossintético de plantas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*)

RESUMO

A maior eficiência do óxido de zinco nanoparticulado (ZnO-NP) no setor industrial é incontestável, mas no setor agrícola estudos devem ser conduzidos para avaliar seu potencial de uso como fertilizante para nutrição de plantas. O objetivo deste estudo foi avaliar doses de ZnO-NP e ZnO comum sobre o crescimento, a composição mineral e o aparato fotossintético de plantas de feijão-caupi. Os tratamentos compreenderam duas fontes de ZnO aplicadas em cinco doses (0, 100, 300, 500 e 800 mg dm⁻³), com três repetições. O teor de Zn na biomassa das plantas seguiu a tendência de aumento das doses dos óxidos no solo. O excesso de Zn reduziu o crescimento e a produção de biomassa das plantas expostas ao ZnO comum, mas para o ZnO-NP houve redução somente na dose mais alta. Em média, a biomassa das plantas tratadas com ZnO-NP foi 19% maior que o ZnO. A dose de 100 mg dm⁻³ proporcionou um leve estímulo na produção de biomassa da parte aérea de ambas as fontes, comparadas ao controle. O excesso de Zn liberado dos óxidos alterou a composição mineral das plantas para os nutrientes Fe, K, Cu e P. Nas condições deste estudo não foram observadas alterações sobre o aparato fotossintético das plantas expostas ao ZnO-NP, cujas plantas apresentaram maior eficiência fotoquímica e eficiência quântica máxima que a fonte comum. Em doses baixas as fontes de Zn foram igualmente eficientes na melhoria dos parâmetros de crescimento e na composição mineral do feijão-caupi. Na dose mais alta o excesso de Zn promoveu alterações no teor de Fe, K, Cu e P e comprometeu o desenvolvimento das plantas, principalmente, para a fonte de Zn comum.

Palavras-chave: Nanofertilizante. Óxido de zinco. Fluorescência de clorofila.

Influence of zinc oxide nanoparticles on production parameters, nutritional status and photosynthetic apparatus of plants of cowpea (*Vigna unguiculata*)

ABSTRACT

The higher efficiency of nanoparticulate zinc (ZnO-NP) in the industrial sector is undeniable, but in the agricultural sector studies should be conducted to evaluate its potential use as a fertilizer for plant nutrition. The objective of this study was to evaluate doses of ZnO-NP and ZnO common on growth, mineral composition and photosynthetic apparatus of cowpea plants. The treatments included two ZnO sources applied in five doses (0, 100, 300, 500 and 800 mg dm⁻³), with three replicates. The Zn content in the biomass of the plants followed the tendency of increasing the doses of the oxides in the soil. The excess of Zn reduced the growth and biomass production of the plants exposed to the common ZnO, but for ZnO-NP there was reduction only at the highest dose. On average, the biomass of plants treated with ZnO-NP was 19% higher than ZnO. The dose of 100 mg dm⁻³ provided a slight stimulus in shoot biomass production of both sources compared to control. The excess of Zn released from the oxides altered the mineral composition of the plants to the nutrients Fe, K, Cu and P. In the conditions of this study no alterations were observed on the photosynthetic apparatus of the plants exposed to ZnO-NP, whose plants showed higher photochemical efficiency and maximum quantum efficiency than the common source. At low doses Zn sources were equally efficient in improving growth parameters and in the mineral composition of cowpea. At the highest dose the excess Zn promoted changes in Fe, K, Cu and P content and compromised the development of plants, mainly for the common Zn source.

Keywords: Nanofertilizer. Zinc oxide. Chlorophyll fluorescence.

4.1 Introdução

Nanopartículas (NPs) são materiais com pelo menos duas dimensões entre 1 e 100 nm (RICO et al., 2011). O tamanho nanométrico condiciona uma alta superfície específica e presença de carga na superfície, determinando uma maior interação das partículas entre si (ex. aglomeração e agregação) e ao seu redor (SCENIHR, 2006), ao contrário dos materiais substitutos correspondentes cujo tamanho (maiores que 1 μm) não favorece a interações com outros materiais. Com ampla utilização de nanopartículas no setor industrial, farmacêutico e comercial, crescem as chances destes materiais entrarem no solo e serem absorvidos pelas plantas.

O uso de fertilizantes na forma de nanopartículas tem sido intensamente estudado nos últimos anos (LIU; LAL 2014; LIU; ZHANG; LAL, 2016; RUI et al., 2016; KOTTEGODA et al., 2017) e prevê-se que estes fertilizantes podem ser de uso corrente em futuro próximo. No entanto, apesar da possibilidade do uso crescente de nanomateriais na agricultura, os riscos associados à entrada desses no ecossistema e sua toxicidade para seres vivos ainda são pouco conhecidos.

Os micronutrientes se destacam nos estudos de fontes nanoparticuladas para nutrição de plantas (MAHAJAN; DHOKE; KHANNA, 2011; PRADHAN et al., 2013; WANG et al., 2013; RAO; SHEKHAWAT, 2014). Por exemplo, em estudo de germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa*) expostas a MnO-NP e FeO-NP verificou-se que a taxa de germinação e a alongação da raiz foram superiores as fontes iônicas (Mn^{2+} , Fe^{2+}) e aos óxidos convencionais até a concentração de 50 mg L^{-1} (LIU et al., 2016) mostrando que nem sempre a fonte nanoparticulada é tóxica e a importância do conhecimento da dose ideal destes compostos. Em estudo com ervilhas (*Pisum sativum*. L) cultivadas em solo Mukherjee et al. (2014) observaram efeito positivo e similar entre ZnO-NP e ZnO comum (125-500 mg kg^{-1}), onde ambas as fontes promoveram um crescimento radicular duas vezes maior que o controle (sem adição do composto), porém o conteúdo de clorofila foi reduzido em mais de 60% para as duas fontes, o que certamente prejudicaria na produção das plantas. Em estudo com Fe_2O_3 -NPs (1000 mg kg^{-1}) observou-se efeito semelhante à fonte tradicional (Fe-EDTA) nos parâmetros de crescimento e teor de clorofila de plantas de amendoim (*Arachis hypogaea*), possibilitando a substituição do Fe-EDTA, a fim de reduzir a perda de Fe por lixiviação que é crítica nesses cultivos que são realizados em solos arenosos (RUI et al., 2016).

