

JAQUELINE RIBEIRO DO NASCIMENTO SILVA

**AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES DE CRESCIMENTO E DO PERFIL
BIOQUÍMICO POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO DE PLÂNTULAS
DE *Lactuca sativa L.* EXPOSTAS A SULFATO DE NÍQUEL**

SERRA TALHADA,

2021



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
UNIDADE ACADÊMICA DE SERRA TALHADA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO

**AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES DE CRESCIMENTO E DO PERFIL
BIOQUÍMICO POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO DE PLÂNTULAS
DE *Lactuca sativa L.* EXPOSTAS A SULFATO DE NÍQUEL**

JAQUELINE RIBEIRO DO NASCIMENTO SILVA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação da Universidade Federal Rural de Pernambuco como exigência para obtenção do título de Mestre.

Linha de pesquisa: Ecologia, Conservação e uso da Biodiversidade de Ambientes Terrestres.

Prof. Dr. Rogério de Aquino Saraiva

Orientador

Prof^a. Dra. Andréa Monteiro S. Silva Brito

Co-orientadora

SERRA TALHADA,

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- S586a Silva, Jaqueline Ribeiro do Nascimento Silva
AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES DE CRESCIMENTO E DO PERFIL BIOQUÍMICO POR ESPECTROSCOPIA
NO INFRAVERMELHO DE PLÂNTULAS DE *Lactuca sativa* L. EXPOSTAS A SULFATO DE NÍQUEL / Jaqueline
Ribeiro do Nascimento Silva. - 2021.
53 f. : il.
- Orientador: Rogerio de Aquino Saraiva.
Coorientadora: Andrea Monteiro Santana Silva Brito.
Inclui referências.
- Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e
Conservação, Serra Talhada, 2021.
1. Ecotoxicologia. 2. Metais pesados. 3. Metabólicos primários. 4. Germinação de plantas. 5. Espectroscopia. I.
Saraiva, Rogerio de Aquino, orient. II. Brito, Andrea Monteiro Santana Silva, coorient. III. Título

CDD 338.95



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA PÓS-GRADUAÇÃO
UNIDADE ACADÊMICA DE SERRA TALHADA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO**

**AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES DE CRESCIMENTO E DO PERFIL
BIOQUÍMICO POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO DE PLÂNTULAS
DE *Lactuca sativa L.* EXPOSTAS A SULFATO DE NÍQUEL**

JAQUELINE RIBEIRO DO NASCIMENTO SILVA

Dissertação julgada adequada para obtenção do título de mestre em Biodiversidade e Conservação. Defendida e aprovada em 28/06/2021 pela seguinte Banca Examinadora.

Prof. Dr. Rogério de Aquino Saraiva - Orientador
[Unidade Acadêmica de Serra Talhada/UFRPE]

Prof^a. Dr^a. Andréa Monteiro Santana Silva Brito – Coorientadora
[Unidade Acadêmica de Serra Talhada/UFRPE]

Prof. Dr. Marcelo Batista de Lima – Membro Externo (Titular)
[Unidade Acadêmica de Serra Talhada/ UFRPE]

Prof^a. Dr^a. Kelem Silva Fonseca – Membro Externo (Titular)
[Unidade Acadêmica de Serra Talhada/ UFRPE]

Prof. Dr. Diego de Souza Buarque – Membro Interno (Suplente)
[Unidade Acadêmica de Serra Talhada/ UFRPE]

Prof^a. Dr^a. Katya Maria Oliveira de Sousa – Membro Interno (Suplente)
[Unidade Acadêmica de Serra Talhada/ UFRPE]

**Dedico esse trabalho ao meu querido esposo com
amor e carinho ... Luiz Carlos**

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar ao meu Amigo, Senhor e razão de tudo que sou, tudo que tenho e o que serei no futuro meu amado Jesus Cristo. Aos meus queridos e amados pais, Geraldo José e Maria Isabel pelo amor, zelo, força, orações. Aos meus irmãos Jonathas Ribeiro, Sérgio José e a todos meus familiares que acreditaram no meu sucesso, amo vocês!

Ao meu melhor amigo, professor, companheiro, meu grande amor Luiz Carlos da Silva Júnior, aquele que me apoiou e incentivou em tudo, antes, durante e após, sempre presente ao meu lado suportando as lutas e dificuldades incentivando-me a perseverar até o fim. Obrigado meu esposo por tudo, te amo! À minha nova família que Deus me deu, meus sogros Claudeci e Luiz Carlos, por toda ajuda e cuidado nesta etapa da minha vida. Aos meus amigos e irmãos na fé pelo encorajamento e as muitas orações por mim durante essa jornada.

Aos Prof.^o Dr. Rogério de Aquino Saraiva e Prof.^a Dra. Andréa Monteiro Santana Silva Brito pela confiança, orientação, cuidado, compreensão e por todo apoio necessário durante o desenvolvimento da pesquisa.

A todos os professores do Programa da Pós-graduação em Biodiversidade e Conservação da Universidade Federal Rural de Pernambuco, por terem contribuído para minha formação acadêmica. Aos membros da banca examinadora Prof.^o Dr. Marcelo Batista de Lima e Prof.^o Dr. Ramom Rachide Nunes pelas contribuições realizadas nos seminários A e na qualificação para aperfeiçoamento do trabalho.

Ao Doutor José Francielson pela ajuda na parte quimiométrica e a professora Katya Maria Oliveira de Sousa por todas as contribuições.

Aos meus amigos de trabalho do Laboratório de Química na Unidade Acadêmica de Serra Talhada, Ewson Andrade, José Felipe, Anderson José, Lorena Cristina e Francisco Danilo pela compreensão e apoio durante o meu afastamento necessário para minha formação e as minhas amigas, técnicas do laboratório de Biologia, Nadja Graciele, Priscila Alves e Suzana Henrique.

À FACEPE (PRONEX/NUQAAPE (APQ-0346-1.06/14)), ao Grupo de Análises Química (UAST / UFRPE), ao Grupo de Estudos em Bioquímica e Ecotoxicologia Molecular - UFRPE, ao programa de Pós-graduação em Biodiversidade e conservação, a Unidade Acadêmica de Serra Talhada / UFRPE e à professora Maria Fernanda Pimentel Avelar (DEQ/UFPE) pelo uso dos softwares The Unscrambler X, versão 10.2 (CAMO S.A.) e MATLAB.

RESUMO

O níquel apesar de ser um micronutriente essencial para vários organismos, em determinadas concentrações pode implicar de forma negativa na biodiversidade. Neste trabalho, utilizou-se a espectroscopia na região do infravermelho médio (MID) com tratamentos estatísticos para identificar as alterações no crescimento e mudanças no perfil bioquímico em plântulas de alface induzida por sulfato de níquel (NiSO_4) cultivada em microambientes e correlacionar com dados biométricos e fisiológicos (percentual de germinação (%G), índice de velocidade de germinação (IVG), comprimento da radícula (CR) e do hipocótilo (CH), índice de vigor (IV) e índice de tolerância ao níquel (IT)). Sementes de alface foram germinadas em diferentes ambientes (água destilada (controle) e NiSO_4 nas concentrações 0,081, 0,161 e 0,323 mmolL^{-1}). As folhas cotiledonares das plântulas de alface (FCAs) foram submetidas à análise espectroscópica MID por reflexão total atenuada (ATR). Os valores de CR, IV e IT reduziram significativamente ($P < 0,05$) nos tratamentos NiSO_4 0,161 mmolL^{-1} e 0,323 mmolL^{-1} quando comparados ao controle. A análise por componentes principais (PCA) dos dados espectrais das FCAs permitiu explicar 98,91% da variância total utilizando três componentes principais. Considerando as análises dos picos no espectro, foram notados mudanças significativas ($P < 0,05$, ANOVA e Teste de Tukey) na intensidade de vibração molecular entre os números de onda 1100 cm^{-1} – 1231 cm^{-1} ; 1355 cm^{-1} – 1366 cm^{-1} e 1738 cm^{-1} , além de deslocamentos de picos significativos ($P < 0,05$, teste de Kruskal-Wallis) entre os números de onda 2845 cm^{-1} – 2930 cm^{-1} . Conjuntamente, os dados sugerem um aumento na biossíntese de carboidratos (pectina, celulose) e lipídios estruturais nas FCAs na concentração 0,081 mmolL^{-1} quando comparado com o controle devido a disponibilidade do íon SO_4^{2-} como ativador de rotas metabólicas de biossíntese e, ao mesmo tempo, decréscimo dependente da concentração de Ni^{+2} na intensidade vibracional de grupos funcionais dessas biomoléculas em concentrações mais elevadas de NiSO_4 , como consequência do aumento da bioacumulação de Ni^{+2} . Os deslocamentos de pico podem estar relacionados à formação de complexos de Ni^{+2} com biomoléculas. A utilização do MID possibilitou a avaliação da composição e intensidade das bandas, e quando associada com os tratamentos estatísticos, mostrou-se uma ferramenta promissora e complementar aos estudos do efeito dos metais tóxicos na germinação das plantas.

Palavras-chave: Ecotoxicologia, Metais tóxicos, Metabólicos primários, Germinação de plantas, Espectroscopia.

ABSTRACT

Nickel despite being an essential micronutrient for several organisms, in certain concentrations can have a negative impact on biodiversity. In this work, spectroscopy in the mid-infrared region (MID) was used with statistical treatments to identify changes in growth and changes in the biochemical profile of lettuce seedlings induced by nickel sulfate (NiSO_4) grown in microenvironments and to correlate with biometric data and physiological (germination percentage (%G), germination speed index (VGI), radicle length (RL) and hypocotyl length (HL), vigor index (IV) and nickel tolerance index (TI)). Lettuce seeds were germinated in different environments (distilled water (control) and NiSO_4 at concentrations of 0.081; 0.161 and 0.323 mmolL^{-1}). Cotyledon leaves of lettuce seedlings (CLLs) were subjected to MID spectroscopic analysis by attenuated total reflection (ATR). The values of RL, VI and TI significantly reduced ($P < 0.05$) in NiSO_4 0.161 mmolL^{-1} and 0.323 mmolL^{-1} treatments when compared to the control. The principal component analysis (PCA) of the spectral data of the CLLs allowed explaining 98.91% of the total variance using three principal components. Considering the analysis of the peaks in the spectrum, significant changes ($P < 0.05$, ANOVA and Tukey's test) were noted in the intensity of molecular vibration between wave numbers 1100 cm^{-1} – 1231 cm^{-1} ; 1355 cm^{-1} – 1366 cm^{-1} and 1738 cm^{-1} , plus significant peak shifts ($P < 0.05$, Kruskal-Wallis test) between wave numbers 2845 cm^{-1} – 2930 cm^{-1} . Together, the data suggest an increase in the biosynthesis of carbohydrates (pectin, cellulose) and structural lipids in CLLs at a concentration of 0.081 mmolL^{-1} when compared to the control due to the availability of the SO_4^{2-} ion as an activator of biosynthesis metabolic pathways and at the same time, Ni^{+2} concentration dependent decrease in the vibrational intensity of functional groups of these biomolecules at higher NiSO_4 concentrations, as a consequence of increased Ni^{+2} bioaccumulation. Peak shifts may be related to the formation of Ni^{+2} complexes with biomolecules. The use of MID enabled the evaluation of the composition and intensity of the bands, and when associated with statistical treatments, it proved to be a promising and complementary tool to studies of the effect of toxic metals on plant germination.

Keywords: Ecotoxicology, Heavy Metals, Primary Metabolics, Plant Germination, Spectroscopy.

Lista de figuras

Artigo científico I

	Página
Figura 1- (a) Scores da PCA e (b) Loadings da PCA de 46 amostras em toda região investigada.	33
Figura 2- Média dos espectros de UATR-FTIR das folhas cotiledonares de plântulas de <i>Lactuca sativa</i> L. (n = 12 por tratamento) tratadas com água destilada (controle, linha preta) ou sulfato de níquel (NiSO ₄) nas concentrações de 0,081 mmolL ⁻¹ (linha verde), 0,161 mmolL ⁻¹ (linha azul) ou 0,323 mmolL ⁻¹ (linha vermelha), na faixa de 600 cm ⁻¹ a 4000 cm ⁻¹ . Na figura, são destacadas as regiões A, B e C. Os dados são expressos em unidades arbitrárias de absorvância, com correção da linha de base.	33
Figura 3- (a) Análise dos componentes principais (PCA) e (b) Loadings da PCA de 46 amostras dos espectros nas regiões A e B.	34
Figura 4- Região A (1000 cm ⁻¹ a 1300 cm ⁻¹), que apresenta a média dos espectros de UATR-FTIR das folhas cotiledonares de plântulas de <i>Lactuca sativa</i> L. (n = 12 por tratamento) tratadas com água destilada (controle, linha preta) ou sulfato de níquel (NiSO ₄) nas concentrações de 0,081 mmolL ⁻¹ (linha verde), 0,161 mmolL ⁻¹ (linha azul) ou 0,323 mmolL ⁻¹ (linha vermelha). Os dados são expressos em unidades arbitrárias de absorvância.	35
Figura 5- Média ± desvio padrão e valores individuais (n = 12) das absorvâncias (em unidades arbitrárias) detectadas no espectro de UATR-FTIR das folhas cotiledonares de plântulas de <i>Lactuca sativa</i> L. tratadas com água destilada (controle, círculos pretos) ou NiSO ₄ nas concentrações de 0,081 mmolL ⁻¹ (quadrados verdes), 0,161 mmolL ⁻¹ (triângulos azuis) ou 0,323 mmolL ⁻¹ (triângulos invertidos vermelhos) para os números de onda 1104 cm ⁻¹ , 1206 cm ⁻¹ , 1217 cm ⁻¹ e 1231 cm ⁻¹ da região A. Letras diferentes indicam diferença estatística pela análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Tukey (P<0,05).	37

Figura 6 - Região B (1300 cm^{-1} a 1850 cm^{-1}), que apresenta a média dos espectros de UATR-FTIR das folhas cotiledonares de plântulas de *Lactuca sativa* L. (n = 12 por tratamento) tratadas com água destilada (controle, linha preta) ou sulfato de níquel (NiSO_4) nas concentrações de 0,081 mmolL^{-1} (linha verde), 0,161 mmolL^{-1} (linha azul) ou 0,323 mmolL^{-1} (linha vermelha). Os dados são expressos em unidades arbitrárias de absorbância. 38

Figura 7- Média \pm desvio padrão e valores individuais (n = 12) das absorbâncias (em unidades arbitrárias) detectadas no espectro de UATR-FTIR das folhas cotiledonares de plântulas de *Lactuca sativa* L. tratadas com água destilada (controle, círculos pretos) ou NiSO_4 nas concentrações de 0,081 mmolL^{-1} (quadrados verdes), 0,161 mmolL^{-1} (triângulos azuis) ou 0,323 mmolL^{-1} (triângulos invertidos vermelhos) para os números de onda 1355 cm^{-1} , 1366 cm^{-1} , 1635 cm^{-1} e 1738 cm^{-1} da região B. Letras diferentes indicam diferença estatística pela análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Tukey ($P < 0,05$). 40

Figura 8- Região C (2820 cm^{-1} a 3000 cm^{-1}), que apresenta a média dos espectros de UATR-FTIR das folhas cotiledonares de plântulas de *Lactuca sativa* L. (n = 12 por tratamento) tratadas com água destilada (controle, linha preta) ou sulfato de níquel (NiSO_4) nas concentrações de 0,081 mmolL^{-1} (linha verde), 0,161 mmolL^{-1} (linha azul) ou 0,323 mmolL^{-1} (linha vermelha). Os dados são expressos em unidades arbitrárias de absorbância. 41

Figura 9 - Média \pm desvio padrão e valores individuais (n = 12) das absorbâncias (em unidades arbitrárias) para o número de onda 2970 cm^{-1} (gráfico à esquerda) e dos números de onda do pico de maior intensidade entre os números de onda 2915-2930 cm^{-1} (gráfico do meio) e 2845-2855 cm^{-1} (gráfico à direita) detectadas no espectro de UATR-FTIR das folhas cotiledonares de plântulas de *Lactuca sativa* L. tratadas com água destilada (controle, círculos pretos) ou NiSO_4 nas concentrações de 0,081 mmolL^{-1} (quadrados verdes), 0,161 mmolL^{-1} (triângulos azuis) ou 0,323 mmolL^{-1} (triângulos invertidos vermelhos), na região C. Letras diferentes indicam diferença estatística pela análise 43

de variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Tukey ($P < 0,05$, gráfico à esquerda) e pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn ($P < 0,05$, gráficos do meio e à direita).

Figura 10 - Processos metabólicos associados de forma direta ou indireta ao SO_4^{2-} , com base na literatura de Kopriva e Rennenberg (2004) e Davidian e Kopriva (2010).

