



Universidade de Aveiro  
Ano 2022

**Gonçalo Pata  
Gamito**

**O impacto no trigo da exposição a fotossensibilizadores  
porfirínicos usados em remediação de águas  
contaminadas**



Gonçalo Pata  
Gamito

## O impacto no trigo da exposição a fotossensibilizadores porfirínicos usados em remediação de águas contaminadas

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia Industrial e Ambiental, realizada sob a orientação científica da Doutora Sónia Marina P. Nunes da Silva, Investigadora Doutorada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e LAQV-REQUIMTE e coorientação da Professora Doutora Maria do Amparo Ferreira Faustino, Professora Auxiliar no Departamento de Química da Universidade de Aveiro e LAQV-REQUIMTE.



Fundação para a Ciência e a Tecnologia  
MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E ENSINO SUPERIOR



UNIÃO EUROPEIA  
Fundo Europeu  
de Desenvolvimento Regional



Governo da República  
Portuguesa



Dedico este trabalho à minha mãe.

**o júri**

presidente

Prof. Doutor Jorge Manuel Alexandre Saraiva  
Professor associado da Universidade de Aveiro

vogais

Prof. Doutora Maria Celeste Pereira Dias  
Investigadora, Departamento de Ciências da Vida, Universidade de  
Coimbra

Prof. Doutora Sónia Marina Pinto Nunes da Silva  
Investigadora Doutorada (nível 1), Universidade de Aveiro

## **agradecimentos**

À Professora Doutora Sónia Silva pela orientação, incentivo, paciência e enorme apoio dedicados durante este trabalho.

À Professora Doutora Amparo Faustino pela orientação e pela prontidão em ajudar sempre que necessitei.

A toda a minha família e aos meus amigos, porque sem eles não era possível.

**palavras-chave**

Fitotoxicidade, inativação fotodinâmica, nanopartículas metálicas, porfirinas, stress oxidativo, tratamento de águas residuais

**resumo**

A utilização crescente de nanomateriais em diversas áreas, incluindo no tratamento de águas, torna importante estimar o seu impacto nas plantas e no ambiente, uma vez que se espera que sejam eventualmente libertados para o meio ambiente e que entrem em contacto com diversos organismos. Assim, o presente trabalho realizado no âmbito desta dissertação propõe avaliar o impacto de derivados porfirínicos não-imobilizados (FORM), conjugados, ou não, a grupos aminopirilo em nanopartículas com núcleo magnético de óxido de ferro ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) ( $\text{NH}_2\text{@NMP}$ ) que foi revestido, ou não, com sílica funcionalizada com grupos aminopropil (FORM@NMP), em plantas de trigo (*Triticum aestivum* L.) – a concentrações de 0,3, 1,5 e 7,5  $\text{mg L}^{-1}$  para FORM e 6,0, 30 e 150  $\text{mg L}^{-1}$  para os restantes grupos de nanopartículas. O efeito de cada um dos materiais foi avaliado na fase de germinação e na fase vegetativa da planta com o propósito de estudar o impacto destes três nanomateriais na morfologia, fisiologia e metabolismo das plantas assim como a sua citotoxicidade.

De uma forma geral, a germinação, o desenvolvimento, a integridade membranar e o ciclo celular das plântulas de trigo não foram comprometidos. Similarmente, a exposição de plantas com 13 dias a estes materiais não condicionou o seu crescimento ou performance, tendo sido até mesmo observada, em particular nas FORM@NMP, a promoção da atividade fotossintética. Foi ainda possível observar que a exposição aos diferentes materiais não induziu danos oxidativos, embora tenha demonstrado certa capacidade para modelar a resposta antioxidante. De uma forma geral, foi possível concluir que tanto as  $\text{NH}_2\text{@NMP}$  como as FORM@NMP têm baixo potencial para induzir fitotoxicidade.

**keywords**

Metallic nanoparticles, oxidative stress, photodynamic inactivation, porphyrin, phytotoxicity, wastewater treatment

**abstract**

The increasing use of nanomaterials in several areas, including in water treatment, makes it important to estimate its impact on plants and the environment, since it is expected that they will eventually be released into the environment and get into contact with different organisms. Thus, the present work carried out within the scope of this dissertation presents a methodology to evaluate the impact of non-immobilized porphyrins (FORM), coupled or not to aminopropyl groups of NPs with a magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> core (NH<sub>2</sub>@NMP) coated, or not, with functionalized silica with aminopropyl groups (FORM@NMP), in wheat plants (*Triticum aestivum* L.) – at concentrations of 0.3, 1.5 and 7.5 mg L<sup>-1</sup> for FORM and 6,0, 30 and 150 mg L<sup>-1</sup> for the remaining groups of nanoparticles. The effect of each of the materials was evaluated in the germination and vegetative phases of the plant in order to study the impact of these three materials on the morphology, physiology and metabolism of plants as well as its cytotoxicity.

In general, germination, development, membrane integrity and cell cycle of wheat seedlings were not compromised. Similarly, the exposure of 13-day-old plants to these materials did not affect their growth or performance, and it was also observed, particularly in FORM@NMP, the increased photosynthetic activity. It was also possible to observe that exposure to different materials did not induce oxidative damage, although it showed a certain ability to model the antioxidant response. In general, it was possible to conclude that both NH<sub>2</sub>@NMP and FORM@NMP have low potential to induce phytotoxicity.

## ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.1	Tratamento de águas residuais .....	2
1.1.1	Nanopartículas metálicas na remediação de águas residuais.....	4
1.2	Inativação fotodinâmica .....	6
1.2.1	Porfirinas e a fotoinativação microbiana .....	8
1.2.1.1	Natureza das porfirinas.....	8
1.2.1.2	Porfirinas como fotossensibilizadores.....	9
1.2.1.3	Porfirinas ancoradas em nanomateriais magnéticos .....	11
1.3	Fitotoxicidade de NPs metálicas.....	15
1.4	Porfirinas nas plantas .....	17
2	Objetivos .....	17
3	Efeito da exposição de porfirinas e de NPs de ferro decoradas com porfirinas em plântulas de <i>Triticum aestivum</i> L. ....	19
3.1	Introdução.....	19
3.2	Materiais e métodos .....	22
3.2.1	Descrição e caracterização das partículas.....	22
3.2.2	Material vegetal e condições de cultura .....	24
3.2.3	Determinação do estado hídrico das plantas .....	24
3.2.4	Estado da membrana.....	25
3.2.4.1	Determinação da permeabilidade membranar.....	25
3.2.4.2	Degradação da membrana .....	25
3.2.5	Análise do ciclo celular .....	26
3.2.6	Análise estatística .....	26
3.3	Resultados.....	28
3.3.1	Caracterização das nanopartículas .....	28
3.3.2	Germinação e crescimento das plântulas .....	28
3.3.3	Citotoxicidade.....	30
3.3.3.1	Estado da membrana.....	30
3.3.3.2	Análise do ciclo celular .....	30
3.4	Discussão.....	32
4	Impacto na fotossíntese .....	37
4.1	Introdução.....	37
4.2	Materiais e métodos .....	41
4.2.1	Descrição e caracterização dos materiais .....	41
4.2.2	Material vegetal e condições de cultura.....	41



4.2.3	Determinação do estado hídrico das plantas e suculência .....	42
4.2.4	Determinação da permeabilidade membranas .....	42
4.2.5	Quantificação dos pigmentos fotossintéticos .....	42
4.2.6	Fotossíntese.....	43
4.2.6.1	Trocas gasosas .....	43
4.2.6.2	Fluorescência da clorofila <i>a</i> .....	44
4.3	Resultados.....	45
4.3.1	Crescimento da planta.....	45
4.3.2	Estado hídrico das plantas .....	47
4.3.3	Teor em pigmentos.....	47
4.4	Discussão.....	54
5	Avaliação do estado redox e da resposta antioxidante .....	59
5.1	Introdução.....	59
5.2	Materiais e métodos .....	64
5.2.1	Descrição e caracterização dos materiais .....	64
5.2.2	Material vegetal e condições de cultura .....	64
5.2.3	Determinação da peroxidação lipídica .....	64
5.2.4	Atividade antioxidante total, fenóis totais e flavonoides .....	65
5.2.5	Quantificação de ROS .....	66
5.2.5.1	Anião radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) .....	66
5.2.5.2	Peróxido de hidrogénio .....	67
5.2.6	Enzimas antioxidantes .....	67
5.2.7	Proteínas .....	68
5.2.8	Análise estatística .....	69
5.3	Resultados.....	70
5.4	Discussão.....	74
6	Conclusões gerais .....	76
7	Referências.....	79

## ABREVIATURAS/NOMENCLATURAS

$\Phi$ PSII - Eficiência efetiva do PSII

$^1\text{O}_2$  – Oxigénio singleto

$^3\text{O}_2$  – Oxigénio molecular no estado tripleto fundamental

5-ALA – Ácido 5-aminolevulínico

AAT – Atividade antioxidante total

ABTS – Ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico

APX – Peroxidase do ascorbato

Ci – Concentração intracelular de  $\text{CO}_2$

CAT – Catalase

DNA - Ácido desoxirribonucleico

*E* – Taxa de transpiração

Fm - Fluorescência máxima adaptada ao escuro

Fm' - Fluorescência máxima adaptada à luz

Fo - Fluorescência mínima adaptada ao escuro

Fo' - Fluorescência mínima adaptada à luz

FORM – Mistura de porfirinas catiónicas

FORM@NMP – Nanopartículas magnéticas de ferro conjugadas com a mistura de porfirinas catiónicas

Fs – Fluorescência em estado estacionário

Fv/Fm - Eficiência máxima do PSII

Fv'/Fm' - Eficiência máxima do PSII adaptada à luz

$g_s$  – Condutância estomática

G-POX – Peroxidase da glutatona

$\text{H}_2\text{O}_2$  – Peróxido de hidrogénio

MDA – Malondialdeído

NBT – Cloreto de azul nitrotetrazólio

NH<sub>2</sub>@NMP – Nanopartículas de ferro decoradas com grupos aminopropilo

NP – Nanopartícula

NPQ – *quenching* não-fotoquímico

O<sub>2</sub><sup>•-</sup> – Radical superóxido

OCDE – Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico

OH<sup>•</sup> - Radical hidroxilo

OMS – Organização Mundial de Saúde

PDI – Inativação fotodinâmica

PS – Fotossensibilizador

P<sub>N</sub> – Taxa de assimilação de CO<sub>2</sub>/taxa fotossintética

PPFD – Densidade de fluxo de fótons fotossintéticos

Psa – *Pseudomonas syringae py. Actinidiae*

PSI - Fotossistema I

PSII - Fotossistema II

PVP-10 – Polivinilpirrolidona

qP – *quenching* fotoquímico

ROS – Espécies reativas do oxigénio

RUBISCO - Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase

SOD – Superóxido dismutase

TBA – Ácido tiobarbitúrico

TCA – Ácido tricloroacético

TPC – Conteúdo fenólico total

TPP – 5,10,15,20 – Tetrafenilporfirina

TRA – Teor relativo de água

Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF – Porfirina tricatiónica

# 1 INTRODUÇÃO GERAL

A água é um dos principais recursos naturais existentes no planeta. É essencial à vida, e um bem que gera riqueza numa comunidade. É um recurso cada vez mais escasso, devido ao aumento da população mundial, à rápida urbanização e às alterações climáticas. Na primeira metade do século XXI, a escassez de água pode vir a afetar 40% da população mundial e em 2025 estima-se que 1,8 mil milhões de pessoas viverão em países ou regiões com escassez absoluta de água (World Health Organization 2019). Nesta perspetiva, o uso equilibrado e racional da água torna-se cada vez mais importante e a preocupação acerca da proteção das fontes de água doce aumenta, considerando-se a utilização e reutilização deste recurso como uma importante ferramenta na indústria, bem como na produção de água tratada. A necessidade de proteger este recurso levou ao desenvolvimento de estratégias que minimizem a poluição das fontes de água, incluindo a libertação de efluentes para o ambiente. Em resposta, nos últimos 40 anos, o número de estações de tratamento de águas praticamente triplicou. A implementação de normas e leis nacionais e comunitárias conduziram a alterações substanciais no controlo da poluição das águas residuais de forma a salvaguardar a saúde pública e a obter um efluente tratado compatível com a sua utilização para fins industriais, na rega e para uso recreativo (Abdelbasir and Shalan 2019; Xu et al. 2012).

As técnicas de tratamento das águas residuais podem ser classificadas como químicas, físicas ou biológicas. Em geral, a aplicação desses processos de tratamento é dispendiosa e, em alguns casos, prejudicial aos microrganismos ou mesmo a espécies recetoras, podendo induzir danos no DNA (Englande Jr., Krenkel, and Shamas 2015).

O desenvolvimento de novos métodos de tratamento de águas residuais, com recurso a fotossensibilizadores (PS) porfirínicos promete ser uma alternativa viável aos métodos tradicionais. Os PSs geralmente utilizados em terapia fotodinâmica são compostos orgânicos naturais ou sintéticos que, ao serem excitados com luz de comprimento de onda adequado, têm a capacidade de transformar a energia absorvida pela luz em espécies reativas de oxigénio (ROS) capazes de reagir com biomoléculas e induzir danos em alvos biológicos. A inativação fotodinâmica (PDI) de microrganismos requer a interação de três elementos fundamentais: luz, PS e oxigénio molecular ( $O_2$ ). A PDI de microrganismos tem sido extensivamente estudada nos últimos anos,

demonstrando ser uma alternativa promissora aos agentes antimicrobianos convencionais para o tratamento de infecções superficiais e localizadas com potencial para aplicações ambientais, como a desinfecção de águas residuais, mas também para aplicações clínicas, nomeadamente no tratamento de infecções causadas por microrganismos que se tornam mais resistentes a antibióticos (Faustino et al. 2015; Liu and Lipták 1999; Sibata et al. 2000).

Existem diversas questões relacionadas com o destino dos PS desenvolvidos para serem aplicados no ambiente e os potenciais impactos na saúde humana existindo pouca informação sobre a forma e as concentrações de PS que são libertados no ambiente devido a limitações na separação e a metodologias analíticas (Xu et al. 2012). Assim, é essencial desenvolver metodologias de análise precisas para a medição da concentração dos PS no ambiente, da forma molecular em que se encontram e do impacto que possam ter no meio ambiente. Pouco se sabe sobre as suas interações com matrizes ambientais, sendo então essencial analisar a potencial toxicidade destes novos materiais nos diferentes níveis de organismos, incluindo as plantas já que são organismos imóveis e particularmente suscetíveis a toxicidade de materiais/moléculas presentes nas águas residuais tratadas e usadas na rega (Xu et al. 2012).

Em linha com o apresentado, neste trabalho pretende-se avaliar o impacto de PS porfirínicos desenvolvidos para tratamento de águas residuais em espécies vegetais, como o trigo.

### **1.1 Tratamento de águas residuais**

O tratamento convencional de águas residuais consiste numa combinação de processos físicos (tratamento primário), químicos (tratamento secundário), biológicos (tratamento terciário) e membranares (tratamento quaternário). Numa primeira instância, com recurso a processos mecânicos que removem cerca de 20-30% dos sólidos de maiores dimensões, a água não tratada passa por sistemas de filtração e decantação. O tratamento secundário de águas residuais funciona a nível mais profundo do que o primário e é projetado para a matéria orgânica ser oxidada por meio de processos biológicos aeróbios e anaeróbios em reatores biológicos. O principal objetivo deste tratamento é a remoção de sólidos orgânicos e inorgânicos criando-se um ambiente em que bactérias, algas, fungos ou outros microrganismos presentes decomponham a matéria orgânica, transformando-as em biomassa densa que acaba por se depositar – sendo posteriormente

removida dos tanques através de processos físicos. Algum nitrogénio, fósforo e metais pesados associados à biomassa também são removidos durante a sedimentação. Após o tratamento biológico, aproximadamente 90% das águas residuais estão livres de substâncias biodegradáveis. No terceiro passo do tratamento, as águas são sujeitas a processos químicos incluindo neutralização, descontaminação (remoção de sólidos suspensos, excesso de nutrientes e compostos tóxicos mais específicos), desinfecção (com ozono, cloro ou radiação UV para remoção de microrganismos), precipitação de fosfato e eliminação de nitrogénio. Aqui, mais de 99% dos contaminantes são removidos. Por último, poderão ser usados processos de nanofiltração onde são removidos sólidos orgânicos de menores dimensões ou óxidos metálicos (Abdelbasir and Shalan 2019; Ding 2017; Bartolomeu, M. Neves, et al. 2018; Pescod 1992; Samer 2015).

A reutilização de águas residuais pode oferecer algumas vantagens e nos últimos anos, têm-se realizado muitos estudos sobre a aplicação destas águas para irrigação de espaços verdes. A utilização das águas residuais é de fácil implementação e permite reduzir bastante o consumo de água potável. Isto permite uma redução de custos provenientes da fertilização (devido ao facto desta água já conter nutrientes que podem substituir esses mesmos fertilizantes), da redução dos custos em água potável e ainda reduzir as descargas e a qualidade dos efluentes no meio recetor. Assim, a produção de culturas vegetais, utilizando águas residuais, torna-se bastante vantajosa (Pedrero et al. 2010). Porém, a qualidade final da água residual a reutilizar para rega agrícola terá de cumprir as exigências necessárias e satisfazer os requisitos agronómicos e de saúde pública estabelecidos pelos documentos legais e normativos. Num documento da Organização Mundial de Saúde (OMS), é priorizada a avaliação de riscos para a saúde, antes de se definirem parâmetros mínimos verificáveis para boas práticas de aplicação e de proteção da saúde pública, quer dos trabalhadores, quer das comunidades locais onde a água residual é utilizada com a finalidade de irrigação de culturas para consumo humano. A **tabela 1**, apresenta um resumo dos riscos associados à utilização de águas residuais para irrigação bem como os grupos de indivíduos sujeitos à exposição (Asano et al. 2007; Monte and Albuquerque 2010; World Health Organization 2006).

Tabela 1 - Sumário dos riscos associados à utilização de água residual para irrigação. Retirado de (World Health Organization 2006).

Grupo de exposição	Riscos para a saúde		
	Parasitas	Vírus/Bactérias	Protozoários
<b>Consumidores</b>	Risco de contaminação de <i>Ascaris</i> tanto para adultos como para crianças quando a água residual não é tratada	Reportórios de surtos de cólera, tifoide e shigelose devido à utilização de água residual não tratada; Respostas seropositivas para <i>Helicobacter pylori</i> ; Aumento de diarreia não específica quando a qualidade da água excede 10 <sup>4</sup> coliformes termotolerantes/100 ml	Evidência de protozoários presentes na superfície de vegetais regados com água residual, mas sem evidência direta de transmissão de doença
<b>Agricultores e família</b>	Risco significativo de contaminação de <i>Ascaris</i> quer em adultos, quer em crianças em contacto com água residual não tratada; Risco, sobretudo para as crianças quando a água residual tratada apresenta < 1 ovo de nematode por litro; Aumento do risco de infeção por ancilóstomos nos trabalhadores	Aumento do risco de diarreia em crianças quando a qualidade da água excede 10 <sup>4</sup> coliformes termotolerantes/100 ml; Elevado risco de infeção por <i>Salmonella</i> em crianças expostas a água residual não tratada; Resposta serológica, positiva ou negativa, a norovírus em adultos expostos a água residual parcialmente tratada	Risco de infeção através de <i>Giardia intestinalis</i> considerada insignificante quando o contacto quer seja água residual tratada ou não tratada; Aumento do risco de amebíase observado quando o contacto com água residual não tratada
<b>Comunidades próximas</b>	A transmissão de <i>Ascaris</i> não foi estudada quando o método de rega aplicado é por aspersão, o mesmo acontece com irrigação por sulcos	Irrigação por aspersão com água que apresenta baixa qualidade (10 <sup>6</sup> - 10 <sup>8</sup> coliformes totais/100 ml) e elevada exposição a aerossóis aumentam o risco de infeção; O uso de água parcialmente tratada (10 <sup>4</sup> - 10 <sup>5</sup> coliformes termotolerantes/100 ml ou menos) em rega por aspersão não foi encontrado aumento de risco de contaminação viral	Sem dados na transmissão de infeções devido a protozoários, durante a rega por aspersão

### 1.1.1 Nanopartículas metálicas na remediação de águas residuais

As propriedades das nanopartículas (NPs) são significativamente diferentes dos materiais convencionais, sobretudo devido ao tamanho extremamente reduzido e, portanto, à maior área superficial. Nanomateriais metálicos demonstraram possuir boas propriedades de adsorção, forte capacidade de redução química, considerável atividade catalítica, alta reatividade e alta mobilidade em solução. Estas características contribuem substancialmente para o excelente desempenho na remoção de contaminantes (Naseem and Durrani 2021).

As NPs de óxidos metálicos apresentam um enorme potencial para o tratamento de águas residuais, a baixo custo e ambientalmente sustentável. Em geral, os nanomateriais metálicos têm a capacidade de remover metais pesados, como o crómo (Cr), cádmio (Cd), cobre (Cu), mercúrio (Hg) ou chumbo (Pb). Estas NPs são facilmente reutilizáveis e regeneradas por alteração do pH da solução, mantendo a sua capacidade de adsorção intacta. A facilidade de separação, o baixo custo associado, a facilidade de regeneração e a alta capacidade de adsorção tornam as NPs economicamente e tecnologicamente promissoras (Singh et al. 2019).



NPs de ferro (Fe), zinco (Zn) ou prata (Ag) apresentam também propriedades interessantes que podem ser usadas na remediação de águas residuais, particularmente na inativação de microrganismos. Com um potencial de redução moderado, as NPs de Fe ou de Zn têm uma boa capacidade para atuar como agentes redutores em relação a muitos contaminantes. Apesar de uma capacidade de redução mais fraca, as NPs de Fe possuem muitas vantagens comparativamente às NPs de Zn em aplicações no tratamento da água, incluindo excelentes propriedades de adsorção, precipitação e oxidação (na presença de oxigênio dissolvido) com baixo custo associado. Este tipo de NPs foi aplicado com sucesso na eliminação de vários contaminantes incluindo compostos orgânicos halogenados, compostos aromáticos nitrogenados, corantes orgânicos, fenóis, metais pesados, aniões inorgânicos (fosfatos ou nitratos) e semimetais. Sabe-se ainda que demonstram eficácia na remoção de alguns vírus (Lu et al. 2016). Em relação ao destino destas NPs, sabe-se apenas que são fortemente dependentes do pH da solução e da temperatura, sendo necessários mais estudos para avaliar como são extraídas destes sistemas de tratamento de água (Abdelbasir and Shalan 2019; Yang, Zhang, and Hu 2013; Lu et al. 2016). As NPs de Ag são altamente tóxicas para microrganismos e têm, portanto, alta atividade antibacteriana contra uma ampla gama de microrganismos, incluindo vírus, bactérias e fungos. Sendo um bom agente antimicrobiano, têm sido amplamente usadas para a desinfecção de águas. Estas NPs são capazes de aderir à parede celular bacteriana e penetrá-la, resultando em mudanças estruturais da membrana (causando dano), aumentando assim sua permeabilidade e levando à morte celular (**Fig. 1**). No entanto, podem surgir alguns problemas como a tendência que apresentam de agregarem em meio aquoso que, se o uso for continuado, pode reduzir a sua eficiência. As NPs de Ag são facilmente removidas da água por transformação química, adsorção e precipitação (Yang et al. 2013; Lu et al. 2016).

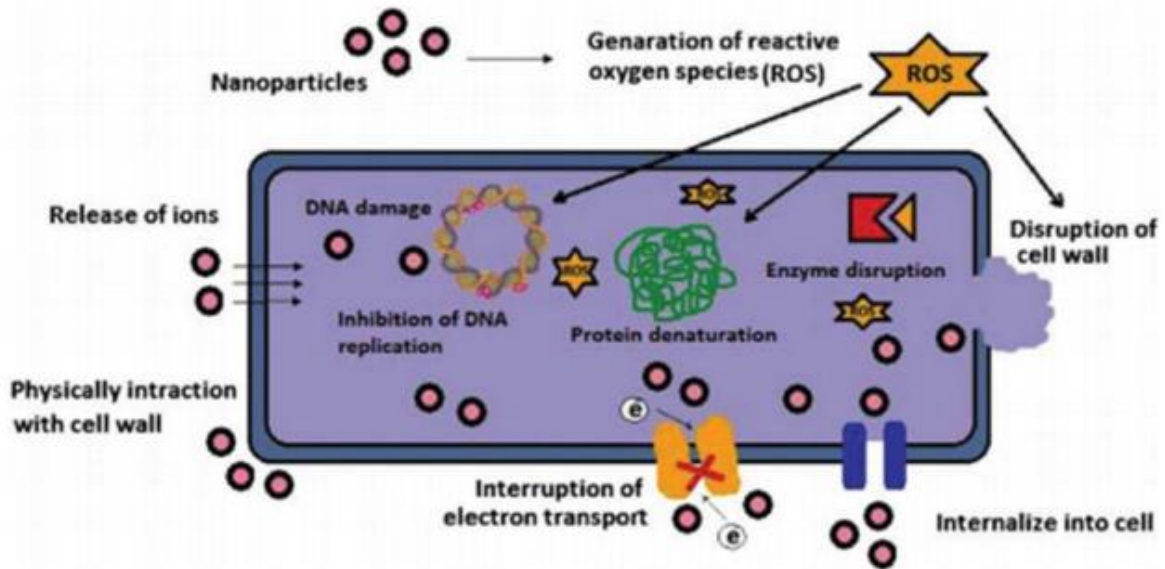


Figura 1 - Vários mecanismos de atividade microbiana das NPs metálicas. Retirado de (Abdelbasir and Shalan 2019).

## 1.2 Inativação fotodinâmica

Os métodos tradicionais (ozonização, cloração, tratamento com luz UV, entre outros) de inativação de microrganismos em águas residuais baseiam-se em processos de desinfecção tóxicos para várias espécies, induzindo dano genético aos microrganismos sendo alguns deles economicamente não-viáveis e nem sempre eficazes (Riggio, Jones, and Gibson 2019; Crini and Lichtfouse 2019). A PDI de microrganismos pode representar-se como uma alternativa aos métodos tradicionais de desinfecção. Os resultados promissores da PDI sugerem que este princípio pode ser aplicado ao tratamento de águas residuais para fotoinativar microrganismos aí presentes, mas também fotodegradar poluentes químicos (Alves et al. 2014; Bartolomeu, M. Neves, et al. 2018; Mesquita et al. 2022). Este tipo de abordagens revela-se de fácil aplicação, de baixo custo e amigo do ambiente (Almeida et al. 2012).

Como já foi referido anteriormente, a PDI requer a interação entre três elementos que, individualmente, são agentes inócuos e sem toxicidade, mas quando combinados causam danos irreversíveis: PS (corante),  $O_2$  e luz visível. A combinação destes três componentes é eficaz na inativação de um amplo espectro de microrganismos - nomeadamente bactérias de Gram-positivo e de Gram-negativo, bem como vírus, fungos, protozoários e outros parasitas - via fotogeração de ROS capazes de induzir dano aos vários constituintes moleculares das células. O PS, localizado nas células-alvo, quando ativado por baixas doses de luz visível e de comprimento de onda adequado, vai induzir a ativação fotoquímica do  $O_2$  gerando diversas ROS que são extremamente tóxicas para as células. No entanto, é mais difícil inativar as complexas comunidades microbianas

naturais das águas ambientais do que as culturas puras de microrganismos isolados dessas águas. Assim, deve ser previamente caracterizada a comunidade microbiana alvo para estabelecer um protocolo eficiente tendo em conta a concentração do PS e dose total de luz (Bartolomeu et al. 2017; Almeida et al. 2012).

O mecanismo fotocatalítico começa com a excitação do PS (**Fig. 2**), mediante a absorção de um fóton de comprimento de onda adequado que origina uma transição entre o estado fundamental ( $^0\text{PS}$ ) e um estado singleto excitado ( $^1\text{PS}^*$ ). Por cruzamento intersistemas do  $^1\text{PS}^*$  gera-se o estado tripleto excitado do fotossensibilizador,  $^3\text{PS}^*$ . O tempo de vida do  $^3\text{PS}^*$  é maior do que do  $^1\text{PS}^*$  permitindo assim que este estado excitado tripleto interaja de uma de duas maneiras, definidas como mecanismos fotoquímicos do Tipo I e II. O mecanismo Tipo I envolve reações de transferência de elétrons entre o PS excitado e um substrato, produzindo radicais livres. No mecanismo de tipo II,  $^1\text{O}_2$  é gerado por meio de um processo de transferência de energia durante uma colisão do fotossensibilizador excitado,  $^3\text{PS}^*$ , com o  $\text{O}_2$  no estado tripleto fundamental ( $^3\text{O}_2$ ) (Fernandez et al. 2017).

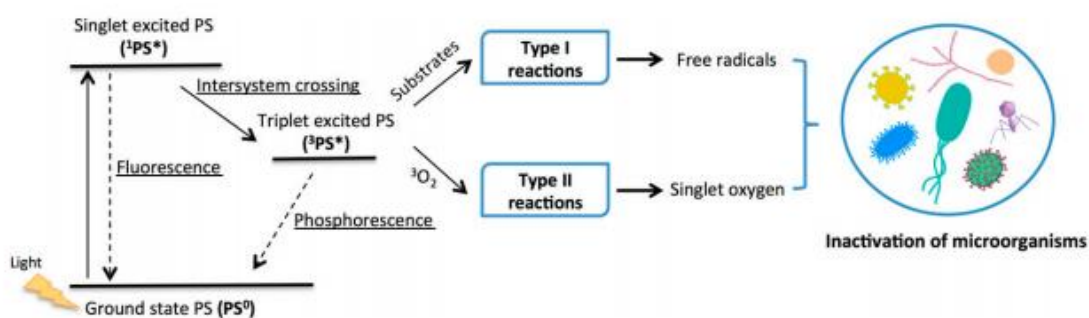


Figura 2 - Ilustração dos mecanismos fotoquímicos de diferentes espécies reativas de oxigênio (ROS) produzidas durante a ação fotodinâmica. Retirado de (Mesquita et al. 2018).

A fotoinativação de estirpes bacterianas de Gram-negativo e de Gram-positivo é altamente dependente da estrutura do PS utilizado, para além de que é requerida a imobilização deste agente num suporte sólido inerte para poder ser recuperado e reutilizado no final do processo. A seleção dos suportes sólidos deve ser baseada em alguns parâmetros: compatibilidade com o PS; resistência mecânica e estabilidade à luz; procedimentos de imobilização fáceis e reproduzíveis; boa permeabilidade ao oxigênio para eficiente produção de oxigênio singleto ( $^1\text{O}_2$ ); baixo custo associado e alta biocompatibilidade para maximizar a interação entre o suporte e os microrganismos. Estudos realizados com porfirinas atuando como PSs demonstram o grande potencial

deste tipo de compostos para aplicações biomédicas, nomeadamente para o tratamento de doenças oncológicas, cardiovasculares, dermatológicas e oftalmológicas (Mesquita et al. 2018). Só mais recentemente se descobriu a aplicabilidade destes compostos na fotoinativação de microrganismos (Mesquita et al. 2018). A abordagem fotodinâmica é utilizada para melhorar a qualidade microbiológica de água e alimentos, para controlar pragas de insetos, e para desinfetar e esterilizar materiais e superfícies em diferentes contextos (industriais, domésticos e hospitalares) (Mesquita et al. 2018; Carvalho et al. 2010; Alves et al. 2015).