Além da aplicação direta ao solo como fertilizante, micronutrientes na forma de nanopartículas podem ser absorvidos pelas plantas a partir da disposição de materiais. Por exemplo, ZnO-NP é um dos materiais mais comumente utilizados em cosméticos, têxteis,

revestimentos industriais, agentes antibacterianos, materiais eletrônicos e filtros solares (WANG et al., 2013). O Zn está associado ao metabolismo de carboidratos, à integridade da membrana, a proteínas envolvidas na replicação do DNA e à expressão de genes; além disso, tem funções estrutural e catalítica em várias enzimas (STOREY, 2007; BROADLEY et al., 2012). O excesso de Zn, por outro lado, provoca clorose foliar, inibição do crescimento das raízes e alterações no fotossistema II (BROADLEY et al., 2012). Indiretamente pode provocar desbalanço no teor de outros nutrientes, por exemplo, em plantas de feijão (*Phaseolus sp*) cultivadas em solo contaminado com Zn o excesso do metal provocou redução no teor de Mg, Fe e Mn, os quais estão estreitamente a fotossíntese (VASSILEV et al., 2011). As faixas de concentração crítica de deficiência e toxicidade para Zn na maioria das plantas variam de 15 a 20 mg kg⁻¹ e de 100 até 300 mg kg⁻¹, em função da tolerância da espécie (EPSTEIN, 1965; EPSTEIN; BLOOM, 2005).

Tal como para os fertilizantes convencionais, é essencial o conhecimento das doses de Zn na forma de nanopartículas, bem como as concentrações equivalentes nas plantas que promovem aumento de produtividade, melhoria da qualidade do produto agrícola e fitotoxidez. A técnica de fluorescência de clorofila é uma ferramenta útil para avaliação de plantas submetidas a doses de micronutrientes (VASSILEV et al., 2011; MARQUES et al., 2014) ou de elementos tóxicos (JINHUA et al., 2009; SILVA et al., 2012).

As variáveis da fluorescência de clorofila utilizadas são: fluorescência inicial (F_0), fluorescência máxima (F_m), fluorescência variável ($F_v = F_m - F_0$), e o índice F_v/F_m . O valor de F_0 representa a emissão de luz pelas moléculas de clorofilas a excitadas, e pode ser alterado por estresses do ambiente que causam alterações estruturais nos pigmentos fotossintéticos do fotossistema II (KRAUSE; WEISS, 1991), o valor de F_m é obtido quando o processo fotoquímico está operando com eficiência e o declínio do índice F_v/F_m infere sobre danos no aparato fotossintético (BJÖRKMAN; DEMMIG-ADAMS, 1987). Em mamona (*Ricinus communis* L) exposta a Zn em solução nutritiva a medida da fluorescência de clorofila foi capaz de indicar alterações nas reações fotossintéticas mesmo antes do surgimento de sintomas visuais de fitotoxicidade (MARQUES et al., 2014), mostrando ser uma técnica útil para o monitoramento ambiental. Em mudas de videira (*Vitis vinifera*) cultivadas em solo contaminado com Zn, o excesso do metal causou efeito negativo nas variáveis de fluorescência de clorofila, que se mostraram boas indicadoras da fitotoxicidade de Zn para esta cultura (ZALAMENA et al., 2015).

Dado o potencial para uso futuro de fertilizantes na forma de nanopartículas, o presente trabalho objetivou avaliar doses de ZnO nas formas comum e de nanopartículas (NP) aplicadas

em solo cultivado com feijão-caupi (*Vigna unguiculata*). Parâmetros de crescimento, avaliação do status nutricional e alterações no aparato fotossintético foram utilizados para comparar os efeitos das duas fontes e das doses utilizadas sobre as plantas.

4.2 Material e Métodos

Para utilização no experimento, o solo foi coletado na camada de 0-20 cm, secado ao ar, destorroado e passado em peneira com malha de 4 mm de abertura. Para caracterização química e física (EMBRAPA, 1999), foi utilizada uma amostra de solo peneirada a 2 mm e que apresentou os seguintes resultados: pH (H₂O) 6,0; matéria orgânica (MO) 20,5 g dm⁻³; P (Melich-1) 29,4 mg dm⁻³; Ca 4,33 cmol_c dm⁻³; Mg 1,20 cmol_c dm⁻³; K 0,15 cmol_c dm⁻³; H + Al 4,63 cmol_c dm⁻³; Zn disponível (Mehlich-1) 3,37 mg dm⁻³; Zn ambientalmente disponível (USEPA, 1998) 9,47 mg kg⁻¹; e 700, 260 e 40 g kg⁻¹ de areia, silte e argila, respectivamente.

O delineamento experimental foi o de blocos casualizados, no esquema fatorial 2 x 5, com três repetições. Os tratamentos compreenderam duas fontes de ZnO (comum e nanoparticulado) aplicadas em cinco doses (0, 100, 300, 500 e 800 mg dm⁻³). As fontes foram homogeneizadas em um volume de 5 dm³ de solo seco, ao qual foram adicionados 250 mg kg⁻¹ de N, 240 mg kg⁻¹ de P, 150 mg kg⁻¹ de K, e 100 mg kg⁻¹ de S, na forma de NH₄SO₂, NH₄H₂PO₄ e KNO₃; os micronutrientes Fe (FeSO₄.7 H₂O), Mn (MnCl₂.4H₂O), B (H₃BO₃), e Mo (Na₂MoO₄.2H₂O) foram aplicados nas concentrações de 2, 4, 1, e 0,2 mg kg⁻¹, respectivamente, todos na forma de solução. Os vasos foram cultivados com sementes de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp. – variedade Miranda IPA 207), mantendo-se duas plantas por vaso. Após 110 dias as plantas foram colhidas, separadas em raiz e parte aérea, secadas a 65°C por 72h, pesadas e trituradas em moinho de facas.

A digestão do material vegetal foi realizada pelo método EPA 3051 em forno de micro-ondas (USEPA, 1998); para controle de qualidade foi utilizado uma amostra de referência para teores de Zn em folhas de espinafre (NIST 1570a). Para avaliação do status nutricional das plantas foram determinados no extrato digerido os teores de Zn, Fe, Cu e Mn por ICP-OES, P por colorimetria e K por fotometria de chama. O teor de N foi determinado por titulação após digestão sulfúrica do material (EMBRAPA, 1999).