45

Listas de Tabelas

Artigo científico I

	Página
Tabela 1- Características da germinação e desenvolvimento inicial de <i>Lactuca sativa</i> L. germinadas na presença de diferentes concentrações de sulfato de níquel (NiSO ₄). Médias representados por letras diferentes, na mesma coluna, diferem significativamente, teste de ANOVA de um fator e teste de Tukey (p<0,05).	31
Tabela 2- Atribuições das bandas de absorbância dos espectros de infravermelho médio das folhas cotiledonares de plântulas de <i>Lactuca sativa</i> L. na presença de sulfato de níquel na Região A.	36
Tabela 3- Atribuições das bandas de absorbância dos espectros de infravermelho médio das folhas cotiledonares de plântulas de <i>Lactuca sativa</i> L. na presença de sulfato de níquel na Região B.	39
Tabela 4 - Atribuições das bandas de absorbância dos espectros de infravermelho médio das folhas cotiledonares de plântulas de <i>Lactuca sativa</i> L. na presença de sulfato de níquel na Região C.	42

Sumário

	Página
Dedicatória	5
Agradecimentos.....	6
Resumo.....	7
Abstract.....	8
Lista de Figuras.....	9
Lista de Tabelas.....	12
1- Introdução geral	14
2- Referências bibliográficas.....	18
3 - Artigo científico.....	23
3.1- Artigo científico I.....	24

1- INTRODUÇÃO GERAL

Durante as últimas décadas, várias ações antrópicas como: atividades na agricultura e indústrias de metal, mineração, fertilizantes e pesticidas, descarte de resíduos de indústrias eletrônicas, entre outros, além do aumento da intensidade de processos naturais como a atividade vulcânica, corrosão de metal, ressuspensão de sedimentos, erosão do solo e intemperismo geológico, têm conjuntamente permitido elevar a quantidade de elementos metálicos e metalóides no ambiente, levando à bioacumulação e biomagnificação na cadeia alimentar (SONG e Li, 2015; BRIFFA et al., 2020) e ameaçando negativamente a saúde humana e ambiental (AMARI et al., 2017; BRIFFA et al., 2020; ZHANG et al., 2021).

A literatura indica que o limite seguro de N^{+2} em plantas é de $1,5 \text{ mg g}^{-1}$ e no solo pode ser 75 e 150 mg g^{-1} . Em frutas e vegetais pode variar entre $0,08 - 0,26$ e $0,03$ e $0,16 \text{ mg kg}^{-1}$ (KUMAR et al., 2021). Dependendo da quantidade de determinados metais no organismo, estes podem afetar as funções biológicas e o crescimento, ao mesmo tempo que podem acumular em um ou mais órgãos como fígado, coração, cérebro e rins causando muitas patologias graves, como danos ao sistema nervoso central (deficiências mentais, deficiências cognitivas e neurológicas), hepatotoxicidade e câncer (SONG e Li, 2015; WANG et al., 2018; BRIFFA et al., 2020; KOTHAPALLI, 2021, KUMAR et al., 2021; RENU et al., 2021 ZHANG et al, 2021). O estresse oxidativo induzido nas células pela geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) é, em parte, desencadeado pela presença desses contaminantes metálicos bioacumulados no organismo (RENU et al., 2021).

O níquel (Ni^{+2}) é um metal amplamente empregado em atividades antrópicas como na fabricação de diversas ligas, baterias e outros dispositivos eletrônicos. Naturalmente, o níquel é 22º elemento mais abundante na crosta terrestre, sendo duas vezes maior que o cobre (Cu) e aproximadamente compreende a cerca de 0,008% da crosta terrestre (AMARI et al., 2017; SHAHZAD et al., 2018).

Do ponto de vista biológico, o Ni^{+2} é um micronutriente essencial para plantas e microrganismos, uma vez que é um cofator das enzimas urease, glicoxalase, peptídeo deformilase e Ni-superóxido dismutase (SEREGIN e KOZHEVNIKVA, 2006; MÁRQUEZ-GARCÍA et al., 2013, ZHAO et al., 2019). No entanto, organismos terrestres e aquáticos

podem facilmente absorver e hiperacumular Ni^{+2} e outros metais tóxicos. Essa hiperacumulação de metal pode levar a alterações morfológicas, funcionais e morte por efeitos genotóxicos e citotóxicos como consequência da interferência negativa em importantes vias metabólicas, incluindo o aumento de espécies reativas de oxigênio (MICHALAK, 2006; GUPTA et al., 2009, SILVA e MATOS, 2016, SHAHID et al., 2017). Além disso, metais bioacumulados em plantas também podem biomagnificar na cadeia alimentar, contaminando diversos organismos, incluindo o próprio ser humano pela ingestão de alimentos contaminados (SHAHID et al., 2017; ZHAO et al., 2019).

Numa célula vegetal, o conjunto de reações químicas que ocorrem continuamente é chamado de metabolismo. O metabolismo nas plantas está dividido em basal (i.e., metabolismo primário) e especial (i.e., metabolismo secundário). No metabolismo primário, ocorrem os processos essenciais à vida, tais como a fotossíntese, a respiração e o transporte de solutos. Os compostos envolvidos no metabolismo primário possuem uma distribuição universal nas plantas. Esse é o caso dos aminoácidos, dos nucleotídeos, dos lipídios, carboidratos e da clorofila. Já no metabolismo secundário se origina compostos que não possuem uma distribuição universal, pois não são necessários para todas as plantas. No entanto, ele desempenha um papel importante na interação das plantas com o meio ambiente. Existem três grandes grupos de metabólitos secundários: terpenos, compostos fenólicos e alcaloides (TÜRKER-KAYA e HUCK, 2017; SIMÕES et al. 2017). Assim, pode-se afirmar que cada planta pode exibir um tipo de impressão digital padrão do seu perfil bioquímico para cada condição ambiental.

Quando as plantas são expostas a alterações ambientais como, por exemplo, estresse hídrico, salinidade e acúmulo de contaminantes, como os metálicos, espera-se que o perfil bioquímico deste órgão seja também modificado, como estratégia da planta para garantir sua sobrevivência. A análise destas mudanças no perfil bioquímico relacionado ao conteúdo total de biomoléculas pode revelar pistas importantes quanto às interferências metabólicas que podem ocorrer na planta após a absorção de um agente tóxico (incluindo metais tóxicos e outros contaminantes), permitindo desta forma melhorar o entendimento da toxicologia desse contaminante em nível molecular (YANG e YEN, 2002; D'SOUZA et al., 2008; AMARI et al., 2017; TÜRKER-KAYA e HUCK, 2017; USMAM et al., 2019).

Geralmente, as análises que se utilizam para avaliar as mudanças bioquímicas nas plantas por efeitos de metais tóxicos são baseados em ensaios enzimáticos, histológicos e técnicas analíticas específicas. (KAMRAN et al., 2016; DEBNATH, 2018; HELLAL et al., 2018; AGUIRRE et al., 2018; KHANLARIAN et al., 2020). Apesar de confiáveis, as metodologias levam um tempo relativamente elevado de análise e algumas dependem da experiência do analista (TAAMALLI et al., 2014; SYAM et al., 2016; LIU et al., 2021). Assim, dentre as metodologias alternativas, o uso da espectroscopia na região do infravermelho (IR) tem sido indicada como uma ferramenta vantajosa em comparação com métodos convencionais, pois é mais rápida, não necessita de reagentes, as amostras não precisam ser processadas e podem identificar mudanças bioquímicas diretamente no tecido do vegetal em estudo (WESTWORTH et al., 2019; YANG e YEN, 2002; LUZ e CROWLEY, 2010; MAZUREK et al., 2013; GUPTA e SIVAKUMARAN, 2016; RANA et al., 2018; CHOW e TING, 2019; LIU et al., 2021).

Os espectros de IR originam-se devido a diversas variações de energia causadas por transições de um estado vibracional / rotacional para outro (SKOOG, 2002). A espectroscopia vibracional é baseada no conceito de que as ligações entre os átomos que formam as moléculas vibram com frequência particular (PASQUINI, 2003). Assim, a aplicação do infravermelho médio (MIR) na caracterização e identificação de compostos orgânicos é amplamente reconhecida. Nessa região, pequenas alterações na estrutura e na constituição de uma molécula resultam em mudanças significativas na distribuição dos picos de absorção do espectro que são relacionados com a estrutura da molécula. Com base nessa informação, a identificação de compostos pode ser realizada pela comparação do seu espectro MIR com bancos de dados existentes e, assim, revelando um perfil bioquímico para as condições ambientais consideradas (IVANOVA e SINGH, 2003; DA LUZ, 2006; RANA et al., 2008; BAKER et al., 2014; PENA et al., 2014; TÜRKER-KAYA e HUCK, 2017; RANA et al., 2018).

No entanto, em alguns casos, principalmente em amostras complexas como as biológicas, os espectros obtidos apresentam informações sobre muitos compostos químicos diferentes. Assim, para facilitar a interpretação dos espectros obtidos, é de grande importância

o uso da análise quimiométrica, ou seja, o emprego de métodos matemáticos e estatísticos para fornecer o máximo de informações químicas com análise dos dados obtidos visando à extração do maior leque de avaliações (FERREIRA et al., 1999). Dentro desta abordagem, existem várias ferramentas, entre as quais está a análise por componentes principais (PCA), que é uma técnica exploratória de dados, cujo objetivo é buscar visualizar similaridades e diferenças entre um conjunto de amostras em investigação (BEEBE et al., 1998). Outra forma de avaliar a diferença entre as médias amostrais com distribuição normal e se os fatores exercem influência em alguma variável dependente é o emprego da análise de variância (ANOVA), que pode ser de um fator ou mais de um fator ou via (VIEIRA, 2006).

Em análises de tecidos vegetais relacionados as mudanças provocadas por fatores abióticos e bióticos, Rana et al. (2018) utilizaram os espectros de infravermelho com transformada de Fourier e reflexão total atenuada (ATR-FTIR) em combinação com métodos estatísticos multivariados, para investigar o perfil bioquímico de espécies de plantas de pastagem relacionadas à intensidade de uso da terra. Os resultados sugeriram que a composição química da folha de algumas espécies responde à intensidade do uso da terra. Em outro trabalho, Rana et al. (2008) comprovaram que análise espectral FTIR em combinação com métodos estatísticos multivariados, como o PCA, pode distinguir a qualidade da madeira de uma mesma espécie cultivadas em diferentes regiões. Yang e Yen (2002) identificaram através dos espectros de folhas das plantas glicófita (*Arabidopsis*) e halófita (*Mesembryanthemum crystallinum*) sob estresse salino que houve mudanças na síntese e estrutura das plantas durante o seu desenvolvimento de acordo com as bandas relacionadas a composição química da parede celular, proteínas e carboidratos. Wilson et al. (2000) analisaram as propriedades moleculares dos polissacarídeos na parede celular do epiderme da cebola (*Allum cepa*) sob condições de hidratação e de estresse mecânico. D'Souza, (2008), Gupta e Sivakumaran (2016), Usman et al. (2019) realizaram estudos que corroboram com base nas informações espectrais, que o FTIR pode detectar mudanças estruturais e prováveis sítios de ligações induzidos pela presença de um poluente metálico nos grupos funcionais das biomoléculas presentes nos seres vivos, no meio ambiente terrestre e aquático.

Os metais de transição encontrados em amostras biológicas interagem com os grupos funcionais de biomoléculas, cuja composição pode ser determinada pela análise de sua absorção de luz infravermelha. O estudo dos efeitos causados pelos metais contaminantes nos

vegetais é de grande importância principalmente quando se deseja avaliar como as plantas respondem à intensidade da contaminação e como se procede a interação destes com as biomoléculas, pois o desenvolvimento tecnológico dos últimos anos tem contribuído para um aumento sistemático da contaminação ambiental por metais tóxicos (PIECHALAK et al., 2002; GUPTA e SIVAKUMARAN , 2016; USMAM et al., 2019; GASECKA et al., 2021), impactando assim todo ecossistema.

Já se sabe que concentrações elevadas de níquel (usado em experimentos controlados na forma de sulfato de níquel, NiSO₄) podem se acumular nas radículas, hipocótilos e folhas cotiledonares de plântulas de alface (*Lactuca sativa* L.), um organismo-modelo amplamente estudado em experimentos de toxicologia e ecotoxicologia. Esse acúmulo interfere negativamente na sua homeostase celular e, conseqüentemente, no desenvolvimento inicial da plântula, reduzindo significativamente seu comprimento (ZHAO et al., 2019). Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar as alterações no perfil bioquímico de compostos das folhas cotiledonares de plântulas de alface expostas a diferentes concentrações de sulfato de níquel usando a espectroscopia no infravermelho e comparar essas informações com dados de germinação, crescimento e tolerância ao estressor.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIRRE, C. F. V.; PÁEZ, F. A. R.; VARGAS, S. E. Effect of arbuscular mycorrhizae and mercury on *Lactuca sativa* (Asteraceae) seedling morpho – histology. **Environmental and Experimental Botany**, v.156, p. 197–202, 2018 .

AMARI, T., GHNAYA, T. & ABDELLEY, C. Nickel, cadmium and lead phytotoxicity and potential of halophytic plants in heavy metal extraction. **South African Journal of Botany**, v.111, p. 99-110, 2017.

BAKER, M.J., TREVISAN, J., BASSAN, P., BHARGAVA, R., BUTLER, H.J., DORLING, K.M., FIELDEN,P.R., FOGARTY, S.W., FULLWOOD, N.J., HEYS, K.A., HUGHES, C., LASCH, P., MARTIN-HIRSCH,P.L., OBINAJU, B., SOCKALINGUM, G.D., SULÉ-SUSO, J., STRONG, R.J., WALSH, M.J., WOOD,B.R., GARDNER, P., MARTIN, F.L.. Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials. **Nature Protocols**, v.9, p.1771-1791, 2014.

BEEBE, K. R.; RANDY, J. P.; SEASHOLTZ, M. B.; **Chemometrics: A practical guide**, 1^a ed.,Wiley Interscience: New York, 1998.

BRIFFA, J. ; SINAGRA, E. ; BLUNDELL, R. Heavy metal pollution in the environment and their toxicological effects on humans. **Heliyon**, v.6 , p.04691, 2020.

CHOW, Y.Y., TING, A. S. Y. Influence of fungal infection on plant tissues: FTIR detects compositional changes to plant cell walls. **Fungal Ecology**, v.37, p. 38 - 47, 2019.

D'SOUZA, L. DEVI, PRABHA, D. SHRIDHAR, M.P. AND NAIK, C.G. Use of Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy to Study Cadmium-Induced Changes in *Padina Tetrastromatica* (Hauck). **Analytical Chemistry Insights**, v. 3 , p. 135-143, 2008.

DA LUZ, B. R. Attenuated total reflectance spectroscopy of plant leaves: a tool for ecological and botanical studies. **New Phytologist**, v. 172, n. 2, p.305-318, 2006.

DEBNATH, M., ASHWATH, N., HILL, CB, CALLAHAN, DL, DIAS, DA, JAYASINGHE, NS, MIDMORE, DJ & ROESSNER, U. Comparative metabolic and ionic profiling de duas cultivares de *Stevia rebaudiana* Bert.(Bertoni) cultivado sob estresse salino. **Plant Physiol Biochem** , v.129, p. 56-70, 2018.

FERREIRA, M. M. C. ; ANTUNES ,A. M. ;MELGO, M. S. ; VOLPE, P. L. O. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, v.22, p.5, 1999.

GASECKA, M. , DRZEWIECKA K. , MAGDZIAK, Z. , PIECHALAK, A. , BUDKA, A. , WALISZEWSKA, B. , SZENTNER, K. , GOLINSKI, P., NIEDZIELSKI, P., BUDZYNSKA, S. , MLECZEK, M. Arsenic uptake, speciation and physiological response of tree species (*Acer pseudoplatanus*, *Betula pendula* and *Quercus robur*) treated with dimethylarsinic acid. **Chemosphere** , v.263 , p. 127859, 2021.

GUPTA, A. D., SIVAKUMARAN, K. Individual and combined toxic effect of nickel and chromium on biochemical constituents in *E. coli* using FTIR spectroscopy and Principle component analysis. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.130, p. 289-294, 2016.

GUPTA, D. K.; NICOLOSO, F.T.; SCHETINGER, M.R.C.; ROSSATO, L.V.; PEREIRA, L.B.; CASTRO, G.Y.; SRIVASTAVA, S.; TRIPATHI, R.D. Antioxidant defense mechanism in hydroponically grown *Zea mays* seedlings under moderate lead stress. **Journal of Hazardous Materials**, v. 172, n. 1, p. 479-484, 2009.

HELLAL, F.A.; EL-SHABRAWI, H.M.; ABD EL-HADY, M.; *ET AL.* Influence of PEG induced drought stress on molecular and biochemical constituents and seedling growth of Egyptian barley cultivars. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v.16, n. 1, p. 203-212, 2018.