No geral, para transpor esta tecnologia do contexto clínico para o meio ambiente alguns aspetos devem ser tidos em consideração: a remoção do PS após ação fotodinâmica para evitar a libertação do PS para o meio ambiente; o uso de PSs estáveis sob a ação de irradiação solar; o impacto deste procedimento na estrutura de comunidades microbianas naturais não patogénicas; a toxicidade do PS para organismos aquáticos/terrestres em doses que induzem mortalidade em microbianos patogénicos; o efeito das propriedades físicas e químicas de águas ambientais na eficiência da PDI e a possibilidade de uso da luz solar como fonte de luz (Almeida et al. 2012).

## 1.2.1 Porfirinas e a fotoinativação microbiana

### 1.2.1.1 Natureza das porfirinas

As porfirinas (**Fig. 3**) são pigmentos orgânicos (de origem natural ou sintética), capazes de absorver luz na região do visível (400-650 nm com uma banda intensa denominada de banda Soret a comprimento de onda ~ 410 nm) e ubíquos na natureza. Pertencem à classe dos macrociclos aromáticos planares composto por quatro anéis de tipo pirrol e ligados por pontes metínicas ( $-\text{CH}=\text{}$ ) (Walker and Simonis 2011).

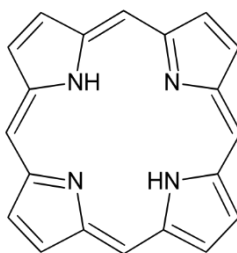


Figura 3 - Estrutura do núcleo porfirínico.

Estas moléculas têm a capacidade para formar complexos metálicos, ao fixar um íon metálico no interior através da interação com os quatro átomos de nitrogênio que possuem. Geralmente na forma de complexos metálicos, fazem parte de biomoléculas como as hemoglobinas, mioglobinas, citocromos, catalases, peroxidases, clorofilas, bacterioclorofilas, entre outros. As porfirinas podem também ser preparadas em laboratório o que permite serem-lhes introduzidos grupos funcionais muito distintos. O Fe é o metal quelante encontrado nos grupos heme e citocromos e o magnésio é encontrado nas várias clorofilas e bacterioclorofilas (**Fig.4**) (Smith 2003; Thunell 2000).

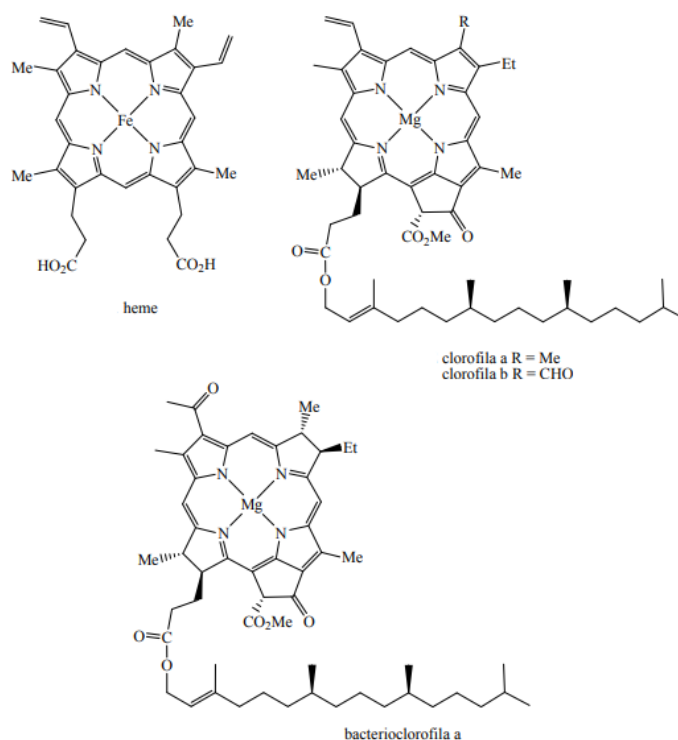


Figura 4 - Exemplos de macrociclos tetrapirrólicos de ocorrência natural. Retirado de (McIntosh and Blankenship 2014).

### 1.2.1.2 Porfirinas como fotossensibilizadores

Os alvos principais do efeito citotóxico das porfirinas como PSs são as estruturas microbianas externas, como as paredes ou membranas celulares, proteínas ou lipídios. A extensão dos danos pode ainda envolver a perda de conteúdo celular ou a inativação de sistemas de transporte membranar e enzimático. Portanto, o PS não precisa de penetrar o microrganismo. Embora ocorram também danos no conteúdo dos ácidos nucleicos, esta não é uma das principais causas de inativação. Sendo este um processo com vários alvos celulares, a probabilidade de ocorrência de desenvolvimento de mecanismos de resistência é baixa (Mesquita et al. 2022).

No entanto, a suscetibilidade aos PSs depende do tipo de microrganismo. Por exemplo, as bactérias de Gram-positivo e as de Gram-negativo não são igualmente suscetíveis ao processo de inativação fotodinâmica. Sabe-se que os PSs neutros e aniônicos são muito eficazes contra bactérias de Gram-positivo, mas não contra bactérias de Gram-negativo (Huang, Dai, and Hamblin 2010). A alta suscetibilidade das bactérias de Gram-positivo pode ser explicada pelo facto de ter uma membrana composta por apenas uma camada de peptidoglicano conferindo à bactéria um grau de porosidade que permite a penetração dos PSs nas células bacterianas. A parede celular de Gram-negativo tem uma constituição mais complexa, com a membrana externa composta por uma bicamada fosfolipídica, e uma camada de peptidoglicanos (**Fig. 5**). A membrana externa representa assim uma barreira adicional à ligação eficiente de PSs neutros e aniônicos à parede celular e mediar a PDI. Existem outros fatores que podem também influenciar a diferença na suscetibilidade da PDI de diferentes grupos de bactérias, tais como diferenças em enzimas antioxidantes, mecanismos de reparação do ácido desoxirribonucleico (DNA) ou o número de células microbianas (Huang et al. 2010; Jori and Brown 2004; Pereira et al. 2014).

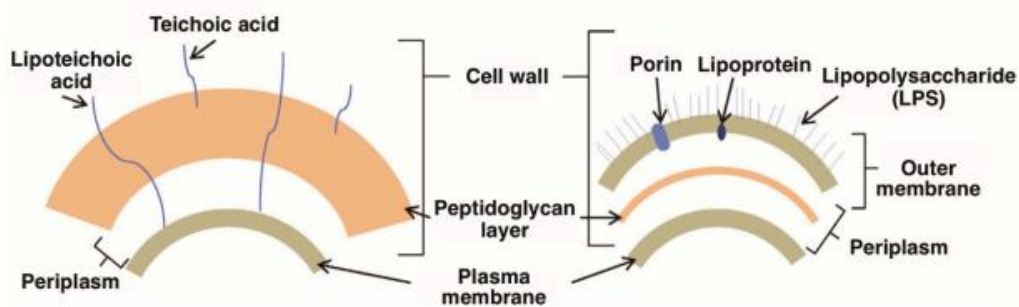


Figura 5 - Representação esquemática do envelope celular das bactérias de Gram-positivo (esquerda) e de Gram-negativo (direita). Retirado de (Mesquita et al. 2018).

A maioria dos resultados demonstram que é possível fotoinativar comunidades bacterianas naturais, mas a eficácia da fotoinativação é dependente da variação sazonal das comunidades microbianas e também da presença de outras partículas não-microbianas. Contudo, esta estratégia não é seletiva para microrganismos patogénicos. Uma vez que esta técnica tem um elevado potencial para ser implementada em aquacultura, é necessário levar em conta o impacto da PDI na comunidade de microrganismos não-patogénicos presentes em aquaculturas, já que possuem um papel ecológico importante nos ciclos biogeoquímicos nas águas de aquicultura. Algumas das porfirinas usadas como PSs foram aprovadas como aditivos alimentares ou como agentes

fototerapêuticos para algumas doenças humanas, o que depende a sua baixa toxicidade para organismos superiores. Outra vantagem de usar porfirinas é que a sua acumulação excessiva no meio ambiente é improvável de ocorrer devido ao seu fotobranqueamento gradual pela luz solar (Almeida et al. 2012; Alves et al. 2011; Alves et al. 2008).

A PDI de bactérias aparenta ser uma estratégia promissora para responder ao desenvolvimento de resistência destes microrganismos aos antibióticos, mas também na inativação de microrganismos que formam biofilmes sem o desenvolvimento de estirpes foto-resistentes. Embora a descoberta desta abordagem não seja recente, foi temporariamente colocada de lado devido ao aparecimento de antibióticos e da eficiência associada a este tipo de medicamentos. Contudo, com o desenvolvimento de resistência por parte das bactérias, houve a necessidade de resgatar esta abordagem a fim de obter uma erradicação eficiente de um amplo espectro de microrganismos.

Um exemplo promissor de porfirinas capazes de inativar microrganismos pela fototerapia é a porfirina tricatiónica (Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF) sintética. Esta porfirina, sob irradiação com luz de baixa intensidade, foi capaz de inativar eficientemente 9 espécies bacterianas (*V. anguillarum*, *V. parahaemolyticus*, *A. salmonicida*, *P. damselae subsp. damselae*, *P. damselae subsp. piscicida*, *E. coli*, *Pseudomonas sp.*, *S. aureus* e *E. faecalis*) isoladas de águas de um sistema de piscicultura (Almeida et al. 2012). Este estudo sugere que, no futuro, a PDI pode ser usada para fotoinativar agentes patogénicos de peixes em águas de aquicultura, mesmo durante dias de baixa luminosidade. Esta porfirina possui de facto características adequadas para ser imobilizada, evitando a sua libertação no meio ambiente e permitindo a sua recuperação e reutilização. Neste estudo, na água tratada com Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF e exposta à luz, observou-se uma redução no número de génotipos em relação às amostras de água não tratadas, o que indica que as populações bacterianas dominantes foram afetados pela PDI (Almeida et al. 2012; Arrojado et al. 2011).

### **1.2.1.3 Porfirinas ancoradas em nanomateriais magnéticos**

Nos últimos anos, foram sintetizados novos PSs com amplo espectro de ação, sendo eles, porfirinas catiónicas que podem inativar eficientemente bactérias, vírus e fungos. Tendo em conta a sua fácil recuperação e reutilização, considerou-se a possibilidade de imobilizar estes PS em NPs magnéticas. O uso de NPs magnéticas como modelo de dispersão de um PS pode facilitar a recuperação de uma grande parte do PS numa estação de tratamento de efluentes aplicando apenas um campo magnético externo,

embora exista sempre uma fração que poderá não ser recuperada. NPs com características magnéticas têm sido amplamente utilizadas na biologia e medicina para imobilização de proteínas e enzimas, ensaios imunológicos, purificação de DNA, isolamento de células, etc. (Faustino et al. 2015; Lu et al. 2016). Estes materiais híbridos são explorados com o objetivo de desenvolver uma abordagem ecologicamente e economicamente viável para desinfecção das águas. As porfirinas catiónicas podem inativar com eficácia os tipos de bactérias de Gram-negativo e de Gram-positivo, mesmo sem a presença de agentes de ruptura de membrana.

As NPs magnéticas representam um grupo particularmente interessante de NPs, já que na ausência de um campo magnético e com agitação adequada, podem ser dispersas homoganeamente no meio de suspensão, mas na presença de um campo magnético, é possível recuperar de forma rápida, fácil e barata o PS da mistura de reação. A fim de manter as propriedades magnéticas, este tipo de NPs são geralmente revestidas com alguns materiais não magnéticos inertes, que podem evitar a oxidação do núcleo metálico (Fernandez et al. 2017; Baker et al. 2017).

As NPs magnéticas são também usadas no tratamento de agentes patogênicos e estudos demonstram que NPs usadas como transportadores no tratamento de várias doenças (como o cancro), podem vir a ser implementadas na identificação e combate a infecções em plantas (Abd-Elsalam, Mohamed, and Prasad 2019).

Agroquímicos, conjugados a NPs magnéticas específicas, podem ser transportados para a localização desejada no tecido vegetal de forma controlada, reduzindo os riscos ambientais uma vez que esta técnica limita a exposição de produtos químicos potencialmente perigosos ao meio ambiente. Este tipo de NPs pode ainda atuar como um agente antiviral e antibacteriano, aumentando a proteção das plantas contra este tipo de agentes patogênicos (Abd-Elsalam et al. 2019).

Nas sementes, o campo magnético induzido interage com as correntes iônicas da membrana celular das sementes e, como resultado das mudanças na concentração de íons e pressão osmótica, regula a penetração da água. O campo magnético pode também afetar a permeabilidade dos canais iônicos da membrana e, portanto, o transporte de substâncias para o interior das células, podendo induzir a formação de radicais livres e alterações na concentração de hormonas vegetais e/ou enzimas e também alterações na síntese ou transmissão do DNA (Kornarzyński et al. 2020).



As abordagens normalmente utilizadas para imobilizar o PS podem envolver adsorção, aprisionamento durante a preparação da matriz inorgânica ou ligação covalente à matriz. A imobilização do PS visa permitir tanto a eliminação eficiente de microrganismos durante vários ciclos de uso como a remoção completa do PS do meio. No contexto de desinfecção de água, o uso de NPs magnéticas revestidas com sílica como um modelo para dispersar o PS também mereceu alguma atenção da comunidade científica, considerando estes materiais fotobactericidas de fácil recuperação (aplicando apenas um campo magnético), amigos do ambiente e economicamente viáveis (Mesquita et al. 2022).

Novos materiais híbridos baseados em porfirinas ancorados a NPs metálicas e revestidas com sílica amorfa foram testados como fotocatalisadores, revelando atividade fotocatalítica na remoção da hormona natural 17- $\beta$ -estradiol, um poluente persistente que causa disrupção endócrina em peixes e outras espécies animais (Fernandez et al. 2017). Em águas ambientais, sem recurso à PDI, a eliminação desta hormona e de compostos relacionados demora entre várias horas a meses, dependendo das condições biológicas do ambiente, como a irradiação solar, pH, teor de oxigênio, concentração de matéria orgânica e atividade microbiana. Observou-se também uma maior adsorção do poluente às NPs, relacionada a uma melhor estabilidade dos híbridos em soluções aquosas ácidas. Além disto, concluiu-se que a atividade fotocatalítica permaneceu praticamente constante durante vários ciclos (Fernandez et al. 2017; Gao et al. 2016; Wang et al. 2011).

Com a finalidade de diminuir o potencial impacto ambiental, os PS, como a porfirina - Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF (**Fig. 6**), podem ser covalentemente incorporados em suportes sólidos inertes como pós ou grânulos de sílica com núcleo metálico. As principais vantagens destes híbridos são o comportamento magnético proporcionado pelo núcleo metálico, a prevenção da tendência intrínseca de oxidação e agregação (e consequente degradação do núcleo magnético) bem como a capacidade de serem ligados por um amplo espectro de PS (Mesquita et al. 2018; Alves et al. 2014; Benabbou et al. 2011).

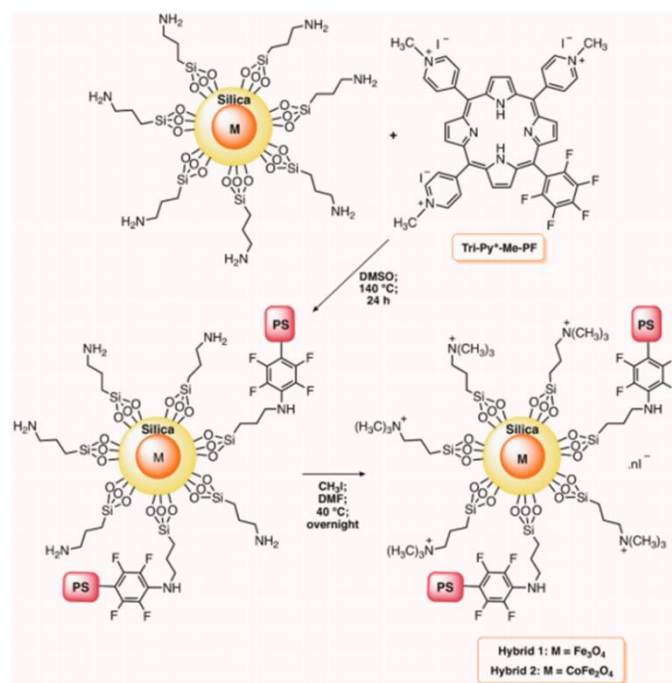


Figura 6 - Preparação de híbridos de nanomagnéticos de sílica-porfirinas. Retirado de (Mesquita et al. 2018).

Estudos realizados utilizando a porfirina catiónica Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF, conjugada a NPs magnéticas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> revestidas com sílica igualmente cationizada, demonstraram uma atividade antimicrobiana considerável para a desinfecção da água via um processo fotodinâmico (Carvalho et al. 2010). Noutro estudo, um material nanomagnético híbrido análogo, mas com núcleo de CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, foi usado com sucesso para a inativação bacteriana de uma bactéria de Gram-negativo (*Allivibrio fischeri*) durante o processo de fotossensibilização (Alves et al. 2014). Os híbridos nanomagnéticos de ambos os estudos, demonstraram fotoestabilidade e mantiveram as suas propriedades magnéticas, durante os processos de fotoinativação bem como as excelentes atividades antimicrobianas e a capacidade de reciclagem e reaproveitamento deste tipo de híbridos em águas contaminadas com bactérias.

Assim, porfirinas ancoradas em nanomateriais magnéticos são estratégias promissoras para a inativação de vários microrganismos. No entanto, uma vez que existe a possibilidade de estes materiais serem libertados para o meio ambiente (por exemplo, em águas residuais tratadas usadas na agricultura) e entrarem em contacto com diversos organismos, é necessário avaliar a toxicidade destes materiais inovadores nos organismos, como por exemplo nas espécies vegetais. A necessidade desta avaliação torna-se ainda mais premente já que estão descritos diversos efeitos negativos de NPs metálicas em espécies vegetais.

### 1.3 Fitotoxicidade de NPs metálicas

O tamanho das NPs permite a fácil penetração nas células (**Fig. 7**), causando possível toxicidade a plantas ou animais. O crescente número de aplicações de NPs aumenta os riscos de exposição ambiental existindo, portanto, preocupações acerca dos potenciais efeitos fitotóxicos causados pela liberação de NPs para o meio ambiente.

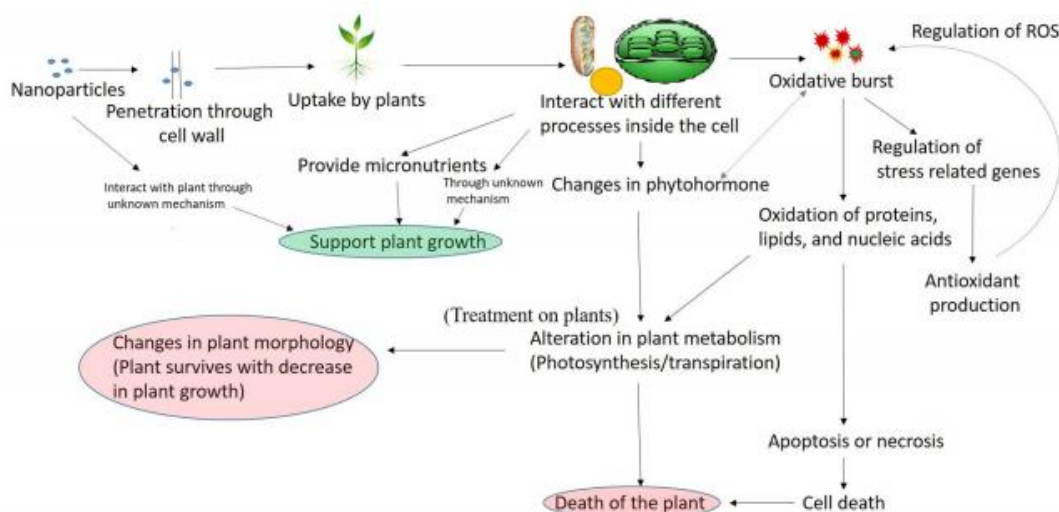


Figura 7 - Mecanismo de interação de NPs com plantas. Retirado de (Rastogi et al. 2017).

As principais vias de toxicidade de NPs metálicas em espécies vegetais parece envolver diversas estratégias, incluindo: a) liberação de íons das NPs que podem ser tóxicos para planta (p.e. os íons libertados podem afetar respiração celular ou transporte de íons através da membrana celular, podendo levar à morte celular ou a efeitos genotóxicos); b) produção de ROS gerando stress oxidativo nas plantas (Tripathi et al. 2017; Chen 2018). A quantidade de ROS produzida pela ação de NPs metálicas está relacionada com o seu tamanho, forma e área de superfície (Fu et al. 2014). As ROS possuem múltiplas funções, incluindo na sinalização celular envolvida na proliferação, respiração, mobilidade e diferenciação celulares. No entanto, quando em excesso, causam graves danos às membranas lipídicas e a outras macromoléculas essenciais, incluindo proteínas e ácidos nucleicos, resultando na morte celular das plantas (Dayem et al. 2017; Kumar et al. 2017). A perda da homeostasia redox em células vegetais pela ação de NPs metálicas já foi descrita para diversas espécies, e entre as NPs metálicas capazes de induzir stress oxidativo incluem-se NPs de ZnO (Azarin et al. 2022), TiO<sub>2</sub> (Silva et al. 2019), Ag@CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (López-Luna et al. 2020) e Fe de valência zero (Ghosh, Mukherjee, and Mukherjee 2017; Yoon et al. 2018). Além disso, a toxicidade de NPs está fortemente

dependente da sua composição e estrutura química, potencial químico do núcleo metálico, tamanho, cristalinidade, porosidade, potencial redox e área da superfície das NPs bem como da espécie vegetal utilizada e ainda do período de exposição (Ruttkay-Nedecky et al. 2017; Thounaojam et al. 2021).

As NPs metálicas podem também causar dano no DNA e induzir alterações na expressão génica (p.e. em genes que regulam a formação da parede celular ou a divisão celular, a assimilação de nutrientes e os canais de transporte de água) (Tripathi et al. 2017; Chen 2018). A interação das NPs metálicas com as plantas afetará o seu destino e transporte no ambiente podendo ainda aderir-se às raízes e, conseqüentemente, causar toxicidade física e química às plantas. A presença das NPs na superfície das raízes pode afetar a superfície química da raiz e, como consequência, afetar a assimilação de nutrientes. As NPs podem ter efeitos negativos na fisiologia das espécies vegetais, como a redução da germinação, desenvolvimento e crescimento das plantas, podendo ainda afetar a biomassa fresca e fotossíntese (J. Yang, Cao, and Rui 2017). Mais especificamente, em relação as Fe-NPs, muitos estudos descrevem o seu potencial fitotóxico. Sabe-se que este tipo de NPs provocou uma diminuição do conteúdo de clorofila e do crescimento em *Arabidopsis thaliana* (de la Rosa et al. 2017) e inibiu também o crescimento de *Chlorella pyrenoidosa* (Lei et al. 2016). *Elodea canadensis* sofreu severas alterações fisiológicas quando em contacto com Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-NPs na presença de luz – as folhas ficaram amarelas devido à diminuição no conteúdo de pigmentos clorofilinos. O mesmo tipo de NPs provocou uma diminuição no conteúdo de clorofila total em *Helianthus annuus* L. e a absorção de micronutrientes como o magnésio, associado à síntese de clorofila (Ramazanov et al. 2015). Em plântulas de milho (*Zea mays* L.), também foi relatado que o total teor de clorofila diminuiu quando comparado com as amostras do controlo, a concentrações de 20, 50 e 100 mg L<sup>-1</sup> em 11,6%, 39,9% e 19,6%, respetivamente (Martínez-Fernández, Barroso, and Komárek 2016). Ainda, quando administradas NPs de óxido de Fe na planta aquática *Lemna minor* verificou-se que, ao fim de 7 dias, as folhas morreram independentemente da concentração das NP. A peroxidação lipídica aumentou (com o aumento da concentração), o conteúdo de clorofila diminuiu - interrompendo o mecanismo de absorção de luz – ocorrendo ainda a acumulação das NPs nas raízes dificultando a captação de nutrientes (Kitajima and Hogan 2003).

## 1.4 Porfirinas nas plantas

Nas plantas, os macrociclos porfirínicos são essenciais para a sinalização luminosa, a assimilação de nitrato e sulfato, respiração e fotossíntese. Assim, não surpreende que este metabolismo seja bastante regulado. Embora a informação acerca da função biológica dos mecanismos de sinalização devido aos macrociclos porfirínicos ainda esteja pouco aprofundada, há evidências claras de que esta sinalização é significativa. Mais especificamente, parece afetar a acumulação de amido nas plantas e pode promover tolerância ao stress abiótico. Em plantas e algas, os macrociclos tetrapirrólicos são sintetizados a partir do glutamato por uma via biossintética ramificada localizada inteiramente dentro dos plastos. Os produtos finais desta via são, por exemplo, clorofila *a* e clorofila *b*. *In vivo*, muitos macrociclos tetrapirrólicos, como as porfirinas, são sequestrados (p.e. por inserção de um átomo de Fe) para prevenir que produzam  $^1\text{O}_2$  ou radicais livres, ROS que causam stress e, em última instância, a morte celular.

Numa vertente de defesa das plantas, a PDI foi testada na inativação da *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa), uma bactéria fitopatogénica de Gram-negativo responsável pelo cancro na planta do kiwi. A Psa é geralmente controlada com a aplicação de compostos de Cu (II) que podem ser tóxicos para a planta, afetando o desenvolvimento da planta ou interferindo na fotossíntese. A terapia fotodinâmica apresenta-se então como um processo alternativo e eficaz na inativação desta bactéria, utilizando porfirinas catiónicas como PSs que demonstraram ser relevantes para induzir a fotoinativação de bactérias de Gram-negativo. A porfirina utilizada foi a Tetra-Py<sup>+</sup>-Me que para além de se revelar eficaz na fotoinativação desta bactéria, foi utilizada durante 3 ciclos consecutivos, com um número de bactérias sobreviventes aproximado em todos os ciclos, significando que não se desenvolveu nenhum tipo de resistência por parte da suspensão bacteriana a este PS e sem que a cutícula da planta fosse afetada (Martins et al. 2018).

## 2 Objetivos

Este trabalho tem por principal objetivo avaliar o impacto nas plantas de uma formulação contendo uma mistura de porfirinas (FORM), conjugada (FORM@NMP), ou não, a NPs com núcleo magnético de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (NH<sub>2</sub>@NMP) contendo grupos aminopropilo. O material híbrido FORM@NMP é usado na fotoinativação de microrganismos em águas

residuais, e devido ao potencial que existe destes materiais virem a interagir com espécies vegetais ao serem regadas com águas residuais tratadas, ou ao facto de poderem vir a ser descartados no ambiente, pretende-se avaliar o impacto destes três materiais (FORM, NH<sub>2</sub>@NMP e FORM@NMP) na morfologia, fisiologia e metabolismo das plantas assim como a sua citotoxicidade.

Para alcançar os objetivos propostos desenvolveu-se um plano de trabalho que aborda o impacto da exposição destes materiais na espécie vegetal modelo, *Triticum aestivum* L., sendo ainda avaliada a ação de cada um dos materiais na fase de germinação e na fase vegetativa da planta.

Na fase de germinação (**Capítulo 3**), as sementes irão germinar na presença dos três materiais e serão avaliados diversos biomarcadores de forma a avaliar o efeito no crescimento (taxa de germinação, comprimento da parte radicular e da parte aérea e biomassa), na indução de stress oxidativo (permeabilidade membranas; degradação da membrana) sendo também analisados parâmetros fisiológicos (estado hídrico das plantas) e ainda o progresso do ciclo celular.

Na fase de desenvolvimento vegetativo, mais particularmente na determinação do impacto na fotossíntese (**Capítulo 4**), serão também avaliados parâmetros morfológicos (comprimento e biomassa fresca das folhas) e fisiológicos (conteúdo hídrico, suculência, permeabilidade membranas, quantificação de pigmentos – clorofilas *a* e *b*, carotenoides e antocianinas - fluorescência da clorofila *a* e trocas gasosas).

Por último, avaliar-se-á a indução de stress oxidativo de cada um dos materiais assim como a resposta antioxidante das plantas (**Capítulo 5**) através de parâmetros bioquímicos (peroxidação lipídica; atividade antioxidante total, fenóis totais e flavonoides; quantificação de ROS – radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) e peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>); quantificação de enzimas antioxidantes e de proteínas solúveis totais).

### **3 Efeito da exposição de porfirinas e de NPs de ferro decoradas com porfirinas em plântulas de *Triticum aestivum* L.**

#### **3.1 Introdução**

Embora a maioria das NPs tenha um tamanho maior do que o dos poros da parede celular de uma planta (3,5-5 nm), foi demonstrado que estas podem entrar nas células da raiz através de diferentes mecanismos: aquaporinas; endocitose; sistemas de transporte membranar ou por ligação a proteínas transportadoras ou a compostos orgânicos do meio (Iannone et al. 2016). Dependendo do tipo de NPs, estas podem acumular-se nas raízes ou podem ser transportadas para outros tecidos via xilema e floema. O movimento das NPs entre as células pode ocorrer com o auxílio de plasmodesmos (canais de comunicação e transporte entre células) e, dentro das células, podem ser transportados por endo ou exocitose. Uma vez nas plantas, os efeitos gerais das NPs podem ser catalíticos, inibitórios, estimuladores, tóxicos ou neutros, dependendo das propriedades das NPs e das características das plantas, a concentração a que as plantas são expostas e as condições a que as plantas estão sujeitas (Tighe-Neira et al. 2018; Iannone et al. 2016).

Após a captação e transporte das NPs pela planta, estas podem acumular-se na parte aérea, aumentando a probabilidade da sua reciclagem no ecossistema através de vários níveis tróficos (Ahmed et al. 2018). As NPs absorvidas podem ser modificadas dentro das plantas por processos de agregação ou biotransformação já que foram encontradas em tamanhos maiores que o original. A presença de NPs nas plantas pode afetar a taxa de germinação e biomassa total e, em última instância, o rendimento de cultura (Kurczynska et al. 2021; Ali, Mehmood, and Khan 2021; Tighe-Neira et al. 2018). Os estudos disponíveis na literatura permitem concluir que os resultados até agora obtidos são inconsistentes e não permitem, portanto, que se façam generalizações sobre os efeitos das NPs no crescimento e desenvolvimento das plantas, indicando que as alterações bioquímicas, morfológicas, fisiológicas e genéticas das plantas estão dependentes de muitos fatores (Kurczynska et al. 2021; Banerjee et al. 2019). São então necessários mais estudos para compreender melhor o impacto das diferentes NPs nas várias espécies de plantas.

Relativamente às NPs metálicas, estas apresentam capacidade de modificar os processos fisiológicos e bioquímicos das plantas, podendo afetar a sua germinação e crescimento. A utilização de nanomateriais de óxido de Fe tem recebido atenção devido ao facto de apresentarem propriedades únicas, como a cinética rápida, baixa toxicidade, alta reatividade e grande biocompatibilidade, mas também por serem partículas de síntese fácil, extremamente versáteis, quimicamente inertes, capazes de promover a captação de nutrientes e com excelentes propriedades magnéticas. De facto, quando se aplica um campo magnético externo às NPs de óxido de Fe, ocorre uma rápida agregação, mas quando este campo magnético é removido, as NPs são facilmente dispersas (Xu et al. 2012; Sukopová et al. 2013; Gutierrez, Dziubla, and Hilt 2017).

As NPs de óxidos de Fe foram aplicadas com sucesso no tratamento de águas residuais devido ao seu baixo custo, forte e rápida capacidade de adsorção dos contaminantes, estabilidade e fácil separação magnética. Neste campo, as NPs de óxido de Fe podem ser divididas em dois grupos: i) nano-adsorventes devido à sua elevada área superficial (de metais pesados, contaminantes orgânicos ou nutrientes) aumentando desta forma a eficácia de remoção; ii) fotocatalisadores para oxidar contaminantes em formas menos tóxicas (ou seja, tecnologia fotocatalítica) – **Fig. 8** (Xu et al. 2012; Sukopová et al. 2013; Gutierrez et al. 2017).