Para avaliar os danos ocasionados pelo Zn ao aparato fotossintético, foram utilizados a emissão de fluorescência de clorofila e o teor de clorofila a, clorofila b, carotenoides e xantofilas. As avaliações foram realizadas no folíolo central da terceira folha superior totalmente expandida, 75 dias após semeadura. Após 30 min de adaptação das folhas ao escuro, foram obtidos os valores da fluorescência inicial (Fo), máxima (Fm), variável (Fv) e capacidade

fotoquímica do fotossistema II ou eficiência quântica (Fv/Fm) por meio de fluorômetro portátil (FluorPen, model FP100, Photon Systems Instruments).

A mesma folha utilizada para determinação da fluorescência foi usada para determinação dos pigmentos - clorofila a, clorofila b, carotenoides e xantofilas (LICHTENTHALER; BUSCHMANN, 2001). A extração foi realizada em acetona 80% por 24h, a leitura da absorvância foi realizada em espectrofotômetro, sendo o teor de clorofilas determinado após aplicação das seguintes equações:

$$Cla = 2,25A_{663,2} - 2,79A_{646,8}$$

em que,

Cla – clorofila a, $\mu\text{g mL}^{-1}$;

$A_{663,2}$ – absorvância no comprimento de onda de 663,2 nm;

$A_{646,8}$ - absorvância no comprimento de onda de 646,8 nm.

$$Clb = 21,50.A_{646,8} - 5,10.A_{663,2}$$

em que,

Clb – clorofila b, $\mu\text{g mL}^{-1}$;

$A_{646,8}$ – absorvância no comprimento de onda de 646,8 nm;

$A_{663,2}$ - absorvância no comprimento de onda de 663,2 nm.

$$C + X = \left(\frac{1000.A_{470} - 1,82.Cla - 85,02.Clb}{198} \right)$$

Em que,

C+X – carotenoides e xantofilas, $\mu\text{g mL}^{-1}$;

A_{470} – absorvância no comprimento de onda de 470 nm;

Cla – clorofila a, $\mu\text{g mL}^{-1}$;

Clb - clorofila b, $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Os resultados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) a 5% de significância. Modelos de regressão linear e não linear foram ajustados as variáveis analisadas em função dos tratamentos. O coeficiente de determinação (R^2) foi utilizado como critério de melhor ajuste, ao nível de significância de 5% de probabilidade. Os valores médios das variáveis foram comparados pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) em função dos tipos de óxidos (comum e nanoparticulado). Todo procedimento estatístico foi realizado utilizando o software Sisvar (versão 5.3).

4.3 Resultados e Discussão

4.3.1 Crescimento e produção de biomassa

A altura das plantas diminuiu de forma significativa ($p < 0,05$) com o aumento da dose de ZnO aplicada ao solo, para ambas as fontes (Figura 1).

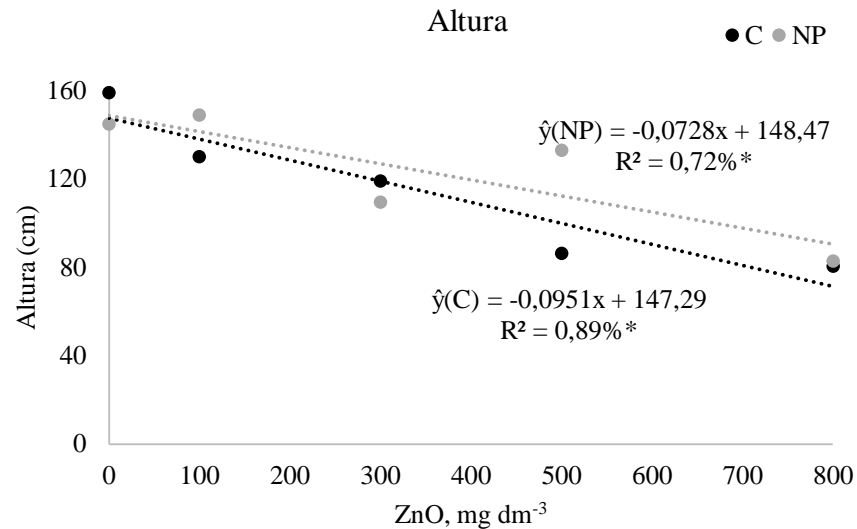


Figura 1. Altura (cm) das plantas de feijão-caupi cultivadas em solo sob doses de ZnO comum (C) e nanoparticulado (NP)

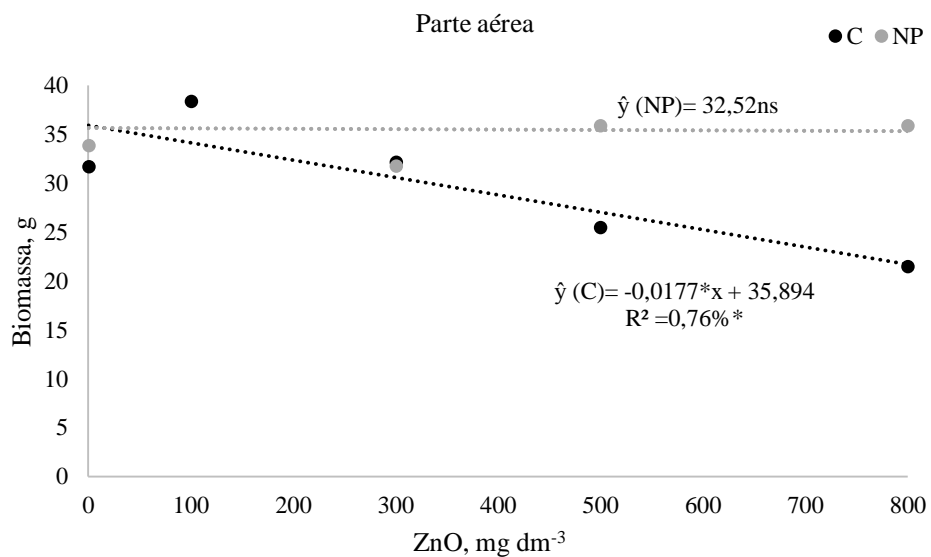


Figura 2. Biomassa da parte aérea de plantas de feijão-caupi cultivadas em solo, sob doses de ZnO comum (C) e nanoparticulado (NP)