IVANOVA, D. G., & SINGH, B. R. Nondestructive FTIR monitoring of leaf senescence and elicitor-induced changes in plant leaves. **Biopolymers: Original Research on Biomolecules**, v.72, n. 2, p. 79-85, 2003.

KAMRAN, M. A.; EQANI, S. A. M. A. S.; BIBI, S.; *ET AL.* Bioaccumulation of nickel by *E. sativa* and role of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) under nickel stress. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 126, p. 256-263, 2016.

KHANLARIAN, M.; ROSHANFAR, M.; RASHCHI, F.; *ET AL.* Phyto-extraction of zinc, lead, nickel, and cadmium from zinc leach residue by a halophyte: *Salicornia europaea*. **Ecological Engineering**, v.148, p. 105797, 2020.

KOTHAPALLI, C. R. Differential impact of heavy metals on neurotoxicity during development and in aging central nervous system. ScienceDirect, **Current Opinion in Toxicology**, v.26, p. 33-38, 2021.

KUMAR, A. ; JIGYASU, D. K. ; KUMAR, A.; SUBRAHMANYAM, G. ; MONDAL, R. ; SHABNAM, A. A. ; CABRAL-PINTO, M. M. S. ; MALYAN, S. K. ; CHATURVEDI, A. K.; GUPTA, D. K. ; FAGODIYA, R. K. ; KHAN, S. A. ; BHATIA, A. Nickel in terrestrial biota: Comprehensive review on contamination, toxicity, tolerance and its remediation approaches. **Chemosphere**, v. 275, p. 129996, 2021.

LIU, X.; RENARD, C. M.G.C. ; BUREAU, S.; BOURVELLEC, C. L. Revisiting the contribution of ATR-FTIR spectroscopy to characterize plant cell wall polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 262, p. 117935, 2021.

LUZ, B. R.; CROWLEY, J. K. Identification of plant species by using high spatial and spectral resolution thermal infrared (8.0–13.5 μm) imagery. **Remote Sensing of Environment**, v.114, p. 404-413, 2010.

MÁRQUEZ-GARCÍA, B.; MÁRQUEZ C.; SANJOSÉ, I.; NIEVA, F.J.J.; RODRÍGUEZ-RUBIO, P.; MUÑOZ-RODRÍGUEZ, A.F. The effects of heavy metals on germination and seedling characteristics in two halophyte species in Mediterranean marshes. **Marine Pollution Bulletin**, v.70, p. 119-124, 2013.

MAZUREK, S., MUCCIOLO, A., HUMBEL, B.M., NAWRATH, C. Transmission Fourier transform infrared microspectroscopy allows simultaneous assessment of cutin and cell-wall polysaccharides of *Arabidopsis* petals. **Plant J.** ,v.74, p. 880-891, 2013.

MICHALAK, A. Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Plants Growing under Heavy Metal Stress. **Plant Cell**, v. 15, n. 4, p. 523-530, 2006.

PASQUINI, C. Near Infrared Spectroscopy: fundamentals, practical aspects and analytical applications. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.14, n.2, Mar./Apr, 2003.

PENA, R., LANG, C., NAUMANN, A., POLLE, A. Ectomycorrhizal identification in environmental samples of tree roots by Fourier transform infrared (FRIR) spectroscopy. **Front. Plant Sci.**, v.5, p. 1-9, 2014.

PIECHALAK, A., TOMASZEWSKA, B., BARALKIEWICZ, D. , MALECKA, A. Accumulation and detoxification of lead ions in legumes. **Phytochemistry** , v. 60 , p. 153-162, 2002.

RANA, R., MÜLLER, G., NAUMANN, A., ANDREA POLLE, A. FTIR spectroscopy in combination with principal component analysis or cluster analysis as a tool to distinguish beech (*Fagus sylvatica* L.) trees grown at different sites. **Holzforschung**, v. 62, p.530-538, 2008.

RANA, R., HERZ, K., BRUELHEIDE, H., DIETZ, S., HAIDER, S., JANDT, U., & PENA, R. Leaf Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR) biochemical profile of grassland plant species related to land-use intensity. **Ecological indicators**, v. 84, p.803-810, 2018.

RENU, K. ; CHAKRABORTY, R. ; MYAKALA, H.; KOTI, R.; FAMUREWA, A.C. ; MADHYASTHA, H. ; VELLINGIRI, B. ; GEORGE, ALEX; GOPALAKRISHNAN, A. V. Molecular mechanism of heavy metals (Lead, Chromium, Arsenic, Mercury, Nickel and Cadmium) - induced hepatotoxicity e A review. **Chemosphere** ,v. 271, p. 129735, 2021.

SEREGIN, I.V.; KOZHEVNIKOVA, A.D. Physiological role of nickel and its toxic effects on higher plants. **Russian journal of plant physiology**, v. 53, n. 2, p. 257-277, 2006.

SHAHID, M.; DUMAT, C.; KHALID, S.; SCHERER, E.; XIONG, T.; NIAZI, N.K. Foliar heavy metal uptake, toxicity and detoxification in plants: A comparison of foliar and root metal uptake. **Journal of Hazardous Materials**, v. 325, p. 36-58, 2017.

SHAHZAD, B. , TANVEER ,M. , REHMAN, A., CHEEMA, S. A. , FAHAD, S. , REHMAN, S. , SHARMA, A. Nickel; whether toxic or essential for plants and environment- A review. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.18, p. 30452-2, 2018.

SILVA, P.; MATOS, M. Assessment of the impact of Aluminum on germination, early growth and free proline content in *Lactuca sativa* L. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 131, p. 151-156, 2016.

SIMÕES, C.M; SCHENKEL, E.P.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Farmacognesia: do produto natural ao medicamento. 1ª ed. Porto Alegre: **Artmed**, p. 148, 2017.

SKOOG, HOLLER, NIEMAN. Princípios de Análise Instrumental, 5ª Edição, **Editora Bookman**, São Paulo-SP, 2002.

SONG, Q. , LI , J. A review on human health consequences of metals exposure to e-waste in China. **Environmental Pollution**, v.196 , p. 450 - 461, 2015.

SYAM, NETTY; WARDIYATI, TATIK; MAGHFOER, MUHAMMAD DAWAM; *ET AL.* Effect of Accumulator Plants on Growth and Nickel Accumulation of Soybean on Metal-contaminated Soil. **Agriculture and Agricultural Science Procedia**, v.9, p.13 -19, 2016.

TAAMALLI, M., GHABRICHE, R., AMARI, T., MNASRI, M., ZOLLA, L., LUTTS, S., ABDELY, C., GHNAYA, T. Comparative study of Cd tolerance and accumulation potential between *Cakile maritima* L. (halophyte) and *Brassica juncea* L. **Ecol. Eng.** , v.71, p. 623- 627, 2014.

TÜRKER-KAYA, S., HUCK, C.W. A Review of mid-infrared and near-infrared imaging: principles, concepts and applications in plant tissue analysis. **Molecules**, v.22, p.168, 2017.

USMAN, K., AL-GHOUTI M.A. & ABU-DIEYEH, M. H. The assessment of cadmium, chromium, copper, and nickel tolerance and bioaccumulation by shrub plant *Tetraena qataranse*. **Scientific Reports**, v.9, p. 5658, 2019.

VIEIRA, SÔNIA. Análise de Variância: ANOVA. **Editora Atlas**, São Paulo-SP, 2006.

WANG, G. ; ZHANG, S. ; ZHONG, Q. ; XU, X. ; LI, T. ; JIA, Y.; ZHANG, Y. ; PEIJNENBURG, W. J.G.M. ; VIJVER, M. G. Effect of soil washing with biodegradable chelators on the toxicity of residual metals and soil biological properties. **Science of the Total Environment**, v.625 , p.1021-1029, 2018.

WESTWORTH, S. ASHWATH. N. COZZOLINO, D. Application of FTIR-ATR spectroscopy to detect salinity in Saori Beauty Leaf Nanjappa Tree (*Calophyllum inophyllum* L). **Science Direct**, v.160, p.761-768, 2019.

WILSON R.H., SMITH, A.C., KAÈURÁKOVÁ, M., SAUNDERS, P.K., WELLNER, N., WALDRON, W. The mechanical properties and molecular dynamics of plant cell wall polysaccharides studied by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Plant Physiol.* v.124, p. 397-405, 2000.

YANG, J., YEN, H.E. Early salt stress effects on the changes in chemical composition in leaves of Ice plant and *Arabidopsis*. A Fourier transform infrared spectroscopy study. **Plant Physiol**, v.130, p. 1032-1042, 2002.

ZHANG, Y. ; ZHAO, M.; CHENG, Q. ; WANG, C. ; LI, H. ; HAN, X.; FAN, Z.; SU, G. ; PAN, D. ; LI, Z. Research progress of adsorption and removal of heavy metals by chitosan and its derivatives: A review. **Chemosphere**, v. 279, p.130927, 2021.

ZHAO, J. LU, C., TARIQ, M., XIAO, Q., ZHANG, W., HUANG, K., LU, Q. , LIN, K., LIU, Z. The response and tolerance mechanisms of lettuce (*Lactuca sativa* L.) exposed to nickel in a spiked soil system. **Chemosphere**, v. 222, p. 399-406, 2019.

4. ARTIGO CIENTÍFICO

4.1 Artigo científico I

Artigo científico a ser encaminhado a Revista *Journal of Hazardous Materials*

Todas as normas de redação e citação, doravante, atendem as estabelecidas pela referida revista, exceto o idioma e a posição das imagens, as quais estão localizadas ao longo do texto.

**AValiação DAS ALTERAÇÕES DE CRESCIMENTO E DO PERFIL
BIOQUÍMICO POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO DE PLÂNTULAS
DE *Lactuca sativa* L. EXPOSTAS A SULFATO DE NÍQUEL**

Jaqueline R. Nascimento-Silva¹, Paulo H. O. Miranda; Luiz C. Silva-Junior¹; Katya M. O. Sousa¹; José Francielson Q. Pereira²; Andréa M. S. S. Brito¹; Rogério A. Saraiva^{1,*}

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco/Unidade Acadêmica de Serra Talhada, Av. Gregório Ferraz Nogueira S/N, Serra Talhada, PE, Brasil.

²Universidade Estadual de Campinas, Departamento de Química, Campinas, SP, Brasil.

* Corresponding author. E-mail: rogerioaqsaraiva@hotmail.com, tel. +55 87 39293017

RESUMO

O níquel apesar de ser um micronutriente essencial para vários organismos, em determinadas concentrações pode implicar de forma negativa na biodiversidade. Neste trabalho, utilizou-se a espectroscopia na região do infravermelho médio (MID) com tratamentos estatísticos para identificar as alterações no crescimento e mudanças no perfil bioquímico em plântulas de alface induzida por sulfato de níquel (NiSO_4) cultivada em microambientes e correlacionar com dados biométricos e fisiológicos (percentual de germinação (%G), índice de velocidade de germinação (IVG), comprimento da radícula (CR) e do hipocótilo (CH), índice de vigor (IV) e índice de tolerância ao níquel (IT)). Sementes de alface foram germinadas em diferentes ambientes (água destilada (controle) e NiSO_4 nas concentrações 0,081, 0,161 e 0,323 mmolL^{-1}). As folhas cotiledonares das plântulas de alface (FCAs) foram submetidas à análise espectroscópica MID por reflexão total atenuada (ATR). Os valores de CR, IV e IT reduziram significativamente ($P < 0,05$) nos tratamentos NiSO_4 0,161 mmolL^{-1} e 0,323 mmolL^{-1} quando comparados ao controle. A análise por componentes principais (PCA) dos dados espectrais das FCAs permitiu explicar 98,91% da variância total utilizando três componentes principais. Considerando a análise espectral, foram observadas mudanças significativas na intensidade de vibração molecular e deslocamentos de picos. Conjuntamente, os dados obtidos sugerem um aumento na biossíntese de carboidratos (pectina, celulose) e lipídios estruturais nas FCAs na concentração 0,081 mmolL^{-1} quando comparado com o controle devido a disponibilidade do íon SO_4^{2-} como ativador de rotas metabólicas de biossíntese e, ao mesmo tempo, decréscimo dependente da concentração de Ni^{+2} na intensidade vibracional de grupos funcionais das biomoléculas em concentrações mais elevadas de NiSO_4 , como consequência do aumento da bioacumulação. Os deslocamentos de pico podem estar relacionados à formação de complexos. A utilização do MID possibilitou a avaliação da composição e intensidade das bandas, mostrando-se uma ferramenta promissora e complementar aos estudos do efeito dos metais tóxicos na germinação das plantas.

Palavras-chave: Ecotoxicologia, Metais tóxicos, Metabólicos primários, Germinação de plantas, Espectroscopia.

1 . INTRODUÇÃO

O níquel (Ni^{+2}) é um metal amplamente empregado em atividades antrópicas como na fabricação de diversas ligas, baterias e outros dispositivos eletrônicos (AMARI et al., 2017; SHAHZAD et al., 2018). Do ponto de vista biológico, o Ni^{+2} é um micronutriente essencial para plantas e microrganismos, uma vez que é um cofator das enzimas urease, glicoxalase, peptídeo deformilase e Ni-superóxido dismutase (SEREGIN e KOZHEVNIKVA, 2006; ZHAO et al, 2019). No entanto, organismos terrestres e aquáticos podem facilmente absorver e hiperacumular Ni^{+2} e outros metais tóxicos. Essa hiperacumulação de metal pode levar a alterações morfológicas, funcionais e morte por efeitos genotóxicos e citotóxicos como consequência da interferência negativa em importantes vias metabólicas, incluindo o aumento de espécies reativas de oxigênio (MICHALAK, 2006; GUPTA et al., 2009, SILVA e MATOS, 2016, SHAHID et al., 2017). Além disso, metais bioacumulados em plantas também podem contaminar diversos organismos, incluindo o próprio ser humano, via biomagnificação ao longo da cadeia alimentar (SHAHID et al., 2017; ZHAO et al, 2019).

O conteúdo total de biomoléculas do metabolismo primário (carboidratos, lipídios, proteínas e ácidos nucleicos) e secundário (terpenos, compostos fenólicos, alcaloides, glicosídeos) acumulado nas células, tecidos e órgãos da planta é essencial para garantir sua homeostase celular em função das condições ambientais e de suas informações genéticas (TÜRKER-KAYA e HUCK, 2017). Assim, pode-se afirmar que cada planta pode exibir um tipo de impressão digital padrão do seu perfil bioquímico para cada condição ambiental. Quando as plantas são expostas a alterações ambientais como, por exemplo, estresse hídrico, salinidade e acúmulo de contaminantes, espera-se que o perfil bioquímico deste órgão seja também modificada, como estratégia da planta para garantir sua sobrevivência. A análise destas mudanças no perfil bioquímico relacionado ao conteúdo total de biomoléculas pode revelar pistas importantes quanto às interferências metabólicas que podem ocorrer na planta após a absorção de um agente tóxico, permitindo desta forma melhorar o entendimento da toxicologia desse contaminante em nível molecular (YANG e YEN, 2002; D'SOUZA et al., 2008; AMARI et al., 2017; TÜRKER-KAYA e HUCK, 2017 ;USMAM et al., 2019).

Geralmente, as análises que se utilizam para avaliar as mudanças bioquímicas nas plantas por efeitos de metais tóxicos têm sido baseadas em ensaios ezimáticos, histológicos e

técnicas analíticas específicas (KAMRAN et al., 2016; DEBNATH et al., 2018; HELLAL et al., 2018; AGUIRRE et al. , 2018; KHANLARIAN et al., 2020). Apesar de confiáveis, boa parte desses métodos leva um tempo relativamente elevado de análises e utilizam muitos reagentes químicos (TAAMALLI et al., 2014; SYAM et al., 2016; LIU et al. , 2021). Assim, o uso da espectroscopia na região do infravermelho (IR) tem sido indicada como uma ferramenta alternativa vantajosa em comparação com métodos convencionais, pois é mais rápida, não necessita de reagentes, as amostras não precisam ser processadas e podem identificar mudanças bioquímicas diretamente no tecido do vegetal em investigação (WESTWORTH et al., 2019; YANG e YEN, 2002; GUPTA e SIVAKUMARAN, 2016; LUZ e CROWLEY, 2010; MAZUREK et al., 2013; RANA et al., 2018; CHOW e TING, 2019; LIU et al, 2021).

Estudos mostram que concentrações de níquel a partir 100 mg kg⁻¹ usado em experimentos controlados na forma de NiSO₄ podem se acumular nas radículas, hipocótilos e folhas cotiledonares de plântulas de alface (*Lactuca sativa* L.), um organismo-modelo amplamente estudado em experimentos de toxicologia e ecotoxicologia (ZHAO et al., 2019). Esse acúmulo interfere negativamente na sua homeostase celular e, conseqüentemente, no desenvolvimento inicial da plântula, reduzindo significativamente seu comprimento (ZHAO et al., 2019; KUMAR et al., 2021). Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar as alterações no perfil bioquímico de compostos das folhas cotiledonares de plântulas de alface expostas a diferentes concentrações de sulfato de níquel usando a espectroscopia no infravermelho e comparar essas informações com dados de germinação, crescimento e tolerância ao estressor.