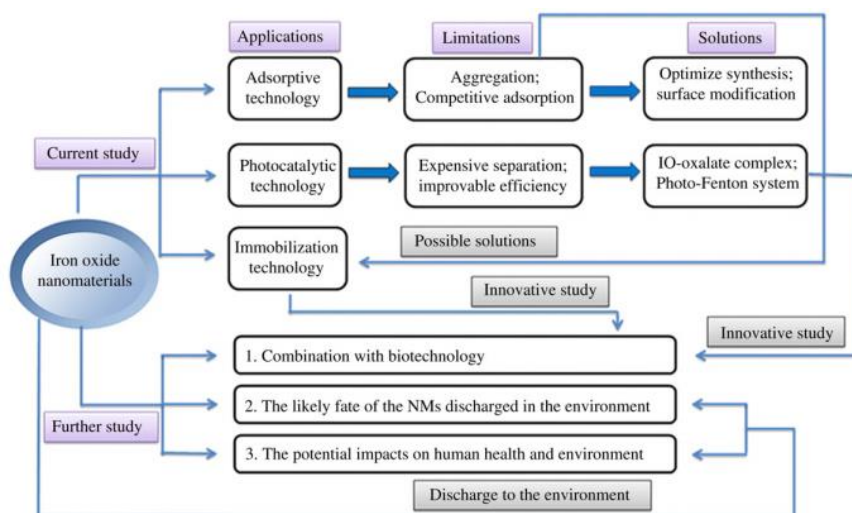


Figura 8 - Aplicações das NPs de óxidos de ferro. Retirado de (Xu et al. 2012).

Uma vez que NPs magnéticas de Fe, isoladas, revestidas ou conjugadas com porfirinas são bastante promissoras no tratamento de águas residuais, havendo uma elevada probabilidade de acabarem por ser libertadas para o meio ambiente e entrarem em contacto com as plantas, é premente avaliar a sua potencial fitotoxicidade. Em linha



com o exposto, nesta secção avaliar-se-á o impacto de NPs magnéticas de Fe conjugadas com uma mistura de porfirinas (FORM@NMP) na germinação e desenvolvimento de plântulas de *Triticum aestivum* L., assim como o efeito da formulação de porfirinas não imobilizadas (FORM) e das NPs magnéticas de Fe sem a formulação porfirínica (NH<sub>2</sub>@NMP). Para isso, ir-se-á analisar a taxa de germinação, crescimento, o conteúdo em água, o estado da membrana e o ciclo celular. No final, pretende-se determinar o potencial destes materiais em induzir toxicidade nas fases mais precoces de desenvolvimento do trigo.

## 3.2 Materiais e métodos

### 3.2.1 Descrição e caracterização das partículas

Foram utilizados 3 tipos de materiais: i) formulação de 5 porfirinas não-imobilizadas (FORM; **Fig. 9**), ii) NPs magnéticas de Fe funcionalizadas com grupos aminopiril (NH<sub>2</sub>@NMP; **Fig. 10**) e iii) FORM conjugada a NH<sub>2</sub>@NMP (FORM@NMP; **Fig.11**).

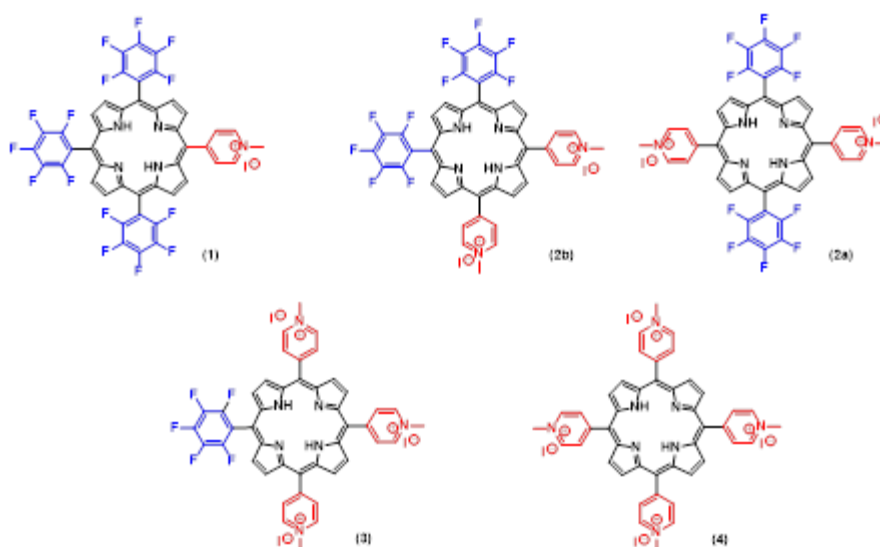


Figura 9 - Algumas das porfirinas que compõem a formulação de porfirinas (FORM): 1) Mono-Py(+)-Me (5-(1-metilpiridinium-4-il)-10,15,20-tris(pentafluorofenil)-porfirina mono-iodida); 2a) Di-Py(+)-Me opp (5,15-bis(1-metilpiridinium-4-il)-10,20-bis(pentafluorofenil)-porfirina di-iodida); 2b) Di-Py(+)-Me adj (5,10-bis(1-metilpiridinium-4-il)-15,20-bis(pentafluorofenil)-porfirina di-iodida); 3) tri-Py(+)-Me (5,10,15-tris(1-metilpiridinium-4-il)-20-(pentafluorofenil)-porfirina tri-iodida) e 4) tetra-Py(+)-Me (5,10,15,20-tetraquis(1-metilpiridinium-4-il) porfirina tetra-iodida) .



Figura 10 - NPs com núcleo de óxido de ferro magnético (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) revestido com uma camada de sílica funcionalizada com grupos aminopropilo.

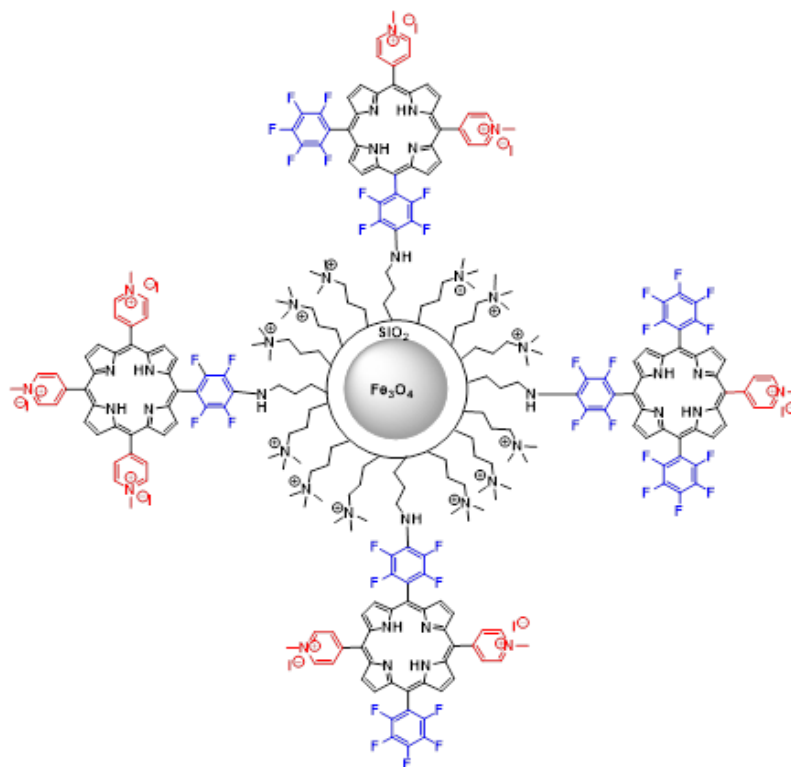


Figura 11 – Porphirinas catiónicas conjugadas a grupos aminopropilo em NPs com núcleo de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e revestido com sílica e funcionalizado com grupos tetrametilamôniopropilo.

A morfologia dos materiais foi analisada por microscopia eletrônica de varrimento (*Hitachi SU-70, Hitachi High-Technologies Corp., Tokyo, Japan*) e o tamanho hidrodinâmico e o potencial zeta dos materiais foram analisados por DLS (*Zetasizer Nano, Malvern Instruments, Malvern, UK*).

As concentrações utilizadas foram obtidas com base nas concentrações de FORM@NMP ( $300 \text{ mg L}^{-1}$ ) usadas em cada ciclo de tratamento de águas residuais e na quantidade de FORM@NMP não recuperadas magneticamente (2%) após cada ciclo de tratamento. Assim, estabeleceu-se a concentração mais baixa de FORM@NMP e de  $\text{NH}_2$ @NMP em  $6 \text{ mg L}^{-1}$  (2% de  $300 \text{ mg L}^{-1}$ ) e de  $0,3 \text{ mg L}^{-1}$  de FORM (equivalente de FORM que se encontra imobilizada em  $6 \text{ mg L}^{-1}$  de FORM@NMP). Tendo em conta que os 2% é um valor estimado e que pode aumentar com o número de ciclos, estabeleceram-se mais duas concentrações:  $30$  e  $150 \text{ mg L}^{-1}$  de FORM@NMP e de  $\text{NH}_2$ @NMP;  $1,5$  e  $7,5 \text{ mg L}^{-1}$  de FORM.

As soluções/suspensões usadas foram preparadas em água ([ $6 \text{ mg/L}$ ]:  $3 \text{ mg}$  de FORM@NMP em  $500 \text{ mL}$  de água destilada; [ $30 \text{ mg/L}$ ]:  $15 \text{ mg}$  de FORM@NMP em  $500 \text{ mL}$  de água destilada e [ $150 \text{ mg/L}$ ]:  $75 \text{ mg}$  de NMP em  $500 \text{ mL}$  de água destilada) e depois as suspensões foram colocadas num banho de ultrassons (*Bandelin Sonorex*

Digitec (Berlin, Germany)), por 30 min. No caso das soluções de FORM em fase homogénea (não-imobilizada), preparou-se uma solução stock de 5 mg de FORM em 10 mL de água destilada (500 mg/L) e em seguida retirou-se o volume apropriado para a concentração pretendida: [0,30 mg/L]: 0,3 mL de solução stock para um volume final de 500 mL de água destilada; [1,5 mg/L]: 1,5 mL de solução stock para um volume final de 500 mL de água destilada e [7,5 mg/L]: 7,5 mL de solução stock para um volume final de 500 mL de água destilada.

### **3.2.2 Material vegetal e condições de cultura**

*Triticum aestivum* L. foi escolhido como espécie-modelo neste estudo devido à sua elevada importância no setor agro-alimentar, destacando-se como o segundo cereal mais cultivado mundialmente para consumo humano, com 713 milhões de toneladas anualmente produzidas e porque é também uma das espécies-modelo sugerida pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico (OCDE) para o teste de produtos químicos (Dias et al. 2018; Manzoor et al. 2021).

Sementes de trigo foram embebidas em água destilada durante 10 min, desinfetadas em lixívia a 10% durante 15 min, lavadas duas vezes com água destilada (10 min) de forma a retirar a lixívia, e colocadas sob papel de filtro humedecido em caixas de Petri para germinarem (30 sementes em cada caixa). Utilizaram-se 4 caixas de Petri para cada tratamento: i) FORM (0,3; 1,5 e 7,5 mg L<sup>-1</sup>); ii) NH<sub>2</sub>@NMP (6, 30 e 150 mg L<sup>-1</sup>); iii) FORM@NMP (6, 30 e 150 mg L<sup>-1</sup>); iv) controlo. Em cada caixa adicionaram-se 9 mL das respetivas soluções/suspensões e no controlo foi adicionado o mesmo volume de água. Foi ainda realizado um controlo positivo ao qual se adicionou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3 mL a 15%) no final do período de germinação de forma a induzir danos às plântulas. Todas as caixas de Petri foram deixadas no escuro. Passados três dias avaliou-se a taxa de germinação, e após 7 dias avaliou-se o comprimento, da parte aérea e da parte radicular (n=12) e colheu-se material para avaliar a massa fresca e a massa seca da parte aérea e radicular (n=6), o teor relativo em água, o estado da membrana e o ciclo celular.

### **3.2.3 Determinação do estado hídrico das plantas**

Para a determinação do teor relativo de água (TRA) foi determinada a massa fresca (MF) do material vegetal e, de seguida, o material vegetal foi colocado em tubos fechados com água destilada no escuro durante a noite para determinação da massa túrgida (MT), após a eliminação do excesso de água. Por último, o material foi colocado numa estufa a

60°C para se obter a massa seca (MS) do material.

O TRA foi calculado de acordo com a fórmula:  $TRA (\%) = \frac{(MF-MS)}{(MT-MS)} \times 100$ .

### 3.2.4 Estado da membrana

#### 3.2.4.1 Determinação da permeabilidade membranar

Colheu-se o material fresco com o mínimo de danos possível e colocou-se em tubos de 15 mL. O material vegetal foi coberto com água Milli-Q de acordo com a razão: 50 mg de material fresco para 3 mL de água Milli-Q e permaneceu em incubação no frio, durante a noite. No dia seguinte, foi lida a condutividade das soluções e as amostras foram colocadas num autoclave a 121 °C e a uma pressão de 1 bar durante 15 min. Passado este período, a condutividade foi novamente lida.

A permeabilidade membranar, expressa em percentagem (%), foi calculada de acordo com a fórmula:  $\frac{\text{condutividade overnight } \left(\frac{\mu\text{S}}{\text{cm}}\right)}{\text{condutividade autoclave } \left(\frac{\mu\text{S}}{\text{cm}}\right)} \times 100$ . Para esta análise foram usadas

6 réplicas biológicas para cada tratamento, em que cada uma consistia nas raízes de duas plântulas.

#### 3.2.4.2 Degradação da membrana

A perda da integridade membranar foi determinada espectrofotometricamente usando a coloração por *Evan's blue*. O corante *Evan's blue* penetra nas células com membranas danificadas ou destabilizadas. Assim, quando as células vegetais estão sujeitas a stress que compromete a integridade da membrana, o número de células permeáveis ao corante aumenta em comparação com as células que mantêm a integridade da membrana. As células que absorvem o *Evan's blue* terão uma coloração protoplasmática azul, e o corante após extração pode ser quantificado espectrofotometricamente. Assim, quanto maior for o valor de absorvância, maior será a concentração de corante e, conseqüentemente, maior a degradação membranar.

Para esta análise, incubou-se o material vegetal (raízes) em 0,1% mM *Evan's blue* (preparado em 0,1 M CaCl<sub>2</sub> pH 5.6) durante 2 h. As raízes foram depois lavadas com água corrente e de seguida com água destilada até que não fosse libertado mais corante. Selecionou-se e macerou-se 0,5 cm dos ápices radiculares em 1 mL de 1% SDS preparado em água Milli-Q. O material vegetal passou por um processo de incubação durante 30 min a 60 °C sendo depois centrifugado durante 10 min a 13.500 g. Por fim, retiraram-se 250 µL do sobrenadante para uma microplaca, onde foi lida a absorvância, a 600 nm, num

leitor de microplacas (Synergy™ HT, BioTeK®). Como controlo positivo foram usados os ápices radiculares de plântulas que foram previamente incubadas a 100 °C durante 10 min. Foram usadas 6 réplicas por tratamento, e cada uma era composta por 12 ápices radiculares de 4 plântulas diferentes.

### 3.2.5 Análise do ciclo celular

A análise da progressão do ciclo celular foi realizada por citometria de fluxo. Suspensões de núcleos foram obtidas a partir de ápices radiculares após o *chopping* em tampão WPB (0,02 M Tris; 4mM MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O; Triton X-100; 2 mM Na<sub>2</sub>\*EDTA.2H<sub>2</sub>O; 86 mM NaCl; 10 mM metabissulfito e 1% PVP-10 (Polivinilpirrolidona)). Para cada tratamento foram usadas 6 réplicas diferentes compostas por 5-8 ápices radiculares cada uma. Após o processo de *chopping*, a suspensão nuclear foi filtrada através de um filtro de nylon e foram adicionados 50 µL de iodeto de propídio e 50 µL RNase às suspensões. Os núcleos foram de seguida analisados num citómetro de fluxo *Attune®Acoustic Focusing Cytometer* (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) equipado com um laser violeta sintonizado a 50 mW (opera a 405 nm) e com um laser azul sintonizado a 20 mW (opera a 488 nm). Analisaram-se cerca de 5000 núcleos por cada amostra e a percentagem de núcleos em cada fase da interfase do ciclo celular (fases G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, S e G<sub>2</sub>) foi determinada por meio do *software FlowJo* (Tree Star Inc., Ashland, Oregon, EUA).

### 3.2.6 Análise estatística

A distribuição da normalidade dos dados foi testada e os dados foram transformados para normalização, quando necessário. A análise estatística foi realizada através do teste *Two-Way* ANOVA procedidos pelos procedimentos de comparação múltipla Holms Sidak ( $p < 0,05$ ). O negrito em cada gráfico corresponde a diferenças significativas ( $P \leq 0,05$ ): entre o grupo de controlo e todas as doses dos três tratamentos (T); entre as doses do mesmo tratamento (D) e entre as mesmas doses dos diferentes tratamentos (TxD). A análise estatística foi realizada no programa SigmaPlot (*Systat Software Inc.*) e foram analisadas diferenças significativas entre o grupo de controlo e todas as concentrações dos três tratamentos (FORM, NH<sub>2</sub>@NMP e FORM@NMP), entre as diferentes concentrações do mesmo tratamento e entre as mesmas concentrações dos diferentes tratamentos. Uma vez que as concentrações usadas de FORM corresponde à fração de porfirinas presentes na FORM@NMP, aquando da realização da análise estatística atribuiu-se ao grupo das FORM as mesmas concentrações dos grupos

NH<sub>2</sub>@NMP e FORM@NMP: 0,3 correspondeu a 6 mg L<sup>-1</sup>; 1,5 correspondeu a 30 mg L<sup>-1</sup>, 7,5 correspondeu a 150 mg L<sup>-1</sup>. De outra forma, não seria possível comparar o grupo FORM com os restantes grupos.

### 3.3 Resultados

#### 3.3.1 Caracterização das nanopartículas

A análise por SEM demonstrou o amorfismo das partículas FORM@NMP (**Fig. 12**). A análise por DLS (*Zetasiser Nano, Malvern Instruments, Malvern, UK*) mostrou a tendência para agregação e aglomeração das partículas, o que dificultou uma medição exata do tamanho hidrodinâmico das partículas. No entanto, foram obtidos os seguintes valores: FORM@NMP – 1,726  $\mu\text{m}$  e  $\text{NH}_2$ @NMP – 2,610  $\mu\text{m}$ . Com relação ao potencial zeta, foram obtidos os seguintes valores para cada material:  $\text{NH}_2$ @NMP: -0,07 mV (1 mg/L) e FORM@NMP: 29,8 mV (1 mg/L), mostrando maior estabilidade das FORM@NMP relativamente às  $\text{NH}_2$ @NMP e menor tendência para formar aglomerados/agregados.

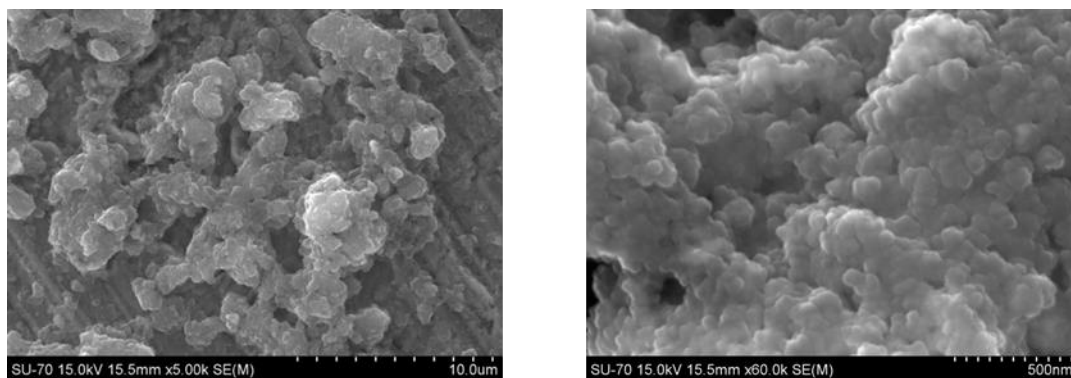


Figura 12 - Fotografias SEM (*Scanning electron microscopy*) do aglomerado FORM@NMP.

#### 3.3.2 Germinação e crescimento das plântulas

A percentagem de germinação (**Fig.13 A**) e o comprimento da parte radicular (**Fig.13 D**) das plântulas não apresentaram quaisquer variações ( $p>0,05$ ). A massa fresca total (**Fig.13 B**), por outro lado, diminuiu de forma geral em todos os tratamentos quando comparados com os valores de controlo (18,9% para FORM, 9,9% para  $\text{NH}_2$ @NMP e 8,9% para FORM@NMP) – não existindo diferenças significativas entre os tratamentos. Relativamente ao comprimento da parte aérea (**Fig. 13 C**) verificou-se um estímulo nas FORM a 7,5  $\text{mg L}^{-1}$  (comparativamente ao controlo (37,6%) e às concentrações mais baixas) e no grupo  $\text{NH}_2$ @NMP a 6  $\text{mg L}^{-1}$  (comparativamente ao controlo (27,8%) e aos grupos FORM e FORM@NMP na mesma concentração).

A análise do teor relativo de água (TRA) (**Fig. 13 E**) revela efeito do tipo de tratamento que se traduz numa diminuição significativa deste parâmetro nas plântulas tratadas com FORM comparativamente ao controlo (2,0%) e aos outros grupos.



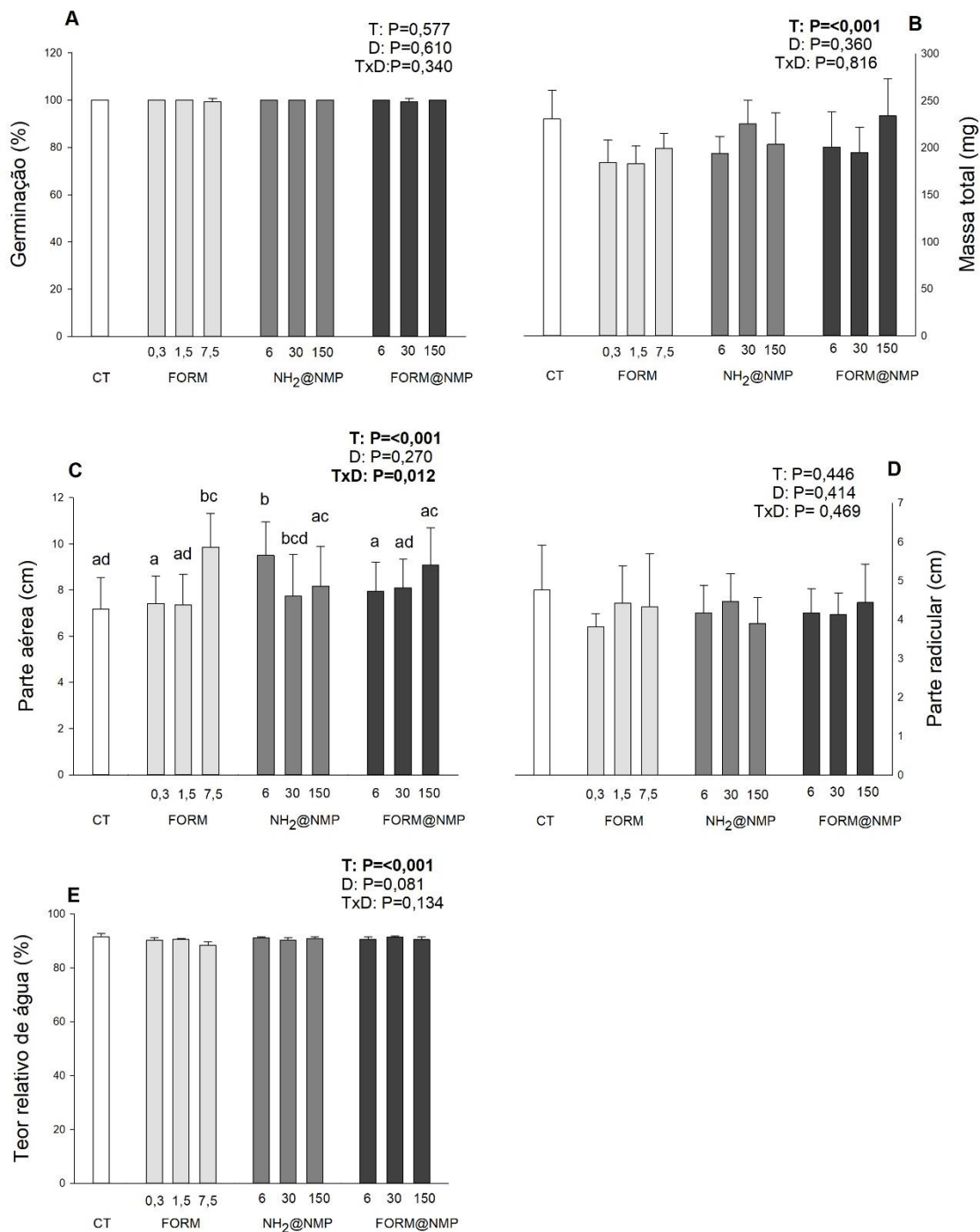


Figura 13 - Percentagem de germinação (A), massa total (B), comprimentos da parte aérea (C) e radicular (D) e teor relativo de água (E) de plântulas de *Triticum aestivum* L. (trigo) tratadas com diferentes materiais – FORM, NH<sub>2</sub>@NMP e FORM@NMP e com diferentes concentrações – 0,3; 1,5 e 7,5 mg L<sup>-1</sup> para FORM e 6, 30 e 150 mg L<sup>-1</sup> para NH<sub>2</sub>@NMP e FORM@NMP. Os valores correspondem à média ± desvio padrão. O negrito corresponde a diferenças significativas (P≤0,05): entre o grupo de controlo e todas as doses dos três tratamentos (T); entre as doses do mesmo tratamento (D) e entre as mesmas doses dos diferentes tratamentos (TxD). Diferentes letras correspondem a diferenças significativas entre o grupo de controlo e todas as concentrações dos três tratamentos, entre as diferentes concentrações do mesmo tratamento ou entre as mesmas concentrações dos diferentes tratamentos (P≤0,05).

### 3.3.3 Citotoxicidade

#### 3.3.3.1 Estado da membrana

Em relação ao efeito dos três materiais na permeabilidade membranar (**Fig. 14 A**), não se observaram quaisquer alterações significativas. No entanto, é possível observar uma tendência para o aumento do valor da permeabilidade em plântulas tratadas com FORM@NMP e uma diminuição dessa permeabilidade no grupo FORM, nas concentrações mais elevadas, e no grupo NH<sub>2</sub>@FORM.

No que toca à degradação da membrana (**Fig. 14 B**), observou-se um efeito do tipo de material usado, com o aumento significativo na dose mais baixa do grupo NH<sub>2</sub>@FORM (25,3%) e na dose intermédia do grupo FORM@NMP (16,3%), em relação ao controlo. Para além disto, existe ainda um efeito da interação entre o tipo de tratamento e dose.

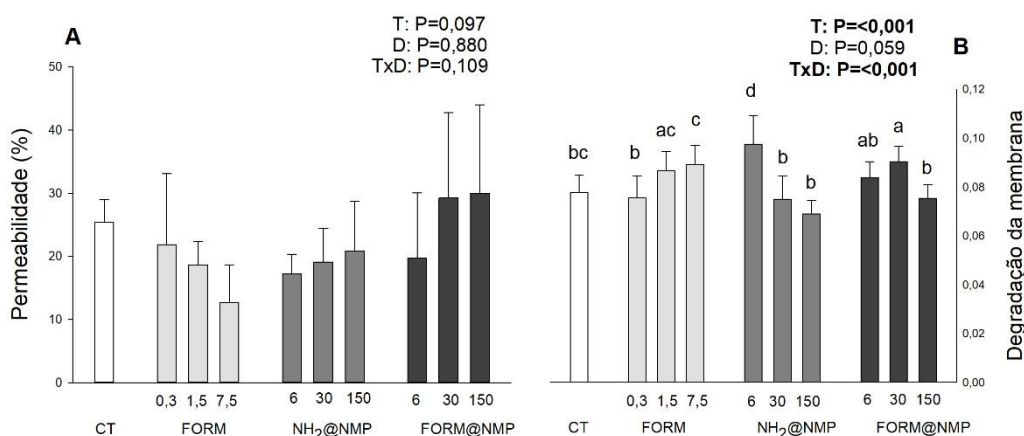


Figura 14 – Permeabilidade (A) e degradação da membrana (B) de plântulas de *Triticum aestivum* L. (trigo) tratadas com diferentes materiais – FORM, NH<sub>2</sub>@NMP e FORM@NMP e com diferentes concentrações – 0,3; 1,5 e 7,5 mg L<sup>-1</sup> para FORM e 6, 30 e 150 mg L<sup>-1</sup> para NH<sub>2</sub>@NMP e FORM@NMP. Os valores correspondem à média ± desvio padrão. O negrito corresponde a diferenças significativas (P ≤ 0,05): entre o grupo de controlo e todas as doses dos três tratamentos (T); entre as doses do mesmo tratamento (D) e entre as mesmas doses dos diferentes tratamentos (TxD). Diferentes letras correspondem a diferenças significativas entre o grupo de controlo e todas as concentrações dos três tratamentos, entre as diferentes concentrações do mesmo tratamento ou entre as mesmas concentrações dos diferentes tratamentos (P ≤ 0,05).

#### 3.3.3.2 Análise do ciclo celular

Na análise do ciclo celular (**Fig. 15**), na presença dos diferentes materiais, não se observaram diferenças significativas nas fases G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> do ciclo celular. Na fase S, parece existir apenas efeito de dose, em que se verificam diferenças apenas na concentração intermédia de todos os grupos face à dose mais elevada, com maior percentagem de núcleos em plântulas tratadas com 1,5 mg L<sup>-1</sup> de FORM ou 30 mg L<sup>-1</sup> de NH<sub>2</sub>@NMP e FORM@NMP.

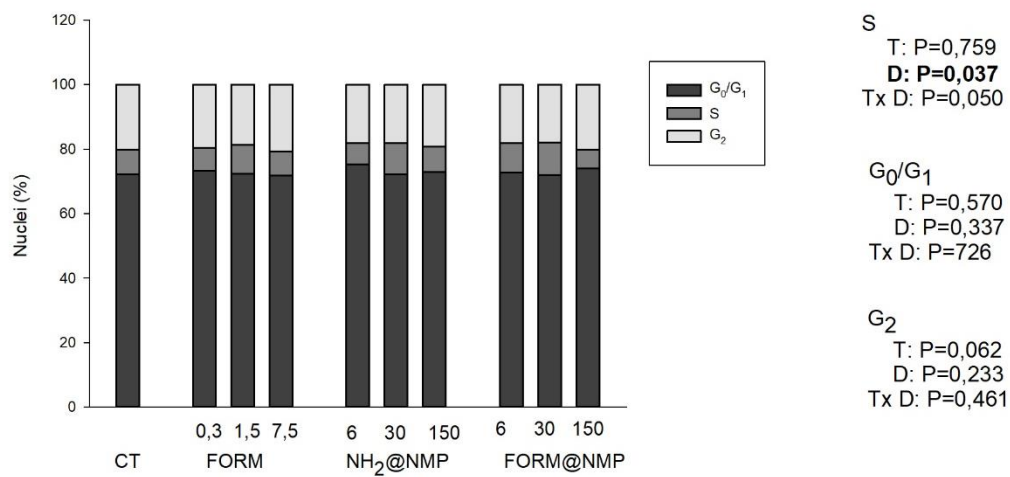


Figura 15 - Ciclo celular de plântulas de *Triticum aestivum* L. (trigo) tratadas com diferentes materiais – FORM, NH<sub>2</sub>@NMP e FORM@NMP e com diferentes concentrações – 0,3; 1,5 e 7,5 mg L<sup>-1</sup> para FORM e 6, 30 e 150 mg L<sup>-1</sup> para NH<sub>2</sub>@NMP e FORM@NMP. Os valores correspondem à média ± desvio padrão. O negrito corresponde a diferenças significativas (P≤0,05): entre o grupo de controlo e todas as doses dos três tratamentos (T); entre as doses do mesmo tratamento (D) e entre as mesmas doses dos diferentes tratamentos (TxD).