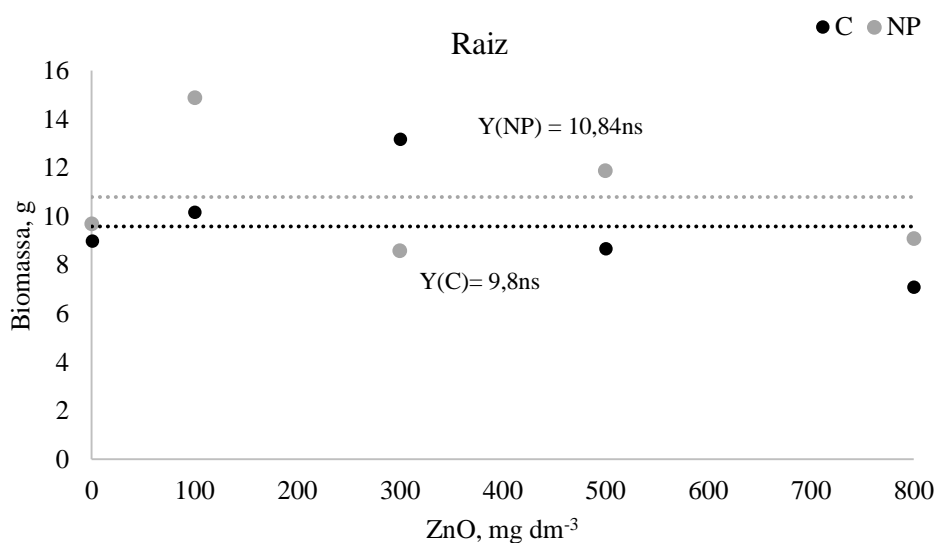


Figura 3. Biomassa radicular de plantas de feijão-caupi cultivadas em solo, sob doses de ZnO comum (C) e nanoparticulado (NP)

O efeito tóxico sobre a altura das plantas expostas ao ZnO-NP só foi verificado na dose de 800 mg dm⁻³ (Figura 1). A produção de biomassa das plantas expostas a fonte nanoparticulada não foi alterada de forma significativa ($p > 0,05$) (Figura 2). Similarmente, plantas de soja (*Glycine max*) cultivadas em solo contaminado com ZnO-NP não apresentaram diferença na produção de biomassa, comparadas ao tratamento sem adição do óxido (PRIESTER et al., 2012). Para o ZnO comum foi observado uma redução de 32% na biomassa da parte aérea, em comparação da dose mais alta ao controle.

Diminuição do crescimento e da produção de biomassa de plantas em condições de excesso de Zn é um comportamento comum (JAIN et al., 2010; GUIMARÃES et al., 2010; LIMA NETO; NATALE; MODESTO, 2015), devido a inibição da divisão celular e do alongamento (ALLOWAY, 2012) e ao efeito competitivo do Zn com Fe e Mn prejudicando reações enzimáticas ativadas por estes metais (MARSCHNER, 2012).

Em média, a produção de biomassa da parte aérea das plantas expostas ao ZnO-NP foi 19% maior do que o ZnO comum. Na dose mais baixa (100 mg dm⁻³) foi observado um pequeno estímulo na produção de biomassa da parte aérea de ambas as fontes (Figura 2), provavelmente, a esta dose a quantidade de Zn dissolvida ajustou a concentração de Zn disponível no solo a um patamar ideal para o desenvolvimento das plantas de feijão-caupi. Nas doses mais elevadas (500 mg dm⁻³ e 800 mg dm⁻³) a produção de biomassa da parte aérea com o ZnO-NP foi 41% e 67% maior que a fonte comum, respectivamente (Figura 2). Esse comportamento pode estar relacionado ao menor teor de Zn encontrado nas plantas nestas doses com a fonte

nanoparticulada, as quais foram cerca da metade do encontrado nas plantas supridas com ZnO comum (Figura 1).

A biomassa radicular não foi influenciada pelas doses e fontes adotadas, mas houve efeito significativo da interação dose x fonte. Novamente, a dose de 100 mg dm^{-3} de ZnO-NP promoveu uma produção de biomassa radicular 46% maior que a fonte comum. Na dose mais elevada o incremento foi de 28%. Demonstrando que ZnO-NP foi mais eficiente no suprimento de Zn nas doses mais baixas e não apresentou sintomas de fitotoxicidade nas doses mais elevadas.

4.3.2 Absorção de Zn pelas plantas

As doses de ZnO aplicadas, independentemente da fonte, propiciaram teores crescentes e similares de Zn disponível no solo, os quais variaram de $0,96$ a $130,55 \text{ mg kg}^{-1}$ para o ZnO comum e de $1,35$ a $144,55 \text{ mg kg}^{-1}$ para o ZnO-NP. O teor de Zn na biomassa das plantas seguiu a tendência de aumento das doses de ZnO no solo (Figura 4).

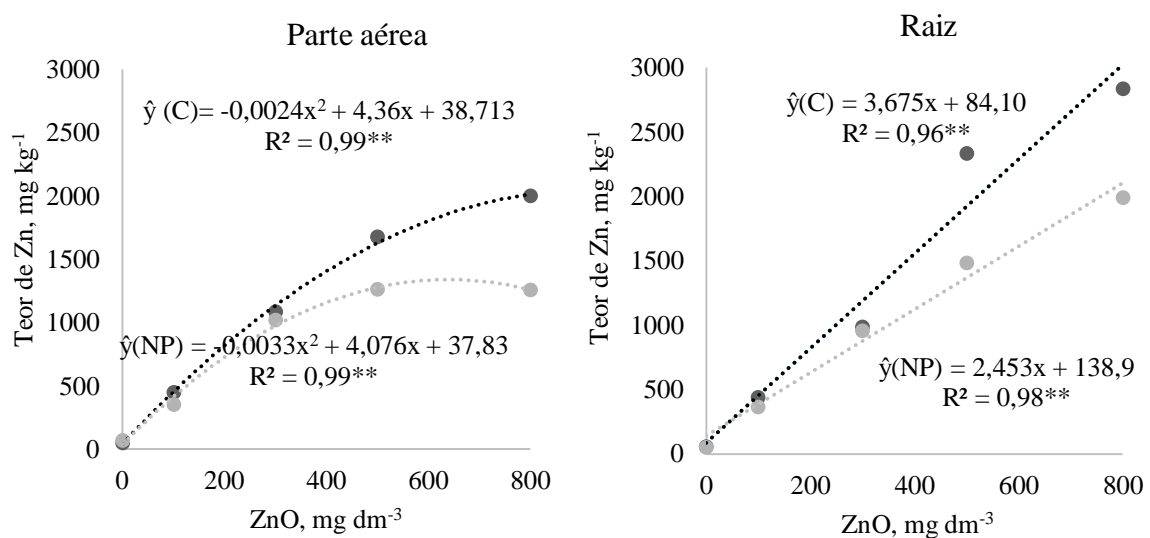


Figura 4. Teor de Zn no tecido da parte aérea e radicular de *Vigna unguiculata* exposta a ZnO comum e nanoparticulado

Até a dose de 300 mg dm^{-3} a taxa de absorção de Zn foi similar entre as fontes, provavelmente, o teor no solo seguiu a mesma tendência. A taxa de dissolução de ZnO comum, micro e nanoparticulado foi determinada por alguns autores (LEE et al., 2010; DIMKPA et al., 2011), que verificaram uma certa semelhança no teor de Zn solúvel quando as concentrações eram mais baixas e nas concentrações altas a fonte nanoparticulada apresentava maior solubilização.