2. MATERIAL E MÉTODOS

As sementes de *Lactuca sativa* L. (alface) obtidas comercialmente (cultivar Monica SF 31, Feltrin®, Farroupilha, Brasil) foram esterilizadas superficialmente através da imersão em solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 3% por 5 min e lavadas com água destilada autoclavada para remoção do excesso do hipoclorito de sódio.

Para evitar o desenvolvimento de fungos, o procedimento de semeadura foi conduzido sob condições assépticas dentro de um gabinete de fluxo laminar previamente esterilizada com álcool 70% (v/v) e luz UV (tempo de exposição à luz de 15 min), em

microambientes artificiais constituídos de placas de Petri (9 cm de diâmetro) esterilizadas e papel filtro qualitativo como substrato (25 sementes por réplica). Para o ensaio de toxicidade induzida por metais, as sementes de alface em placas de Petri foram tratadas com 3 mL de água destilada contendo sulfato de níquel anidro nas concentrações de 0,081, 0,161 e 0,323 mmolL⁻¹ e o grupo controle foi tratado com água destilada.

As concentrações de NiSO₄ foram escolhidas com base em estudos anteriores realizados pelo grupo de pesquisa (MIRANDA, 2019). O ensaio inicial de toxicidade foi realizado nas concentrações de 6,462x10⁻⁴, 6,462x10⁻³, 6,462x10⁻², 6,462x10⁻¹ e 6,462 mmolL⁻¹ que indicou uma concentração inibitória média (CI₅₀) da radícula próximo de 0,182 mmolL⁻¹ de NiSO₄. Então, definiu-se as concentrações mais próximas ao CI₅₀ com a finalidade de investigar melhor a faixa de concentração de 0,081, 0,161 e 0,323 mmolL⁻¹ de NiSO₄ (MIRANDA, 2019).

Os tratamentos foram dispostos em delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), com quatro repetições por tratamento e cada réplica com 25 sementes (HELLAL et al., 2018). Após a sementeira, todas as placas de Petri fechadas foram seladas com Parafilm M® e colocadas em uma câmara de crescimento com demanda bioquímica de oxigênio (FANEM), com temperatura controlada de 25 ± 1 ° C e fotoperíodo de 12 h claro a 12 h escuro durante sete dias, sendo observadas diariamente e o número de sementes germinadas contabilizados.

No sétimo dia, os comprimentos de radículas e hipocótilos (10 mudas aleatórias por réplica) foram medidos com um paquímetro para determinar os parâmetros biométricos para avaliação toxicológica no desenvolvimento de mudas e análise espectroscópica (SILVA e MATOS, 2016).

2.1 Parâmetros biométricos para avaliação toxicológica

2.1.1 Porcentagem de germinação (%G)

Durante os 7 dias de incubação de *Lactuca sativa* L. na estufa incubadora, foram contadas o número de sementes germinadas a cada 24 h. Quando a radícula atingiu 1 mm de comprimento, as sementes foram consideradas germinadas. A taxa de germinação foi calculada conforme a seguinte fórmula (MAGUIRE, 1962):

$$\%G = \frac{ng_t}{ns_t} \times 100 \quad (1)$$

Onde:

%G = Porcentagem de germinação (%);

ng_t = Número total de sementes germinadas;

ns_t = Número total de sementes.

2.1.2 Índice de velocidade de germinação (IVG)

Após o cálculo da taxa de germinação, equação (1), foi determinado o índice de velocidade de germinação das sementes pela equação (2) (Carvalho e Carvalho,2009):

$$IVG = \sum_{i=1}^n \frac{ng_i}{i} \quad (2)$$

Onde:

IVG = Índice de velocidade de germinação (sementes germinadas por dia);

ng_i = Número de sementes germinadas no dia *i*;

i = Dia observado;

n = Último dia observado.

2.1.3 Comprimento da radícula e do hipocótilo

A análise de morfometria linear foi realizada ao final do sétimo dia do experimento. Em cada replica selecionou-se dez plântulas e com auxílio de paquímetro foram mensurados o comprimento da radícula e do hipocótilo, onde os dados foram expressos em cm.

2.1.4 Índice de tolerância ao níquel (IT)

Com os dados de germinação e comprimento radicular, foi calculado o índice de tolerância (IT) ao estressor (TURNER e MARSHALL,1972) de acordo com a fórmula (3):

$$IT = 1 + \log \left(\frac{c_e}{c_o} \right) \quad (3)$$

Onde:

IT= Índice de tolerância ao níquel;

c_e = Comprimento esperado (Comprimento do grupo controle) (cm);

c_o = Comprimento observado (Comprimento do grupo observado) (cm).

2.1.5 Índice de vigor

O índice de vigor das plântulas de *Lactuca sativa* L., para cada grupo, foi determinado de acordo com a metodologia de Abdul-baki e Anderson, (1973), usando a formula (4):

$$IV = (CR + CH) \times \%G \quad (4)$$

Onde,

IV = Índice de Vigor (%);

CR = Comprimento da radícula (cm);

CH = Comprimento do hipocótilo (cm);

%G = Porcentagem de germinação (%).

3. Análises Espectroscópica (Infravermelho Médio – FTIR / UATR)

As análises espectrais das folhas foram realizadas em um espectrofotômetro de infravermelho, modelo Frontier da Perkin Elmer, utilizando o acessório Universal de Reflexão Total Atenuada (UATR). Os espectros foram adquiridos na região de 4000 - 600 cm^{-1} , resolução 4 cm^{-1} e 16 varreduras. O branco utilizado foi o ar e as medições foram realizadas diretamente nas folhas, sem pré-tratamento.

Para minimizar o erro das flutuações de linha de base, utilizou-se a média de três medidas sucessivas em quatro mudas, totalizando 12 repetições espectrais por tratamento.

4. Análise estatística

O delineamento inteiramente casualizado foi adotado para os experimentos e os resultados obtidos expressos em média \pm desvio padrão. Para dados paramétricos as médias foram submetidas a análise de variância (ANOVA) de um fator seguidos do teste de Tukey. Quando não-paramétricos, os dados foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis seguido da comparação múltipla de Dunn. Diferenças significativas entre as médias foram consideradas para o valor de $p < 0,05$. Para a realização das análises dos dados foi utilizado o software GraphPad Prism 6.

A análise exploratória das amostras foi realizada utilizando os dados espectrais de 46 amostras. Dentre as amostras apenas duas não tiveram o perfil similar com as demais, por isso retiramos para não interferir na média, sendo destruídas da seguinte maneira: 11 nas folhas germinadas em água como controle; 11 nas folhas germinadas em níquel com 0,0801 mmolL^{-1} ; 12 nas folhas germinadas em níquel com 0,161 mmolL^{-1} e 12 nas folhas germinadas em níquel com 0,323 mmolL^{-1} . A avaliação qualitativa do conjunto de dados permite identificar a formação de agrupamentos de amostras, que indicaria ou não se existe semelhança ou diferença quando se germina em ambiente com níquel em variadas concentrações. Para isso, utilizou-se análise por componentes principais (PCA) dos dados espectrais após pré-processamento para correção dos efeitos físicos indesejados. Todos os dados foram tratados usando o programa The Unscrambler® X, versão 10.2.

5. RESULTADOS

5.1 Índices de desenvolvimento e toxicidade na presença de sulfato de níquel

A tabela 1 mostra os indicadores de germinação e desenvolvimento inicial das plântulas de alface expostas a diferentes concentrações de sulfato de níquel. Os dados mostram que o percentual de germinação (%G) e o índice de velocidade de germinação (IVG) dos tratamentos não diferiram significativamente quando comparado com o grupo controle (Tabela 1).

Tabela 1- Características da germinação e desenvolvimento inicial de *Lactuca sativa* L. germinadas na presença de diferentes concentrações de sulfato de níquel (NiSO₄). Médias representados por letras diferentes, na mesma coluna, diferem significativamente, teste de ANOVA de um fator e teste de Tukey (p<0,05).

[NiSO ₄] mmolL ⁻¹	Percentual de germinação (%G)	Índice de velocidade de germinação	Comprimento da radícula (cm)	Comprimento do hipocótilo (cm)	Índice de tolerância (IT)	Índice de Vigor (IV)
0	100,00± 0,00 a	0,90 ± 0,03 a	5,01 ± 0,13 a	0,44 ± 0,01 a	0,99 ± 0,01 a	125,00 ± 3,38 a
0,081	100,00 ± 0,00 a	0,94 ± 0,01 a	5,44 ± 0,24 a	0,33 ± 0,01b	0,96 ± 0,01 a	136,10 ± 6,15 a
0,161	99,00 ± 1,00 a	0,87 ± 0,04 a	3,51 ± 0,17 b	0,39 ± 0,02 a	0,77 ± 0,04 b	87,04 ± 4,58 c
0,323	99,00 ± 1,00a	0,86 ± 0,02 a	1,12 ± 0,08 c	0,40 ± 0,01 a	0,27 ± 0,03 c	27,21 ± 1,81 d

Contudo, em relação ao comprimento da radícula, as plântulas de *L. sativa* demonstraram uma redução significativa nas concentrações 0,161 mmolL⁻¹ e 0,323 mmolL⁻¹ de NiSO₄ quando comparada com o controle (Tabela 1), evidenciando seu efeito tóxico. Quanto ao comprimento do hipocótilo, observa-se que não houve diferença significativa entre os tratamentos, exceto do grupo tratado com a concentração 0,081 mmolL⁻¹ de NiSO₄ que apresentou redução significativa de 25% quando comparado com o controle (Tabela 1).

Já o índice de tolerância (IT) diminuiu significativamente nas plântulas tratadas com 0,161 mmol L⁻¹ e 0,323 mmolL⁻¹ de NiSO₄ (p < 0,0001) em 22,2 % e 73,3%, respectivamente,

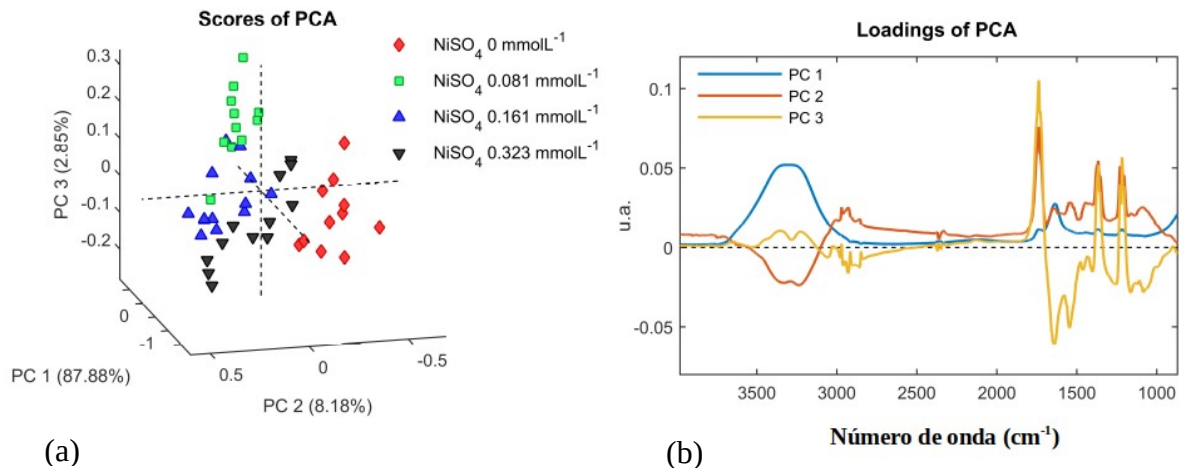
quando comparadas com o grupo controle. Esse indicativo reforça a toxicidade e mostra uma sensibilidade importante das plântulas de alface quando expostas a estas concentrações.

Os dados também mostram que o índice de vigor das plântulas foi afetado nas mesmas concentrações que o índice de tolerância, havendo uma diminuição no vigor de 30,4% e 78,2% respectivamente, comparando com o resultado de $125,3 \pm 3,38$ relacionado ao índice de vigor do grupo controle.

5.2 Análise espectroscópica das folhas cotiledonares de alface.

Os espectros de infravermelho das amostras foram pré-processados utilizando a técnica *multiplicative scattering correction* (MSC) para remover efeitos de linha de base e do espalhamento da radiação. Após a correção, os dados foram centrados na média e análise de PCA foi realizada utilizando a validação cruzada *venatian blinds* com 10 subgrupos e 10 ciclos. A variância total acumulada em três componentes (PC1 (87,88%), PC2 (8,18%) e PC3 (2,85)) foi de 98,91%. A Figura 1 (a) apresenta o gráfico de scores da PCA considerando os quatro grupos de amostras investigados. Observa-se um distanciamento entre os grupos de amostras germinada na presença do níquel e o conjunto de amostras germinadas sem influência de níquel. As amostras com menor concentração de níquel durante a germinação são as que mais se diferenciam das amostras puras em relação a primeira componente principal. Observando o gráfico de *loadings* para PC1 (Figura 1 (b)), fica evidente a forte influência da banda entre 3000 e 3500 cm^{-1} , geralmente associada a presença de hidroxilas na estrutura das moléculas. Com relação aos grupos de amostras com concentrações mais elevadas de níquel durante a germinação, a PC2 tem maior influência na separação desses dois grupos de amostras (Figura 1 (a)). Os *loadings* para da PC2 mostram que a região de impressão digital dos espectros (1000 a 1300 cm^{-1}), a região de característica de moléculas proteicas (1400-1900 cm^{-1}) e os picos em torno de 3000 cm^{-1} , têm uma forte influência sobre as amostras e a separação dos grupos observada. É importante ressaltar que essa separação também é observada para o conjunto de amostras germinadas na presença de níquel em menor concentração (0,081 mmolL^{-1}), contudo a influência da banda larga em 3500 cm^{-1} tem maior contribuição na separação e sobrepõe a influência das demais bandas.

Figura 1 - (a) Scores da PCA e (b) Loadings da PCA de 46 amostras em toda região investigada.



Além disso, é interessante notar no gráfico dos *loadings* (Figura 1 (b)), que além da banda larga de OH (em torno de 3500cm^{-1}), a qual não será abordada, uma vez que as amostras não foram secas, três regiões são indicadas como informativas e responsáveis pelos agrupamentos vistos na PCA, que aqui será denominada de região A, B e C, Figura 2.

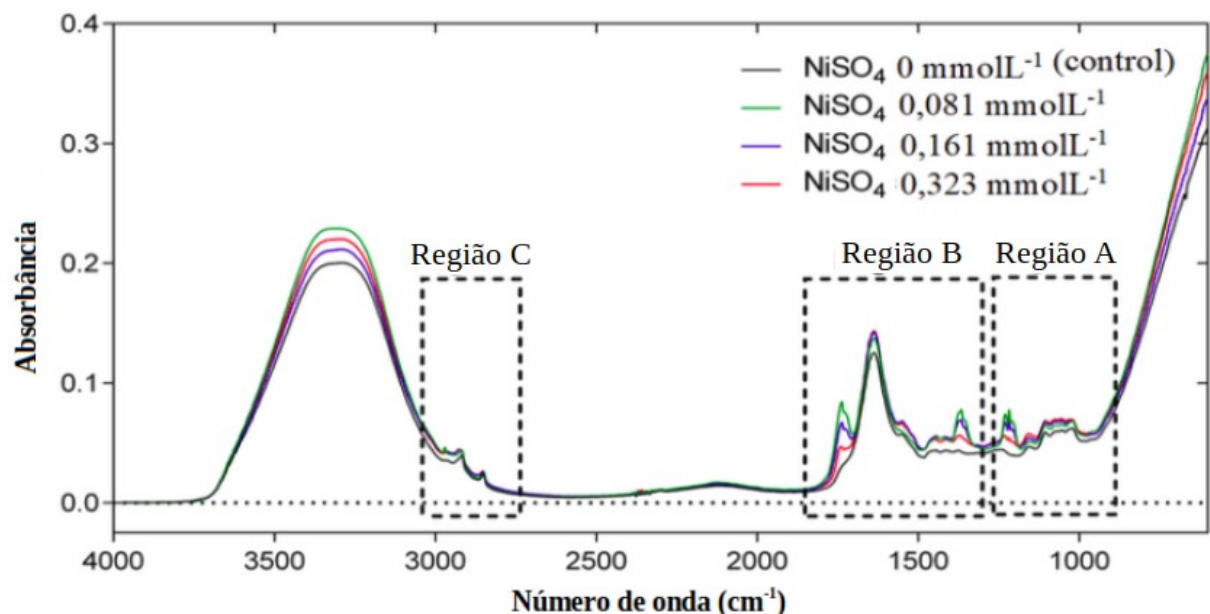


Figura 2 - Média dos espectros de UATR-FTIR das folhas cotiledonares de plântulas de *Lactuca sativa* L. ($n = 12$ por tratamento) tratadas com água destilada (controle, linha preta) ou sulfato de níquel (NiSO_4) nas concentrações de $0,081\text{ mmolL}^{-1}$ (linha verde), $0,161\text{ mmolL}^{-1}$ (linha azul) ou $0,323\text{ mmolL}^{-1}$ (linha vermelha), na faixa de 600 cm^{-1} a 4000 cm^{-1} . Na figura, são destacadas as regiões A, B e C. Os dados são expressos em unidades arbitrárias de absorvância, com correção da linha de base.