### 3.4 Discussão

As NPs de óxido de Fe podem favorecer o crescimento de cereais, já que são uma boa fonte de Fe, essencial para o seu desenvolvimento. No entanto, uma exposição elevada ou crónica, assim como a sua acumulação nas plantas pode levar a efeitos negativos (Yasmeen et al. 2015; Răuciu and Creangă 2007).

Presume-se que as NPs se difundam através de poros presentes nas sementes, promovendo a sua germinação, seguida por uma liberação mínima e lenta das NPs (Shankamma et al. 2016; Brasili et al. 2020). Neste estudo, a percentagem de germinação não foi afetada, o que significa que a plântula é capaz de germinar sem sofrer alterações na presença de qualquer um dos três materiais, seja qual for a dose utilizada. Este resultado está em linha com o trabalho de Iannone et al. (Iannone et al. 2016) em que sementes de trigo expostas a NPs de  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  apresentaram uma percentagem de germinação de 90%. No entanto, noutro estudo também em trigo, observou-se que nas concentrações mais baixas e mais elevadas (gama de concentrações: 25-600 ppm), a percentagem de germinação foi significativamente afetada pela presença de NPs de óxido de Fe num dos genótipos de trigo utilizados, enquanto noutro genótipo, a percentagem de germinação aumentou quando usadas concentrações até aos 200 ppm tendo, a partir daí, diminuído até à concentração máxima (Sundaria et al. 2019).

Apesar dos testes de germinação serem reconhecidos pela OCDE (Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) 1984) para avaliação da toxicidade de produtos químicos ou contaminantes, ainda se encontra em discussão se serão métodos adequados para avaliar a fitotoxicidade das NPs. Alguns autores relatam a baixa reprodutibilidade dos testes de germinação em estudos com NPs, levantando algumas questões sobre quais dos fatores envolvidos na germinação são influenciados pelas próprias NPs e quais os testes que podem ser usados em complemento aos testes de germinação.

Relativamente à biomassa, observou-se em todos os tratamentos, uma tendência para diminuição da massa das plântulas. Estes valores estão de acordo com os resultados observados em plântulas de trigo (Lu et al. 2020), pepino (*Cucumis sativus*) (Konate et al. 2018) e de espinafre (*Spinacia oleracea*) (Kamran et al. 2020), onde os grupos tratados com NPs de óxido de Fe apresentaram valores inferiores ao grupo de controlo. Esta inibição pode ser explicada pela redução da disponibilidade dos nutrientes para captação

(fator limitante/regulador da biomassa das espécies vegetais), uma vez que a altas concentrações, as NPs podem facilmente formar aglomerados que bloqueiam os poros presentes na parede celular. As NPs que partilham o sistema vascular das plantas com a água e nutrientes podem, aqui, agregar ou até mesmo obstruir o sistema vascular, resultando em pouca ou nenhuma translocação de nutrientes. A diminuição pode também ser explicada por uma elevada concentração de Fe livre que conduz à produção de radicais hidroxilo, como resultado de reações de Fenton, e consequente citotoxicidade e alterações metabólicas (Hu et al. 2017; Kamran et al. 2020; Lewandowski et al. 2018; Y. Yang, Dou, and An 2017).

A exposição aos materiais usados neste trabalho resultou no estímulo do desenvolvimento da parte aérea mas numa tendência para diminuição da parte radicular. A promoção do crescimento da parte aérea observada está de acordo com o descrito por (Alam, Sultana, and Iqbal 2015) em que NPs de Fe demonstraram um efeito estimulador no crescimento de trigo a concentrações entre 1 e 2 ppm. Também em trigo, mas em plântulas aspergidas com NPs de Fe (100, 200, 300, e 400 mg L<sup>-1</sup>), verificou-se um aumento do comprimento da parte aérea (Rostamizadeh et al. 2021). Por outro lado, num estudo em que plântulas de trigo foram expostas a Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-NPs (5, 10, 15, 20 mg L<sup>-1</sup>) não se verificaram alterações face ao grupo de controlo (Iannone et al. 2016). Os estímulos do crescimento induzidos pelas NPs de Fe poderão ser explicados por um aumento no fornecimento de nutrientes (Yoon et al. 2019; El-Saadony et al. 2021). Por outro lado, o pré-tratamento de sementes com NPs de óxido de Fe pode afetar positivamente o vigor das plântulas ao estimular o metabolismo celular, promovendo o crescimento e a sua produtividade (Sundaria et al. 2019). Outra possível explicação para o aumento do crescimento das plantas mediado por NPs, será pela estimulação, através da exposição ao Fe, de processos redox que afetam positivamente o crescimento das plantas (Rizwan et al. 2018).

Contrariamente à parte aérea, verificou-se que a aplicação dos dois tipos de NPs e das FORM pode potencialmente ( $p > 0.05$ ) inibir o desenvolvimento das raízes. O efeito que as FORM e as Fe-NPs possam ter no alongamento da raiz pode ter como base, por um lado a formação de ROS e consequente stress oxidativo e/ou por outro, a putativa adesão das NPs às raízes das plântulas com consequente alteração na divisão celular e/ou alongamento. Uma vez que não se observaram alterações na interfase do ciclo celular, é provável que a diminuição do comprimento da raiz tenha ocorrido devido a alterações no

alongamento celular. Em linha com os resultados obtidos no nosso estudo, e também em trigo, Lu et al. (Lu et al. 2020) reportou inibição do crescimento radicular em plantas expostas a Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-NPs (60 e 180 µg de NPs por planta). No entanto, não é claro de que forma as Fe-NPs alteram o ciclo celular, se essas mudanças estão dependentes da espécie e se as mudanças exercidas ao longo do tempo podem ser reversíveis após a remoção das NPs (Yasmeen et al. 2015; Monteiro et al. 2018; M. Li et al. 2021).

O teor relativo de água é um dos parâmetros mais usados para avaliar o estado hídrico das plantas, refletindo o equilíbrio entre o fornecimento de água para a folha e a taxa de transpiração, o qual influencia a capacidade da planta de recuperar do stress que, conseqüentemente, afeta o rendimento da planta. Os valores do TRA variam entre 98% em folhas túrgidas e saudáveis até cerca de 40% em folhas gravemente ressequidas. Na maioria das espécies agrícolas, o valor típico do TRA ronda os 60% a 70% (Lugojan and Ciulca 2011; van Heerden and de Villiers 1906; Weng et al. 2015). Neste estudo, os valores obtidos para o TRA em todos os tratamentos e doses, encontram-se numa gama muito estreita de percentagem (88,4 – 91,3%) e que, apesar de em nenhum caso serem superiores ao grupo de controlo (91,5%), estão muito próximos disso, mostrando que nenhum dos tratamentos afetou o estado hídrico das plântulas.

A propriedade mais importante das membranas biológicas é a sua permeabilidade visto que determina a estabilidade de tecidos, células e organelos celulares (Gurova and Denisyuk 2021). A membrana plasmática permite a passagem de iões (através de proteínas de transporte e/ou pela fase lipídica da membrana), apresentando-se também como uma barreira a outras moléculas, existindo a necessidade de manter as concentrações ideais de eletrólitos para que seja possível manter a estabilidade e o funcionamento de enzimas e das membranas celulares (Ashraf and Ali 2008; Mansour 2013). Alterações na libertação de eletrólitos podem apontar para transformações nas proteínas e na matriz lipídica da membrana plasmática. Apenas no tratamento com FORM@NMP se verificou uma tendência para o aumento da permeabilidade da membrana nas concentrações mais elevadas, evidenciando maior instabilidade membranar. É expectável que os valores mais elevados da permeabilidade membranar reflitam alterações que ocorreram nos componentes membranares (proteínas e lípidos). Por outro lado, a diminuição da permeabilidade membranar observada no grupo FORM pode ser explicada pela ativação de mecanismos para limitar a captação das porfirinas

para as células (Silva, Craveiro, et al. 2017). Estes valores podem ainda estar relacionados com uma maior atividade do sistema antioxidante (Ashraf and Ali 2008).

A permeabilidade e degradação membranares são cruciais para a integridade celular e influenciam significativamente a entrada de NPs na planta. Quando as células vegetais são submetidas a stress que compromete a integridade da membrana, o número de células que são permeáveis ao corante *Evan's blue* aumenta em comparação com as células não stressadas (Vijayaraghavareddy et al. 2017). Neste caso, foi apenas observado o aumento da degradação membranares na concentração mais baixa de  $\text{NH}_2\text{@NMP}$ , face ao controlo. A fluidez da membrana celular pode ser alterada quando a célula é exposta a stress oxidativo: as ROS associadas ao stress oxidativo interagem com os lípidos da membrana, induzem oxidação lipídica e consequente dano nas membranas, alterando a permeabilidade e integridade membranares (Ghosh, Bandyopadhyay, and Mukherjee 2010). Os dados obtidos para o estado da membrana revelam que os materiais usados apresentam algum potencial para induzir danos nas membranas, o que já seria de esperar já que tanto as FORM como as Fe-NPS podem produzir/induzir a formação de ROS, e as FORM e FORM@NMP estão descritas como induzindo alterações nas membranas de bactérias pela formação de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  (Ezealigo et al. 2021; Vijayaraghavareddy et al. 2017).

O crescimento de uma planta resulta da divisão e alongamento celulares. Portanto, alterações no perfil do ciclo celular podem fornecer informações sobre o potencial de crescimento das plantas e, quando ocorre dano no DNA, as células ativam mecanismos de reparação do DNA que podem atrasar ou parar a progressão das várias etapas. O bloqueio do ciclo celular acontece antes da passagem pelos checkpoints transitórios:  $G_1$  para S e  $G_2$  para a fase mitótica. As eventuais modificações nestas etapas em resposta a diferentes tratamentos podem contribuir para uma melhor compreensão da fase crescimento e da capacidade da planta de se adaptar na presença de contaminantes ambientais (Silva, Craveiro, et al. 2017; Silva, Oliveira, et al. 2017; Monteiro et al. 2018). Os checkpoints do ciclo celular e o controlo da reparação do DNA são considerados mecanismos importantes que podem determinar a progressão do ciclo celular nas plantas expostas a agentes prejudiciais ao DNA (Youssef et al. 2021). Depois de realizada a análise ao ciclo celular, nenhum dos tratamentos parece ter afetado o progresso do ciclo celular face ao grupo de controlo. Ainda assim, as doses mais elevadas de todos os tratamentos apresentaram uma diminuição na subpopulação S comparativamente à dose intermédia, indicando uma possível indução de efeitos citostáticos que poderão levar a

alterações na progressão do ciclo celular. De forma semelhante, em trigo exposto a TiO<sub>2</sub>-NPs, a dose de 50 mg/L induziu um bloqueio na fase S comparativamente a uma dose inferior (Silva, Craveiro, et al. 2017). Apesar de não haver alterações significativas no comprimento da radícula das plântulas, todos os valores estão abaixo dos valores do grupo de controlo, indicando que poderá haver uma potencial inibição deste parâmetro pelos três tratamentos que pode ser explicada com atrasos na progressão do ciclo celular (Youssef et al. 2021; Qi and Zhang 2020).



## 4 Impacto na fotossíntese

### 4.1 Introdução

O Fe é geralmente abundante nos solos agrícolas, no entanto, aproximadamente 30% dos solos são pobres em Fe. A concentração de Fe solúvel necessária para o crescimento das plantas varia entre  $10^{-9}$  a  $10^{-4}$  mg/kg sendo a concentração total média de Fe disponível nos solos menor que  $10^{-15}$  mg/kg (Yuan et al. 2018; M. Li et al. 2021). O Fe desempenha um papel muito importante na formação dos tilacóides e a carência deste elemento inibe a atividade dos fotossistemas I e II e reduz o conteúdo de pigmentos fotossintéticos, especialmente o conteúdo total de clorofila que por sua vez causa um crescimento lento, diminuindo a biomassa e valor nutricional. Desempenha também um papel fundamental na assimilação de nitrogênio e do seu metabolismo, em reações redox, respiração mitocondrial, proteção osmótica e na defesa contra agentes patogênicos (Yang, Alidoust, and Wang 2020; Lebedev, Korotkova, and Osipova 2014; Yuan et al. 2018). O stress relacionado à carência de Fe gera ROS, as quais podem causar alterações nos pigmentos e induzir peroxidação lipídica, que pode levar à destruição da membrana (Yasmeen et al. 2016).

O uso de NPs de Fe na agricultura pode ser uma estratégia eficaz para compensar a deficiência de Fe nos solos e evitar os efeitos negativos da carência de Fe na produção agrícola (Lu et al. 2020). O  $Fe^{2+}$  pode ser libertado das NPs de Fe para o meio ambiente pela degradação da matriz, através de processos que podem envolver decomposição térmica, fotodegradação ou desgaste mecânico (Lu et al. 2020). Como resultado disto, a área de superfície das NPs geralmente diminui, acabando por afetar a sua mobilidade, reatividade e toxicidade no meio ambiente (Yang et al. 2020). No entanto, se por um lado este tipo de aplicação pode ser benéfica em condições de carência de Fe, por outro lado pode induzir fitotoxicidade quando se encontra em excesso.

O grau de toxicidade das NPs está relacionado com as propriedades da sua superfície (carga e revestimento), forma e tamanho. Certas NPs têm sido desenvolvidas para serem utilizadas na agricultura como nanopesticidas e nanofertilizantes (incluindo o uso de NPs como nanotransportadores para pesticidas ou fertilizantes). De um modo geral, as NPs metálicas podem ser tóxicas para microrganismos, animais e plantas em concentrações elevadas, mas em concentrações mais baixas podem ter um efeito benéfico.

No entanto, as respostas morfológicas e ultraestruturais das plantas quando expostas às NPs permanecem ainda pouco compreendidas (Yuan et al. 2018; Demangeat et al. 2017).

Particularmente, as NPs metálicas podem induzir efeitos negativos a nível funcional e estrutural no aparelho fotossintético. Uma vez na célula, as NPs metálicas podem interferir na cadeia transportadora de elétrons tanto nos cloroplastos como nas mitocôndrias, o que pode resultar em aumento de ROS. Embora as ROS possam atuar como mensageiros secundários na via de transdução de sinais de stress, a produção excessiva de ROS pode causar stress oxidativo e consequente dano nos pigmentos fotossintéticos, lípidos, proteínas e ácidos nucleicos. Foram relatados vários casos em que NPs de óxidos metálicos reduziram a taxa fotossintética e a eficiência de assimilação de CO<sub>2</sub> das plantas (sob condições de alta luminosidade e elevado valor nutricional), afetando assim negativamente o crescimento das plantas, possivelmente ao interromper a oxidação ou transferência de energia do fotossistema II (PSII) para o ciclo de Calvin (Conway et al. 2015).

Por outro lado, está também descrita a estimulação, resultante da presença de NPs de óxidos metálicos, das concentrações de oxigénio nos cloroplastos, a proteção dos cloroplastos do excesso de luz, o aumento da transferência de elétrons e fotofosforilação, o aumento da atividade da enzima Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (RUBISCO), o aumento do rendimento do PSII, o aumento da quantidade de clorofila, bem como dos níveis de ácidos nucleicos (Tighe-Neira et al. 2018; Silva, Oliveira, et al. 2017; Masarovicová and Králová 2013; Prasad, Bhattacharyya, and Nguyen 2017; Demangeat et al. 2021). Sabe-se ainda que a toxicidade de iões metálicos livres é mais acentuada do que a das respetivas NPs (Siddiqi and Husen 2017).

Mais especificamente, as Fe-NPs são um dos nanomateriais mais explorados e aplicados nas plantas por serem considerados benignos para o ambiente, magneticamente ativos, biocompatíveis e por estarem prontamente disponíveis para uso (J. Li, Ma, and Xie 2021). A interação entre estas NPs e as plantas pode melhorar a eficiência do aparelho fotossintético como já foi referido anteriormente (**Fig. 16**): um estudo demonstrou que *Arabidopsis thaliana* exposta a Fe-NPs zero-valente aumentou a atividade de ATPase - enzima essencial para vários processos fisiológicos nas plantas, incluindo a absorção de nutrientes, expansão celular e controlo estomático - na membrana plasmática, promovendo a abertura estomática que facilita a captação de CO<sub>2</sub>, aumentando assim a taxa fotossintética (Kim et al. 2015). Assume-se que a planta, quando exposta a estas NPs,

seja capaz de mediar a ativação da enzima responsável pela abertura estomática. Num outro estudo em que foi usada a mesma espécie, concluiu-se que as Fe-NPs zero-valente promoveram todos os parâmetros fotossintéticos analisados (taxa de assimilação de CO<sub>2</sub>, concentração intracelular de CO<sub>2</sub>, taxa de transpiração e condutância estomática) (Kim et al. 2015). No que toca aos pigmentos fotossintéticos, em ambos os estudos não se verificaram quaisquer alterações em relação aos grupos de controlo. Ainda, num ensaio em que se aplicaram Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NPs a plantas de soja (*Glycine max*), foi possível observar um aumento no conteúdo de clorofila e alterações na atividade bioquímica e enzimática durante a fotossíntese (Ghafariyan et al. 2013).

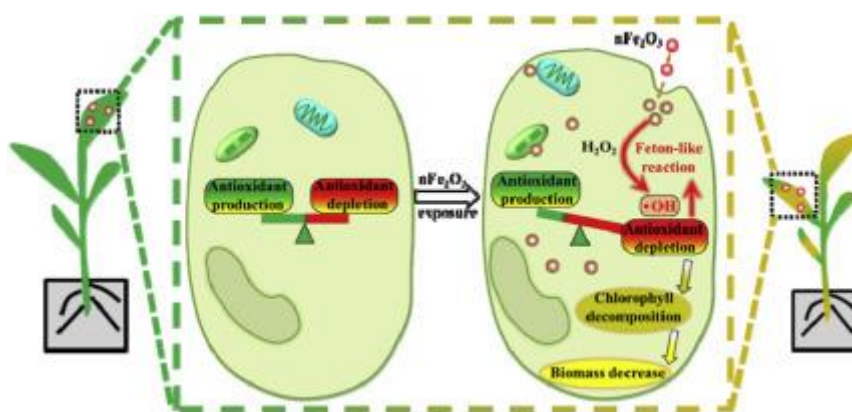


Figura 16 - Representação esquemática da captura de NPs de óxido de ferro e efeitos na fotossíntese do trigo. Retirado de (Lu et al. 2020).

As Fe-NPs, a baixas concentrações, desempenham um papel importante na formação de mais cloroplastos e na compactação dos grana. As NPs metálicas também contribuem para o aumento da fotossíntese na eliminação das ROS, podendo ainda servir como antenas artificiais de captação de energia, transferindo-a para os centros de reação (Nabiev et al. 2010). Para além disto, contribuem para aumentar a eficiência de conversão de energia para o PSII (permitindo assim uma maior absorção de luz) e o conteúdo de clorofilas (Mingyu et al. 2009; Ghorbanpour et al. 2021). Existem ainda NPs capazes de alterar os domínios de comprimento de onda da fotossíntese ao absorver comprimentos de onda entre os 200-700 nm, aumentando assim o espectro de captação de luz e também a performance da cadeia transportadora de eletrões no PSII e, em última instância, promover a fotossíntese. Curiosamente, as NPs (como as de TiO<sub>2</sub>) também podem atuar como uma sombra, reduzindo a disponibilidade de luz para a fotossíntese. Como resultado disto, as plantas começam a produzir mais clorofila para captar mais luz (Ghorbanpour et al. 2021). As NPs podem também afetar a morfologia das estruturas fotossintetizantes e o conteúdo dos pigmentos fotossintéticos (Ghorbanpour et al. 2021). A biogénese dos

cloroplastos e a organização dos grana são conhecidos por serem dois elementos vitais do desenvolvimento dos próprios cloroplastos e são importantes para o processo de captação de luz durante a fotossíntese. O empilhamento dos grana desempenha um papel importante na proteção do PSII (localizado nos grana) (Yuan et al. 2018). Num estudo em que foi utilizado o trigo exposto a Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-NPs (as concentrações utilizadas foram 0, 60 e 180 µg de NP por planta) obtiveram-se os seguintes resultados: observou-se um decréscimo do conteúdo de clorofila (*a* e *b*) com o aumento da concentração de NPs (apesar de não existirem diferenças significativas em relação ao controlo), traduzido também numa redução da biomassa das plantas. As folhas, com o aumento do tempo de exposição, tornaram-se gradualmente mais amarelas (Lu et al. 2020).

No entanto, nem todos os efeitos são positivos ou benéficos, e as Fe-NPs podem causar efeitos citotóxicos em muitas espécies vegetais aquáticas e terrestres, gerando ROS (Siddiqi and Husen 2020). Ficou demonstrado que estas NPs quando administradas na planta aquática *Lemna gibba*, diminuem o conteúdo de clorofila, a atividade fotossintética e o crescimento da planta (Barhoumi et al. 2015). De uma forma análoga, uma concentração 0,2 g/L, também o conteúdo em clorofila *a* e a taxa fotossintética da alga *Chlorella vulgaris* diminuíram quando expostas a NPs de óxido de Fe (Chen et al. 2012).

Tendo em conta que não existem dados relativos à exposição de plantas a porfirinas desenvolvidas para o tratamento de águas residuais, assim como das partículas magnéticas de Fe a que estão conjugadas, nesta secção pretende-se avaliar o impacto na fotossíntese da exposição de FORM, NH<sub>2</sub>@NMP e FORM@NMP em trigo. Para tal, avaliar-se-á o estado hídrico e suculência das plantas, a permeabilidade membranar, quantificação dos pigmentos, trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a*. Pretende-se então determinar o potencial destes materiais em induzir toxicidade tanto numa fase mais avançada do desenvolvimento do trigo como no aparelho fotossintético da planta.

## 4.2 Materiais e métodos

### 4.2.1 Descrição e caracterização dos materiais

Para a avaliação da fotossíntese foram utilizados os 3 tipos de materiais usados no capítulo 3 (ver pág. 22): 1) FORM; 2) NH<sub>2</sub>@NMP e 3) FORM@NMP.

### 4.2.2 Material vegetal e condições de cultura

Sementes de *Triticum aestivum* L. foram desinfetadas da mesma forma que no capítulo 3 (ver pág. 24) e semeadas em 44 vasos (ca. 12,5 cm de diâmetro por 11 cm altura) contendo 200 g de substrato (turfa (pH 5.5-5.6): vermiculite, 2:1). Cada vaso foi regado com 250 mL de água destilada de forma a obter 100% da capacidade de campo e após este ponto, a capacidade de campo foi mantida a 80%. Em cada vaso colocaram-se inicialmente 8 sementes (agrupadas duas a duas) enterradas a cerca de 1 cm. Após 13 dias retiraram-se algumas das plantas de forma a ficarem apenas 4 plantas por vaso com tamanho e espaçamento semelhante entre estas e adicionaram-se 10 mL de uma solução nutritiva (Hoagland's N°2 1,6 g/L) ao solo de cada vaso. Neste ponto os vasos foram divididos em 4 grupos principais: i) FORM; ii) NH<sub>2</sub>@NMP; iii) FORM@NMP; iv) controlo. Os grupos i a iii foram por sua vez divididos em 3 subgrupos, correspondendo às diferentes doses de material aplicado no solo: 0,3, 1,5 e 7,5 mg L<sup>-1</sup> de formulação porfirínica (FORM) e 6, 30 e 150 mg L<sup>-1</sup> de NH<sub>2</sub>@NMP ou FORM@NMP. Ao grupo controlo foi adicionada água sem qualquer material. Ao longo de 14 dias, realizaram-se 5 aplicações de 50 mL das soluções/suspensões com concentrações de 6, 30 e 150 mg L<sup>-1</sup> para os grupos NH<sub>2</sub>@NMP e FORM@NMP e de 0,3, 1,5 e 7,5 mg L<sup>-1</sup> para o grupo FORM num volume final de 250 mL em cada vaso. Após as 5 aplicações, obtiveram-se as seguintes concentrações no solo: 9,4, 46,7 e 234,4 mg kg<sup>-1</sup> de peso seco de substrato para os grupos NH<sub>2</sub>@NMP e FORM@NMP e 0,47, 2,34 e 11,72 mg kg<sup>-1</sup> de peso seco de substrato para o grupo FORM.

Ao longo do ensaio as plantas foram mantidas em condições controladas de temperatura (de 28 ±2 °C), intensidade luminosa (150 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>) (sensor de radiação do equipamento LICOR-6400XT Portable Photosynthesis System) e fotoperíodo (16 h/8 h, noite/dia).

Após 13 dias, a fotossíntese foi analisada e, no dia seguinte, as plantas foram colhidas.

O comprimento e a biomassa fresca da folha (utilizou-se a 3ª e 4ª folhas mais jovens a partir da mais velha) e da parte aérea foi medido e determinou-se a área da 3ª folha mais jovem. Para os três parâmetros utilizaram-se folhas de 6 plantas diferentes. O restante material foi dividido em 4 grupos diferentes, sendo que cada um consistia nas 4ª e 5ª folhas mais jovens de 3 plantas diferentes, congelado em N<sub>2</sub> líquido, macerado e armazenado a -80 °C.

#### **4.2.3 Determinação do estado hídrico das plantas e suculência**

Para a determinação do teor relativo de água (TRA) foi utilizada a 4ª folha a partir da mais velha de todos os tratamentos (n=6). A massa fresca (MF) do material vegetal foi determinada e, de seguida, o material vegetal foi colocado em tubos fechados com água destilada no escuro durante a noite para determinação da massa túrgida (MT). Por último, o material foi colocado numa estufa de secagem a 60 °C para se obter a massa seca (MS) do material vegetal.

O teor relativo de água foi calculado de acordo através da fórmula: TRA (%) =  $\frac{(MF-MS)}{(MT-MS)} \times 100$ .

A suculência foi calculada a partir dos valores da massa fresca (MF), da massa seca (MS) e da área da 4ª folha a partir da mais velha e de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Suculência} = \frac{(MF-MS)}{\text{Área}}$$

#### **4.2.4 Determinação da permeabilidade membranar**

A permeabilidade membranar foi determinada de igual modo que no capítulo 3 (ver página 25).

#### **4.2.5 Quantificação dos pigmentos fotossintéticos**

Os pigmentos fotossintéticos (clorofilas *a* e *b*) e carotenoides foram quantificados usando acetona pura, Tris 50 mM em tampão pH 7.8 (80:20) (v/v) de acordo com (Sims and Gamon 2002).

A 100 mg de material vegetal adicionou-se 1,0 mL de acetona: Tris 50 mM em tampão pH 7.8 (80:20) (v/v) que prontamente foram agitados no vortex (30 s) e centrifugados a 2800 g, durante 5 min. O sobrenadante foi recolhido e transferido para um novo tubo coberto com papel de alumínio. Ao pellet adicionou-se 1,0 mL da acetona:

Tris 50 mM (80:20) e repetiram-se de igual forma os processos de agitação e centrifugação realizados anteriormente. O sobrenadante foi adicionado à solução já contida no tubo coberto com papel de alumínio. Por fim, adicionou-se a este tubo acetona: Tris 50 mM até perfazer um volume de 3,0 mL e procedeu-se à leitura da absorvância a 470, 537, 647 e 663 nm (Synergy™ HT, BioTeK®).

O conteúdo de clorofilas *a* e *b* e os carotenoides foram calculadas de acordo com as seguintes equações (Sims and Gamon 2002):

$$\text{Chl } a = 0,01373 A_{663} - 0,000897 A_{537} - 0,003046 A_{647}$$

$$\text{Chl } b = 0,02405 A_{647} - 0,004305 A_{537} - 0,005507 A_{663}$$

$$\text{Carotenoides} = \{ [A_{470} - (17,1 \times (\text{Chl } a + \text{Chl } b) - 9,479 \times \text{antocianinas})] \} / 119,26$$

μmol/mL

$$\text{Antocianinas} = 0,08173 A_{537} - 0,00697 A_{647} - 0,002228 A_{663}$$

Para cada tratamento foram usadas 4-5 réplicas biológicas em que cada uma consistia no conjunto das 4ª e 5ª folhas mais velhas de 3 plantas diferentes.

#### 4.2.6 Fotossíntese

Para a avaliação das trocas gasosas e da fluorescência da clorofila *a* utilizaram-se as 3ª e 4ª folhas mais jovens completamente expandidas a partir da mais velha de 6 plantas diferentes para cada tratamento.

##### 4.2.6.1 Trocas gasosas

A análise das trocas gasosas foi realizada através de um sistema fotossintético portátil (LICOR-6400XT Portable Photosynthesis System) que atuou sob uma densidade de fluxo de fótons fotossintéticos (PPFD) de 300 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, proporcionada por uma lâmpada de halogénio externa (LICOR-6400XT Portable Photosynthesis System). Condições de 200 mol.s<sup>-1</sup> de fluxo de ar a uma temperatura do bloco de 25 °C foram mantidas dentro da câmara durante todas as medições e, para tal, a concentração de CO<sub>2</sub> atmosférico foi usada como referência (400 ppm). Os dados foram gravados quando os parâmetros de medição estavam estáveis (2-6 min) sendo estes parâmetros a taxa de transpiração (*E*; mol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), a condutância estomática (*g<sub>s</sub>*; mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), a concentração intercelular de CO<sub>2</sub> (*C<sub>i</sub>*; ppm) e a taxa de assimilação de CO<sub>2</sub>/taxa fotossintética (*P<sub>N</sub>*; μmol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>).

#### 4.2.6.2 Fluorescência da clorofila *a*

Os parâmetros da fluorescência foram obtidos através de um fluorômetro de modulação de amplitude de pulso (LICOR -6400XT Portable Photosynthesis System). A fluorescência mínima ( $F_0$ ) foi medida em folhas adaptadas ao escuro (30 min) aplicando uma luz modulada fraca. Depois de aplicar um pulso de luz branca saturada de 0.7 s ( $>300 \mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) a fluorescência máxima ( $F_m$ ) foi obtida sendo possível calcular a eficiência máxima do PSII através da fórmula ( $F_v/F_m$ , sendo  $F_v=F_m-F_0$ ) (Dias et al. 2020; Silva et al. 2012; Dias et al. 2018). É importante referir que estas análises foram feitas com as folhas adaptadas ao escuro. Utilizando folhas adaptadas à luz foi calculada a eficiência efetiva do PSII ( $\Phi_{\text{PSII}}$ ), o *quenching* fotoquímico (qP) e o *quenching* não fotoquímico (NPQ) através das seguintes fórmulas: ( $\Phi_{\text{PSII}} = (F_m' - F_s')/F_m'$ ;  $qP=(F_m' - F_s')/(F_m' - F_0')$ ;  $NPQ=(F_m - F_m')/F_m'$ . Para tal, foi medida a fluorescência em estado estacionário ( $F_s$ ), a fluorescência máxima ( $F_m'$ ) expondo a amostra a luz branca saturada ( $5000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  para 0.7 s) e a fluorescência mínima ( $F_0'$ ) que foi determinada após se desligar a luz actínica (LICOR-6400XT Portable Photosynthesis System).