A partir da dose 300 mg dm^{-3} , a concentração de Zn foi maior nas plantas submetidas ao ZnO comum em relação a fonte nanoparticulada (Figura 4). Na dose de 500 mg dm^{-3} e 800 mg dm^{-3} o teor de Zn foi 25% e 37% mais elevado para o ZnO comum que o ZnO-NP, respectivamente. É provável que a taxa de dissolução do ZnO-NP tenha ocorrido de forma mais rápida que a fonte convencional devido à maior reatividade destas partículas, imposta pela alta área de superfície específica (AUFFAN et al., 2009; LEE et al., 2010), e que o Zn liberado em solução tenha precipitado com o P ($\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$) fornecido para nutrição do feijoeiro, reduzindo tanto a disponibilidade de Zn, quanto a de P, para absorção pelas plantas, o fato pode ser confirmado pela redução significativa do teor de P na biomassa radicular das plantas (Tabela 1). Em um estudo sobre a cinética de dissolução de nanopartículas de ZnO na presença e ausência de fosfato Lv et al. (2012) constataram que o Zn liberado a partir da dissolução do ZnO-NP rapidamente reage com o P em solução para formar $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$, reduzindo tanto o teor de Zn quanto o de P da solução.

Enquanto que a taxa de dissolução do ZnO comum é mais lenta que a nanoparticulada, nesta fonte também deve ter ocorrido precipitação de Zn por P mas em menor quantidade. Em um estudo de investigação de óxido de metais nanoparticulados sobre o desenvolvimento de *Arabidopsis thaliana* verificou-se que a concentração de Zn liberado da dissolução de ZnO nanoparticulado (45 nm) foi 3 vezes maior que o ZnO microparticulado (820 nm) na dose de 4000 mg L^{-1} do produto (LEE et al., 2010), mostrando a influência do tamanho da partícula na reatividade e taxa de dissolução do produto.

A absorção de Zn pelas raízes das plantas tratadas com ZnO-NP também pode ter sido reduzida por uma provável aglomeração do produto na região da parede celular, apoplástica e na endoderme das raízes. Vários autores observaram este comportamento em plantas expostas a nanopartículas (LIN; XING, 2008; LEE et al., 2010, ZHANG et al., 2013, 2015). Mas somente Asli e Neumann (2009) mediram a condutividade hidráulica e o diâmetro dos poros da parede celular de plantas de milho cultivadas em solução nutritiva com suspensão coloidal de nanopartículas de TiO_2 e bentonita, os autores relataram redução no valor desses parâmetros e atribuíram essa redução a obstrução das raízes na região apoplástica.

4.3.3 Composição mineral das plantas

A aplicação de ZnO comum e NP ao solo não promoveu desequilíbrio no teor de nutrientes na parte aérea das plantas. Exceção ao teor de Fe, que reduziu de forma significativa, e o teor de K, que aumentou linearmente ($p < 0,05$), Tabela 1. A redução no teor de Fe, provavelmente, foi devido ao efeito de competição com Zn.

Tabela 1. Equação de regressão ajustada do teor de nutrientes (mg kg^{-1}) na parte aérea e na raiz de planta de feijão-caupi expostas a doses de ZnO nanoparticulado (NP) e comum (C)

Nutriente	Equação de regressão ajustada	R ²
K parte aérea NP	$\hat{y} = 0,0045x + 9,0226$	0,96*
K parte aérea C	$\hat{y} = 0,0112 + 9,4325$	0,88*
Fe parte aérea NP	$\hat{y} = -0,0363x + 85,696$	0,31*
Fe parte aérea C	$\hat{y} = 0,0002x^2 - 0,1253x + 81,886$	0,94*
P raiz NP	$\hat{y} = -5 \cdot 10^{-5}x + 0,1442$	0,73*
P raiz C	$\hat{y} = -9 \cdot 10^{-5}x + 0,176$	0,77*
Cu raiz NP	$\hat{y} = 4 \cdot 10^{-5}x^2 - 0,0504 + 29,375$	0,69*
Cu raiz C	$\hat{y} = 10^{-5}x^2 - 0,0079 + 23,5$	0,21*

NP, fonte nanoparticulada; C, fonte comum. *= significativo a 5%.

Em condições de excesso de Zn a absorção de Fe é reduzida, pois ambos são cátions divalentes e micronutrientes requeridos em maiores quantidades pelas plantas. Resultados semelhantes foram observados em outros trabalhos (MUKHERJEE et al., 2014; MARQUES et al., 2014). Por exemplo, o teor de Fe em plantas de feijão foi reduzido pela metade após exposição das plantas a $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Zn e que essa redução interferiu na produção de clorofila (VASSILEV et al., 2011). Essa redução no teor de Fe pode prejudicar as reações de oxirredução da fotossíntese, pois 80% do Fe na planta se encontra nos cloroplastos, prejudicando principalmente o fotossistema II (HANSCH; MENDEL, 2009; MARQUES et al., 2014). O efeito positivo sobre o K deve estar relacionado ao papel que o Zn exerce no controle da absorção de K pelas células guarda nas folhas (SHARMA; TRIPATHI; BISHT, 1995; SUBBA et al., 2014), o aumento do teor de Zn foliar permitiu um aumento na absorção e acumulação de K na biomassa da parte aérea.