Essas três regiões mais informativas também são as regiões que a PCA identifica como mais importantes para diferenciar as amostras com diferentes formas de germinação, corroborando com o fato de o níquel alterar as propriedades química e bioquímica das plantas.

Tendo em vista a Figura 3 (a) dos scores da PCA para a faixa reduzida, fica mais evidente que a região de impressão digital é responsável pela separação entre as amostras controle e as demais, sendo que as amostras germinadas com menor concentração de níquel são as que mais se destacam em relação a amostras controle. Observando o gráfico de *loadings* (Figura 3 (b)), nota-se que essas amostras com menor concentração de níquel são positivamente influenciadas pelos picos em 1217 cm^{-1} , 1366 cm^{-1} e 1738 cm^{-1} .

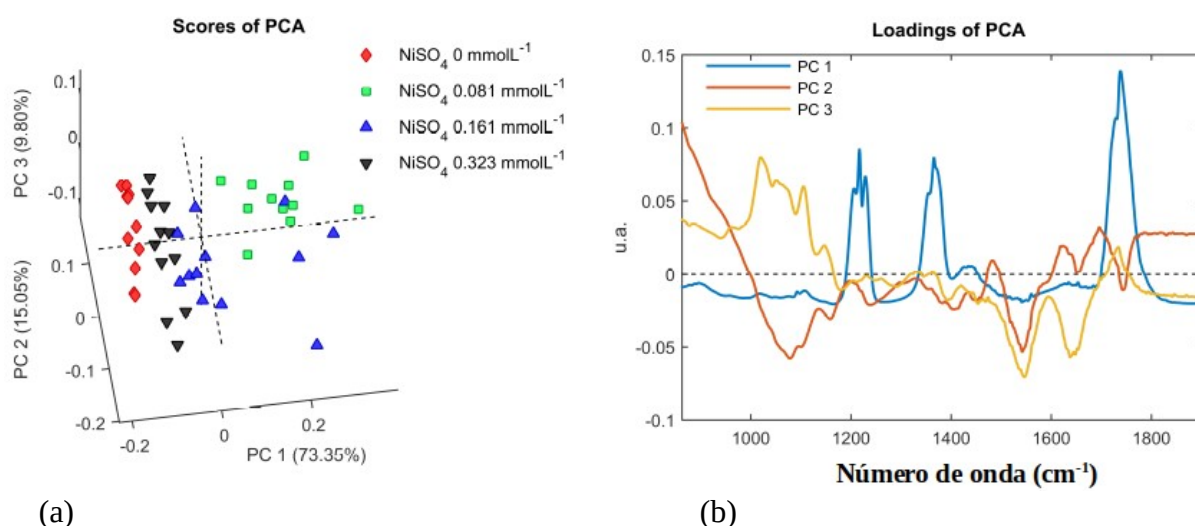


Figura 3 - (a) Scores da PCA e (b) Loadings da PCA de 46 amostras dos espectros nas regiões A e B.

Os grupos funcionais presentes nas biomoléculas em amostras de tecidos vegetais, podem ser observadas nos espectros na região do infravermelho de menor número de onda correspondente a curvas e vibrações do esqueleto de carbono ($600 - 1.450\text{ cm}^{-1}$); as regiões das bandas proteicas, amida I e amida II estão entre $1.500 - 1.800\text{ cm}^{-1}$ e a região de número de onda mais alto ($2.550 - 3.500\text{ cm}^{-1}$) está relacionado aos alongamentos de vibrações como SH, CH, NH e OH (BAKER et al., 2014; D'SOUZA et al., 2008; TÜRKER-KAYA e HUCK, 2017). Observa-se na Figura 2 uma região do espectro que vai de 600 até 4000 cm^{-1} , em destaque estão as regiões A, B e C que sinalizam os picos mais importantes para a análise.

A região A, Figura 4, que compreende as bandas de 1000 cm^{-1} a 1300 cm^{-1} está relacionada com regiões da impressão digital, caracterizando as biomoléculas como polissacarídeos, carboidratos, celulose lignina, pectina, entre outras. A Banda 1231 cm^{-1} é referente as vibrações das ligações C–O, que estão relacionadas as macromoléculas lignina, presentes na celulose da parede celular (TÜRKER-KAYA e HUCK, 2017).

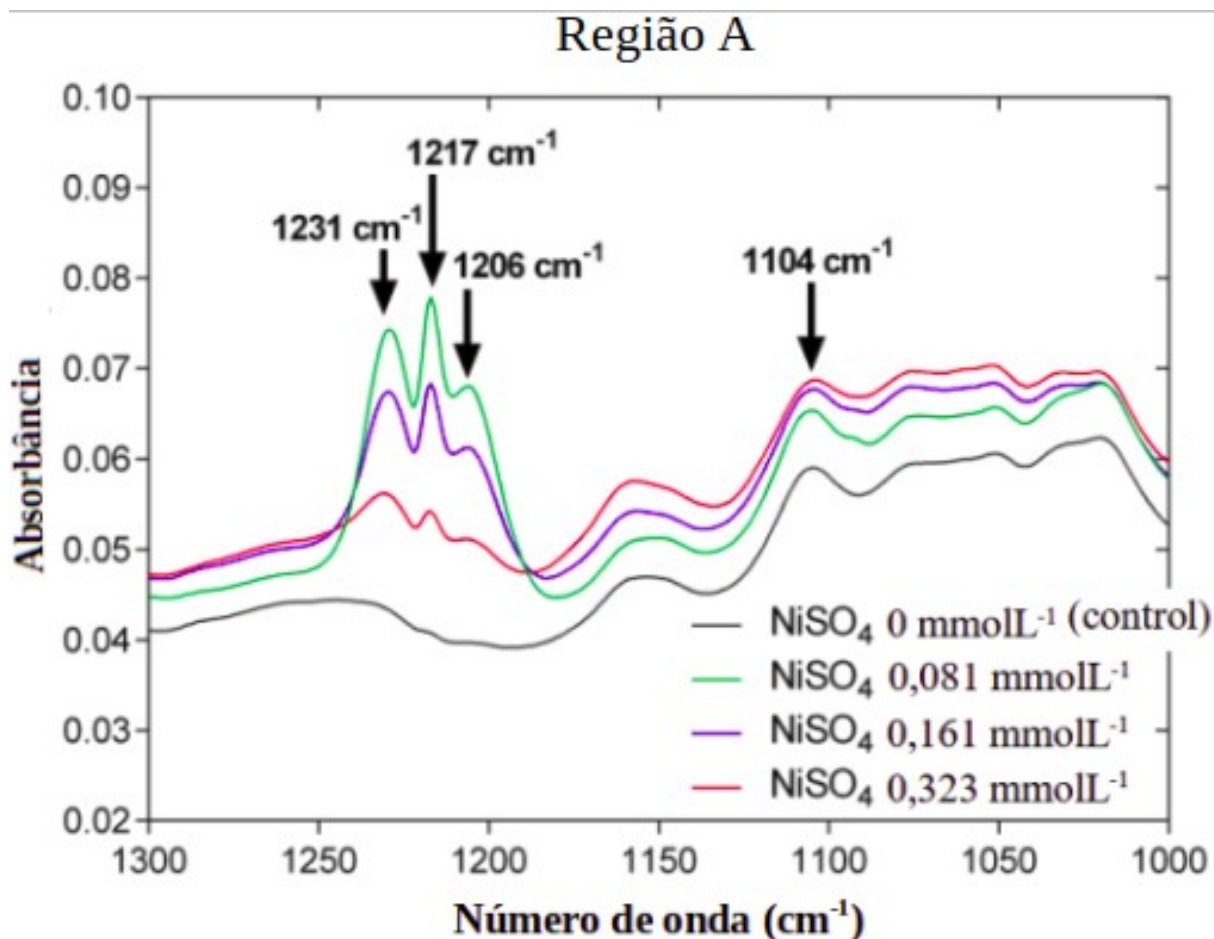


Figura 4 - Região A (1000 cm^{-1} a 1300 cm^{-1}), que apresenta a média dos espectros de UATR-FTIR das folhas cotiledonares de plântulas de *Lactuca sativa* L. ($n = 12$ por tratamento) tratadas com água destilada (controle, linha preta) ou sulfato de níquel (NiSO_4) nas concentrações de $0,081\text{ mmolL}^{-1}$ (linha verde), $0,161\text{ mmolL}^{-1}$ (linha azul) ou $0,323\text{ mmolL}^{-1}$ (linha vermelha). Os dados são expressos em unidades arbitrárias de absorbância.

A Banda 1217 cm^{-1} é referente a vibração das ligações das moléculas de fosfato (PO_2^- assimétrico (Fosfato I)), presentes nos ácidos nucleicos do RNA na síntese de proteínas (CHOO et al, 1995; D'SOUZA et al. , 2008). A Banda 1206 cm^{-1} é o espectro relacionado a vibração da molécula O – H presentes na curva plana da celulose (TÜRKER-KAYA e HUCK, 2017) e Amida III (MOVASAGHI et al., 2008). A região $1000\text{-}350\text{ cm}^{-1}$ é conhecida

como a região da vibração do fosfato e resíduos de carboidratos ligados a vibração de amida III (MOVASAGHI et al., 2008). A Banda 1104 cm^{-1} se encontra dentro da região denominada impressão digital, e é referente aos carboidratos (MOVASAGHI et al., 2008), Tabela 2.

Tabela 2. Atribuições das bandas de absorvância dos espectros de infravermelho médio das folhas cotiledonares de plântulas de *Lactuca sativa* L. na presença de NiSO_4 (sulfato de níquel) na Região A.

Número de onda (cm^{-1})	Definição das atribuições espectrais	Referências
1104	Alongamento simétrico P-O-C Substâncias Pécnicas, carboidratos e polissacarídeos	Movasaghi et al., 2008
1206	O – H presentes na curva plana da celulose	Türker-kaya e Huck, 2017
1217	Moléculas de fosfato PO_2^- assimétrico (fosfato I)	Choo et al., 1995 D'Souza et al. , 2008
1231	Ligações C–O, que está relacionado a lignina	Türker-kaya e Huck, 2017

Na Figura 5, encontram-se destacados os espectros correspondentes a 1104 cm^{-1} (carboidratos), 1206 cm^{-1} (celulose e Amida III), 1217 cm^{-1} (fosfato) e 1231 cm^{-1} (lignina), todos esses espectros apresentados são o resultado da média de 12 leituras distintas. No número de onda 1104 cm^{-1} , há um aumento significativo da absorvância nos grupos $0,161\text{ mmolL}^{-1}$ e $0,323\text{ mmolL}^{-1}$ quando comparados ao grupo controle (Figura 5). No entanto, para os números de onda 1206 cm^{-1} e 1217 cm^{-1} , há um aumento significativo na intensidade da absorvância na concentração $0,081\text{ mmolL}^{-1}$ e, na medida em que as concentrações de NiSO_4

aumentam, são observadas reduções significativas quando comparadas ao grupo tratado com a menor concentração de NiSO_4 (Figura 5).

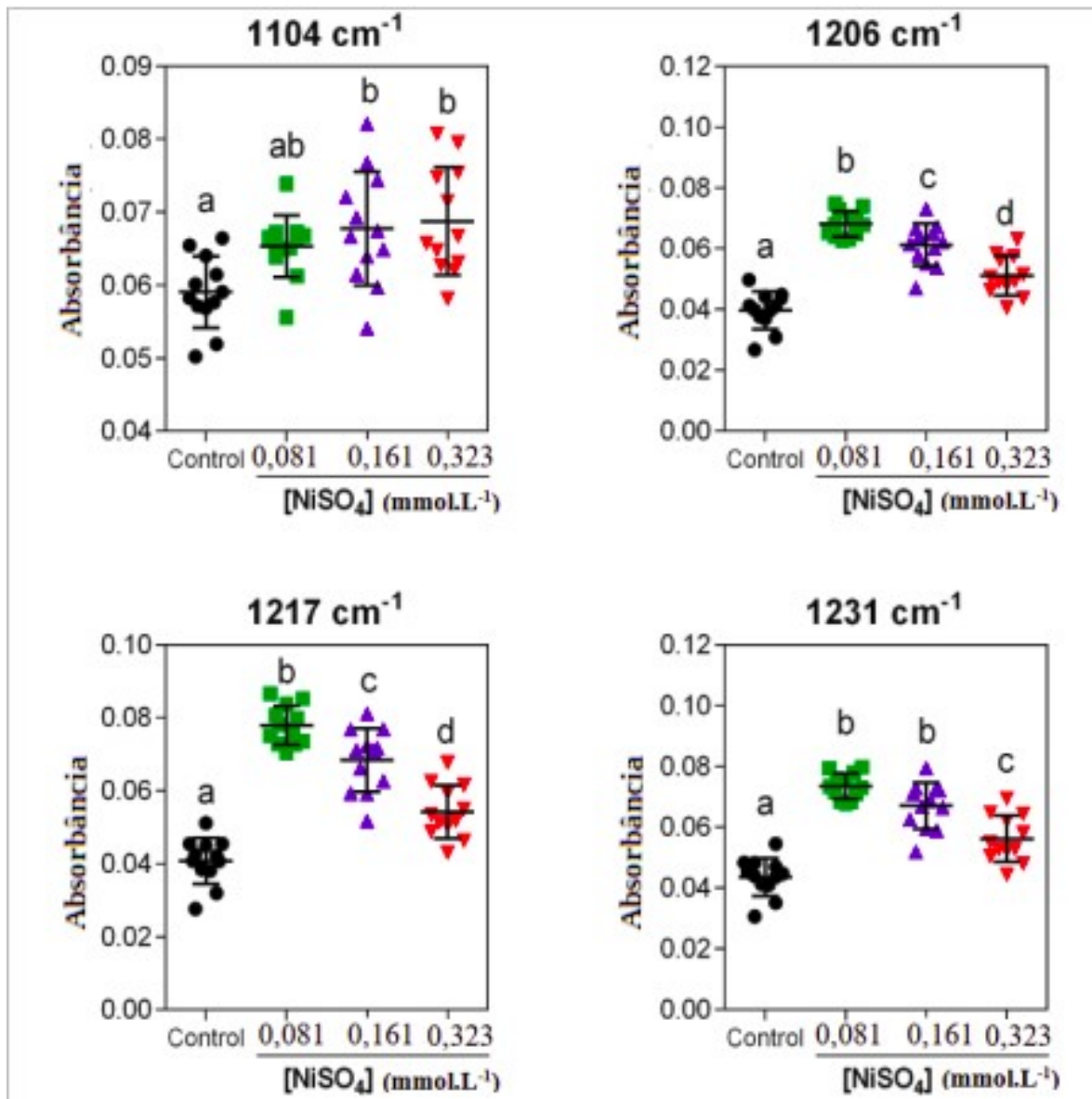


Figura 5 - Média \pm desvio padrão e valores individuais ($n = 12$) das absorbâncias (em unidades arbitrárias) detectadas no espectro de UATR-FTIR das folhas cotiledonares de plântulas de *Lactuca sativa* L. tratadas com água destilada (controle, círculos pretos) ou NiSO_4 nas concentrações de 0,081 mmolL^{-1} (quadrados verdes), 0,161 mmolL^{-1} (triângulos azuis) ou 0,323 mmolL^{-1} (triângulos invertidos vermelhos) para os números de onda 1104 cm^{-1} , 1206 cm^{-1} , 1217 cm^{-1} e 1231 cm^{-1} da região A. Letras diferentes indicam diferença estatística pela análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Tukey ($P < 0,05$).

Os dados estatísticos nas concentrações $0,161 \text{ mmolL}^{-1}$ e $0,323 \text{ mmolL}^{-1}$ apresentam um aumento significativo na absorvância em comparação ao controle. Em 1206 cm^{-1} , 1217 cm^{-1} e 1231 cm^{-1} na concentração $0,081 \text{ mmolL}^{-1}$ de NiSO_4 observamos um aumento significativo na absorvância em comparação a todos demais grupos e uma diminuição significativa a medida que as concentrações dos tratamentos aumentaram.