## 4.3 Resultados

### 4.3.1 Crescimento da planta

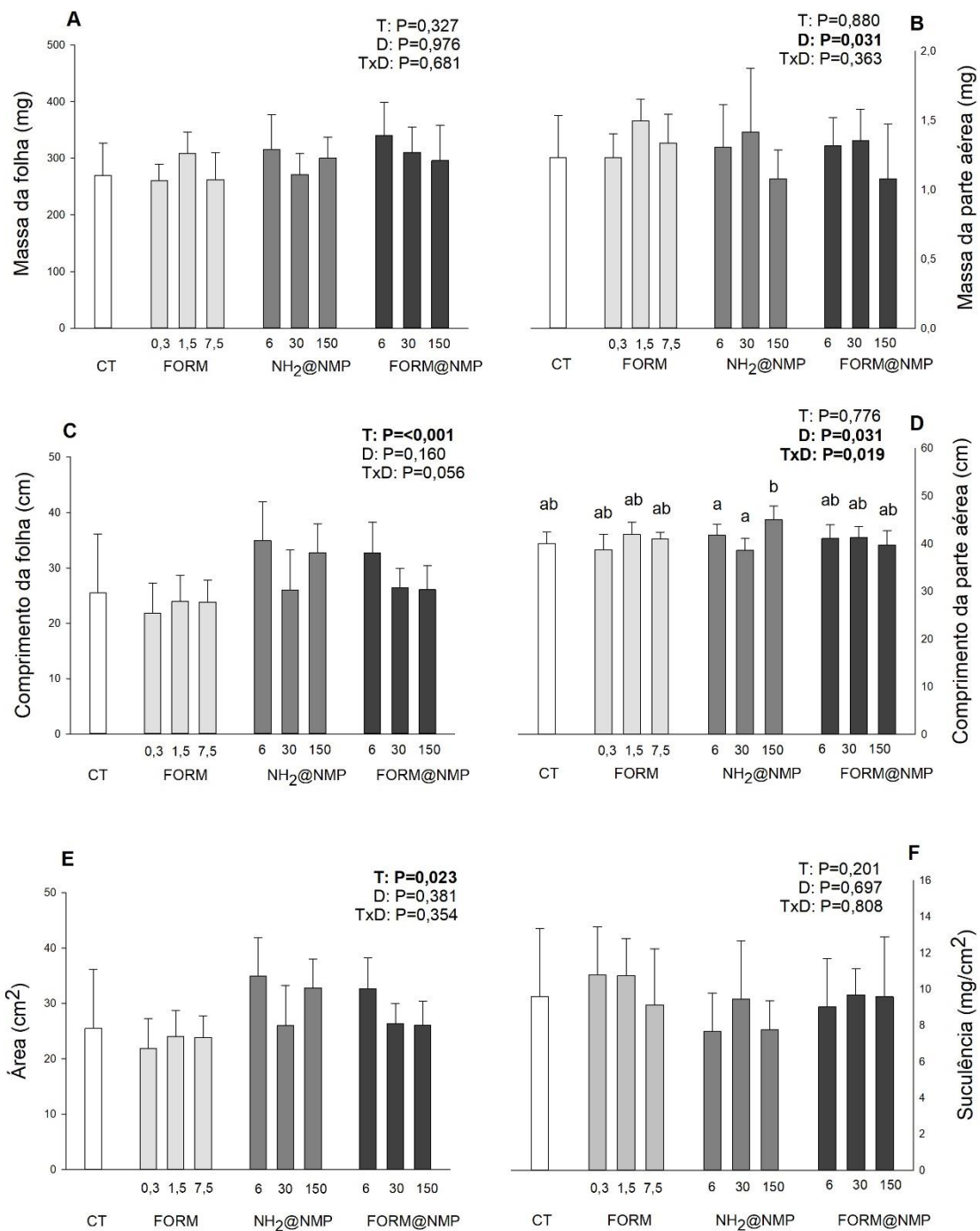
Da análise do crescimento da planta, não foram detetadas diferenças significativas para os valores da massa das folhas (**Fig. 17 A**). Ainda assim, verifica-se uma tendência para aumento da massa das folhas nos tratamentos com  $\text{NH}_2\text{@NMP}$  e  $\text{FORM@NMP}$ .

Com relação à massa da parte aérea (**Fig.17 B**), verificou-se um efeito do fator da dose, com a diminuição da massa na dose de  $150 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{FORM@NMP}$  e  $\text{NH}_2\text{@NMP}$ , comparativamente à dose de  $30 \text{ mg L}^{-1}$ . Não se verificou ainda interação entre o tipo de tratamento e dose.

O comprimento da folha (**Fig.17 C**) apresenta efeito do tipo de tratamento. Aqui, observou-se a promoção do comprimento das folhas nos grupos  $\text{NH}_2\text{@NMP}$  e  $\text{FORM@NMP}$  uma vez que, em todas as concentrações, os valores são significativamente superiores aos grupos controlo (22,4% e 11,2%, respetivamente). No entanto, o grupo  $\text{FORM}$  sofreu um decréscimo significativo de 9,0% face ao controlo.

O comprimento da parte aérea (**Fig.17 D**) apresenta apenas efeito do tipo de dose no grupo  $\text{NH}_2\text{@NMP}$ , com o aumento significativo na concentração  $150 \text{ mg L}^{-1}$  comparativamente às restantes. Não se registam outras alterações significativas.

Nos valores da área das folhas (**Fig.17 E**), é apenas observado o efeito do tipo de material, registando-se diferenças significativas entre o grupo  $\text{NH}_2\text{@NMP}$  e  $\text{FORM}$ , em todas as concentrações. De notar ainda que ocorreu um aumento, de forma geral, da área das folhas nos grupos  $\text{NH}_2\text{@NMP}$  e  $\text{FORM@NMP}$ .



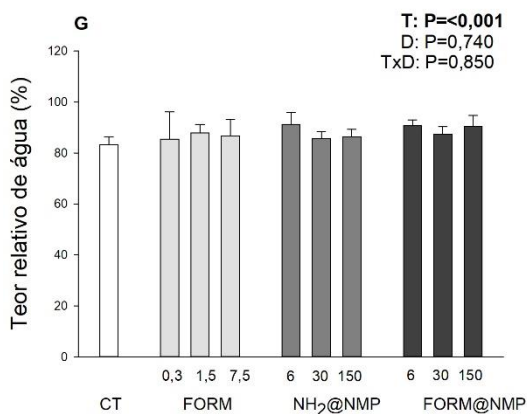


Figura 17 – Massa da folha (A) e da parte aérea (B), comprimento da folha (C) e da parte aérea (D), área da folha (E), suculência (F) e teor relativo de água (G) de *Triticum aestivum* L. (trigo) tratadas com diferentes materiais – FORM, NH<sub>2</sub>@NMP e FORM@NMP e com diferentes concentrações – 0,3; 1,5 e 7,5 mg L<sup>-1</sup> para FORM e 6, 30 e 150 mg L<sup>-1</sup> para NH<sub>2</sub>@NMP e FORM@NMP. Os valores correspondem à média ± desvio padrão. O negrito corresponde a diferenças significativas ( $P \leq 0,05$ ): entre o grupo de controlo e todas as doses dos três tratamentos (T); entre as doses do mesmo tratamento (D) e entre as mesmas doses dos diferentes tratamentos (TxD). Diferentes letras correspondem a diferenças significativas entre o grupo de controlo e todas as concentrações dos três tratamentos, entre as diferentes concentrações do mesmo tratamento ou entre as mesmas concentrações dos diferentes tratamentos ( $P \leq 0,05$ ).

#### 4.3.2 Estado hídrico das plantas

Não se verifica, na suculência das folhas (**Fig.17 F**), qualquer alteração significativa com os tratamentos. Nos valores do TRA (**Fig.17 G**), não existe um efeito do fator dose nem da interação entre tratamento e dose, mas é possível observar diferenças significativas quando é considerado o fator tratamento. Neste caso, as FORM@NMP apresentaram um aumento de TRA face ao controlo (7,6%).

#### 4.3.3 Teor em pigmentos

A análise dos valores do conteúdo em clorofila *a* (**Fig.18 A**), quando as plantas são tratadas com FORM, NH<sub>2</sub>@NMP e FORM@NMP, revelou alterações consoante o tipo de tratamento e exhibe efeito da interação entre o tipo de tratamento e dose. Face ao grupo de controlo, é possível observar um aumento significativo nas concentrações 6 e 30 mg L<sup>-1</sup> de FORM (35,1% e 25,3%, respetivamente) e na dose de 30 mg L<sup>-1</sup> de FORM@NMP (49,1%). Em relação à clorofila *b* (**Fig. 18 B**), existe apenas um efeito do tipo de tratamento, traduzido num aumento nos grupos FORM e NH<sub>2</sub>@NMP em relação ao controlo (18,5% e 15,9%, respetivamente) em todas as concentrações, particularmente evidente na concentração mais baixa.

No que toca à presença de antocianinas (**Fig.18 C**), existe o efeito das duas variáveis isoladamente assim como da interação entre elas. De realçar que nas

NH<sub>2</sub>@NMP se verificou um aumento no conteúdo em antocianinas na concentração de 30 mg L<sup>-1</sup> face aos restantes tratamentos e doses e ao controlo, com um aumento de 113,5%. O conteúdo em carotenoides (**Fig.18 D**) apresenta efeito do tipo de material, com aumento significativo (15,2%) entre o grupo FORM (todas as concentrações) e o controlo.

Por fim, a razão Chl *a*/Chl *b* (**Fig.18 E**) apresenta efeito da interação entre o tipo de tratamento e dose, onde se verificam diferenças significativas entre concentrações do grupo NH<sub>2</sub>@NMP (30 mg L<sup>-1</sup> vs 150 mg L<sup>-1</sup>) e do grupo FORM@NMP (30 mg L<sup>-1</sup> vs 6 mg L<sup>-1</sup>). Para além disto, existe um aumento significativo deste parâmetro face ao controlo (28,9%), na concentração intermédia do grupo FORM@NMP.

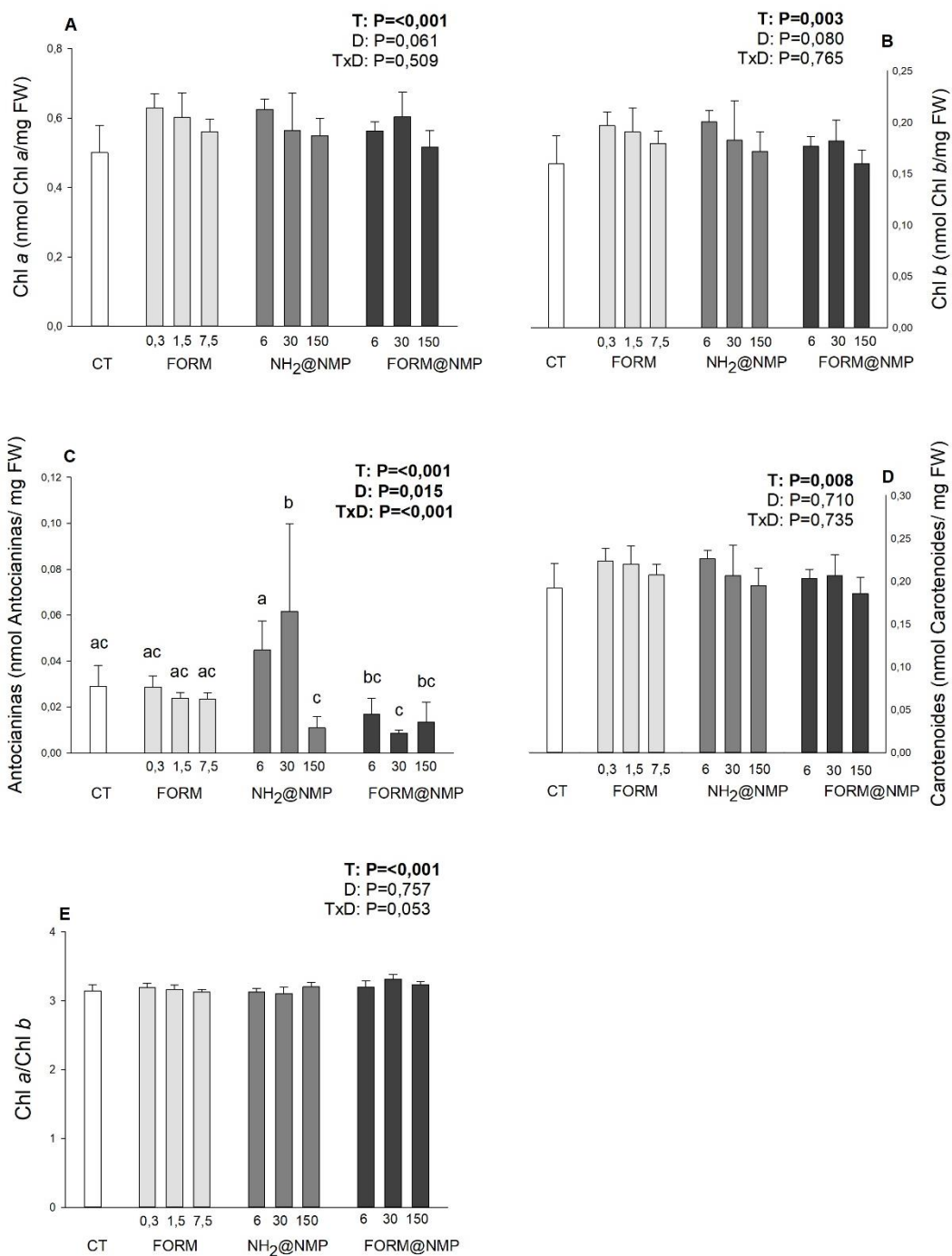


Figura 18 - Conteúdo em clorofila *a* (A), clorofila *b* (B), antocianinas (C) e carotenoides (D) e razão *a*/Chl *b* de folhas de *Triticum aestivum* L. (trigo) tratadas com diferentes materiais – FORM, NH<sub>2</sub>@NMP e FORM@NMP e com diferentes concentrações – 0,3; 1,5 e 7,5 mg L<sup>-1</sup> para FORM e 6, 30 e 150 mg L<sup>-1</sup> para NH<sub>2</sub>@NMP e FORM@NMP. Os valores correspondem à média ± desvio padrão. O negrito corresponde a diferenças significativas (P≤0,05): entre o grupo de controlo e todas as doses dos três tratamentos (T); entre as doses do mesmo tratamento (D) e entre as mesmas doses dos diferentes tratamentos (TxD). Diferentes letras correspondem a diferenças significativas entre o grupo de controlo e todas as concentrações dos três tratamentos, entre as diferentes concentrações do mesmo tratamento ou entre as mesmas concentrações dos diferentes tratamentos (P≤0,05).

Em relação às trocas gasosas, não se detetaram quaisquer alterações na taxa de assimilação de CO<sub>2</sub>/taxa fotossintética (P<sub>N</sub>) (**Fig.19 A**). A condutância estomática (g<sub>s</sub>) (**Fig.19 B**) apresenta apenas um efeito do tipo de tratamento, com um aumento significativo nos tratamentos com FORM@NMP em relação ao grupo FORM e ao grupo de controlo (46,5%), em todas as concentrações. No que toca à taxa de transpiração (E) (**Fig.19 C**), existe um efeito do tipo de tratamento e efeito do tipo de dose, mas não da interação entre ambos. Isto traduz-se num aumento significativo nos tratamentos com FORM@NMP e NH<sub>2</sub>@NMP face ao grupo de controlo (24,4% e 24,1%, respetivamente) e ao grupo FORM (em todas as concentrações), sendo particularmente evidente na dose mais baixa. Por último, a concentração intracelular de CO<sub>2</sub> (C<sub>i</sub>) (**Fig.19 D**) apresenta apenas efeito do tipo de tratamento, havendo um aumento significativo desta concentração em todas as doses do grupo NH<sub>2</sub>@NMP em relação ao grupo de controlo (5,8%).

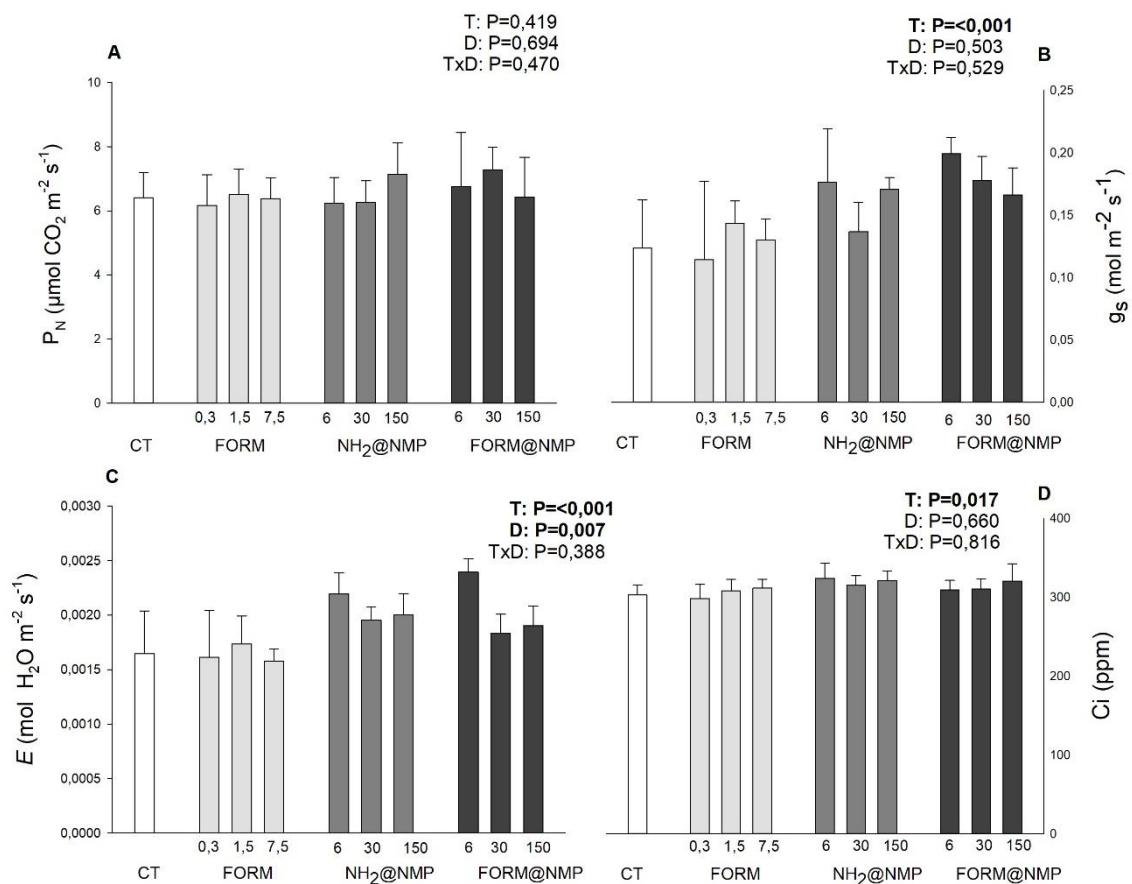
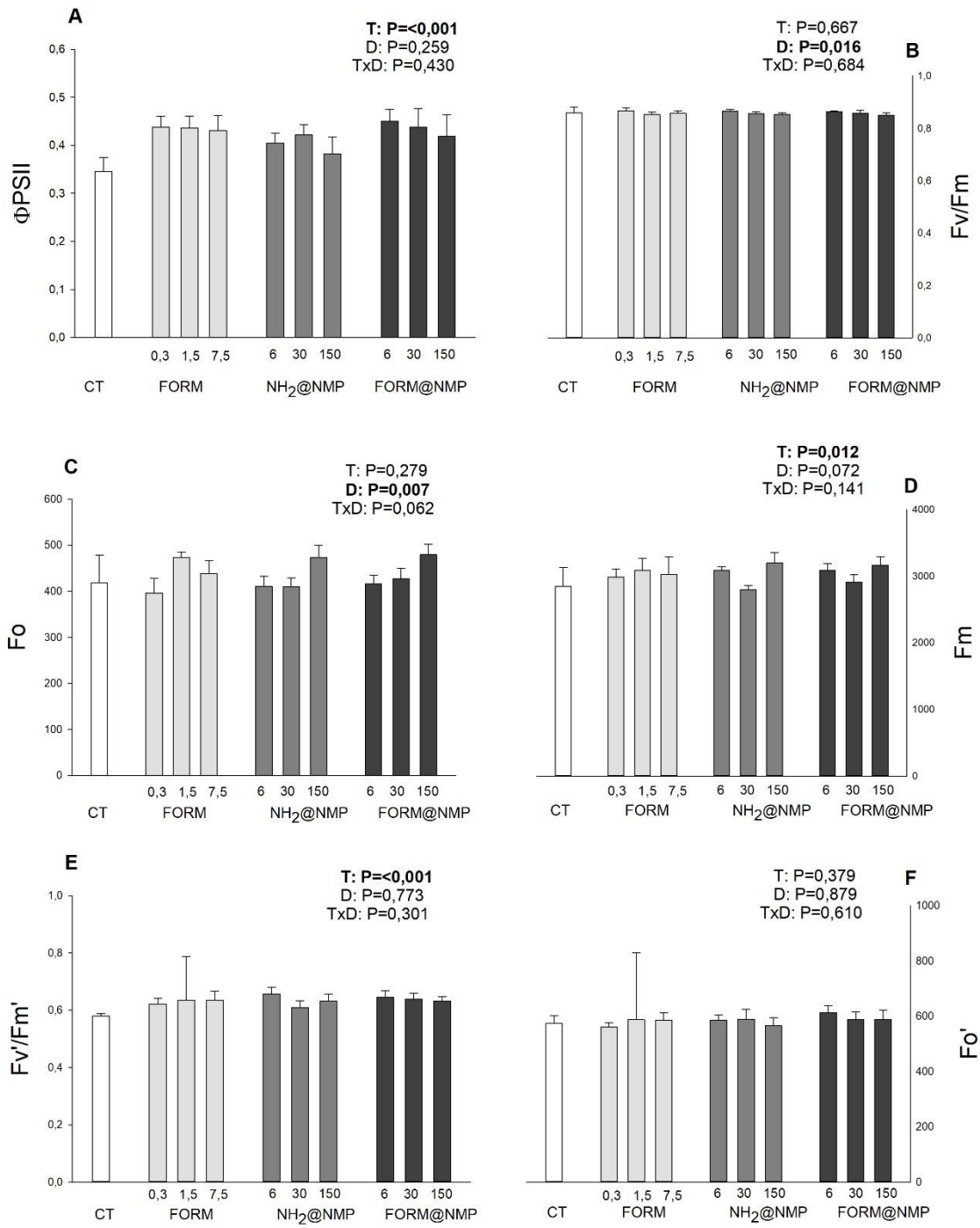


Figura 19 - Taxa fotossintética/taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> (A), condutância estomática (B), taxa de transpiração (C) e concentração intracelular de CO<sub>2</sub> (D) avaliadas em folhas de *Triticum aestivum* L. (trigo) tratadas com diferentes materiais – FORM, NH<sub>2</sub>@NMP e FORM@NMP e com diferentes concentrações – 0,3; 1,5 e 7,5 mg L<sup>-1</sup> para FORM e 6, 30 e 150 mg L<sup>-1</sup> para NH<sub>2</sub>@NMP e FORM@NMP. Os valores correspondem à média ± desvio padrão. O negrito corresponde a diferenças significativas (P≤0,05): entre o grupo de controlo e todas as doses dos três tratamentos (T); entre as doses do mesmo tratamento (D) e entre as mesmas doses dos diferentes tratamentos (TxD). Diferentes letras correspondem a diferenças significativas entre o grupo de controlo e todas as concentrações dos três tratamentos, entre as diferentes concentrações do mesmo tratamento ou entre as mesmas concentrações dos diferentes tratamentos (P≤0,05).

No que toca à fluorescência da clorofila *a*, a  $\Phi$ PSII (**Fig.20 A**) exhibe um efeito do tipo de tratamento, traduzido num aumento significativo deste parâmetro em todos os tratamentos quando comparados com o controlo (26,5% para FORM, 16,5% para NH<sub>2</sub>@NMP e 25,9% para FORM@NMP). A  $F_v/F_m$  (**Fig.20 B**), não apresenta alterações em nenhum dos tratamentos face ao controlo. No entanto, houve um estímulo na dose de 6 mg L<sup>-1</sup> nos três grupos (FORM, NH<sub>2</sub>@NMP e FORM@NMP) face às outras duas concentrações usadas. Na  $F_0$  (**Fig.20 C**) verificou-se apenas a ocorrência do efeito do fator dose: aumento significativo dos valores deste parâmetro na dose de 150 mg L<sup>-1</sup>, comparativamente à dose de 6 mg L<sup>-1</sup>, para todos os tratamentos. Face ao controlo, não se verificam alterações em quaisquer dos tratamentos. A  $F_m$  (**Fig.20 D**) apresentou somente um efeito do tipo de tratamento que se traduziu num aumento em todos os grupos e concentrações em relação ao controlo (6,6% para FORM, 6,4% para NH<sub>2</sub>@NMP e 7,4% para FORM@NMP), não se verificando efeito do tipo de dose nem da interação entre dose e partícula. A  $F_v'/F_m'$  (**Fig.20 E**) apresenta também somente o efeito do tipo de tratamento em relação ao controlo (aumento de 8,9% para FORM, 9,2% para NH<sub>2</sub>@NMP e 10,2% para FORM@NMP) e entre grupos. A  $F_m'$  (**Fig.20 G**) também apresenta o mesmo perfil que os dois parâmetros anteriores. Em relação ao controlo, os aumentos foram de 15,1% para FORM, 18,9% para NH<sub>2</sub>@NMP e 19,0% para FORM@NMP. A  $F_o'$  (**Fig.22 F**) não apresenta quaisquer variações.

Relativamente ao NPQ (**Fig.20 H**), verificou-se que existe efeito do tipo de tratamento que se traduz numa diminuição no grupo FORM@NMP em relação ao controlo na concentração mais baixa (26,3%) e na intermédia (15,6%), e uma tendência para diminuição nos restantes tratamentos ( $P > 0.05$ ). Por fim, no qP (**Fig.20 I**), observou-se a ocorrência de efeito do tipo de tratamento, com um aumento nos grupos FORM e FORM@NMP quando comparados com o grupo de controlo (13,2% e 14,1%), em todas as concentrações.





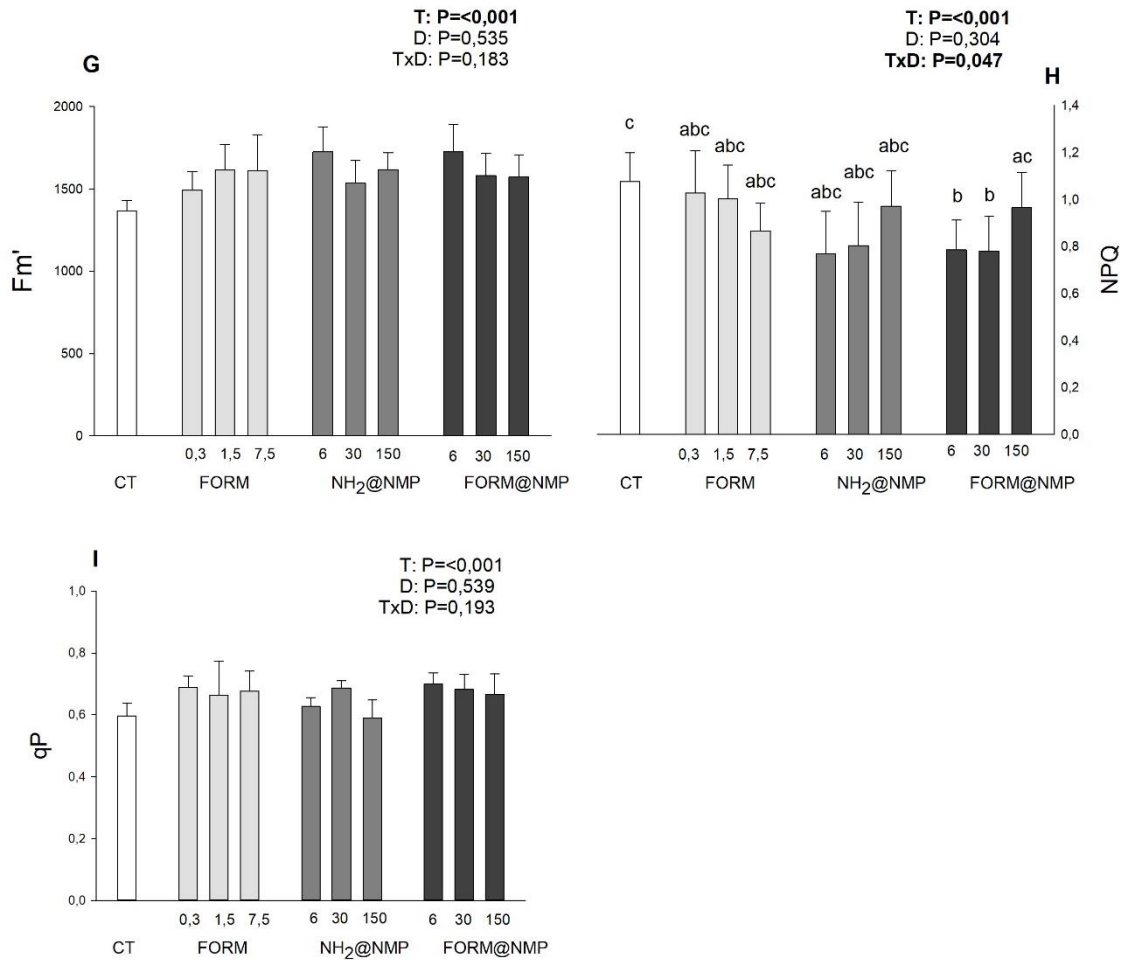


Figura 20 - Eficiência efetiva do PSII (A), eficiência máxima do PSII (B), fluorescência mínima adaptada ao escuro (C), fluorescência máxima adaptada ao escuro (D), eficiência máxima do PSII adaptada à luz saturada (E), fluorescência mínima adaptada à luz saturada (F), fluorescência máxima adaptada à luz saturada (G), *quenching* não-fotoquímico (H), *quenching* fotoquímico (I) e em folhas de *Triticum aestivum* L. (trigo) tratadas com diferentes materiais – FORM, NH<sub>2</sub>@NMP e FORM@NMP e com diferentes concentrações – 0,3; 1,5 e 7,5 mg L<sup>-1</sup> para FORM e 6, 30 e 150 mg L<sup>-1</sup> para NH<sub>2</sub>@NMP e FORM@NMP. Os valores correspondem à média ± desvio padrão. O negrito corresponde a diferenças significativas (P≤0,05): entre o grupo de controlo e todas as doses dos três tratamentos (T); entre as doses do mesmo tratamento (D) e entre as mesmas doses dos diferentes tratamentos (TxD). Diferentes letras correspondem a diferenças significativas entre o grupo de controlo e todas as concentrações dos três tratamentos, entre as diferentes concentrações do mesmo tratamento ou entre as mesmas concentrações dos diferentes tratamentos (P≤0,05).