Na raiz, os teores de Cu e P foram significativamente reduzidos em função da aplicação do ZnO (Tabela 1). Para o Cu, assim como discutido para Fe, deve ter ocorrido efeito antagônico entre os elementos. Para o P, a redução do teor na raiz deve estar relacionada a diminuição do teor de P disponível no solo pela precipitação com o Zn solúvel. Alguns trabalhos na literatura relatam que após a dissolução do ZnO nanoparticulado o íon Zn^{2+} reage com ânions de P ($\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$; HPO_4^{-2}) convertendo o P solúvel em fosfato de zinco (LV et al., 2012).

4.3.4 Fluorescência de clorofila e pigmentos

A emissão de fluorescência de clorofila foi utilizada para avaliar possíveis danos ao aparato fotossintético das plantas. Verificou-se efeito significativo para a interação fonte x dose nas variáveis F_0 e F_m . Na dose de 800 mg dm^{-3} a F_0 e F_m do tratamento com ZnO-NP foi 31%

e 41% maior que na fonte de ZnO comum, respectivamente (Tabela 2), indicando maior eficiência do processo fotossintético. Em mudas de videira cultivadas em solo com diferentes concentrações de Zn também foi possível verificar danos ao aparato fotossintético das plantas por meio das variáveis F_0 e F_m , que se mostraram boas indicadoras do nível de estresse causado pelo Zn nessa cultura (ZALAMENA et al., 2015). Em aveia preta cultivada em solo agrícola contaminado com Zn e Cu (metais utilizados em pesticidas) também foi verificado redução da F_0 e F_m resultando em declínio da eficiência fotoquímica (TIECHER et al., 2016).

A eficiência quântica máxima, F_v/F_m , obtida no tratamento com ZnO foi inferior à do ZnO-NP (Tabela 2), confirmando maiores danos ao aparato fotossintético das plantas expostas ao ZnO. Segundo Björkman & Demmig-Adams (1987), o índice F_v/F_m entre 0,754-0,896 é típico de plantas C_3 saudáveis; para plantas de *Vigna marina* o valor obtido foi de 0,830. Neste estudo somente as plantas expostas a ZnO comum a partir da dose de 300 mg dm⁻³ obtiveram índice inferior ao valor ideal, resultando em perda de eficiência fotoquímica, nesta dose as plantas não apresentaram sintomas visuais de toxicidade.

Tabela 2. Fluorescência inicial (F_0), fluorescência máxima (F_m) e índice de eficiência fotoquímica de plantas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) cultivadas em solo sob doses de ZnO comum (C) e nanoparticulado (NP)

ZnO mg dm ⁻³	F_0		F_m		F_v/F_m	
	C	NP	C	NP	C	NP
0	7054,5	7098,0	32792,7	30777,3	0,77	0,77
100	7065,7	7299,0	31286,3	29396,3	0,77	0,77
300	7786,0	6697,3	34591,3	28772,3	0,74	0,77
500	7412,7	7737,0	28653,0	30733,3	0,74	0,75
800	6336,5	8323,0	24732,5	34895,0	0,74	0,77
CV %	5,72		8,47		5,28	
Dose (D)	0,3341		0,4825		0,7636	
Fonte (F)	0,0642		0,6018		0,3976	
D x F	0,0001		0,0006		0,8613	

Essa perda de eficiência fotoquímica das plantas expostas ao ZnO comum está relacionada ao maior teor de Zn encontrado na biomassa da parte aérea nas doses mais elevadas e, conseqüentemente, ao efeito tóxico sobre a biossíntese de clorofila *a* que foi reduzida em 22% comparada ao controle ($p < 0,05$), tabela 3; enquanto que a adição de ZnO-NP não influenciou no teor de clorofila *a*. Em plantas de tomate tratadas com diferentes doses de Zn também foi verificado redução do teor de clorofila *a* em função do excesso de Zn em solução nutritiva, que prejudicou o desenvolvimento das plantas (CHERIF et al., 2010). Esse declínio

está associado a capacidade do Zn deslocar o Mg da molécula de clorofila (MARSCHNER, 2012). De forma geral, o teor de clorofila *a* foi 13% maior ($p < 0,05$) para a fonte ZnO-NP, comparada a fonte comum (Tabela 3). Para clorofila *b* o tratamento com ZnO-NP foi 24% maior que o ZnO (Tabela 3). Na dose de 800 mg dm⁻³ o teor de clorofila *b* no tratamento com ZnO-NP foi 58% superior a fonte comum. Esses resultados mostram que o ZnO-NP, nas doses testadas, não promoveu alterações no aparato fotossintético das plantas, revelando potencial para fertilização do solo com Zn e nutrição de plantas de *V. unguiculata*, mas, ainda se faz necessário estudos que avaliem os possíveis riscos à saúde humana provenientes da ingestão destes produtos.

Tabela 3. Teor de clorofila a (Cla), clorofila b (Clb) e carotenoides e xantofilas (car+xant), mg g⁻¹, em folhas de plantas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) cultivadas em solo sob doses de ZnO comum (C) e nanoparticulado (NP)

ZnO mg dm ⁻³	Cla		Clb		Car+xant.	
	C	NP	C	NP	C	NP
0	0,9	1,2	0,4	0,5	0,2	0,3
100	1,5	1,3	0,5	0,5	0,3	0,3
300	1,1	1,2	0,4	0,5	0,3	0,3
500	1,1	1,0	0,4	0,4	0,2	0,3
800	0,7	1,3	0,2	0,5	0,2	0,3
Média	1,1	1,2	0,4	0,5	0,2	0,3
CV %	16,0		18,0		19,0	
Dose (D)	0,0063		0,0886		0,0202	
Fonte (F)	0,0374		0,0027		0,0313	
D x F	0,0065		0,0124		0,5558	

4.4 Conclusões

Em doses baixas (100 mg dm⁻³) ambas as fontes de ZnO promovem a nutrição de *Vigna unguiculata* e melhoram os parâmetros de crescimento;

O excesso de Zn na planta promoveu alterações no balanço de nutrientes (K, Fe, P e Cu) que pode ter prejudicado o pleno desenvolvimento das plantas;

Não foram observadas alterações no aparato fotossintético das plantas expostas a ZnO-NP, mostrando potencial para uso como fertilizante do solo.

O ZnO comum promoveu fitotoxicidade à *V. unguiculata* nas doses superior a 300 mg dm⁻³, devido ao maior teor de Zn no tecido das plantas.

Referências

ALLOWAY, B. J. **Heavy Metals in Soils: Trace metals and metalloids in soils and their bioavailability** (Environmental Pollution). 3 ed. eBook. Dordrecht Springer, 2013.