A região B (Figura 6), compreende as bandas de 1300 cm^{-1} a 1850 cm^{-1} que fornece informações sobre regiões das bandas de proteínas (grupos amidas) e polissacarídeos caracterizando as biomoléculas presentes na parede celular como celulose, hemicelulose, lignina, pectina e na membrana plasmática os fosfolipídeos, amida I - proteína, pectina, água associada a celulose ou lignina e alcaloides (MOVASAGHI et al., 2008; TÜRKER-KAYA e HUCK, 2017).

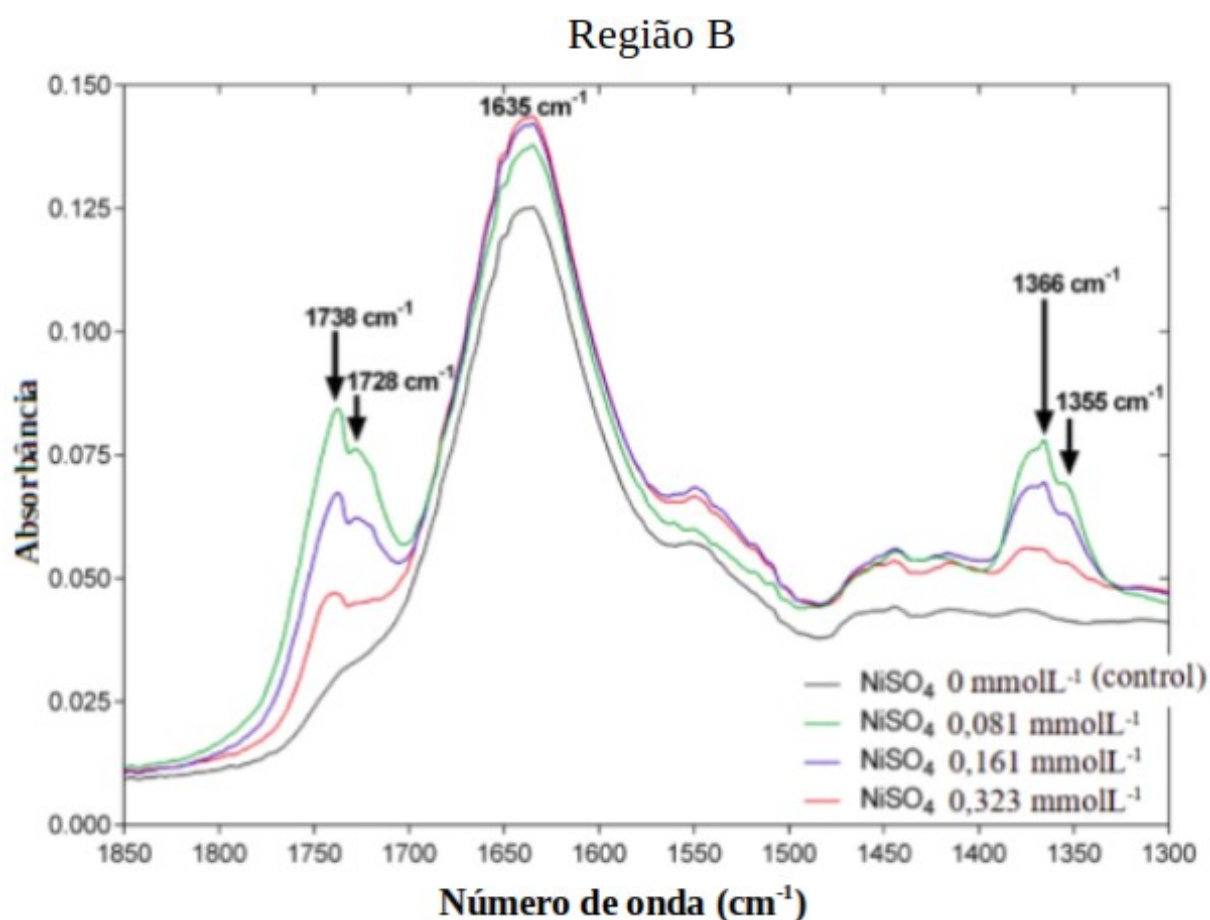


Figura 6 - Região B (1300 cm^{-1} a 1850 cm^{-1}), que apresenta a média dos espectros de UATR-FTIR das folhas cotiledonares de plântulas de *Lactuca sativa* L. ($n = 12$ por tratamento) tratadas com água destilada (controle, linha preta) ou sulfato de níquel (NiSO_4) nas concentrações de $0,081 \text{ mmolL}^{-1}$ (linha verde), $0,161 \text{ mmolL}^{-1}$ (linha azul) ou $0,323 \text{ mmolL}^{-1}$ (linha vermelha). Os dados são expressos em unidades arbitrárias de absorvância.

As Bandas 1355 cm^{-1} e 1366 cm^{-1} são correspondentes as vibrações das ligações C-H, que se relaciona as macromoléculas celulose e hemicelulose encontrados na parede celular (TÜRKER-KAYA e HUCK, 2017). A Banda 1635 cm^{-1} está relacionada a presença de amida I, que representa as biomoléculas de proteína, pectina, água associada a celulose ou lignina e alcalóides (TÜRKER-KAYA e HUCK, 2017). Esse espectro caracteriza as vibrações de alongamento C = O referente a ligação peptídica, fornecendo informações sobre a estrutura secundária da proteína (D'SOUZA et al. , 2008) e estruturas secundárias de folha-beta, padrão estrutural encontrados em várias proteínas (MOVASAGHI et al., 2008). As Bandas 1728 cm^{-1} e 1738 cm^{-1} correspondem também as vibrações das ligações C=O do estiramento de éster saturado, caracterizando biomoléculas de fosfolípídeo, éster de colesterol, hemicelulose, pectina, lignina, ésteres de suberina e cutina (MOVASAGHI et al., 2008; TÜRKER-KAYA e HUCK, 2017), Tabela 3.

Tabela 3. Atribuições das bandas de absorvância dos espectros de infravermelho médio das folhas cotiledonares de plântulas de *Lactuca sativa* L. na presença de sulfato de níquel na Região B.

Número de onda (cm^{-1})	Definição das atribuições espectrais	Referências
1355	Vibração das ligações C-H, presente na celulose	Türker-kaya e Huck, 2017
1366	Vibração das ligações C-H em hemicelulose	Türker-kaya e Huck, 2017
1635	Vibrações de alongamento C = O referente a ligação peptídica - amida I- bandas de proteínas	Türker-kaya e Huck, 2017 D'Souza et al , 2008
1728	Vibrações das ligações C=O do estiramento de éster saturado - fosfolípídeo, pectina, lignina	Movasaghi et al, 2008
1738		Türker-kaya e Huck, 2017

Na Figura 7 observamos que os espectros 1355 cm^{-1} , 1366 cm^{-1} e 1738 cm^{-1} na concentração $0,081\text{ mmolL}^{-1}$ de NiSO_4 teve um aumento significativo na absorbância em comparação a todos demais grupos e uma diminuição significativa a medida que as concentrações dos tratamentos aumentaram. Em 1635 cm^{-1} , a análise estatística confirma que não há mudança significativa entre as concentrações nessa região nos grupos observados.

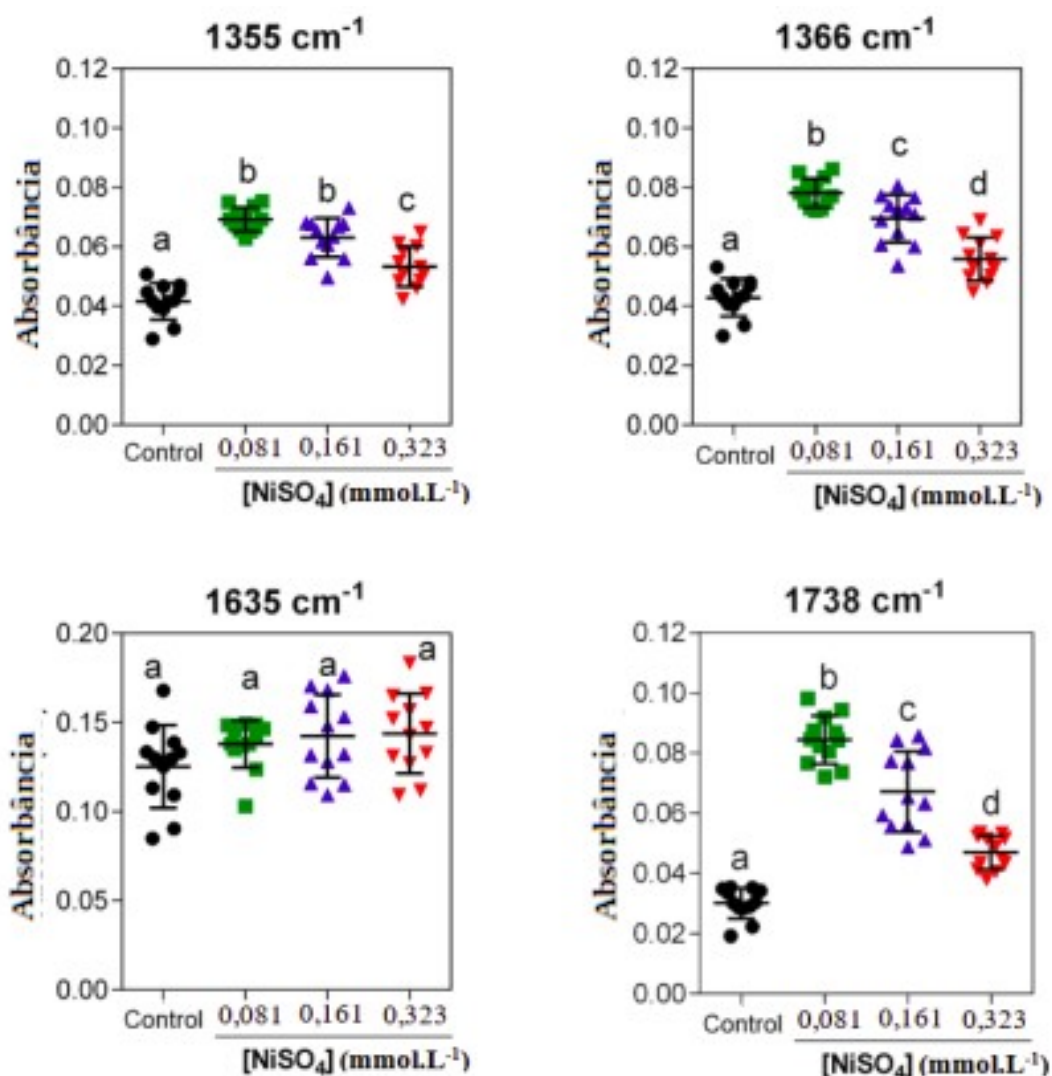


Figura 7 - Média \pm desvio padrão e valores individuais ($n = 12$) das absorbâncias (em unidades arbitrárias) detectadas no espectro de UATR-FTIR das folhas cotiledonares de plântulas de *Lactuca sativa* L. tratadas com água destilada (controle, círculos pretos) ou NiSO_4 nas concentrações de $0,081\text{ mmolL}^{-1}$ (quadrados verdes), $0,161\text{ mmolL}^{-1}$ (triângulos azuis) ou $0,323\text{ mmolL}^{-1}$ (triângulos invertidos vermelhos) para os números de onda 1355 cm^{-1} , 1366 cm^{-1} , 1635 cm^{-1} e 1738 cm^{-1} da região B. Letras diferentes indicam diferença estatística pela análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Tukey ($P < 0,05$).

A região C (Figura 8) corresponde a região entre 2820 cm^{-1} a 3000 cm^{-1} fornecendo informações referentes a região lipídica e alongamento de vibrações de SH, CH, NH e OH (BAKER et al., 2014; D'SOUZA et al., 2008; TÜRKER-KAYA e HUCK, 2017; MOVASAGHI et al., 2008). As bandas detectadas nessa região podem caracterizar vibrações de grupos químicos de hidrocarbonetos CH, CH₂, CH₃ que estão relacionados com fosfolipídios das membranas celulares. Na figura 8, observa-se deslocamentos dos picos nas concentrações $0,161\text{ mmolL}^{-1}$ e $0,323\text{ mmolL}^{-1}$ de sulfato de níquel.

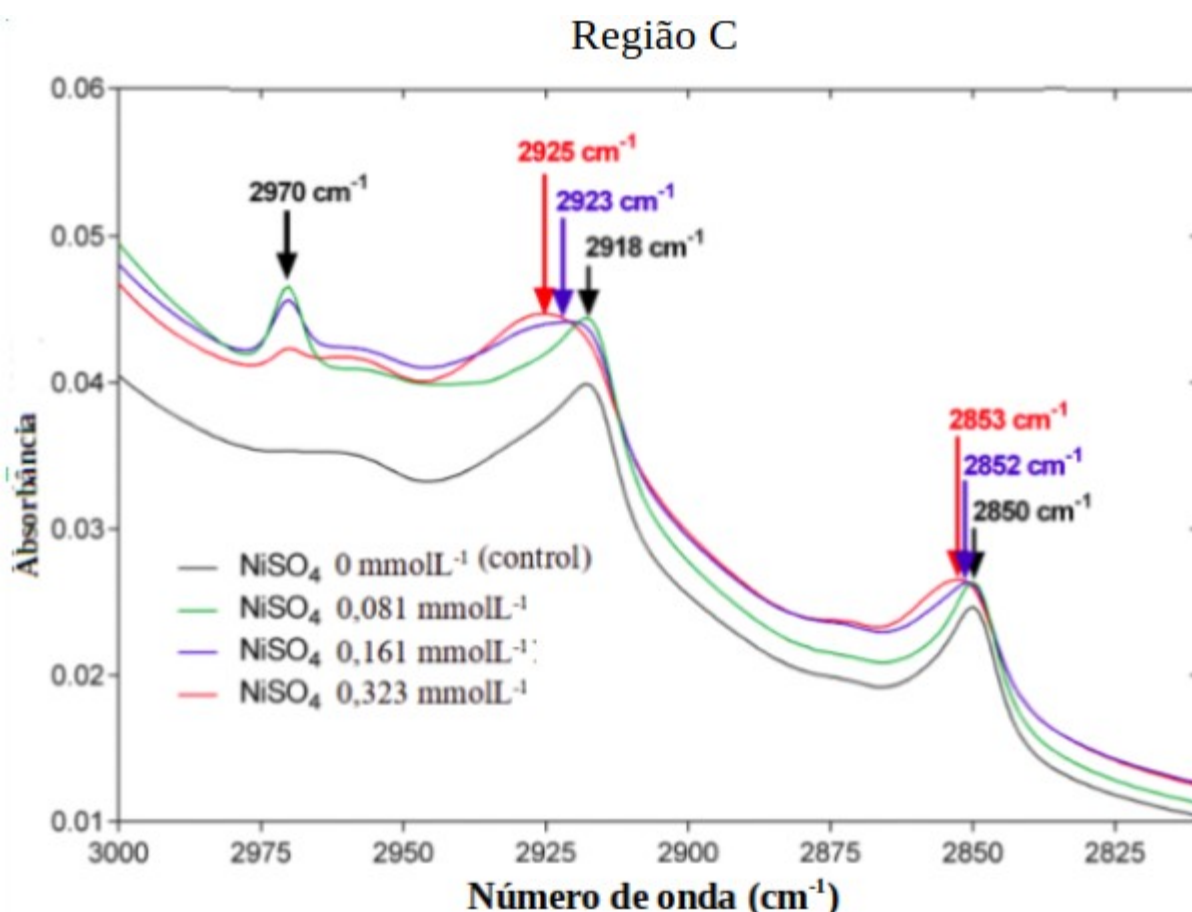


Figura 8 - Região C (2820 cm^{-1} a 3000 cm^{-1}), que apresenta a média dos espectros de UATR-FTIR das folhas cotiledonares de plântulas de *Lactuca sativa* L. ($n = 12$ por tratamento) tratadas com água destilada (controle, linha preta) ou sulfato de níquel (NiSO_4) nas concentrações de $0,081\text{ mmolL}^{-1}$ (linha verde), $0,161\text{ mmolL}^{-1}$ (linha azul) ou $0,323\text{ mmolL}^{-1}$ (linha vermelha). Os dados são expressos em unidades arbitrárias de absorvância.

As bandas 2850 cm^{-1} , 2852 cm^{-1} , e 2853 cm^{-1} correspondem as vibrações dos alongamentos simétricos C-H e CH₂, principalmente de lipídeos com pequena contribuição de proteína, ácidos graxos, carboidratos e ácidos nucleicos (TÜRKER-KAYA e HUCK, 2017).

As bandas 2918 cm^{-1} e 2923 cm^{-1} correspondem as vibrações do alongamento C-H na região lipídica. E as faixas 2925 cm^{-1} , e 2970 cm^{-1} correspondem respectivamente, a vibração do alongamento C-H e CH_2 em lipídios e vibração de alongamento de CH_3 , referente aos lipídios e ácidos graxos. (MOVASAGHI et al., 2008; TÜRKER-KAYA e HUCK, 2017), Tabela 4.