#### 4.4 Discussão

A planta depende principalmente das folhas para absorver  $\text{CO}_2$  e água, importantes para a fotossíntese. Por outro lado, a luz usada na fotossíntese está dependente da área da superfície foliar e esta ajuda a perceber de que forma é que a planta se adapta ao ambiente (Hussain et al. 2021). Neste trabalho, não se verificaram alterações significativas na área foliar dos grupos tratados comparativamente ao grupo de controlo, no entanto observou-se um tendência para a diminuição no grupo FORM, indicando maior potencial das porfirinas não imobilizadas em inibir o crescimento das folhas. Esta hipótese é corroborada pela diminuição no desenvolvimento das folhas observada após o tratamento com FORM, contrariamente ao aumento observado nos grupos  $\text{NH}_2\text{@NMP}$  e  $\text{FORM@NMP}$ . Num estudo recente em que se aplicaram  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -NPs em plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*), NPs com 20 nm promoveram o aumento da área foliar, enquanto que NPs com 5 nm reduziram a área das folhas, mostrando que a expansão da área foliar está dependente do tamanho das NPs. (Rahmatizadeh et al. 2019).

O aumento do comprimento foliar apenas nos grupos  $\text{NH}_2\text{@NMP}$  e  $\text{FORM@NMP}$ , sugere que as NPs de Fe, às quais estão conjugadas as porfirinas que constituem a FORM, podem estar a exercer um efeito positivo no desenvolvimento das folhas. Este resultado está de acordo com o descrito em vários estudos onde fica demonstrada a capacidade das Fe-NPs em promover o crescimento das folhas (Yuan et al. 2018; Iannone et al. 2016). No entanto, é importante referir que os efeitos destas NPs no comprimento foliar estão fortemente dependentes da dose e da espécie vegetal utilizadas (Rahmatizadeh et al. 2019; Yasmineen et al. 2016; Shankamma et al. 2016). O aumento do comprimento das folhas pode ser resultado da estimulação da biossíntese de clorofila e dos processos redox pela ação do Fe (Briat, Curie, and Gaymard 2007). De facto, foi observada uma tendência para o aumento de pigmentos fotossintéticos. Num outro estudo em que foram aplicadas NPs de óxido de Zn (aplicação foliar) em plantas de pepino (*Cucumis sativus*), observou-se que este material promoveu o crescimento das folhas ao regular os componentes da parede celular, resultando em maior fluidez da membrana celular e relaxamento da parede celular, levando ao crescimento das folhas (Ghani et al. 2022). No mesmo estudo, as NPs de Zn regularam as hormonas de crescimento, importantes no alongamento, diferenciação e divisão celulares (Ghani et al. 2022). Estes resultados podem indicar que as NPs de Fe, às quais estão conjugadas as

porfirinas (FORM@NMP), podem estar a exercer um efeito similar às NPs de Zn e de Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

Em contraste com o que se verificou na fase de germinação (onde foi possível observar certo decréscimo da biomassa), na fase vegetativa os tratamentos não parecem afetar a biomassa. Estes resultados sugerem que os efeitos na biomassa estão dependentes do período de desenvolvimento do trigo e da duração da exposição. Sabe-se ainda que a massa da folha pode resultar de um aumento da área ou da espessura da própria folha (Weraduwege et al. 2015). Um decréscimo da biomassa das plantas pode traduzir alterações nas primeiras fases da formação de biomassa mediada pela absorção de luz pelas moléculas de clorofila. Os eletrões fotossintéticos são usados para a assimilação de CO<sub>2</sub> e para a formação de hidratos de carbono. Assim, se a produção de açúcares for deficiente, a planta não se desenvolve corretamente (Lewandowski et al. 2018). Corroborando com o que se obteve no nosso estudo, foi descrito que Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-NPs estimularam a biomassa fresca de plantas de *Capsicum annuum* (Sanati, Razavi, and Hosseinzadeh 2018), podendo este facto ser atribuído ao papel do Fe no aumento da absorção de nitrogénio, fósforo e potássio que estimulam o crescimento das plantas. Isto estimula o metabolismo celular e a mitose das células meristemáticas (Tawfk et al. 2021).

O estado hídrico das plantas não foi negativamente afetado, tendo em conta que não existem alterações significativas na suculência e apenas se verificou alteração nos valores de TRA em folhas expostas a FORM@NMP (ligeiro aumento), com níveis dentro dos valores para folhas saudáveis. Além disso, observou-se um estímulo ou manutenção dos valores normais das trocas gasosas.

A clorofila é um dos principais componentes dos cloroplastos e está diretamente relacionada com a taxa fotossintética uma vez que está envolvida na absorção e conversão da energia luminosa em energia eletroquímica (Hussain et al. 2021). Os metais, como o Fe, têm um impacto significativo no conteúdo de clorofila uma vez que são essenciais para a manutenção e funcionalidade dos cloroplastos, estando também envolvidos na cadeia transportadora de eletrões. A alteração do conteúdo de clorofilas pode pôr em risco a saúde da planta, bem como a sua resposta a alterações no ambiente. Neste trabalho, verificou-se um aumento do conteúdo de clorofila *a* em todos os tratamentos, assim como de clorofila *b* (FORM e NH<sub>2</sub>@NMP), evidenciando que tanto as porfirinas não imobilizadas como as NPs de Fe podem estimular a biossíntese de clorofilas e, em consequência, aumentar a taxa fotossintética, comprovado pelo aumento da ΦPSII, e a

tendência para incrementar o  $qP$  e  $P_N$  (Ghani et al. 2022; J. Li et al. 2021). São vários os estudos que relatam o aumento do conteúdo de clorofilas nas plantas expostas a Fe-NPs. Por exemplo, quando aplicadas em *Capsicum annuum*, observou-se um aumento do número de cloroplastos bem como do conteúdo de clorofila (Yuan et al. 2018). Os mesmos resultados foram obtidos quando foram aplicadas Fe-NPs em plantas de *Arachis hypogaea* (Rui et al. 2016), *Cucumis sativus* L. (Ghani et al. 2022), *Pseudostellaria heterophylla* (J. Li et al. 2021) e *Citrus maxima* (Hu et al. 2017). No entanto, existem estudos que reportaram um decréscimo no conteúdo de clorofilas induzido pela exposição a Fe-NPs (Lu et al. 2020; Sundaria et al. 2019; Alkhatib et al. 2019; Hu et al. 2017). Esta inibição pode surgir como consequência das doses utilizadas nestes estudos uma vez que poderão ter induzido uma maior produção de ROS e consequente degradação destes pigmentos, mas também pelo facto de as Fe-NPs possuírem a tendência de se agregarem e acumularem na superfície das raízes, impedindo assim o transporte da água para as folhas. A diminuição do teor de clorofila é muitas vezes associada à sua degradação causada pelo aumento da produção de  $OH^{\bullet}$  (gerada pela decomposição de  $H_2O_2$ ) por reações tipo-Fenton mediadas por  $Fe_2O_3$ -NPs, significando isto que a presença deste tipo de NPs facilita a degradação de clorofila (Lu et al. 2020).

Ainda no que diz respeito aos pigmentos, no presente estudo, verificou-se o aumento da quantidade de carotenoides nas plantas tratadas com as porfirinas isoladas, assim como o aumento de antocianinas no grupo  $NH_2@NMP$ , mas diminuição no grupo  $FORM@NMP$ . Os carotenoides estão envolvidos em múltiplas funções de captação de luz e podem atuar como antioxidantes para proteger as clorofilas da foto-oxidação. O conteúdo destes pigmentos fotoprotetores tende a aumentar em condições de stress ambiental, por exemplo quando ocorre um défice na disponibilidade de nitrogénio ou em condições de stress hídrico (Colom and Vazzana 2003; Jalal et al. 2013). Similarmente, as antocianinas estão também envolvidas no controlo de danos oxidativos nas células, bloqueando diretamente a ação de ROS nas membranas celulares e protegendo o aparelho fotossintético de danos através da absorção do excesso de radiação solar, reduzindo assim a energia de excitação (Silva et al. 2018; Zhang et al. 2010; Moradbeygi et al. 2020). Estes pigmentos protegem os órgãos/tecidos das plantas contra vários stresses abióticos, auxiliando ainda na recuperação da homeostasia celular (Vankar and Srivastava 2010; Landi, Tattini, and Gouldc 2015; Dias et al. 2020). Assim, o aumento destes pigmentos nos grupos  $FORM$  e  $NH_2@NMP$  pode ser um mecanismo de defesa adotado pelas plantas

para contrabalançar um putativo aumento de ROS que poderia conduzir a danos no aparelho fotossintético. Por outro lado, a diminuição de antocianinas nas plantas tratadas com FORM@NMP, conjugado com a diminuição do NPQ e aumento do qP, pode indicar maior capacidade por parte do PSII em assimilar a energia luminosa e menor perigo de foto-oxidação e stress oxidativo. A razão Chl *a*/Chl *b* caracteriza a proporção de captação de luz do PSII em todas as estruturas que contêm clorofila. Uma vez que os grupos FORM e FORM@NMP são os que possuem valores mais elevados deste parâmetro é possível concluir que são também os que melhor garantem que as plantas possam capturar e transferir energia luminosa a ser utilizada na fotossíntese (J. Li et al. 2021).

As análises da fluorescência da clorofila *a* são frequentemente utilizadas para detetar a resposta da planta a fatores externos e para uma melhor compreensão dos mecanismos desta mesma resposta. Neste trabalho, os resultados apontam para um estímulo significativo da eficiência do PSII em todos os tratamentos, traduzida pelo aumento do  $\Phi_{PSII}$ ,  $F_v'/F_m'$  e/ou qP. Assim, a aplicação de porfirina não imobilizada (FORM) e das NPs, decoradas ou não com FORM, em plantas de trigo, é benéfica aos processos fotoquímicos do PSII, promovendo a eficiência da absorção, transferência e transformação de energia luminosa no PSII. O aumento do qP e do  $F_o$  (em quase todas as concentrações e tratamentos) permite afirmar que a planta possui mecanismos de proteção eficazes contra danos foto-oxidativos (Silva et al. 2012). No entanto, valores mais elevados de  $F_o$  poderão indicar maior possibilidade de fotoinibição nos grupos NH<sub>2</sub>@NMP e FORM@NMP, nas concentrações mais elevadas (Dias et al. 2020). Os valores de  $F_o$  indicam que a planta tem a tendência de manter o equilíbrio entre o nível de absorção e utilização de energia luminosa e, em conjunto com os valores normais de  $F_v/F_m$ , também é possível afirmar que não ocorreram mudanças na absorção de luz por parte da planta (Dias et al. 2018). Para combater reações potencialmente desfavoráveis que são induzidas fotoquimicamente, as plantas têm um conjunto de mecanismos de fotoproteção, que servem para dissipar o excesso de energia proveniente da captação de luz e dissipá-la inofensivamente como calor (NPQ). De todos os parâmetros relacionados com a fotossíntese, o NPQ foi claramente o mais alterado, diminuindo em todos os tratamentos e concentrações. Os dados do NPQ, conjugados com os do qP (superiores ao grupo de controlo), sugerem que todos os tratamentos favoreceram uma maior eficiência na captação e uso da energia de excitação que por sua vez poderá ter contribuído para o aumento do  $\Phi_{PSII}$  (J. Li et al. 2021).

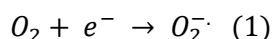
Relativamente aos processos não-fotoquímicos da fotossíntese, houve uma tendência para o aumento das trocas gasosas, particularmente em plantas tratadas com as NPs (decoradas ou não com as porfirinas). Tanto a  $g_s$ , como a  $E$  e a  $C_i$  aumentaram ou apresentaram uma tendência de aumento, no entanto o  $P_N$  manteve-se semelhante ao controlo, apesar de haver uma tendência para aumento no grupo FORM@NMP. Estes resultados mostraram que nenhum dos tratamentos induziu limitações estomáticas (Dias et al. 2018) e que os materiais usados têm elevado potencial em regular as trocas gasosas ao promover a abertura estomática e, potencialmente, estimular a taxa de assimilação de  $CO_2$  e a produção de hidratos de carbono, aumentando assim a performance fotossintética e a transpiração (J. Li et al. 2021; Yoon et al. 2019).

## 5 Avaliação do estado redox e da resposta antioxidante

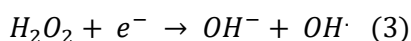
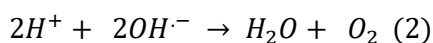
### 5.1 Introdução

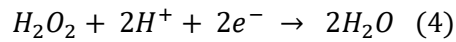
A fonte de todas as espécies reativas do oxigênio (ROS), o  $O_2$ , é uma molécula diradical estável e inofensiva para as plantas. No entanto, pode ser gradualmente convertido em espécies com elevada reatividade através de reações de transferência de elétrons ou alterações do estado de spin. As ROS são espécies reativas do  $O_2$  que incluem: o  $O_2^{\cdot-}$ , radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ),  $H_2O_2$  e  $^1O_2$  e que possuem a capacidade de oxidar e provocar dano em diversos componentes celulares, incluindo proteínas, lípidos e DNA (Huang et al. 2019; Sharma et al. 2012). Cada tipo de ROS tem uma capacidade oxidativa diferente e afeta diferentes reações bioquímicas e fisiológicas. Nas plantas, as ROS são formadas pela transferência de elétrons para o  $O_2$ , resultantes das atividades de transporte de elétrons dos cloroplastos, mitocôndrias, peroxissomas e membranas plasmáticas e das atividades metabólicas altamente oxidantes destes organelos ou pela absorção de uma quantidade elevada de energia (Anjum et al. 2019; Sharma et al. 2012). Apesar da sua atividade destrutiva, as ROS, a baixas concentrações, são descritas como sendo mensageiros secundários de uma variedade de processos celulares (Sharma et al. 2012).

O  $O_2^{\cdot-}$  é o precursor da maioria das outras ROS devido à sua elevada instabilidade e forte poder redutor/oxidante, consequência do seu elétron extra na camada de valência. Este ião é formado principalmente durante a fotossíntese, na cadeia transportadora de elétrons do fotossistema I (PSI), e resulta da redução do  $O_2$  através de um elétron que vai parar à sua camada de valência, como demonstrado na **Equação 1**. (Turrens 2003; Das and Roychoudhury 2014).



O  $H_2O_2$ , com um tempo de semivida de 1 ms, é gerado pela dismutação do  $O_2^{\cdot-}$  (**Equação 2**), que, a concentrações mais elevadas, pode ser parcialmente reduzido a radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ) – espécie mais tóxica e mais reativa - (**Equação 3**) ou totalmente reduzido a água (**Equação 4**) (Turrens 2003).





O  $^1O_2$  é outro tipo de ROS, com um tempo de semivida muito curto (100 ns) que pode ser gerado no PSII e possui alta oxidabilidade. A clorofila pode converter o  $^3O_2$  em  $^1O_2$ , na presença de luz e oxigênio. Esta espécie pode reduzir a eficiência fotossintética de ambos os fotossistemas devido à sua alta reatividade, colocando em risco os vários processos fotossintéticos e degradação de clorofila (Laloi and Havaux 2015; Das and Roychoudhury 2014).

A abundância de ROS pode resultar no fenômeno de stress oxidativo que advém de um desequilíbrio entre a produção de ROS e a capacidade do sistema antioxidante em as eliminar ou reparar o dano ocorrido. As células e tecidos das plantas respondem aos crescentes níveis de stress oxidativo por meio de um robusto sistema antioxidante composto por enzimas antioxidantes (**Fig.21**) (superóxido dismutase - SOD; catalase - CAT; peroxidase do ascorbato - APX; peroxidase da glutatona - G-POX, etc.) e antioxidantes não enzimáticos (ascorbato, glutatona, compostos fenólicos, prolina, tióis, carotenoides e  $\alpha$ -tocoferol) que trabalham de forma sinérgica de modo a neutralizar os radicais livres produzidos (Siddiqi and Husen 2017; Manke, Wang, and Rojanasakul 2013). Estes sistemas antioxidantes são a primeira linha de defesa contra os danos causados pelas ROS e são vitais para reestabelecer a saúde das células vegetais (Rajput, Harish, et al. 2021; Huang et al. 2019).

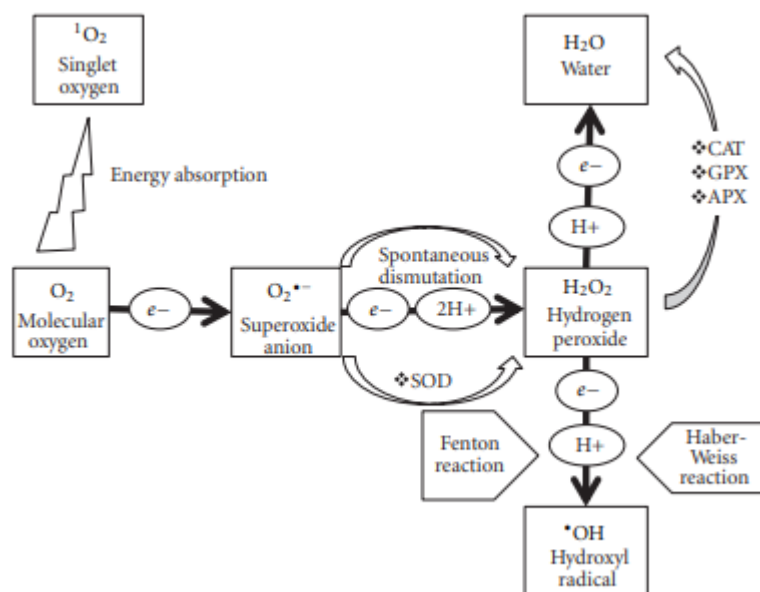


Figura 21 - Representação esquemática da geração de ROS nas plantas e consequente ativação dos mecanismos enzimáticos. Retirado de (Sharma et al. 2012).



A SOD, predominantemente presente nos cloroplastos, perixomas, mitocôndrias, citoplasma e apoplasto, é considerada a linha de defesa primária no combate às ROS e está envolvida na destoxificação de  $O_2^{\cdot-}$  em espécies menos tóxicas como o  $H_2O_2$  ou  $O_2$  (evitando assim a formação de radicais  $OH^{\cdot}$ ), enquanto que a CAT, a G-POX e a APX catalisam a disrupção de  $H_2O_2$ . Como não existe um sistema enzimático capaz de eliminar diretamente o  $OH^{\cdot}$ , a sua acumulação excessiva leva à morte celular. Enquanto que a CAT catalisa a redução do  $H_2O_2$  predominantemente nos perixomas, a APX desempenha a mesma função no citosol e nos cloroplastos. A CAT converte diretamente o  $H_2O_2$  em  $O_2$  e água e a APX, que é a enzima com maior afinidade ao  $H_2O_2$  uma vez que está mais amplamente distribuída, converte-o em água através da oxidação do ascorbato em desidroascorbato e água – peróxido este maioritariamente proveniente da dismutação do  $O_2^{\cdot-}$  pela SOD. A enzima G-POX, visto que é ativa tanto intracelularmente (vacúolos e citosol), extracelularmente e na parede celular, é considerada uma enzima-chave na eliminação de  $H_2O_2$ . Juntas, a SOD, a CAT, a POX e a GPX previnem a formação de ROS via reações de Haber-Weiss. O aumento da atividade de enzimas antioxidantes indica indiretamente o aumento dos valores das ROS nas células (Das and Roychoudhury 2014; Rajput, Harish, et al. 2021; Rajput, Minkina, et al. 2021).

Em relação aos antioxidantes não enzimáticos, estes não protegem apenas os diferentes componentes celulares de possíveis danos, mas desempenham também um papel importante no crescimento e desenvolvimento das plantas, regulando processos celulares como a mitose, alongamento, senescência (processos que acompanham o envelhecimento e morte de uma planta ou de uma parte dela) e morte celulares (Das and Roychoudhury 2014). Existem várias moléculas envolvidas na remoção direta das ROS e/ou servindo de substrato para as enzimas antioxidantes como a APX. Por exemplo, o ascorbato é um antioxidante crucial que pode resistir ao stress oxidativo induzido pela geração de ROS. Uma vez que está concentrado não apenas no citosol mas também no apoplasto, apresenta-se assim como a primeira linha de defesa ao ataque oxidativo. Devido à capacidade intrínseca do ascorbato de doar elétrons em diversas reações enzimáticas e não-enzimáticas, possui a capacidade de eliminar  $O_2^{\cdot-}$  e  $OH^{\cdot}$  e regenerar  $\alpha$ -tocoferol, de modo a proteger as membranas do dano oxidativo (Noctor and Foyer 1998; Das and Roychoudhury 2014). Outro exemplo é a glutatona, metabolito localizado nos cloroplastos, mitocôndrias, vacúolos, citosol, peroxissomas, retículo endoplasmático e até no apoplasto. Sendo um antioxidante com elevado potencial redutor, a glutatona atua

como doador de prótons nos radicais livres orgânicos e, na presença de ROS, elimina-as (Foyer and Noctor 2003). O  $\alpha$ -tocoferol pertence a uma família de antioxidantes lipofílicos que eliminam eficientemente as ROS, apresentando-se como protetores dos lípidos e de outros constituintes membranares dos cloroplastos protegendo assim a estrutura e funcionalidade do PSII. Os carotenoides e a prolina – que também possui capacidade de eliminar o  $\text{OH}^\bullet$  - apresentam atividade antioxidante na proteção os processos fotossintéticos ao eliminar o  $^1\text{O}_2$ . Os flavonoides também participam na eliminação do  $^1\text{O}_2$ , aliviando os danos causados no invólucro exterior da membrana dos cloroplastos (Das and Roychoudhury 2014).

A atividade antioxidante dos compostos fenólicos caracteriza-se pelo seu poder de oxidação-redução, que tem um papel importante na absorção e neutralização de radicais livres (Moradbeygi et al. 2020).

Assim, é o equilíbrio homeostático que se estabelece entre a produção de ROS e a sua remoção pelos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos que permite a manutenção do estado redox celular, prevenindo a ocorrência de dano oxidativo que pode levar a lesões nas proteínas, ácidos nucleicos e lípidos, culminando na morte celular (Soares, Pereira, and Fidalgo 2018). O mecanismo mediado por ROS tem sido considerado como um dos principais mecanismos subjacentes à toxicidade causada por NP metálicas em organismos vivos, incluindo as plantas.

A produção de ROS devido à exposição a NPs metálicas está muitas vezes relacionada com o tamanho, forma, área de superfície e solubilidade em meio aquoso e é um fator chave na toxicidade induzida por NPs metálicas bem como na modulação da sinalização celular que está envolvida na morte, proliferação, respiração, mobilidade e diferenciação celulares (Rahmatizadeh et al. 2019; Dayem et al. 2017; Fu et al. 2014).

Tendo sido amplamente descrito o potencial que NPs metálicas e porfirinas têm na indução de stress oxidativo, torna-se premente avaliar o nível de fitotoxicidade que NPs metálicas e porfirinas usadas em processos de remediação e no tratamento de águas residuais podem ter nas espécies vegetais. Desta forma, nesta secção avaliar-se-á o impacto de NPs desenvolvidas para fotoinativar microrganismos de águas residuais no trigo. Para isso, foram avaliados os seguintes parâmetros: peroxidação lipídica; atividade antioxidante total, fenóis totais e flavonoides; quantificação de ROS ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) e  $\text{H}_2\text{O}_2$ ;

quantificação de enzimas antioxidantes (CAT, APX, SOD e G-POX) e proteínas solúveis totais.

## **5.2 Materiais e métodos**

### **5.2.1 Descrição e caracterização dos materiais**

Para a avaliação do impacto na fotossíntese foram utilizados os 3 tipos de materiais descritos no capítulo 3 (ver pág. 22): 1) FORM; 2) NH<sub>2</sub>@NMP; Fig. 2) e 3) FORM@NMP.

### **5.2.2 Material vegetal e condições de cultura**

O material vegetal e as condições usadas são as mesmas que as descritas no capítulo 4. No final do ensaio, as 4<sup>a</sup> e 5<sup>a</sup> folhas mais jovens de 3 plantas diferentes foram maceradas em nitrogénio líquido e armazenadas a -80 °C para posteriormente serem usadas na avaliação de diversos biomarcadores de stress oxidativo. Para cada parâmetro foram usadas 5 réplicas biológicas, em que cada uma consistia no conjunto das 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> folhas mais velhas de 3 plantas diferentes.

### **5.2.3 Determinação da peroxidação lipídica**

Os níveis de peroxidação lipídica foram medidos em termos do conteúdo em malondialdeído (MDA), produtos resultantes da peroxidação lipídica dos tecidos, determinados através da reação com ácido tiobarbitúrico (TBA), segundo o método descrito por Dhindsa and Matowe 1981 e por Hodges et al. 1999.

Antes do início desta análise prepararam-se três soluções: TCA 0,1% (0,05 g de ácido tricloroacético em 50 mL de água destilada); TCA 20% (10 g de ácido tricloroacético em 50 mL de água destilada) e a mistura TCA 20% + TBA 0,5% (10 g de ácido tricloroacético + 0,25 g de ácido tiobarbitúrico em 50 mL de água destilada).

A 100 mg de material vegetal adicionou-se 1,0 mL de TCA 0,1%, agitou-se no vortex e centrifugou-se a 10.000 g durante 5 min, a 4 °C. Posteriormente retirou-se uma alíquota de 250 µL do sobrenadante para tubos de 2,0 mL, aos quais se adicionaram 500 µL de TCA (20%) + TBA 0.5% (controlo positivo). Em paralelo, retirou-se também uma alíquota de 250 µL do sobrenadante para outro tubo de 2 ml, ao qual se adicionaram 500 µL de TCA (20%) (controlo negativo). De seguida, os tubos foram colocados num banho a 95 °C, durante 30 min. Após este período, os tubos foram imediatamente arrefecidos em gelo e centrifugados novamente a 10.000 g, durante 10 min, a 4 °C. Por fim, leu-se a absorvância específica das amostras a 440 nm e 532 nm contra a absorvância não específica a 600 nm (usou-se o controlo positivo como branco para ler a 600, 532 e 440 nm e o controlo negativo para o 600 e 532nm).

O conteúdo de MDA foi calculado usando o coeficiente de extinção molar:  $\epsilon = 155 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ :

$$[(\text{Abs } 532_{+TBA}) - (\text{Abs } 600_{+TBA}) - ((\text{Abs } 532_{-TBA} - \text{Abs } 600_{-TBA}))] = A$$

$$[(\text{Abs } 440_{+TBA} - \text{Abs } 600_{+TBA}) \times 0.0571] = B$$

$$\text{MDA equiv (nmol.mL}^{-1}) = ((A - B) / 157\,000) \times 10^9$$

$$\text{MDA} = (\text{MDA equiv} \times V_{\text{extração}}) / \text{Peso das folhas}$$

#### 5.2.4 Atividade antioxidante total, fenóis totais e flavonoides

Para a determinação da atividade antioxidante total (AAT), fenóis totais e flavonoides usou-se o mesmo extrato: a 100 mg de material vegetal e adicionou-se 1,0 mL de metanol 100%, sendo depois esta mistura sonicada (Bandelin Sanorex digitec, Berlin, Germany) a uma temperatura de 40 °C, durante 30 min. De seguida, procedeu-se à centrifugação a 15.000 g durante 15 min a 4 °C e recolheu-se o sobrenadante, obtendo-se assim o extrato metanólico.

Para a quantificação da AAT foi utilizado o método do ABTS, que quando presente em solução enquanto radical livre  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  (ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolína-6-sulfónico) é reduzido pelos antioxidantes presentes, suprimindo a produção de cor proporcionalmente à concentração de compostos antioxidantes. O método do ABTS baseia-se na capacidade dos antioxidantes presentes em capturar o cátion radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  (**Fig.22**) provocando assim um decréscimo na absorvância, que é lida a partir da mistura da solução contendo o ião radical com a solução do antioxidante, em diferentes tempos. O método  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  apresenta excelente estabilidade, sendo um dos testes mais rápidos de medição da atividade antioxidante (Kuskoski et al. 2005).

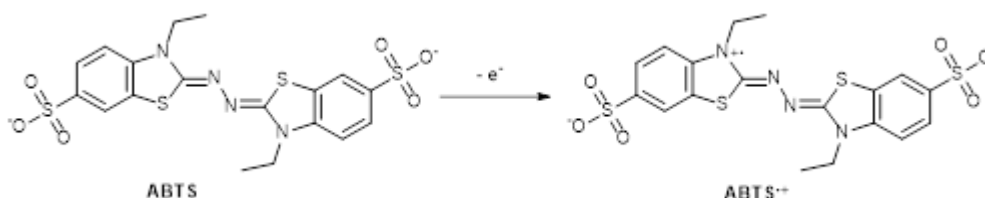


Figura 22 - Oxidação do ABTS a cátion radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$ .

Foram adicionados 190  $\mu\text{L}$  de ABTS a 10  $\mu\text{L}$  de extrato metanólico, ficando esta mistura em incubação, cerca de 5 min, a uma temperatura de 30 °C. Por fim, foi traçada uma reta padrão com ácido gálico (Sigma, USA) (concentrações: 0,007; 0,015; 0,03; 0,06;

0,125; 0,25 e 0,5 mg/mL;  $R^2=0,9763$ ) e medida a absorvância a 734 nm dos extratos metanólicos e dos preparados para a reta padrão num leitor de microplacas (Synergy™ HT, BioTeK®), com recurso a placas de 92 poços.

O conteúdo fenólico total do extrato foi avaliado espectrofotometricamente usando o método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, baseado na transferência de eletrões, com utilização do reagente de Folin-Ciocalteu, uma mistura de óxidos fosfotungsténio e fosfomolibénico, que é reduzida pelos fenóis a ácidos de tungsténio e de molibdénio de cor azul, proporcional à concentração de fenóis (Lamuela-Raventós 2017). A 20 µL de extrato, adicionou-se 160 µL de reagente de Folin, agitou-se e deixou-se incubar durante 5 min. De seguida, foram adicionados 30 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 20% e procedeu-se à agitação da mistura e posterior incubação durante 2h30 min. O conteúdo fenólico total foi determinado com base numa reta padrão de ácido gálico (concentrações: 0,007; 0,015; 0,03; 0,06; 0,125; 0,25 e 0,5 mg/mL;  $R^2=0,9973$ ) após medida a absorvância a 765 nm num leitor de microplacas (Synergy™ HT, BioTeK®), com recurso a placas de 92 poços.

A técnica utilizada para a quantificação de flavonoides baseou-se na complexação de moléculas de flavonoide com cloreto de alumínio (III) (AlCl<sub>3</sub>) e na determinação espectrofotométrica do complexo formado (Silva, Pezzini, and Soares 2015). Foram adicionados 37,5 µL de extrato, 75 µL de nitrato de sódio (NaNO<sub>3</sub>) 5% e 75 µL de AlCl<sub>3</sub> 10%. As amostras foram agitadas no vortex e ficaram a incubar durante 6 min no escuro e, posteriormente, foram adicionados 250 µL de hidróxido de sódio (NaOH) 1 mol.dm<sup>-3</sup>. O conteúdo em flavonoides foi determinado com base numa reta padrão de rutina (Sigma, USA) (concentrações: 0,039; 0,007; 0,015; 0,03; 0,06; 0,125; 0,25 e 0,5 mg/mL;  $R^2=0,9985$ ) após medida a absorvância a 510 nm num leitor de microplacas (Synergy™ HT, BioTeK®), com recurso a placas de 92 poços.

## **5.2.5 Quantificação de ROS**

### **5.2.5.1 Anião radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>)**

Para a quantificação do O<sub>2</sub><sup>•-</sup> adicionaram-se 2,0 mL de tampão de extração a 100 mg de material vegetal. O tampão de extração é composto por tampão fosfato 0,01 mol.dm<sup>-3</sup> pH 7,8, contendo 100 mg de 0,05% NBT (preparado em 100 µL de DMSO) e 130 mg azida sódica 10 mM. Depois de adicionado o tampão ao material vegetal, esta mistura foi incubada 1 h à temperatura ambiente e depois centrifugada a 13.000 g durante 2 min, a 4 °C. De seguida, transferiu-se 1,5 mL do sobrenadante para um novo tubo passando por um período de 15 min de incubação, a 85 °C. Por fim, foi prontamente

colocado em gelo, durante 10 min, e procedeu-se à leitura da absorvância, a 580 nm.