ASLI, S.; NEUMANN, P. M. Colloidal suspensions of clay or titanium dioxide nanoparticles can inhibit leaf growth and transpiration via physical effects on root water transport. **Plant, Cell and Environment**, Hoboken, v. 32, p. 577–584, 2009.

AUFFAN, M.; ROSE, J.; WIESNER, M. R.; BOTTERO, J. Y. Chemical stability of metallic nanoparticles: A parameter controlling their potential cellular toxicity in vitro. **Environmental Pollution**, Oxford, v. 157, n. 4, p. 1127–1133, 2009

BJÖRKMANN, O.; DEMMIG-ADAMS, B. Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 k among vascular plants of diverse origins. **Planta**, New York, v. 170, n. 4, p. 489- 504, 1987.

CHERIF, J.; DERBEL, N.; NAKKACH, M.; von BERGMANN, H.; JEMAL, F.; BENLAKHDAR, Z. Analysis of in vivo chlorophyll fluorescence spectra to monitor physiological state of tomato plants growing under zinc stress. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Lausanne, v. 101, p. 332–339, 2010.

BROADLEY, M.; BROWN, P.; CAKMAK, I.; RENGEL, Z.; ZHAO, F. Function of Nutrients: Micronutrients. In: **Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants**. 3 ed., p. 191-248, 2012.

DIMKPA, C. O.; CALDER, A.; BRITT, D. W.; MCLEAN, J. E.; ANDERSON, A. J. Responses of a soil bacterium, *Pseudomonas chlororaphis* O6 to comercial metal oxide nanoparticles compared with responses to metal ions. **Environmental Pollution**, Oxford, v. 159, n. 7, p. 1749-1756, 2011.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Manual of chemical analysis of soils, plants and fertilizers**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 1999.

EPSTEIN, E. Mineral metabolism. In: Bonner, J. and Varner, J. E. (Eds). **Plant Biochemistry** London and Orlando: Academic Press, 1965. p. 438–466.

EPSTEIN, E.; BLOOM, A. **Mineral Nutrition of Plants: Principles and Perspectives**, 2 ed., Sinauer Associates Inc. Publishers, 2005. p. 400.

GUIMARÃES, A. A.; MENDONÇA, V.; TOSTA, M. D. S.; DANTAS, D. D. J.; PAULA, Y. C. M.; RODRIGUES, G. S. O. Doses de sulfato de zinco na produção de mudas de pinheira. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 5, n. 2, p. 153-158, 2010.

HANSCH, R.; MENDEL, R. R. Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 12, n. 3, p. 259-266, 2009.

JAIN, R.; SRIVASTAVA, S.; SOLOMON, S.; SHRIVASTAVA, A. K.; CHANDRA, A. Impact of excess zinc on growth parameters, cell division, nutrient accumulation, photosynthetic pigments and oxidative stress of sugarcane (*Saccharum* spp.). **Acta Physiologiae Plantarum**, Heidelberg, v. 32, n. 5, p. 979-986, 2010.

JINHUA, Z.; KELI, Y.; ZHONGGUI, Z.; WUSHENG, J.; DONGHUA, L. Antioxidant response system and chlorophyll fluorescence in chromium (VI)- treated *Zea mays* L. seedlings. **Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica**, Warszawa, v. 51, n. 1, p. 23–33, 2009.

KOTTEGODA, N.; SANDARUWAN, C.; PRIYADARSHANA, G.; SIRIWARDHANA, A.; RATHNAYAKE, U. A.; ARACHCHIGE, D. M. B.; KUMARASINGHE, A. R.; DAHANAYAKE, D.; KARUNARATNE, V.; AMARATUNGA, G. A. J. Urea-hydroxyapatite nanohybrids for slow release of nitrogen. **ACS Nano**, Washington, v. 11, n. 2, p. 1214–1221, 2017.

KRAUSE, G.H.; WEIS, E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. Annual Review Plant Physiology, **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, California, v.42, p.313-349, 1991. Disponível em: <<https://doi.org/10.1146/annurev.pp.42.060191.001525>>.

LEE, C. W.; MAHENDRA, S.; ZODROW, K.; LI, D.; TSAI, Y.C.; BRAAM, J. Developmental phytotoxicity of metal oxide nanoparticles to *Arabidopsis thaliana*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Hoboken, v. 29, n. 3, p. 669–675, 2010.

LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMANN, C. Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, v. 1, n. 1, p. F4.3.1-F4.3.8, 2001. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/0471142913.faf0403s01>>.

LIMA NETO, A. J.; NATALE, W.; MODESTO, V.C. Resposta de porta-enxertos de caramboleira à adubação com zinco. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 37, n. 4, p. 1074-1082, 2015.

LIN, D.; XING, B. Root uptake and phytotoxicity of ZnO nanoparticles. **Environmental Science & Technology**, Washington, v. 42, n. 15, p. 5580–5585, 2008. Disponível em: <<http://doi.org/10.1021/es800422x>>.

LIU, R.; LAL, R. Synthetic apatite nanoparticles as a phosphorus fertilizer for soybean (*Glycine max*). **Scientific Reports**, London, v. 4, n. 5686, p. 1–6, 2014.

LIU, R.; ZHANG, H.; LAL, R. Effects of stabilized nanoparticles of copper, zinc, manganese, and iron oxides in low concentrations on lettuce (*Lactuca sativa*) seed germination: nanotoxicants or nanonutrients? **Water Air & Soil Pollution**, Dordrecht, v. 227, n. 42, 2016.

LV, I.; ZHANG, S.; LUO, L.; HAN, W.; ZHANG, J.; YANG, K.; CHRISTIE, P. Dissolution and microstructural transformation of ZnO nanoparticles under the influence of phosphate. **Environmental Science & Technology**, Washington, v. 6, p. 7215–7221, 2012. Disponível em: <<http://doi.org/10.1021/es301027a>>.

MAHAJAN, P.; DHOKE, S. K.; KHANNA, A. S. Effect of nano-zno particle suspension on growth of mung (*Vigna radiata*) and gram (*Cicer arietinum*) seedlings using plant agar method. **Journal of Nanotechnology**, Cairo, v. 2011, n. 696535, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1155/2011/696535>>.

MARQUES, M. C.; NASCIMENTO, C. W. A. Tolerância de mamona a zinco avaliada por fluorescência de clorofila e nutrição das plantas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 38, p. 850-857, 2014.