Tabela 4. Atribuições das bandas de absorvância dos espectros de infravermelho médio das folhas cotiledonares de plântulas de *Lactuca sativa* L. na presença de sulfato de níquel na Região C.

Número de onda (cm^{-1})	Definição das atribuições espectrais	Referências
2850	Alongamento das ligações C-H e CH_2 em lipídios e alongamento simétrico nas ligações CH_2 em ácidos graxos	Movasaghi et al, 2008
2852	Alongamento simétrico de CH_2 nas cadeias acil (lipídios)	Türker-kaya e Huck , 2017
2853	Alongamento assimétrico de CH_2 nas cadeias de metileno em lipídios	Türker-kaya e Huck, 2017 D'Souza et al , 2008
2918 2923 2925	Alongamento C-H na região lipídica	Movasaghi et al, 2008
2970	Vibração do alongamento C-H e CH_2 em lipídios	Movasaghi et al, 2008 Türker-kaya e Huck, 2017

De acordo com a Figura 9, observa-se na banda 2970 cm^{-1} um aumento na absorvância nas concentrações $0,081$ e $0,161\text{mmolL}^{-1}$ de sulfato de níquel que são iguais e diferem apenas

do controle. Na faixa de números de onda $2915\text{-}2930\text{ cm}^{-1}$ e $2845\text{-}2855\text{ cm}^{-1}$ detectadas no espectro, observamos um aumento na intensidades do comprimentos de onda em $0,161\text{ mmolL}^{-1}$ e $0,323\text{ mmolL}^{-1}$ em comparação com $0,081\text{ mmolL}^{-1}$ e o controle.

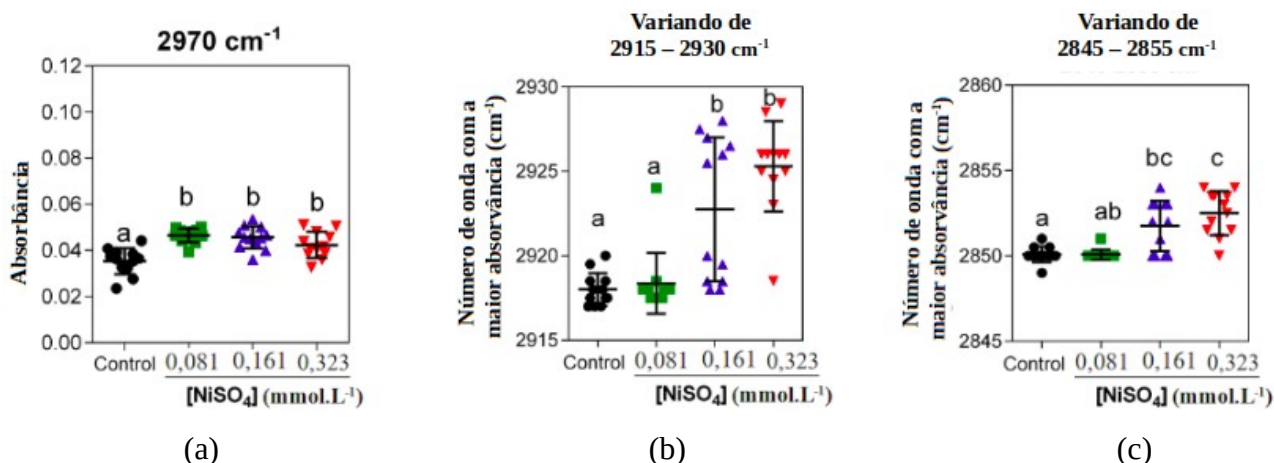


Figura 9 - Média \pm desvio padrão e valores individuais ($n = 12$) das absorvâncias (em unidades arbitrárias) para o número de onda 2970 cm^{-1} (a) e dos números de onda do pico de maior intensidade entre os números de onda $2915\text{-}2930\text{ cm}^{-1}$ (b) e $2845\text{-}2855\text{ cm}^{-1}$ (c) detectadas no espectro de UATR-FTIR das folhas cotiledonares de plântulas de *Lactuca sativa* L. tratadas com água destilada (controle, círculos pretos) ou NiSO₄ nas concentrações de $0,081\text{ mmolL}^{-1}$ (quadrados verdes), $0,161\text{ mmolL}^{-1}$ (triângulos azuis) ou $0,323\text{ mmolL}^{-1}$ (triângulos invertidos vermelhos), na região C. Letras diferentes indicam diferença estatística pela análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Tukey ($P < 0,05$, gráfico à esquerda) e pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn ($P < 0,05$, gráficos do meio e à direita).

6. DISCUSSÃO

6.1 - Índices de desenvolvimento e toxicidade na presença de sulfato de níquel

Os resultados mostram maior crescimento nas plântulas expostas na concentração de $0,081\text{ mmolL}^{-1}$ de sulfato de níquel comparado ao controle, pois a exposição em baixas concentrações de Ni pode contribuir para o crescimento inicial da semente. Contudo, um alto valor altera e prejudica o crescimento das plântulas originando encurtamento da parte aérea e sistema radicular. Pode-se observar esse efeito tóxico nos tratamentos $0,161\text{ mmolL}^{-1}$ e $0,323\text{ mmolL}^{-1}$ que mostraram maior efeito inibitório comparado ao controle (KUMAR et al., 2021).

De acordo com Zhao et al. (2019), o índice de desenvolvimento calculado a partir do desenvolvimento inicial da alface é um bom indicador de toxicidade para diversos tipos de

metais tóxicos, incluindo o Ni, tendo a raiz como maior indicador de danos provocados pelo efeito tóxico. A maior parte do Ni absorvido pelas plantas se acumula nos vacúolos de células radiculares, o que implica em um estresse maior neste órgão desencadeando determinados processos que levará ainda mais ao dano da integridade das paredes celulares, membrana plasmática, vazamento celular e perdas de nutrientes (GALICHET et al., 2001; ZHAO et al., 2019). Este fato corrobora com as observações realizadas neste estudo, visto que, a radícula se mostrou o indicador mais afetado e mais adequado para avaliar a toxicidade induzida pelo Ni. Além disso, outros indicadores como vigor e índice de tolerância (IT), corroboraram com o dado do comprimento radicular, apresentando uma diminuição nas plântulas de forma significativa a partir da concentração de $0,161 \text{ mmolL}^{-1}$.

Nos grupos tratados com NiSO_4 , as plântulas também são expostas aos íons SO_4^{2-} , que é considerado um ativador das vias metabólicas fundamentais, que conseqüentemente ativam outras rotas metabólicas, estando direta e indiretamente relacionado a síntese de proteínas, carboidratos e fosfolipídios fundamentais para desenvolvimento da planta (KOPRIVA e RENNENBERG, 2004; DAVIDIAN e KOPRIVA, 2010). Essa informação contribui com os dados biométricos apresentados nesse trabalho em relação ao tratamento $0,081 \text{ mmolL}^{-1}$, confirmando o maior desenvolvimento nas plântulas em relação ao controle.

O SO_4^{2-} é transportado para o meio intracelular por meio de transportadores de sulfato, como pode ser visto na Figura 10. Em seguida é convertido em adenosina 5'-fosfosulfato (APS), numa reação catalisada pela ATP sulfúrilase. A APS é convertida em sulfito pela enzima APS redutase graças à oxidação da glutathiona reduzida (GSH). A glutathiona é reduzida pela glutathiona redutase, que oxida o NADPH proveniente da via das pentoses-fosfato, que por sua vez consome a glicose-6-fosfato. Para aumentar a concentração de glicose-6-fosfato, o amido de reserva é degradado, podendo ser utilizado para a obtenção de mais glicose-6-fosfato. O sulfito obtido na reação da APS redutase é precursor dos aminoácidos cisteína, metionina, glutathiona e glicina. Na fotossíntese, o CO_2 será convertido em hexoses, e uma vez no citosol, as hexoses são convertidas em glicose-6-fosfato, que seguirá para a via das pentoses-fosfato ou para a glicólise, permitindo a biossíntese de vários compostos abundantes na folha: biossíntese de celulose, hemicelulose, amido, fosfolipídios (a partir dos ácidos graxos produzidos a partir da acetil-CoA e do glicerol-3-fosfato) e

aminoácidos, aumentando a síntese proteica (KOPRIVA; RENNENBERG, 2004; DAVIDIAN; KOPRIVA, 2010).

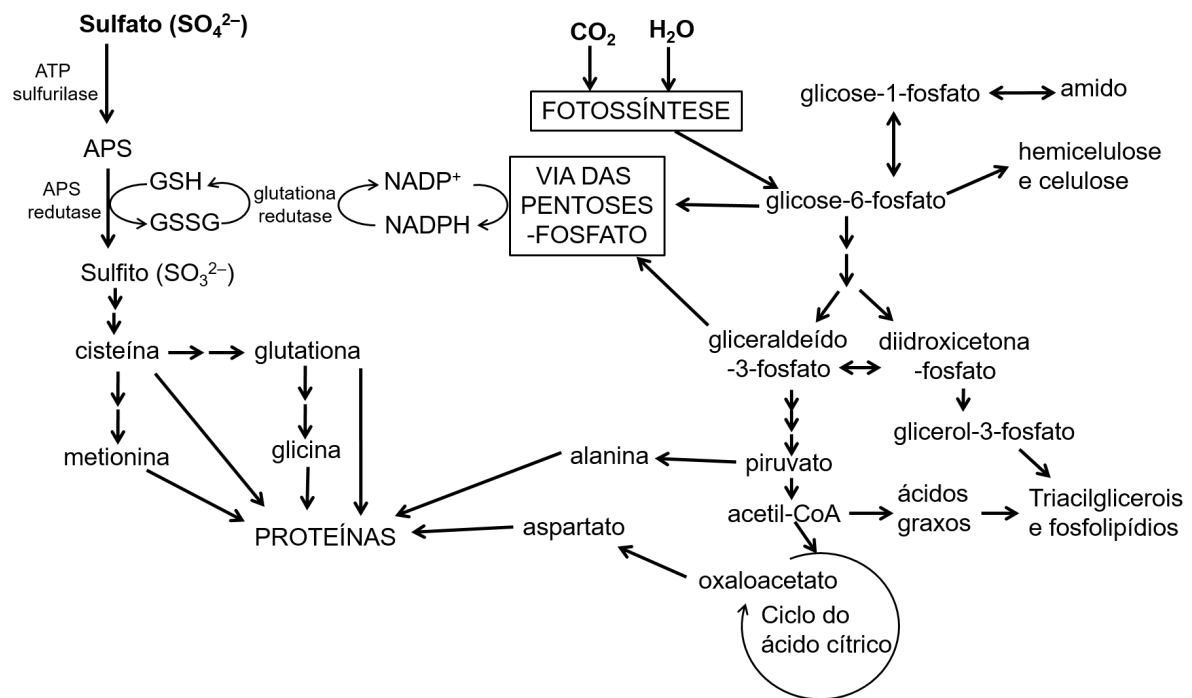


Figura 10: Processos metabólicos associados de forma direta ou indireta ao SO_4^{2-} , com base na literatura de Kopriva e Rennenberg (2004) e Davidian e Kopriva (2010).

Léon et al. (2005) ao realizarem o teste de germinação para *Grevillea exul* var. utilizando três sais diferentes (sulfato de Ni, Cloreto de Ni, Acetato de Ni) determinaram o efeito da forma química do Ni em sua assimilação por distribuição em sementes. Este estudo mostra que a presença do níquel altera a composição mineral das sementes afetando a germinação e o crescimento da raiz. A porcentagem de minerais e o comprimento radicular tiveram efeitos semelhantes em todos tratamentos na maior concentração de 500 mgL^{-1} de Ni, sendo que, o mínimo de inibição foi produzida pelo sulfato de Níquel, enquanto o cloreto de Níquel e o acetato de Níquel mostraram efeitos altamente inibitórios equivalentes. O menor efeito tóxico pelo sulfato de níquel na germinação e no crescimento da raiz pode esta relacionado ao sulfato que fornecer o enxofre (macronutriente) necessário para desenvolvimento envolvidos na síntese de moléculas de desintoxicação celular, como as metalotioneínas (proteínas). Esses dados confirmam que para o tratamento de $0,081 \text{ mmolL}^{-1}$, o sulfato contribuiu para a maior germinação das plântulas em relação ao controle.

ZHAO et al. (2019) analisaram as diferentes formas químicas do níquel em tecidos de alfaca para entender melhor seus efeitos tóxicos na planta e concluíram que o níquel na forma

química de fosfato e oxalato dissolvidos, contribuiu para uma menor capacidade de transferência e desempenhou um papel importante na desintoxicação e tolerância ao níquel na alface. Neste trabalho, pode-se supor que na concentração $0,081 \text{ mmolL}^{-1}$, o sulfato pode ter contribuído para desempenhar a mesma função de bloquear a transferência do níquel favorecendo a tolerância da plântula ao metal de acordo com os dados biométricos.

6.2 Análise espectroscópica nas folhas cotiledonares de *L. sativa*

Nas amostras controle, as plântulas dispõem para o crescimento inicial apenas água e substâncias da reserva da semente (BARBOSA, 2020), por isso a concentração de carboidratos, celulose, lignina e fosfato são baixos e os sinais menos intensos.

A maior intensidade das bandas nas plântulas nos grupos de $0,081 \text{ mmolL}^{-1}$ comparadas ao controle está relacionado ao sulfato (SO_4^{2-}) que atua como nutriente ativando as vias metabólicas fundamentais para desenvolvimento da planta (KOPRIVA e RENNENBERG, 2004; DAVIDIAN e KOPRIVA, 2010). Portanto, na concentração de $0,081 \text{ mmolL}^{-1}$ o níquel não inibiu o crescimento das plântulas.

O aumento de carboidratos nas concentrações de $0,161$ e $0,323 \text{ mmolL}^{-1}$ pode estar relacionado com a degradação de polissacarídeos (celulose) em outros carboidratos como monossacarídeos e oligossacarídeos, aumentando a intensidade das bandas de carboidratos nessas concentrações, Figura 5. No gráfico dos *loadings* (Figura 1 (b)), observa-se que a PC2 tem a região de carboidratos, região B, como principal banda para separação dos grupos, uma vez que as amostras controle estão no quadrante negativo, enquanto as de concentração $0,161$ e $0,323 \text{ mmolL}^{-1}$ estão no quadrante positivo.

Por outro lado, a diminuição das intensidades das bandas (Figura 5) nos tratamentos de $0,161$ e $0,323 \text{ mmolL}^{-1}$ de sulfato de níquel está relacionado ao efeito tóxico induzido pelo níquel, provocando mudanças significativas na composição e propriedades da parede celular e alterações na síntese de proteínas (RNA) (SUNKAR et al, 2007; AMURI, et al, 2017). Altas concentrações de Ni provocam o aumento do estresse oxidativo interferindo na biossíntese de fosfolipídios, polissacarídeos da parede celular e proteínas das células da folha (AMURI, et al, 2017). A diminuição das intensidades das bandas nos tratamentos de $0,161$ e $0,323 \text{ mmolL}^{-1}$

de sulfato de níquel está relacionada ao efeito tóxico induzido pelo níquel, afetando negativamente a funcionalidade da membrana e provocando mudanças consideráveis nas composições lipídicas das membranas celulares (fosfolipídeos) e da parede celular (celulose, hemicelulose, pectina e lignina) (AMURI, et al, 2017).

Na célula, o metal tóxico entra em contato com várias membranas celulares interferindo em suas funções e gerando muitos efeitos negativos nas composições lipídicas (FODOR et al., 1995; GONNELLI et al., 2001). A peroxidação lipídica, está dentre as formas de defesa da planta ao estresse provocado pelos metais. O acúmulo de peróxidos lipídicos pode modificar a estrutura das membranas interferindo em sua fluidez, no equilíbrio iônico do citoplasma e ainda alterar as membranas celulares das mitocôndrias e peroxissomos (AMURI et al, 2017, ZHAO et al., 2019).

Na região C, observamos um deslocamento significativo do pico para a esquerda, de 2850 cm^{-1} no grupo controle para 2852 cm^{-1} na concentração de $\text{NiSO}_4\ 0,161\text{ mmol.L}^{-1}$ e para 2853 cm^{-1} na concentração de $\text{NiSO}_4\ 0,323\text{ mmol.L}^{-1}$ (Figura 8). Ao realizamos a análise estatística em relação ao aumento na intensidades do comprimentos de onda (figuras 9 (b) e (c)) também foi possível comprovar um deslocamento efetivo e significativo com inicio de quelação do metal a parti de $0,161\text{mmolL}^{-1}$. Deslocamentos de pico são indicativos de formação de complexos com metais (FIONA et al. 2003, D'SOUZA et al, 2008).