#### **5.2.5.2 Peróxido de hidrogénio**

Para a quantificação de  $H_2O_2$  foi primeiramente preparada uma solução de extração contendo TCA 5% + 0,15 g de carvão ativado que foi então homogeneizado com a amostra vegetal (na proporção 100 mg de amostra para 1 mL de solução de extração). A mistura foi centrifugada a 10.000 g durante 20 min, a 4 °C. Depois, o pH da solução foi ajustado a 8.4 com 17 M amoníaco e, seguidamente, filtrou-se a solução.

De seguida, o extrato vegetal foi dividido em duas alíquotas. Uma parte com incubação com catalase e outra sem incubação com a enzima. Juntaram-se então 8 µg de catalase a parte do filtrado (controlo) e adicionou-se um reagente colorimétrico (na proporção 1 mL de reagente para 1 mL de amostra) a todas as amostras. O reagente contém 8 mg de 4-aminoantipirina, 8 mg de fenol e 4 mg de peroxidase 150 U/mg. Seguidamente, as amostras foram incubadas, durante 10 min, a 30 °C e foi adicionado novamente o reagente colorimétrico na mesma proporção. Finalmente, procedeu-se à leitura das absorvâncias, a 505 nm.

Após a realização desta análise e do respetivo tratamento de dados, verificou-se que os dados obtidos não foram coerentes e por isso não estão apresentados na secção dos resultados.

#### **5.2.6 Enzimas antioxidantes**

Os extratos enzimáticos usados na quantificação da CAT, G-POX e SOD foram obtidos macerando 100 mg de material vegetal congelado com 1 ml de 100mM de tampão fosfato de pH 7,5 contendo 0,5 mM de EDTA dissódico desidratado. Para a APX usou-se um tampão de extração semelhante que apenas continha também 0,5 mM de ascorbato. Os extratos foram de seguida centrifugados a 15.000 g durante 20 min, a 4 °C.

*Catalase (CAT):* Para determinar a atividade de CAT, foi utilizado um método espectrofotométrico UV. A mistura de reação continha 0,1 M tampão fosfato pH 7, 150 µL de água Mili-Q e 10 µL de extrato. Para iniciar a reação adicionou-se 20 µL de  $H_2O_2$  6 mM. A mistura de reação foi então colocada numa microplaca e as amostras foram lidas, a 240 nm, durante 8 min, de 46 em 46 segundos. O controlo foi feito sem enzima e o branco não continha  $H_2O_2$ .

*Peroxidase do ascorbato (APX):* Para a quantificação, foram adicionados 20 µL

de tampão fosfato 0,5 M pH 7, 130 µL de água Milli-Q, 20 µL de AsA 0,5 mM, 10 µL de EDTA 0,1 mM e 10 µL de extrato. Para dar início à reação adicionaram-se 10 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,1 mM. As amostras foram lidas a 290 nm, monitorizando o decréscimo no conteúdo de AsA. O controlo foi feito sem enzima e o branco não continha H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

*Superóxido dismutase (SOD)*: Para a quantificação da atividade da SOD, foi utilizado um método espectrofotométrico que se baseia na redução do azul de nitrotetrazólio (NBT) como medida da quantidade de SOD presente em solução. Preparou-se uma Master Mix com 120 µL de Milli-Q, 10 µL de 50 mM tampão fosfato pH 7,8, 10 µL de 0,1 mM EDTA, 20 µL de 13 mM metionina, 10 µL de 50 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e 10 µL de 75 µM de NBT. De seguida, 180 µL da solução Master Mix foram pipetados para uma microplaca juntamente com 10 µL de extrato enzimático e 10 µL de 2 µM riboflavina (início da reação). A placa foi depois colocada sob luz fluorescente 18 W durante 15 min – a riboflavina é reduzida pela luz e gera O<sub>2</sub><sup>•-</sup> na presença da metionina, o qual, na ausência de SOD, vai reduzir o NBT. Finalmente, procedeu-se à leitura das absorvâncias a 560 nm. O controlo foi feito sem enzima e o branco sem irradiação com luz fluorescente.

*Peroxidase da glutatona (G-POX)*: Para a quantificação da atividade da G-POX foi também realizada uma Master Mix com 130 µL de água Milli-Q, 20 µL de 10 mM tampão fosfato pH 6,1 e 20 µL de 96 mM guaiacol. 170 µL da solução Master Mix foram então pipetados para uma microplaca, adicionou-se 10 µL de extrato, e de seguida lida a absorvância das amostras a 470 nm, durante 3 min. De forma a iniciar a reação adicionaram-se 20 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e leu-se a absorvância novamente a 470 nm. O branco foi realizado sem adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e o controlo sem adição de enzima.

### 5.2.7 Proteínas

Para a quantificação das proteínas solúveis totais, foi utilizado o método de (Bradford 1976) utilizando o kit Total Protein, Micro (Sigma-Aldrich, USA). Os resultados foram expressos em mg de proteína/mg de peso fresco. Numa microplaca, pipetaram-se 196 µL de corante em todos os poços, juntamente com: 4 µL de padrão; 4 µL de NaCl (85%) – para o branco, e 4 µL de amostra. A concentração do padrão utilizado foi de 0,3 mg mL<sup>-1</sup> e as absorvâncias das amostras, padrão e branco foram lidas a 596 nm. A concentração de proteína foi determinada através da seguinte fórmula:

$$[\text{proteína}] = \frac{\text{Abs da amostra} \times [\text{padrão}]}{\text{Abs do padrão}}$$



### 5.2.8 Análise estatística

A distribuição da normalidade dos dados foi testada e os dados foram transformados para normalização, quando necessário. A análise estatística foi realizada através do teste Two-Way ANOVA procedidos pelos procedimentos de comparação múltipla Holms Sidak ( $p < 0,05$ ). O negrito em cada gráfico corresponde a diferenças significativas ( $P \leq 0,05$ ): entre o grupo de controlo e todas as doses dos três tratamentos (T); entre as doses do mesmo tratamento (D) e entre as mesmas doses dos diferentes tratamentos (TxD). A análise estatística foi realizada no programa SigmaPlot (Systat Software Inc.) e foram analisadas diferenças significativas entre o grupo de controlo e todas as concentrações dos três tratamentos (FORM, NH<sub>2</sub>@NMP e FORM@NMP), entre as diferentes concentrações do mesmo tratamento e entre as mesmas concentrações dos diferentes tratamentos. Uma vez que as concentrações usadas de FORM corresponde à fração de porfirinas presentes na FORM@NMP, aquando da realização da análise estatística atribuiu-se ao grupo das FORM as mesmas concentrações dos grupos NH<sub>2</sub>@NMP e FORM@NMP: 0,3 correspondeu a 6 mg L<sup>-1</sup> ; 1,5 correspondeu a 30 mg L<sup>-1</sup> , 7,5 correspondeu a 150 mg L<sup>-1</sup> . De outra forma, não seria possível comparar o grupo FORM com os restantes grupos.

### 5.3 Resultados

O tratamento do trigo com os diferentes materiais levou a alterações no conteúdo em MDA (**Fig.23 A**). Os valores de MDA diminuíram, principalmente no grupo FORM (54,3%) e FORM@NMP (53,4%), em todas as concentrações, face ao controlo. A análise da permeabilidade membranar (**Fig.23 B**) revela a existência do efeito do tipo de material, apesar de não se registarem quaisquer variações significativas entre os tratamentos e controlo. A atividade antioxidante total (**Fig.23 C**) apresenta-se dependente do tipo de tratamento, com valores superiores no grupo NH<sub>2</sub>@NMP, comparativamente a FORM@NMP. Em relação ao controlo, não se verificam quaisquer diferenças.

Com relação ao conteúdo de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> presente (**Fig.23 D**), observou-se um efeito do tipo de tratamento, aumentando no grupo FORM@NMP face ao controlo (26,6%) e comparativamente ao NH<sub>2</sub>@NMP.

No que toca ao conteúdo em flavonoides (**Fig.23 E**) ocorreu um efeito do tipo de tratamento bem como da interação entre o tipo de tratamento e dose: no grupo FORM, o tratamento com 0.3 mg L<sup>-1</sup> levou à diminuição ( $p \leq 0.05$ ) do conteúdo em flavonoides, relativamente às restantes doses; o valor mais baixo foi obtido no grupo NH<sub>2</sub>@NMP e na dose de 30 mgL<sup>-1</sup>, sendo significativamente diferente das concentrações homólogas nos outros tratamentos e do grupo de controlo (20,2%). Assim como o parâmetro anterior, também na avaliação dos fenóis totais (**Fig.23 F**), se verificou apenas a ausência do efeito do tipo dose. Não há registo de quaisquer alterações significativas em relação ao controlo, no entanto, existem diferenças significativas entre concentrações no grupo FORM: o valor da concentração mais baixa é inferior às restantes dosagens.

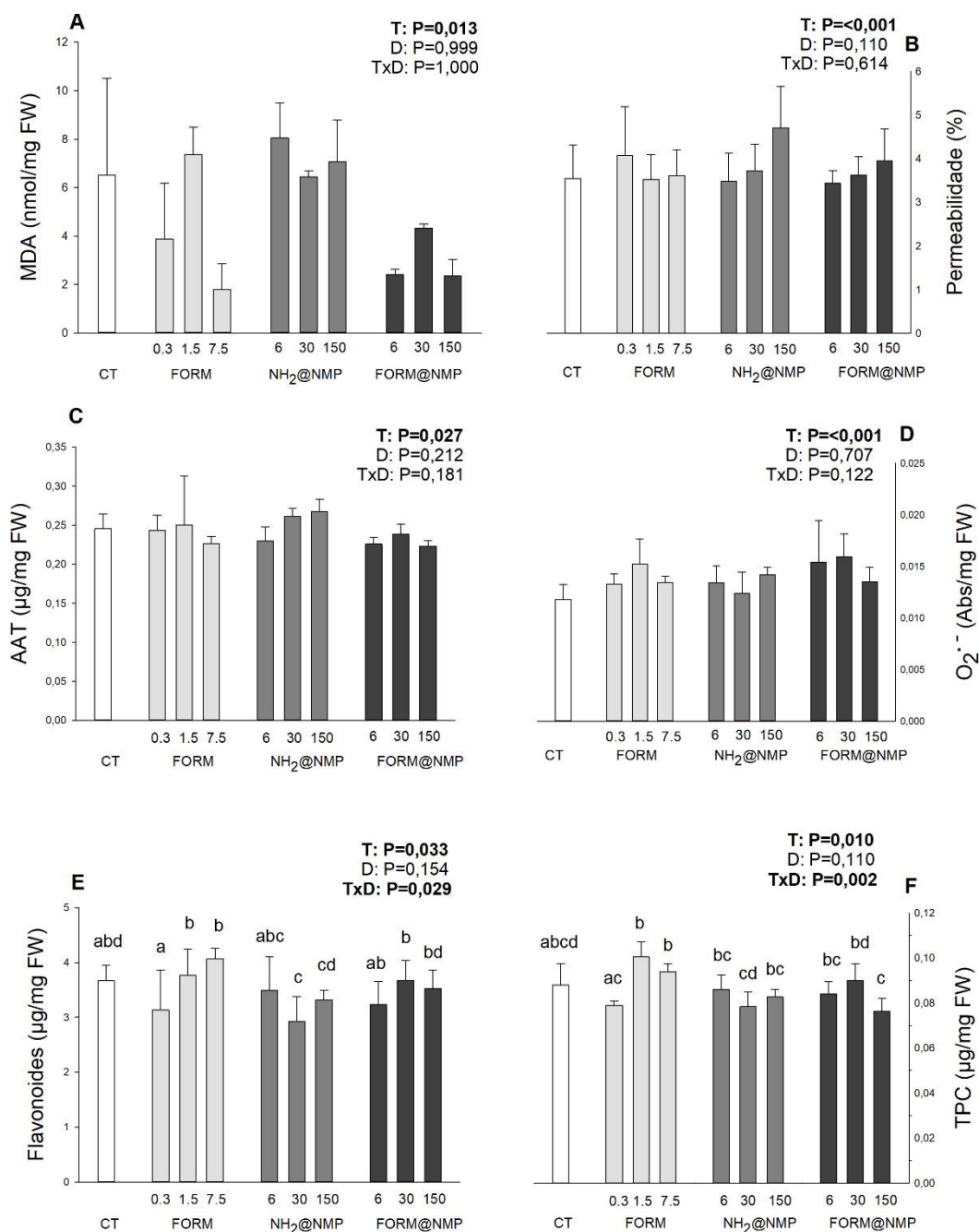


Figura 23 – Conteúdo em malondialdeído (A), permeabilidade membranal (B), atividade antioxidante total (C), concentração do radical superóxido (D), quantidade de flavonoides (E) e fenóis totais (F) em folhas de *Triticum aestivum* L. (trigo tratadas com diferentes materiais – FORM, NH<sub>2</sub>@NMP e FORM@NMP e com diferentes concentrações – 0,3; 1,5 e 7,5 mg L<sup>-1</sup> para FORM e 6, 30 e 150 mg L<sup>-1</sup> para NH<sub>2</sub>@NMP e FORM@NMP. Os valores correspondem à média ± desvio padrão. O negrito corresponde a diferenças significativas (P≤0,05): entre o grupo de controle e todas as doses dos três tratamentos (T); entre as doses do mesmo tratamento (D) e entre as mesmas doses dos diferentes tratamentos (TxD). Diferentes letras correspondem a diferenças significativas entre o grupo de controle e todas as concentrações dos três tratamentos, entre as diferentes concentrações do mesmo tratamento ou entre as mesmas concentrações dos diferentes tratamentos (P≤0,05).

No que toca à atividade das enzimas antioxidantes, observou-se uma tendência para diminuição da SOD, CAT e APX, salvo algumas exceções. Na APX (**Fig.24 A**) e no grupo NH<sub>2</sub>@NMP, verificou-se uma atividade superior na dose intermédia, comparativamente às restantes deste tratamento, e verificou-se uma diminuição em relação ao controlo (74,2%) na dose intermédia do grupo FORM@NMP. A SOD (**Fig.24 B**) apresenta apenas um efeito do tipo de tratamento com valores inferiores no grupo FORM@NMP (em todas as concentrações) em relação ao controlo (27,1%). A G-POX (**Fig.24 C**) também apresenta apenas um efeito do tipo de tratamento, que se traduziu na diminuição da atividade no grupo FORM@NMP, relativamente ao grupo de controlo (3,4%) e ao grupo FORM. Por último, na CAT (**Fig.24 D**), o grupo NH<sub>2</sub>@NMP apresenta valores significativamente inferiores face ao grupo FORM, em todas as concentrações. Não se verificam quaisquer alterações significativas em relação ao controlo, nem um efeito do tipo dose, nem efeito da interação entre o tipo de partícula e dose. Com relação às proteínas totais (**Fig.24 E**), não se verificam nenhuma alteração significativa.

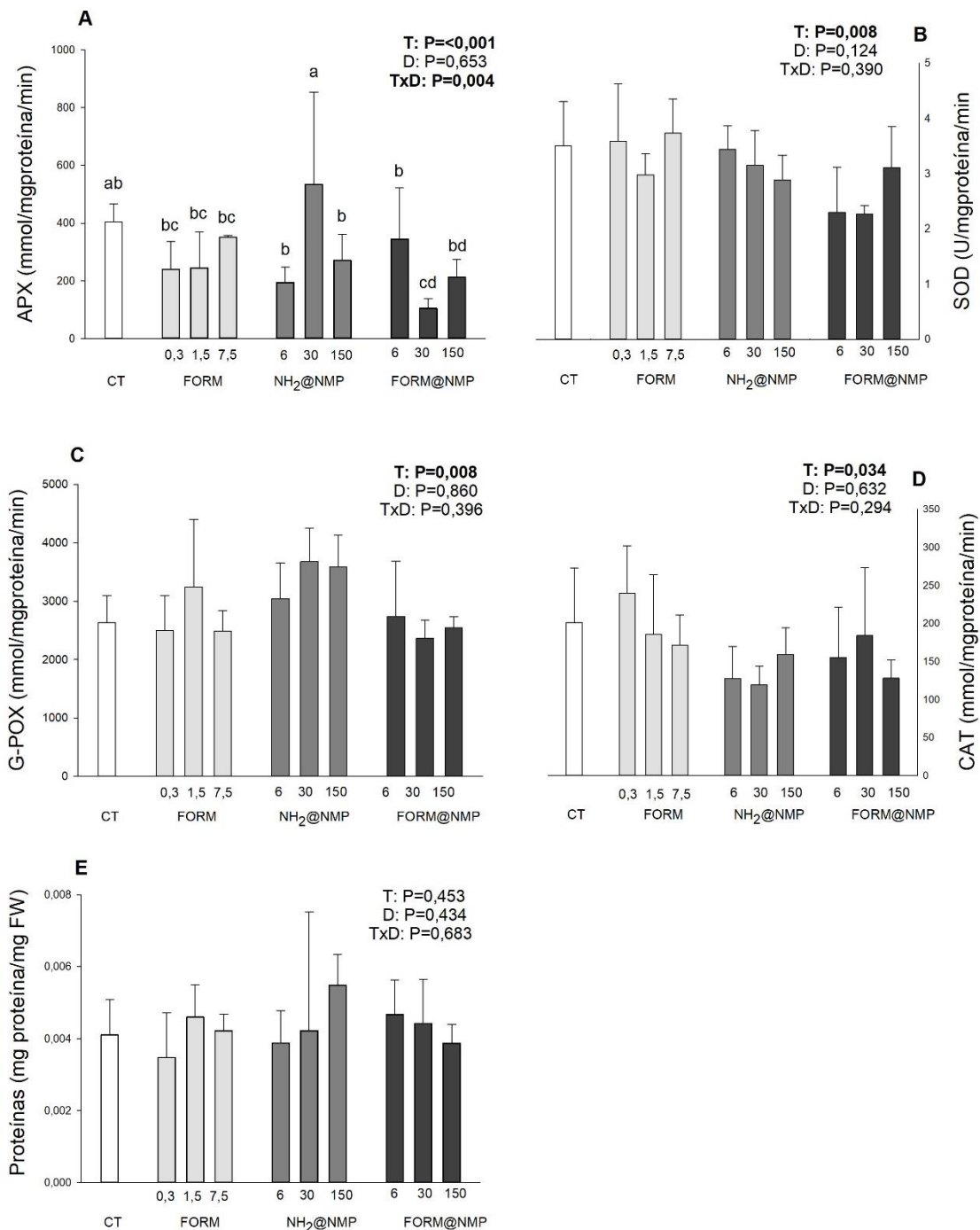


Figura 24 - Quantidade de peroxidase do ascorbato (A), superóxido dismutase (B), peroxidase da glutatona (C), catalase (D) e concentração de proteínas totais (E) presentes nas folhas de *Triticum aestivum* L. (trigo) tratadas com diferentes materiais – FORM, NH<sub>2</sub>@NMP e FORM@NMP e com diferentes concentrações – 0,3; 1,5 e 7,5 mg L<sup>-1</sup> para FORM e 6, 30 e 150 mg L<sup>-1</sup> para NH<sub>2</sub>@NMP e FORM@NMP. Os valores correspondem à média ± desvio padrão. O negrito corresponde a diferenças significativas (P≤0,05): entre o grupo de controle e todas as doses dos três tratamentos (T); entre as doses do mesmo tratamento (D) e entre as mesmas doses dos diferentes tratamentos (TxD). Diferentes letras correspondem a diferenças significativas entre o grupo de controle e todas as concentrações dos três tratamentos, entre as diferentes concentrações do mesmo tratamento ou entre as mesmas concentrações dos diferentes tratamentos (P≤0,05).

## 5.4 Discussão

A produção exagerada de ROS pode levar a danos em diversas biomoléculas e comprometer o metabolismo celular e o desenvolvimento das plantas. O aumento de ROS em plantas induzido pela exposição a NPs está descrito para vários tipos NPs (Sharma et al. 2012). Relativamente aos materiais usados neste trabalho, é expectável que promovam o aumento de ROS nos grupos FORM e FORM@NMP já que estes dois materiais são compostos por porfirinas e estas, quando excitadas pela luz, geram ROS, nomeadamente  $^1\text{O}_2$ . De forma a analisar o potencial destes materiais em induzir dano oxidativo analisaram-se diversos biomarcadores de stress oxidativo.

Ao analisar o conteúdo em  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , verificou-se uma tendência para aumento desta ROS em todos os grupos, embora apenas significativo no grupo FORM@NMP. A dismutação desta molécula é muito rápida e pode ocorrer espontaneamente, ou então por ação de enzimas antioxidantes como a SOD (Rajput, Harish, et al. 2021), a qual apresentou uma diminuição da sua atividade em plantas exposta a FORM@NMP. Este facto pode justificar o aumento de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  observado. Para além da SOD, também a APX e a G-POX foram reguladas e a CAT apresentou uma tendência de decréscimo, mostrando uma capacidade deste material em modelar a atividade das enzimas antioxidantes e em regular a resposta antioxidante do trigo. Em linha com o decréscimo da atividade enzimática, também foi observada uma tendência para a diminuição da AAT, embora não tenham havido alterações nos conteúdos dos flavonoides totais e TPC – indicando que as NPs não induziram respostas de stress significativas nas plantas. Os compostos fenólicos e os flavonoides acumulam-se nos tecidos vegetais e são moléculas antioxidantes responsáveis por destoxificar os radicais livres devido à sua capacidade de doar átomos de hidrogénio aos radicais livres, possuindo também propriedades estruturais ideais para a sua eliminação. (Moradbeygi et al. 2020; Aryal et al. 2019). O aumento da sua concentração pode ser considerado como um fator de tolerância adquirido pelas plantas, o que significa que a  $30 \text{ mg L}^{-1}$ , no grupo  $\text{NH}_2\text{@NMP}$ , a planta pode não ter conseguido estabelecer tolerância a algum tipo de stress induzido. Estes resultados sugerem que a diminuição da AAT dever-se-á à diminuição da atividade enzimática.

A redução da atividade de enzimas que destoxificam o  $\text{H}_2\text{O}_2$ , como a CAT e as peroxidases, poderá levar a uma acumulação  $\text{H}_2\text{O}_2$  nas células (Stancill et al. 2019; Lennicke et al. 2015). Uma vez que um dos alvos desta ROS são os lípidos, principais

constituintes das membranas celulares, seria expectável que houvesse um aumento no produto da peroxidação lipídica, como o MDA, nas plantas tratadas com FORM@NMP. No entanto, no grupo FORM@NMP verificou-se uma diminuição dos níveis de MDA em todas as concentrações usadas. Estes resultados apontam para um efeito protetor por parte das FORM@NMP contra a peroxidação lipídica e o dano nas membranas (Yan et al. 2020). Similarmente, as FORM (0,3 e 7,5 mg L<sup>-1</sup>) parecem diminuir a peroxidação lipídica. O mesmo não se poderá dizer em relação ao grupo NH<sub>2</sub>@NMP, visto que nas concentrações de 6 e 150 mg L<sup>-1</sup> houve uma tendência para o aumento dos níveis de MDA (p>0.05), indicando maior potencial para induzir danos nas membranas, o que seria de esperar uma vez que as NPs de Fe levar à produção de ROS (M. Li et al. 2021; Jalali, Ghanati, and Modarres-Sanavi 2016). Apesar disso, nenhum dos materiais levou ao aumento da permeabilidade membranar, o que indica que a exposição não induziu alterações significativas na integridade das membranas celulares.

De uma forma geral, os três tipos de materiais mostraram ter certo potencial para modelar a resposta antioxidante do trigo, induzindo a uma aparente diminuição da atividade antioxidante. Este restringimento, no entanto, não parece ter conduzido ao aumento de ROS ou a danos significativos de macromoléculas como os lípidos.

## 6 Conclusões gerais

No futuro, o reaproveitamento de águas residuais será uma das principais contribuições para lidar com a redução da disponibilidade de água doce. Recentemente, a implementação de NPs no tratamento de águas residuais é uma das potenciais alternativas aos processos de tratamento de águas já existentes. Estes nanomateriais agem de forma eficiente na purificação da água sem a necessidade de uso de tecnologia de ponta. A inibição eficiente de microrganismos frequentemente encontrados no meio ambiente, incluindo estirpes resistentes a antibióticos, através da PDI ocorre a concentrações de PSs mais baixas do que aquelas que induzem respostas citotóxicas em organismos aquáticos, sem a possibilidade de recuperação da viabilidade microbiana e desenvolvimento de resistência após o tratamento. Consequentemente, a PDI revela ser uma abordagem alternativa no controlo de microrganismos no meio ambiente.

Embora os resultados da PDI sejam promissores, a aplicação deste tratamento para desinfetar águas microbiologicamente contaminadas depende de muitos fatores: a remoção das porfirinas como PS após tratamento fotodinâmico para evitar a libertação destas NPs magnéticas para o meio ambiente; o uso de PS foto-estáveis (isto é, que não se degradam sob irradiação) e o impacto deste procedimento em comunidades microbianas naturais não patogénicas. Após a aplicação deste tipo de procedimentos, existe uma percentagem de PS que não é recuperada e pode ser libertada para o meio ambiente, entrando em contacto com vários organismos, incluindo as plantas. Os efeitos da interação de PS com espécies vegetais e a fitotoxicidade das porfirinas conjugadas a NPs com núcleo de  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  ainda são desconhecidos, tornando-se premente avaliar o impacto que estes materiais têm no desenvolvimento e performance de espécies vegetais, assim como a sua potencial fitotoxicidade. Este estudo surge assim como resposta a esta lacuna e contribuirá para assegurar a segurança no uso no ambiente destes materiais altamente promissores.

Existem três potenciais destinos aquando da libertação das NPs no ambiente (**Fig. 25**): as NPs permanecem estáveis e sua toxicidade não sofre alterações; as NPs decompõem-se em componentes não tóxicos ou as NPs decompõem-se em componentes tóxicos. Se as NPs forem usadas para aumentar o rendimento de cultura, a sua toxicidade será também relativamente baixa para os humanos, plantas e meio ambiente – explicada pela modificação química da superfície das NPs, que já se mostrou promissora em estudos



de citotoxicidade humana. No entanto, em última análise, a estabilidade das NPs e seus possíveis produtos de decomposição devem ser motivo de preocupação e o uso de NPs deve ser considerado inútil se os produtos de degradação das NPs no ambiente forem eles próprios tóxicos (Swift et al. 2018).

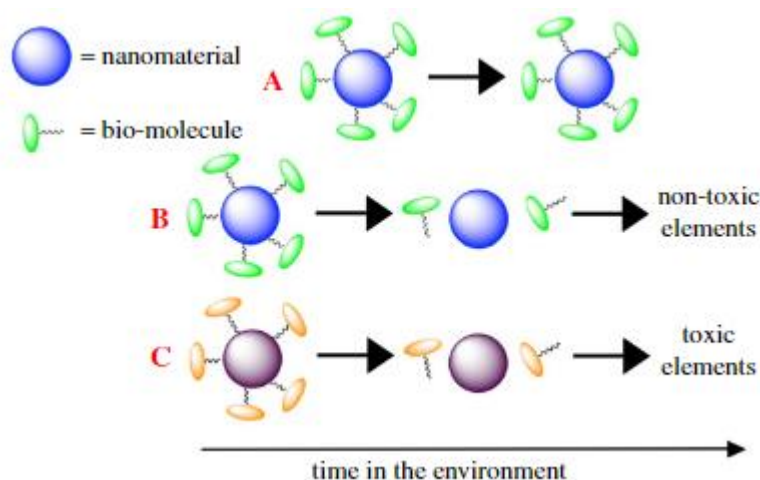


Figura 19 - Esquema das potenciais vias de degradação de NPs no ambiente: (A) As NPs apresentam estabilidade no meio ambiente e mantêm a toxicidade inicialmente observada; (B) As NPs decompõem-se no meio ambiente em elementos não-tóxicos; (C) As NPs decompõem-se no meio ambiente em elementos tóxicos. Retirado de (Swift et al. 2018)

Com a realização deste trabalho foi possível observar que a fase de germinação não foi severamente comprometida. Tal é sustentado pelo facto de que, em todos os tratamentos e concentrações, a percentagem de germinação não foi afetada. O estado hídrico das plântulas também não se alterou, o comprimento da parte aérea foi promovido com as três aplicações e a progressão do ciclo celular não foi afetada. No entanto, alguns parâmetros sofreram alterações significativas. A aplicação dos três materiais, nas três doses, pode potencialmente inibir o comprimento da parte radicular. A biomassa das plântulas tende a diminuir em relação ao controlo, inibição que pode ser explicada pelo tempo de exposição às NPs ou por uma redução na disponibilidade de nutrientes para captação pelas plantas. A permeabilidade membranar foi afetada apenas com o tratamento FORM@NMP, apresentando assim maior instabilidade membranar, podendo refletir alterações que ocorrem nos vários componentes membranares. Por último, a degradação membranar apresentou um aumento significativo face ao controlo nos para FORM@NMP, na concentração intermédia, e para NH<sub>2</sub>@NMP, na concentração mais baixa. Este estudo revelou que os diferentes materiais possuem potencial em promover a germinação e crescimento da parte aérea das plântulas de trigo, no entanto, o seu efeito é dependente da concentração.

A aplicação radicular em plantas com 13 dias de idade revelou que nenhum dos três tipos de materiais apresenta elevada capacidade para induzir fitotoxicidade nas condições estudadas, embora as FORM possam exercer alguma pressão nesse sentido. Não se verificaram alterações significativas na área foliar e na biomassa, em comparação ao controlo, em nenhum dos tratamentos e doses. O comprimento das folhas aumentou em NH<sub>2</sub>@NMP e FORM@NMP, sugerindo que as Fe-NPs conjugadas com porfirinas podem exercer um efeito positivo no desenvolvimento das folhas. O teor de clorofilas aumentou em todos os tratamentos, indicando que as partículas podem estimular a sua biossíntese e, conseqüentemente, aumentar a taxa fotossintética. Os carotenoides sofreram um aumento no grupo FORM, indicando que a porfirina isolada ativou mecanismos antioxidantes no trigo. O conteúdo de antocianinas aumentou em FORM e NH<sub>2</sub>@NMP, indicando a ativação de mecanismos de defesa utilizados no combate às ROS. Os resultados obtidos relativamente à fase dependente e independente da luz da fotossíntese revelam um elevado potencial destes materiais em promover tanto processos fotoquímicos como não-fotoquímicos, modelando a resposta da planta a diferentes níveis, o que pode ser de particular interesse em condições de stress quando ambas as fases da fotossíntese são negativamente impactadas.

Por fim, os resultados da análise da ação das enzimas antioxidantes e dos parâmetros indicadores de stress oxidativo demonstraram que a exposição aos diferentes materiais usados neste trabalho não induz stress oxidativo significativo, embora possam modelar a resposta antioxidante, nomeadamente na presença de FORM@NMP.

Assim, com base neste caso de estudo, a potencial libertação das porfinas e da formulação FORM@NMP para o meio ambiente e a interação destes materiais com espécies vegetais não parece ter impacto negativo na performance do trigo. No entanto, dever-se-á analisar o impacto da exposição destes materiais noutras espécies e sob diferentes condições de forma a assegurar a sua segurança para o meio ambiente e para as próprias espécies.