MUKHERJEE, A.; PERALTA-VIDEA, J. R.; BANDYOPADHYAY, S.; RICO, C. M.; ZHAO, L.; GARDEA-TORRESDEY, J. L. Physiological effects of nanoparticulate ZnO in green peas (*Pisum sativum* L.) cultivated in soil. **Metallomics**, Cambridge, v. 6, p. 132—138, 2014.

PRADHAN, S.; PATRA, P.; DAS, S.; CHANDRA, S.; MITRA, S.; DEY, K. K.; AKBAR, S.; PALIT, P.; GOSWAMI, A. Photochemical modulation of biosafe manganese nanoparticles on *Vigna radiata*: a detailed molecular, biochemical, and biophysical study. **Environmental Science & Technology**, Washington, v. 47, p. 13122–13131, 2013.

PRIESTER, J. H.; GE, Y.; MIELKE, R. E.; HORST, A. M.; MORITZ, S. C.; ESPINOSA, K.; GELB, J.; WALKER, S. L.; NISBET, R. M.; AN, Y.; SCHIMEL, J. P.; PALMER, R. G.; HERNANDEZ-VIEZCAS, J. A.; ZHAO, L.; GARDEA-TORRESDEY, J. L.; HOLDEN, P. A. Soybean susceptibility to manufactured nanomaterials with evidence for food quality and soil fertility interruption. **PNAS**, v. 109, n. 37, p. E2451-E2456, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1073/pnas.1205431109>>.

RAO, S.; SHEKHAWAT, G. S. Toxicity of zinc oxide engineered nanoparticles and evaluation of their effect on growth, metabolism and tissue specific accumulation in *Brassica juncea*. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, Santa Maria, v. 2, n. 1, 105–114, 2014.

RICO, C. M.; MAJUMDAR, S.; DUARTE-GARDEA, M.; PERALTA-VIDEA, J. R.; GARDEA-TORRESDEY, J. L. Interaction of nanoparticles with edible plants and their possible implications in the food chain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Washington, v. 201159, n. 8, p. 3485–3498, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/jf104517j>>.

RUI, M.; MA, C.; HAO, Y.; GUO, J.; RUI, Y.; TANG, X.; ZHAO, Q.; FAN, X.; ZHANG, Z.; HOU, T.; ZHU, S. Iron Oxide Nanoparticles as a Potential Iron Fertilizer for Peanut (*Arachis hypogaea*). **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v 7, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00815>>.

SCENIHR- SCIENTIFIC COMMITTEE ON EMERGING AND NEWLY IDENTIFIED HEALTH RISKS. **The appropriateness of existing methodologies to assess the potential risks associated with engineered and adventitious products of nanotechnologies**. European Commission Health & Consumer Protection Directorate-general, 2006. Disponível em: <https://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_scenih/ docs/scenih_r_o_003b.pdf>.

SHARMA, P. N.; TRIPATHI, A.; BISHT, S. S. Zinc requirement for stomatal opening in cauliflower. **Plant Physiology**, Rockville, v. 107, p. 751–756, 1995.

SILVA, A. J.; NASCIMENTO, C.W.A.; GOUVEIA-NETO, A.S. & SILVA-JR, E.A. LED-induced chlorophyll fluorescence spectral analysis for the early detection and monitoring of cadmium toxicity in maize plants. **Water Air & Soil Pollution**, Dordrecht, v. 223, p. 3527-3533, 2012.

SOUZA, E.P.; SILVA, I.F.; FERREIRA, L. E. Mecanismos de tolerância a estresses por metais pesados em plantas. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.17, n.2-4, p.167-173, 2011.

SUBBA, P.; MUKHOPADHYAY, M.; MAHATO, S. K.; BHUTIA, K. D.; MONDAL, T. K.; GHOSH, S. K. Zinc stress induces physiological, ultra-structural and biochemical changes in mandarin orange (*Citrus reticulata* Blanco) seedlings. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, New York, v. 20, n. 4, p. 461–473, 2014.

TIECHER, T. L.; CERETTA, C. A.; FERREIRA, P. A. A.; NICOLOSO, F. T.; SORIANI, H. H.; TASSINARI, A.; PARANHOS, J. T.; CONTI, L.; BRUNETTO, G. Physiological and nutritional status of black oat (*Avena strigose* Schreb.) grown in soil with interaction of high doses of copper and Zinc. **Plant Physiology and Biochemistry**, Issy-Les-Moulineaux, v. 106, p.253-263, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.05.015>>.

USEPA- UNITED STATE ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Method 3051A – Microwave assisted acid digestion of sediments, sludges and soils**. Washington, 1998. 14p. Disponível em:<http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3051a.pdf>.

VASSILEV, A.; NIKOLOVA, A.; KOLEVA, L.; LIDON, F. Effects of excess Zn on growth and photosynthetic performance of young bean plants. **Journal of Phytology**, v. 3, n. 6, p. 58-62, 2011.

WANG, PENG; MENZIES, NEAL W.; LOMBI, ENZO; MCKENNA, BRIGID A.; JOHANNESSEN, BERNT; GLOVER, CHRIS J.; KAPPEN, PETER; KOPITTKE, PETER M. Fate of ZnO nanoparticles in soils and cowpea (*Vigna unguiculata*). **Environmental Science & Technology**, Washington, v. 47, n. 23, p. 13822–13830, 2013. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1021/es403466p>>.

ZALAMENA, J.; MELO, G. W.; SANTOS, H. P.; SILVA, L. S.FIALHO, F. B. BRUNETTO, G. Physiological characterization of grapevine rootstocks grown in soil with increasing zinc doses. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola Ambiental**, Campina Grande, v. 19, n. 10, p. 973–980, 2015.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O emprego da nanotecnologia ainda é muito incipiente em todos os setores industriais, inclusive no setor agrícola; contudo, os investimentos crescem a cada ano, aumentando as expectativas de melhorias nessas áreas. O uso de nanofertilizantes na agricultura deve promover a nutrição de plantas com maior eficiência que os fertilizantes convencionais, com menor toxicidade e perdas por lixiviação. O ZnO-NP e o CuO-NP apresentam potencial para nutrição de plantas de feijão-caupi, mas estudos com taxas de aplicação mais baixas e em diferentes tipos de solos devem ser realizados para melhor diferenciar as taxas de aplicação agrônômica entre as fontes convencional e nanoparticulada.