Em 2970 cm^{-1} , o aumento da intensidade da banda na concentração $0,081\text{ mmolL}^{-1}$ comparada com o controle, está relacionado com a influência do ânion sulfato (SO_4^{2-}) que ativa as vias metabólicas fundamentais nos vegetais contribuindo de forma direta e indiretamente com a síntese de fosfolipídios e lipídeos (CATALDI et al., 2003). Essa banda contribuiu positivamente em PC2 (ver Figura 1 (a e b)) para separar as amostras controle das demais.

O trabalho realizado para estudar alterações por cádmio quelado em algas marinhas, ao comparar as bandas de absorção de 1224 cm^{-1} (controle) e 1220 cm^{-1} (tratamento com cádmio) relatou que a diferença nas bandas é devido às vibrações de alongamento assimétrico $\text{P} = \text{O}$ presentes nos fosfodiésteres (PO_2^-). Porções de fosfato adotam propriedades quelantes e, entre os metabólitos que contêm fosfato desempenham um papel crucial na quelação de metal

(FIONA et al. 2003, D'SOUZA et al, 2008). Os deslocamentos significativos observados na região lipídica (quando aumenta a concentração as bandas são deslocadas para maiores comprimentos de onda) podem estar relacionados com a complexação do níquel pelo grupo funcional fosfato (PO_2^-) presentes nos fosfolipídeos.

D'Souza et al (2008) através dos espectros vibracionais, observaram mudanças na estrutura química nos tecidos de algas marinhas na presença do metal Cádmio. Os grupos hidroxilas presentes em todos polissacarídeos têm alta afinidade para cátions bivalentes, podendo ficar carregados negativamente favorecendo a adsorção significativa do metal e nos tecidos biológicos os íons do metal são quelados pelas funcionalidades das biomoléculas como hidroxila, amino, carbonila e fosforila. Então de acordo com os dados observados, os deslocamentos da região lipídica também podem estar relacionados com a quelação do níquel pelos grupos funcionais carbonila ($\text{C}=\text{O}$) presentes nas biomoléculas de lipídeos. Estas observações estão claramente observadas no gráfico da PCA (Figura 1), onde é possível perceber que a presença do níquel na germinação provoca a formação de grupamentos de amostras, com diferenças e similaridades, formando grupos com as amostras germinadas na presença de níquel com mesma concentração e diferenciando estes grupos uns dos outros de acordo com o efeito na estrutura química da molécula em decorrência presença do níquel em diferentes concentrações.

Através das mudanças das bandas e os dados biométricos pode-se confirmar que houve o efeito tóxico do níquel nas plântulas nas concentrações maiores que $0,081 \text{ mmolL}^{-1}$.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados obtidos foi possível observar as alterações de crescimento e perfil bioquímico por parâmetros biométricos, espectroscopia no infravermelho e tratamento estatístico de plântulas de *Lactuca sativa* L. (alface) induzida por sulfato de níquel cultivada em microambientes. Houve influência do ânion sulfato (SO_4^{2-}) como ativador das vias metabólicas nas plântulas em $0,081 \text{ mmolL}^{-1}$ de sulfato de níquel.

A toxicidade da planta foi confirmada pelos dados biométricos e pela diminuição das concentrações das principais biomoléculas presentes na folha identificadas pelas intensidades

dos espectros vibracionais nos tratamentos 0,161 e 0,323 mmolL⁻¹ de sulfato de níquel, assim como observou-se formação de grupamentos distintos na PCA indicando que a variação das condições de germinação afeta o perfil bioquímico.

O aumento na biossíntese de compostos estruturais na concentração mais baixa de NiSO₄ (0,081 mmolL⁻¹) possivelmente está relacionado à presença de Ni⁺² e SO₄²⁻ e a interferência negativa na biossíntese desses compostos em maiores concentrações, como consequência da bioacumulação de Ni. Os dados espectrais são capazes de identificar formação de complexos do metal com biomoléculas estruturais dotadas de hidrocarbonetos, como evidenciado na faixa entre 2845 a 2930 cm⁻¹, onde se observa deslocamento dos picos em função do aumento da concentração de NiSO₄.

Utilizou-se os resultados biométricos para avaliação toxicológica juntamente com a técnica de espectroscopia no infravermelho (ATR-FTIR) para detectar mudanças estruturais nas principais biomoléculas presentes na fase do desenvolvimento inicial das folhas cotiledonares de plântulas de alface em exposição ao estresse por níquel. O trabalho pode contribuir para o conhecimento atual da fisiologia, bioquímica e processos toxicológicos de níquel em alface, como um indicador sensível da poluição ambiental.

8- Referências bibliográficas

ABDUL-BAKI, A.A.; ANDERSON, J.D. Relationship between decarboxylation of glutamic acid and vigour in soybean seeds. **Crop science**. v. 13. p. 222-226, 1973.

AGUIRRE, C. F. V.; PÁEZ, F. A. R.; VARGAS, S. E. Effect of arbuscular mycorrhizae and mercury on *Lactuca sativa* (Asteraceae) seedling morpho – histology. **Environmental and Experimental Botany**, v.156, p.197-202, 2018 .

AMARI, T., GHNAYA, T. & ABDELLY, C. Nickel, cadmium and lead phytotoxicity and potential of halophytic plants in heavy metal extraction. **South African Journal of Botany**, v. 111, p. 99-110, 2017.

BAKER, M.J., TREVISAN, J., BASSAN, P., BHARGAVA, R., BUTLER, H.J., DORLING, K.M., FIELDEN, P.R., FOGARTY, S.W., FULLWOOD, N.J., HEYS, K.A., HUGHES, C., LASCH, P., MARTIN-HIRSCH, P.L., OBINAJU, B., SOCKALINGUM, G.D., SULÉ-SUSO, J., STRONG, R.J., WALSH, M.J., WOOD, B.R., GARDNER, P., MARTIN, F.L.. Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials. **Nature Protocols**, v.9, p.1771-1791, 2014.

BARBOSA, L. DA S. Indução de tolerância à deficiência hídrica na germinação e crescimento inicial de melão. (2020). (Dissertação em mestrado em Horticultura Tropical) - Universidade Federal de Campina Grande, Paraíba.

CARVALHO, D. B. ; CARVALHO, R. I. N. Qualidade fisiológica de sementes de guanxuma em influência do envelhecimento acelerado e da luz. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 31, n. 3, p. 489-494, 2009. DOI: 10.4025/actasciagron.v31i3.585

CATALDI, T.R.I.; MARGIOTTA, G.; FIORE, A.D.; BUFO, S.A. Ionic content in plant extracts determined by ion chromatography with conductivity detection. **Phytochemical Analysis**, v. 14. p. 176-183, 2003.

CHOO, L. P., MANSFIELD, J. R., PIZZI, N., SOMORJAI, R. L., JACKSON, M., HALLIDAY, W. C., AND MANTSCH, H. H. Infrared spectra of human central nervous system tissue: Diagnosis of alzheimer's disease by multivariate analyses. **Biospectros**. v.1(2): p. 141-148, 1995.

CHOW, Y.Y., TING, A. S. Y. Influence of fungal infection on plant tissues: FTIR detects compositional changes to plant cell walls. **Fungal Ecology**, v.37, p. 38 - 47, 2019.

D'SOUZA, L. DEVI, PRABHA, D. SHRIDHAR, M.P. AND NAIK, C.G. Use of Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy to Study Cadmium-Induced Changes in *Padina Tetrastrum* (Hauck). **Analytical Chemistry Insights**, v. 3 , p. 135-143, 2008.

DAVIDIAN, J. KOPRIVA, S. Regulation of the Sulfate Uptake and Assimilation – The Same or Not the Same? **Molecular Plant**, v. 3, p. 314-325, 2010.

DEBNATH, M., ASHWATH, N., HILL, CB, CALLAHAN, DL, DIAS, DA, JAYASINGHE, NS, MIDMORE, DJ & ROESSNER, U. Comparative metabolic and ionic profiling de duas cultivares de *Stevia rebaudiana* Bert.(Bertoni) cultivado sob estresse salino. **Plant Physiol Biochem** , v. 129, p. 56-70, 2018.

FIONA, H. F., JENSEN P, KEPERT CM, SPICCIA L. Macrocyclic copper(II) and Zinc(II) complexes incorporating phosphate esters. **Inorganic Chemistry**, v. 42, n. 18, p. 5637-44. 2003.

FODOR, A., SZABÓ-NAGY, A., ERDEI, L. The effects of cadmium on the fluidity and H⁺ -ATPase activity of plasma membrane from sunflower and wheat roots. **Journal Plant Physiol**, v. 14, p. 787-792, 1995.

GALICHET, A., SOCKALINGUM, G.D., BELARDI, A., MANFAIT, M. FTIR spectroscopic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls: study of an anomalous strain exhibiting a pink-colored cell phenotype. **FEMS Microbiol. Lett**, v. 197, p.179-186, 2001.

GONNELLI, C., GALARDI, F., GABBRIELLI, R. Nickel and copper tolerance in three Tuscan populations of *Silene paradoxa*. **Physiol. Plant.** , v. 113, p. 507-514, 2001.

GUPTA, A. D., SIVAKUMARAN, K. Individual and combined toxic effect of nickel and chromium on biochemical constituents in *E. coli* using FTIR spectroscopy and Principle component analysis. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.130, p. 289-294, 2016.

GUPTA, D. K.; NICOLOSO, F.T.; SCHETINGER, M.R.C.; ROSSATO, L.V.; PEREIRA, L.B.; CASTRO, G.Y.; SRIVASTAVA, S.; TRIPATHI, R.D. Antioxidant defense mechanism in hydroponically grown *Zea mays* seedlings under moderate lead stress. **Journal of Hazardous Materials**, v. 172, n. 1, p. 479-484, 2009.

HELLAL, F.A.; EL-SHABRAWI, H.M.; ABD EL-HADY, M.; *ET AL.* Influence of PEG induced drought stress on molecular and biochemical constituents and seedling growth of Egyptian barley cultivars. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 203-212, 2018.

KAMRAN, M. A.; EQANI, S. A. M. A. S.; BIBI, S.; *ET AL.* Bioaccumulation of nickel by *E. sativa* and role of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) under nickel stress. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 126, p. 256-263, 2016.

KHANLARIAN, M.; ROSHANFAR, M.; RASHCHI, F.; *ET AL.* Phyto-extraction of zinc, lead, nickel, and cadmium from zinc leach residue by a halophyte: *Salicornia europaea*. **Ecological Engineering**, v. 148, p. 105797, 2020.

KOPRIVA, S.; RENNENBERG, H. Control of sulphate assimilation and glutathione synthesis: interaction with N and C metabolism. **Journal of experimental botany**. v. 55, p.1831-1842, 2004.

KUMAR, A. ; JIGYASU, D. K. ; KUMAR, A.; SUBRAHMANYAM, G. ; MONDAL, R. ; SHABNAM, A. A. ; CABRAL-PINTO, M. M. S. ; MALYAN, S. K. ; CHATURVEDI, A. K.; GUPTA, D. K. ; FAGODIYA, R. K. ; KHAN, S. A. ; BHATIA,A. Nickel in terrestrial biota: Comprehensive review on contamination, toxicity, tolerance and its remediation approaches. **Chemosphere**, v. 275, p. 129996, 2021.

LÉON, V. ; RABIE , J. ; NOTONIER, R. ; BARTHELÉM, R. ; MOREAU, X. ; BOURAÏMA - MADJËBI, S. ; VIANO, J. and PINEAU, R. Effects of Three Nickel Salts on Germinating Seeds of *Grevillea exulvar. rubiginosa*, an Endemic Serpentine Proteaceae. **Annals of Botany** , v. 95, p. 609-618, 2005.

LIU, X.; RENARD, C. M.G.C. ; BUREAU, S.; BOURVELLEC, C. L. Revisiting the contribution of ATR-FTIR spectroscopy to characterize plant cell wall polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, 262, 117935, 2021.

LUZ, B. R.; CROWLEY, J. K. Identification of plant species by using high spatial and spectral resolution thermal infrared (8.0–13.5 μm) imagery. **Remote Sensing of Environment**, v. 114, p. 404-413, 2010.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination - aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop science**, v. 2, p. 176-177, 1962.

MAZUREK, S., MUCCIOLO, A., HUMBEL, B.M., NAWRATH, C. Transmission Fourier transform infrared microspectroscopy allows simultaneous assessment of cutin and cell-wall polysaccharides of Arabidopsis petals. **Plant J**, v. 74, p. 880-891, 2013.

MICHALAK, A. Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Plants Growing under Heavy Metal Stress. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 15, n. 4, p. 523-530, 2006.

MIRANDA, P. H. O. Efeito protetor do extrato hidroetanólico das folhas de caryocar coriaceum wittm. sobre a fitotoxicidade induzida pelo sulfato de níquel em *Lactuca sativa* L. 2019. 96 f. (Dissertação de mestrado em biodiversidade e conservação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Pernambuco.

MOVASAGHI, Z., REHMAN, S., REHMAN, I.U. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues. **Appl. Spectrosc**, v. 43, p. 134-179, 2008.

RANA, R., HERZ, K., BRUELHEIDE, H., DIETZ, S., HAIDER, S., JANDT, U., & PENA, R. Leaf Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR) biochemical profile of grassland plant species related to land-use intensity. **Ecological indicators**, v. 84, p. 803-810, 2018.

RANA, R., MÜLLER, G., NAUMANN, A., ANDREA POLLE, A. FTIR spectroscopy in combination with principal component analysis or cluster analysis as a tool to distinguish beech (*Fagus sylvatica* L.) trees grown at different sites. **Holzforschung**, v. 62, p. 530-538, 2008.

SEREGIN, I.V.; KOZHEVNIKOVA, A.D. Physiological role of nickel and its toxic effects on higher plants. **Russian journal of plant physiology**, v. 53, n. 2, p. 257-277, 2006.

SHAHID, M.; DUMAT, C.; KHALID, S.; SCHERER, E.; XIONG, T.; NIAZI, N.K. Foliar heavy metal uptake, toxicity and detoxification in plants: A comparison of foliar and root metal uptake. **Journal of Hazardous Materials**, v. 325, p. 36-58, 2017.

SHAHZAD, B. , TANVEER ,M. , REHMAN, A., CHEEMA, S. A. , FAHAD, S. , REHMAN, S. , SHARMA, A. Nickel; whether toxic or essential for plants and environment- A review. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.18, p. 30452-2, 2018.

SILVA, P.; MATOS, M. Assessment of the impact of Aluminum on germination, early growth and free proline content in *Lactuca sativa* L. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 131, p. 151-156, 2016.

SUNKAR, R. ; CHINNUSAMY, V. ; ZHU, J. ; ZHU, J. Small RNAs as big players in plant abiotic stress responses and nutrient deprivation. **TRENDS in Plant Science**, v.12, n. 7, p.1360-1385, 2007.

SYAM, NETTY; WARDIYATI, TATIK; MAGHFOER, MUHAMMAD DAWAM; *ET AL.* Effect of Accumulator Plants on Growth and Nickel Accumulation of Soybean on Metal-contaminated Soil. **Agriculture and Agricultural Science Procedia**, v.9, p.13-19, 2016.

TAAMALLI, M., GHABRICHE, R., AMARI, T., MNASRI, M., ZOLLA, L., LUTTS, S., ABDELY, C., GHNAYA, T. Comparative study of Cd tolerance and accumulation potential between *Cakile maritima* L. (halophyte) and *Brassica juncea* L. **Ecol. Eng.** , v.71, p. 623-627, 2014.

TÜRKER-KAYA, S., HUCK, C.W. A Review of mid-infrared and near-infrared imaging: principles, concepts and applications in plant tissue analysis. **Molecules**, v.22, p.168, 2017.

TURNER, R.C.; MARSHAL, C. Accumulation of Zinc by sub-cellular fraction of root of *Agrotis tennis* Sibith in relation to Zinc tolerance. **New phytologist**, v. 71, p. 671-676, 1972.

WESTWORTH, S. ASHWATH. N. COZZOLINO, D. Application of FTIR-ATR spectroscopy to detect salinity in Saori Beauty Leaf Nanjappa Tree (*Calophyllum inophyllum* L). **Science Direct**, v. 160, p. 761-768, 2019.

YANG, J., YEN, H.E. Early salt stress effects on the changes in chemical composition in leaves of Ice plant and *Arabidopsis*. A Fourier transform infrared spectroscopy study. *Plant Physiol.* v.130, p. 1032-1042, 2002.

ZHAO, J. LU, C., TARIQ, M., XIAO, Q., ZHANG, W., HUANG, K., LU, Q. , LIN, K., LIU, Z. The response and tolerance mechanisms of lettuce (*Lactuca sativa* L.) exposed to nickel in a spiked soil system. **Chemosphere**, v. 222, p. 399-406, 2019.