## 7 Referências

- Abd-Elsalam, K., M. Mohamed, and R. Prasad. 2019. "Magnetic Nanostructures. Environmental and Agricultural Applications." *Nanotechnology in the Life Sciences* 213-224
- Abdelbasir, S., and A. Shalan. 2019, 36. "An Overview of Nanomaterials for Industrial Wastewater Treatment." *Korean Journal of Chemical Engineering* 1209–25.
- Ahmed, B., M. Khan, Q. Saquib, M. Al-Shaeri, and J. Musarrat. 2018. "Interplay Between Engineered Nanomaterials (ENMs) and Edible Plants: A Current Perspective." *Phytotoxicity of Nanoparticles* 63–102.
- Alam, J., F. Sultana, and T. Iqbal. 2015, 1. "Potential of Iron Nanoparticles to Increase Germination and Growth of Wheat Seedling." *Journal of Nanoscience with Advanced Technology*.
- Ali, S., A. Mehmood, and N. Khan. 2021. "Uptake, Translocation, and Consequences of Nanomaterials on Plant Growth and Stress Adaptation." *Journal of Nanomaterials* 1–17.
- Alkhatib, R., B. Alkhatib, N. Abdo, L. AL-Eitan, and R. Creamer. 2019, 19. "Physio-Biochemical and Ultrastructural Impact of (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) Nanoparticles on Tobacco." *BMC Plant Biology*.
- Almeida, A., E. Alves, C. Costa, A. Cunha, J. Tomé, A. Tomé, and M. Faustino. 2012, 1. "Photodynamic Inactivation of Pathogenic Microorganisms in the Environment: An Efficient, Cost-Effective and Sustainable Technology." *Magazine SPM*.
- Alves, E., C. Carvalho, J. Tomé, M. Faustino, M. G. Neves, A. Tomé, J. Cavaleiro, Â. Cunha, S. Mendo, and A. Almeida. 2008. "Photodynamic Inactivation of Recombinant Bioluminescent Escherichia Coli by Cationic Porphyrins under Artificial and Solar Irradiation." *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 1447–1454.
- Alves, E., M. Faustino, M. Neves, Â. Cunha, H. Nadais, and A. Almeida. 2015. "Potential Applications of Porphyrins in Photodynamic Inactivation beyond the Medical Scope." *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* 34–57.

- Alves, E., M. Faustino, J. Tomé, M. G. Neves, A. Tomé, J. Cavaleiro, Â. Cunha, and A. Almeida. 2011, 6. "Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy in Aquaculture: Photoinactivation Studies of *Vibrio Fischeri*." *PLoS ONE*.
- Alves, E., J. Rodrigues, M. Faustino, M. G. Neves, J. Cavaleiro, Z. Lin, Â. Cunha, M. Nadais, J. Tomé, and A. Almeida. 2014. "A New Insight on Nanomagnetoporphyrin Hybrids for Photodynamic Inactivation of Microorganisms." *Dyes and Pigments* 80–88.
- Anjum, N., S. Gill, A. Duarte, and E. Pereira. 2019. "Oxidative Stress Biomarkers and Antioxidant Defense in Plants Exposed to Metallic Nanoparticles." *Nanomaterials and Plant Potential* 427–39.
- Arrojado, C., C. Pereira, J. Tomé, M. Faustino, M. G. Neves, A. Tomé, J. Cavaleiro, Â. Cunha, R. Calado, N. Gomes, and A. Almeida. 2011. "Applicability of Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy as an Alternative to Inactivate Fish Pathogenic Bacteria in Aquaculture Systems." *Photochemical & Photobiological Sciences* 1691-700
- Aryal, S., M. Baniya, K. Danekhu, P. Kunwar, R. Gurung, and N. Koirala. 2019, 8. "Total Phenolic Content, Flavonoid Content and Antioxidant Potential of Wild Vegetables from Western Nepal." *Plants*.
- Asano, T., F. Burton, H. Leverenz, R. Tsuchihashi, and G. Tchobanoglous. 2007. "Water Reuse: Issues, Technologies and Applications." *Engenharia Sanitaria e Ambiental* 1–33.
- Ashraf, M., and Q. Ali. 2008. "Relative Membrane Permeability and Activities of Some Antioxidant Enzymes as the Key Determinants of Salt Tolerance in Canola (*Brassica Napus* L.)." *Environmental and Experimental Botany* 266–73.
- Azarin, K., A. Usatov, T. Minkina, A. Plotnikov, A. Kasyanova, A. Fedorenko, N. Duplii, E. Vechkanov, V. Rajput, S. Mandzhieva, and S. Alamri. 2022, 287. "Effects of ZnO Nanoparticles and Its Bulk Form on Growth, Antioxidant Defense System and Expression of Oxidative Stress Related Genes." *Chemosphere*.
- Baker, S., T. Volova, S. Prudnikova, S. Satish, and M. Nagendra Prasad. 2017. "Nanoagroparticles Emerging Trends and Future Prospect in Modern Agriculture System." *Environmental Toxicology and Pharmacology* 10–17.

- Banerjee, K., P. Pramanik, A. Maity, and D. Joshi. 2019. "Methods of Using Nanomaterials to Plant Systems and Their Delivery to Plants (Mode of Entry, Uptake, Translocation, Accumulation, Biotransformation and Barriers)." *Advances in Phytonanotechnology* 123–52.
- Barhoumi, L., A. Oukarroum, L. Taher, L. Smiri, H. Abdelmelek, and D. Dewez. 2015, 68. "Effects of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles on Photosynthesis and Growth of the Aquatic Plant *Lemna Gibba*." *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*.
- Bartolomeu, M., M. Neves, M. Faustino, and A. Almeida. 2018. "Wastewater Chemical Contaminants: Remediation by Advanced Oxidation Processes." *Photochemical and Photobiological Sciences* 1573–98.
- Bartolomeu, M., S. Reis, M. Fontes, M. G. Neves, M. Faustino, and A. Almeida. 2017, 9. "Photodynamic Action against Wastewater Microorganisms and Chemical Pollutants: An Effective Approach with Low Environmental Impact." *Water*.
- Benabbou, A., C. Guillard, S. Pigeot-Rémy, C. Cantau, T. Pigot, P. Lejeune, Z. Derriche, and S. Lacombe. 2011. "Water Disinfection Using Photosensitizers Supported on Silica." *International Journal of Photoenergy* 101–8.
- Bradford, M. 1976. "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding." *Analytical Biochemistry* 248–54.
- Brasili, E., I. Bavasso, V. Petruccelli, G. Vilardi, A. Valletta, C. Dal Bosco, A. Gentili, G. Pasqua, and L. Di Palma. 2020, 10. "Remediation of Hexavalent Chromium Contaminated Water through Zero-Valent Iron Nanoparticles and Effects on Tomato Plant Growth Performance." *Scientific Reports*.
- Briat, J., C. Curie, and F. Gaymard. 2007. "Iron Utilization and Metabolism in Plants." *Current Opinion in Plant Biology* 276–82.
- Carvalho, C., E. Alves, L. Costa, J. Tomé, M. Faustino, M. Neves, A. Tomé, J. Cavaleiro, A. Almeida, Â. Cunha, Z. Lin, and J. Rocha. 2010. "Functional Cationic Nanomagnet-Porphyrin Hybrids for the Photoinactivation of Microorganisms." *ACS Nano* 7133–7140.

- Chen, H. 2018. "Metal Based Nanoparticles in Agricultural System: Behavior, Transport, and Interaction with Plants." *Chemical Speciation & Bioavailability* 1–12.
- Chen, X., X. Zhu, R. Li, H. Yao, Z. Lu, and X. Yang. 2012. "Photosynthetic Toxicity and Oxidative Damage Induced by Nano-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> on *Chlorella Vulgaris* in Aquatic Environment." *Open Journal of Ecology* 21–28.
- Colom, M., and C. Vazzana. 2003. "Photosynthesis and PSII Functionality of Drought-Resistant and Drought-Sensitive Weeping Lovegrass Plants." *Environmental and Experimental Botany* 135–44.
- Conway, J., A. Beaulieu, N. Beaulieu, S. Mazer, and A. Keller. 2015. "Environmental Stresses Increase Photosynthetic Disruption by Metal Oxide Nanomaterials in a Soil-Grown Plant." *ACS Nano* 11737–11749.
- Crini, G., and E. Lichtfouse. 2019. "Advantages and Disadvantages of Techniques Used for Wastewater Treatment." *Environmental Chemistry Letters* 145–155.
- Das, K., and A. Roychoudhury. 2014, 2. "Reactive Oxygen Species (ROS) and Response of Antioxidants as ROS-Scavengers during Environmental Stress in Plants." *Frontiers in Plant Science*.
- Dayem, A., M. Hossain, S. Lee, K. Kim, S. K. Saha, G. Yang, H. Y. Choi, and S. Cho. 2017, 18. "The Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in the Biological Activities of Metallic Nanoparticles." *International Journal of Molecular Sciences*.
- Demangeat, E., M. Pedrot, A. Dia, M. Bouhnik-Le-Coz, P. Roperch, G. Compaore, and F. Cabello-Hurtado. 2017. "Investigating the Remediation Potential of Iron Oxide Nanoparticles in Cu-Polluted Soil–Plant Systems: Coupled Geochemical, Geophysical and Biological Approaches." *Nanoscale Advances* 2017-2029.
- Demangeat, E., M. Pedrot, A. Dia, M. Bouhnik-Le-Coz, P. Roperch, G. Compaoré, and F. Cabello-Hurtado. 2021. "Investigating the Remediation Potential of Iron Oxide Nanoparticles in Cu-Polluted Soil–Plant Systems: Coupled Geochemical, Geophysical and Biological Approaches." *Nanoscale Advances* 2017–2029.
- Dhindsa, R., and W. Matowe. 1981. "Drought Tolerance in Two Mosses: Correlated with Enzymatic Defence against Lipid Peroxidation." *Journal of Experimental*

*Botany* 79–91.

- Dias, M., C. Santos, G. Pinto, A. Silva, and S. Silva. 2018. “Titanium Dioxide Nanoparticles Impaired Both Photochemical and Non-Photochemical Phases of Photosynthesis in Wheat.” *Protoplasma* 69–78.
- Dias, M., C. Santos, S. Silva, G. Pinto, and A. Silva. 2020. “Physiological and Metabolite Reconfiguration of *Olea Europaea* to Cope and Recover from a Heat or High UV–B Shock.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 11339–49.
- Ding, G. 2017. “Wastewater Treatment and Reused The Future Source of Water Supply.” 43–52.
- El-Saadony, M., A. Almoshadak, M. Shafi, N. Albaqami, A. Saad, A. El-Tahan, E. Desoky, A. Elnahal, A. Almakas, A. El-Mageed, A. Taha, A. Elrys, and A. Helmy. 2021. “Vital Roles of Sustainable Nano-Fertilizers in Improving Plant Quality and Quantity-an Updated Review.” *Saudi Journal of Biological Sciences* 7349–59.
- Englande Jr., A., P. Krenkel, and J. Shamas. 2015. “Wastewater Treatment & Water Reclamation.” *Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences*.
- Ezealigo, U., B. Ezealigo, S. Aisida, and F. Ezema. 2021, 4. “Iron Oxide Nanoparticles in Biological Systems: Antibacterial and Toxicology Perspective.” *Journal of Colloid and Interface Science*.
- Faustino, M., E. Alves, M. Neves, A. Cunha, H. Nadais, and A. Almeida. 2015. “Potential Applications of Porphyrins in Photodynamic Inactivation beyond the Medical Scope.” *Journal of Photochemistry and Photobiology C Photochemistry Reviews* 34–57.
- Fernandez, L., W. Borzecka, Z. Lin, R. J. Schneider, K. Huvaere, V. I. Esteves, Â. Cunha, and J. P. C. Tomé. 2017. “Nanomagnet-Photosensitizer Hybrid Materials for the Degradation of 17- $\beta$ -Estradiol in Batch and Flow Modes.” *Dyes and Pigments* 535–43.
- Foyer, C., and G. Noctor. 2003. “Redox Sensing and Signalling Associated with Reactive Oxygen in Chloroplasts, Peroxisomes and Mitochondria.” *Physiologia Plantarum* 55–364.
- Fu, P., Q. Xia, H. Hwang, P. C. Ray, and H. Yu. 2014. “Mechanisms of Nanotoxicity:

- Generation of Reactive Oxygen Species.” *Journal of Food and Drug Analysis* 64–75.
- Gao, R., X. Cui, Y. Hao, L. Zhang, D. Liu, and Y. Tang. 2016. “A Highly-Efficient Imprinted Magnetic Nanoparticle for Selective Separation and Detection of 17 $\beta$ -Estradiol in Milk.” *Food Chemistry* 1040-1047.
- Ghafariyan, M., M. Malakouti, M. Dadpour, P. Stroeve, and M. Mahmoudi. 2013. “Effects of Magnetite Nanoparticles on Soybean Chlorophyll.” *Environmental Science and Technology* 10645–10652.
- Ghani, M., S. Saleem, M. Rehmani, S. Alamri, V. Rajput, H. Kalaji, N. Saleem, T. Sial, M. Liu, and S. Rather. 2022, 289. “Foliar Application of Zinc Oxide Nanoparticles: An Effective Strategy to Mitigate Drought Stress in Cucumber Seedling by Modulating Antioxidant Defense System and Osmolytes Accumulation.” *Chemosphere*.
- Ghorbanpour, M., M. Hatami, K. Kariman, M. Shahid, A. Movahedi, and F. Bovand. 2021, 59. “Insights into Nanoparticle-Induced Changes in Plant Photosynthesis.” *Photosynthetica*.
- Ghosh, I., A. Mukherjee, and A. Mukherjee. 2017. “In Planta Genotoxicity of NZVI: Influence of Colloidal Stability on Uptake, DNA Damage, Oxidative Stress and Cell Death.” *Mutagenesis* 371–87.
- Ghosh, M., M. Bandyopadhyay, and A. Mukherjee. 2010. “Genotoxicity of Titanium Dioxide (TiO<sub>2</sub>) Nanoparticles at Two Trophic Levels: Plant and Human Lymphocytes.” *Chemosphere* 1253–62.
- Gurova, T., and S. Denisyuk. 2021, 677. “The Relationship of Cell Membrane Permeability of Wheat Seedlings with Resistance of the Variety.” *IOP Publishing*.
- Gutierrez, A., T. Dziubla, and J. Hilt. 2017. “Recent Advances on Iron Oxide Magnetic Nanoparticles as Sorbents of Organic Pollutants in Water and Wastewater Treatment.” *Reviews on Environmental Health* 1–2.
- van Heerden, P., and O. de Villiers. 1906. “Evaluation of the Relative Water Content and the Reduction of 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchloride as Indicators of Drought Tolerance in Spring Wheat Cultivars.” *South African Journal of Plant and Soil*



131–35.

- Hodges, D., J. DeLong, C. Forney, and R. Prange. 1999. “Improving the Thiobarbituric Acid-Reactive-Substances Assay for Estimating Lipid Peroxidation in Plant Tissues Containing Anthocyanin and Other Interfering Compounds.” *Planta* 604–611.
- Hu, J., H. Guo, J. Li, Q. Gan, Y. Wang, and B. Xing. 2017. “Comparative Impacts of Iron Oxide Nanoparticles and Ferric Ions on the Growth of Citrus Maxima.” *Environmental Pollution* 199–208.
- Huang, H., F. Ullah, D. Zhou, M. Yi, and Y. Zhao. 2019, 10. “Mechanisms of ROS Regulation of Plant Development and Stress Responses.” *Frontiers in Plant Science*.
- Huang, L., T. Dai, and M. Hamblin. 2010. “Antimicrobial Photodynamic Inactivation and Photodynamic Therapy for Infections.” *Photodynamic Therapy* 155–73.
- Hussain, S., I. Shafiq, M. Chattha, M. Mumtaz, M. Brestic, A. Rastogi, G. Chen, S. Allakhverdiev, W. Liu, and W. Yang. 2021, 187. “Effect of Ti Treatments on Growth, Photosynthesis, Phosphorus Uptake and Yield of Soybean (*Glycine Max L.*) in Maize-Soybean Relay Strip Intercropping.” *Environmental and Experimental Botany*.
- Iannone, F., M. Groppa, M. Sousa, and M. van Raap. 2016. “Impact of Magnetite Iron Oxide Nanoparticles on Wheat (*Triticum Aestivum L.*) Development: Evaluation of Oxidative Damage.” *Environmental and Experimental Botany* 77–88.
- Jalal, K., A. Shamsuddin, M. Rahman, N. Nurzatul, and M. Rozihan. 2013. “Growth and Total Carotenoid, Chlorophyll a and Chlorophyll b of Tropical Microalgae (*Isochrysis Sp.*) in Laboratory Cultured Conditions.” *Journal of Biological Sciences* 10–17.
- Jalali, M., F. Ghanati, and A. Modarres-Sanavi. 2016. “Effect of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles and Iron Chelate on the Antioxidant Capacity and Nutritional Value of Soil-Cultivated Maize (*Zea Mays*) Plants.” *Crop & Pasture Science* 621–628.
- Jori, G., and S. Brown. 2004. “Photosensitized Inactivation of Microorganisms.” *Photochemical and Photobiological Sciences* 403–5.

- Kamran, M., H. Ali, M. Saeed, H. Bakhat, Z. Hassan, M. Tahir, G. Abbas, M. Naeem, M. Rashid, and G. Shah. 2020. “Unraveling the Toxic Effects of Iron Oxide Nanoparticles on Nitrogen Cycling through Manure-Soil-Plant Continuum.” *Ecotoxicology and Environmental Safety* 1–8.
- Kim, J., Y. Oh, H. Yoon, I. Hwang, and Y. Chang. 2015. “Iron Nanoparticle-Induced Activation of Plasma Membrane H<sup>+</sup>-ATPase Promotes Stomatal Opening in *Arabidopsis Thaliana*.” *American Chemical Society* 1113–1119.
- Kitajima, K., and K. Hogan. 2003. “Increases of Chlorophyll a / b Ratios during Acclimation of Tropical Woody Seedlings to Nitrogen Limitation and High Light.” *Plant, Cell and Environment* 857–865.
- Konate, A., Y. Wang, X. He, M. Adeel, P. Zhang, Y. Ma, Y. Ding, J. Zhang, J. Yang, S. Kizito, Y. Rui, and Z. Zhang. 2018. “Comparative Effects of Nano and Bulk-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> on the Growth of Cucumber (*Cucumis Sativus*).” *Ecotoxicology and Environmental Safety* 547–54.
- Kornarzyński, K., A. Sujak, G. Czernel, and D. Wiącek. 2020, 10. “Effect of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles on Germination of Seeds and Concentration of Elements in *Helianthus Annuus* L. under Constant Magnetic Field.” *Scientific Reports*.
- Kumar, V., T. Khare, M. Sharma, and S. H. Wani. 2017. “Impact of Nanoparticles on Oxidative Stress and Responsive Antioxidative Defense System of Plants.” *Nanomaterials in Plants, Algae and Microorganisms* 1-14.
- Kurczynska, E., K. Godel-Jedrychowska, K. Sala, and A. Milewska-Hendel. 2021, 11. “Nanoparticles—Plant Interaction: What We Know, Where We Are?” *Applied Sciences*.
- Kuskoski, M., A. Asuero, A. Troncoso, J. Mancini-Filho, and R. Fett. 2005. “Aplicação de Diversos Métodos Químicos Para Determinar Atividade Antioxidante Em Polpa de Frutas.” *Food Sci. Technol* 726–32.
- de la Rosa, G., M. Garcia, E. Núñez, A. Alonso-Castro, G. Islas, Á. Mendoza, G. Cruz-Jiménez, and C. Molina. 2017. “Physiological and Biochemical Response of Plants to Engineered NMs: Implications on Future Design.” *Plant Physiology and Biochemistry* 226–35.

- Laloi, C., and M. Havaux. 2015, 6. “Key Players of Singlet Oxygen-Induced Cell Death in Plants.” *Frontiers in Plant Science*.
- Lamuela-Raventós, R. 2017. “Folin–Ciocalteu Method for the Measurement of Total Phenolic Content and Antioxidant Capacity” *Measurement of Antioxidant Activity & Capacity* 107-115.
- Landi, M., M. Tattini, and K. Gouldc. 2015. “Multiple Functional Roles of Anthocyanins in Plant-Environment Interactions.” *Environmental and Experimental Botany* 4–17.
- Lebedev, S., A. Korotkova, and E. Osipova. 2014. “Influence of Fe<sub>0</sub> Nanoparticles, Magnetite Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles, and Iron (II) Sulfate (FeSO<sub>4</sub>) Solutions on the Content of Photosynthetic Pigments in Triticum Vulgare.” *Russian Journal of Plant Physiology* 564–69.
- Lei, C., L. Zhang, K. Yang, L. Zhu, and D. Lin. 2016. “Toxicity of Iron-Based Nanoparticles to Green Algae: Effects of Particle Size, Crystal Phase, Oxidation State and Environmental Aging.” *Environmental Pollution* 505–12.
- Lennicke, C., J. Rahn, R. Lichtenfels, L. Wessjohann, and B. Seliger. 2015, 13. “Hydrogen Peroxide – Production, Fate and Role in Redox Signaling of Tumor Cells.” *Cell Communication and Signaling*.
- Lewandowski, I., R. Kindervater, U. Göttert, and D. Patzelt. 2018. “Biobased Resources and Value Chains.” *Bioeconomy* 75–95.
- Li, J., Y. Ma, and Y. Xie. 2021. “Stimulatory Effect of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles on the Growth and Yield of Pseudostellaria Heterophylla via Improved Photosynthetic Performance.” *HortScience* 753–761.
- Li, M., P. Zhang, M. Adeel, Z. Guo, A. Chetwynd, C. Ma, T. Bai, and Y. Rui. 2021, 269. “Physiological Impacts of Zero Valent Iron, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> and Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Nanoparticles in Rice Plants and Their Potential as Fe Fertilizers.” *Environmental Pollution*.
- Liu, D., and B. Lipták. 1999. *Wastewater Treatment* 1-472.
- López-Luna, J., S. Cruz-Fernández, D. Mills, A. Martínez-Enríquez, F. Solís-Domínguez, M. Del Carmen Ángeles González-Chávez, R. Carrillo-González, S. Martínez-Vargas, O. Mijangos-Ricardez, and M. Cuevas-Díaz, Del Carmen. 2020.

- “Phytotoxicity and Upper Localization of Ag@CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles in Wheat Plants.” *Environmental Science and Pollution Research* 1923–40.
- Lu, H., J. Wang, M. Stoller, T. Wang, Y. Bao, and H. Hao. 2016, 2016. “An Overview of Nanomaterials for Water and Wastewater Treatment.” *Hindawi Publishing Corporation* 1-10.
- Lu, K., D. Shen, X. Liu, S. Dong, X. Jing, W. Wu, Y. Tong, S. Gao, and L. Mao. 2020, 259. “Uptake of Iron Oxide Nanoparticles Inhibits the Photosynthesis of the Wheat after Foliar Exposure.” *Chemosphere*.
- Lugojan, C., and S. Ciulca. 2011. “Evaluation of Relative Water Content in Winter Wheat.” *Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology* 173–77.
- Manke, A., L. Wang, and Y. Rojanasakul. 2013, 2013. “Mechanisms of Nanoparticle-Induced Oxidative Stress and Toxicity.” *Hindawi Publishing Corporation*.
- Mansour, M. 2013, 57. “Plasma Membrane Permeability as an Indicator of Salt Tolerance in Plants.” *Biologia Plantarum*
- Martínez-Fernández, D., D. Barroso, and M. Komárek. 2016. “Root Water Transport of *Helianthus Annuus* L. under Iron Oxide Nanoparticle Exposure.” *Environmental Science and Pollution Research* 1732–41.
- Martins, D., M. Mesquita, Maria. G. Neves, M. Faustino, L. Reis, E. Figueira, and A. Almeida. 2018. “Photoinactivation of *Pseudomonas Syringae* Pv. *Actinidiae* in Kiwifruit Plants by Cationic Porphyrins.” *Planta* 409–21.
- Masarovicová, E., and K. Králová. 2013. “Metal Nanoparticles and Plants.” *Plant Physiology and Biochemistry* 9–22.
- Mesquita, M., C. Dias, M. Neves, A. Almeida, and M. Faustino. 2022. “The Role of Photoactive Materials Based on Tetrapyrrolic Macrocycles in Antimicrobial Photodynamic Therapy.” *Handbook of Porphyrin Science with Applications to Chemistry, Physics, Materials Science, Engineering, Biology and Medicine* 46.
- Mesquita, M., C. Dias, M. G. Neves, A. Almeida, and M. Faustino. 2018, 23. “Revisiting Current Photoactive Materials for Antimicrobial Photodynamic Therapy.” *Molecules*.

- Mingyu, S., H. Liu, C. Liu, C. Qu, L. Zheng, and F. Hong. 2009. "Promotion of Nano-Anatase TiO<sub>2</sub> on the Spectral Responses and Photochemical Activities of D1/D2/Cytb559 Complex of Spinach." *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 1112–1116.
- Monte, H., and A. Albuquerque. 2010. *Reutilização de Águas Residuais* 1-340.
- Monteiro, C., S. Sario, R. Mendes, N. Mariz-Ponte, S. Silva, H. Oliveira, V. Bastos, C. Santos, and M. Dias. 2018. "Bridging a Gap between Cr(VI)-Induced Oxidative Stress and Genotoxicity in Lettuce Organs after a Long-Term Exposure." *International Journal of Agronomy* 1–8.
- Moradbeygi, H., R. Jamei, R. Heidari, and R. Darvishzadeh. 2020, 272. "Investigating the Enzymatic and Non-Enzymatic Antioxidant Defense by Applying Iron Oxide Nanoparticles in *Dracocephalum Moldavica* L. Plant under Salinity Stress." *Scientia Horticulturae*.
- Nabiev, I., A. Rakovich, A. Sukhanova, and E. Lukashev. 2010. "Fluorescent Quantum Dots as Artificial Antennas for Enhanced Light Harvesting and Energy Transfer to Photosynthetic Reaction Centers." *Angewandte Chemie International Edition* 7217–7221.
- Naseem, T., and T. Durrani. 2021. "The Role of Some Important Metal Oxide Nanoparticles for Wastewater and Antibacterial Applications: A Review." *Environmental Chemistry and Ecotoxicology* 59–75.
- Noctor, G., and C. Foyer. 1998. "Ascorbate and Glutathione: Keeping Active Oxygen under Control." *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 249–79.
- Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). 1984. "OECD Test Guidelines for Chemicals." Disponível em: <https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/oecdguidelinesforthetestingofchemicals.htm>
- Pedrero, F., I. Kalavrouziotis, J. Alarcón, P. Koukoulakis, and T. Asano. 2010. "Use of Treated Municipal Wastewater in Irrigated Agriculture-Review of Some Practices in Spain and Greece." *Agricultural Water Management* 1233–1241.

- Pereira, M., M. Faustino, A. C. Tomé, A. Cunha, M. G. Neves, J. Cavaleiro, A. Almeida, and J. Tomé. 2014, 13. "Influence of External Bacterial Structures in the Efficiency of Photodynamic Inactivation by a Cationic Porphyrin." *Photochemical & Photobiological Sciences*.
- Pescod, M. 1992. "Wastewater Treatment and Use in Agriculture - FAO Irrigation and Drainage Paper 47." *Economics*
- Prasad, R., A. Bhattacharyya, and Q. Nguyen. 2017, 8. "Nanotechnology in Sustainable Agriculture: Recent Developments, Challenges, and Perspectives." *Frontiers in Microbiology*, 8.
- Qi, F., and F. Zhang. 2020, 10. "Cell Cycle Regulation in the Plant Response to Stress." *Frontiers in Plant Science*.
- Răcuciu, M., and D. Creangă. 2007, 52. "TMA-OH coated magnetic nanoparticles internalized in vegetal tissue." *Romanian Journal of Physics*.
- Rahmatizadeh, R., S. Arvin, R. Jamei, H. Mozaffari, and F. Nejhad. 2019. "Response of Tomato Plants to Interaction Effects of Magnetic (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) Nanoparticles and Cadmium Stress." *Journal of Plant Interactions* 474–81.
- Rajput, V., Harish, R. Singh, K. Verma, L. Sharma, F. Quiroz-Figueroa, M. Meena, V. Gour, T. Minkina, S. Sushkova, and S. Mandzhieva. 2021, 10. "Recent Developments in Enzymatic Antioxidant Defence Mechanism in Plants with Special Reference to Abiotic Stress." *Biology*.
- Rajput, V., T. Minkina, A. Kumari, Harish, V. Singh, K. Verma, S. Mandzhieva, S. Sushkova, S. Srivastava, and C. Keswani. 2021, 10. "Coping with the Challenges of Abiotic Stress in Plants: New Dimensions in the Field Application of Nanoparticles." *Plants*.
- Ramazanov, M., I. Ahmadov, V. Ramazanli, and N. Agayeva. 2015. "Effect of Nanoparticles on the Activity of the Electron Ion Pumps in Plasmatic Membrane of Plant Cells." *Trends in Nanotechnology & Material Science* 1–5.
- Riggio, G., S. Jones, and K. Gibson. 2019, 5. "Risk of Human Pathogen Internalization in Leafy Vegetables During Lab-Scale Hydroponic Cultivation." *Horticulturae*.
- Rizwan, M., S. Ali, B. Ali, M. Adrees, M. Arshad, A. Hussain, M. Rehman, and A.

- Waris. 2018, 214. "Zinc and Iron Oxide Nanoparticles Improved the Plant Growth and Reduced the Oxidative Stress and Cadmium Concentration in Wheat." *Chemosphere*.
- Rostamizadeh, E., A. Iranbakhsh, A. Majd, S. Arbabian, and I. Mehregan. 2021. "Physiological and Molecular Responses of Wheat Following the Foliar Application of Iron Oxide Nanoparticles." *International Journal of Nano Dimension* 128–34.
- Rui, M., C. Ma, Y. Hao, J. Guo, Y. Rui, X. Tang, Q. Zhao, X. Fan, Z. Zhang, T. Hou, and S. Zhu. 2016, 7. "Iron Oxide Nanoparticles as a Potential Iron Fertilizer for Peanut (*Arachis Hypogaea*)." *Frontiers in Plant Science*.
- Ruttkay-Nedecky, B., O. Krystofova, L. Nejdl, and V. Adam. 2017, 15. "Nanoparticles Based on Essential Metals and Their Phytotoxicity." *Journal of Nanobiotechnology*.
- Samer, M. 2015. "Biological and Chemical Wastewater Treatment Processes." *Wastewater Treatment Engineering* 1-50.
- Sanati, S., B. Razavi, and H. Hosseinzadeh. 2018. "A Review of the Effects of *Capsicum Annuum* L. and Its Constituent, Capsaicin, in Metabolic Syndrome." *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* 439–48.
- Shankamma, K., S. Yallappa, M. Shivanna, and J. Manjanna. 2016. "Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Magnetic Nanoparticles to Enhance *S. Lycopersicum* (Tomato) Plant Growth and Their Biomineralization." *Applied Nanoscience* 983–990.
- Sharma, P., A. Jha, R. Dubey, and M. Pessarakli. 2012, 2012. "Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions." *Journal of Botany*.
- Sibata, C. H., V. C. Colussi, N. L. Oleinick, and T. J. Kinsella. 2000. "Photodynamic Therapy: A New Concept in Medical Treatment." *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 869–80.
- Siddiqi, K., and A. Husen. 2020, 12. "Plant Response to Engineered Metal Oxide Nanoparticles." *Nanoscale Research Letters*.
- Silva, L., B. Pezzini, and L. Soares. 2015. "Spectrophotometric Determination of the

- Total Flavonoid Content in *Ocimum Basilicum* L. (Lamiaceae) Leaves.”  
*Pharmacogn Mag* 96–101.
- Silva, S., S. Craveiro, H. Oliveira, A. Calado, R. Pinto, A. Silva, and C. Santos. 2017. “Wheat Chronic Exposure to TiO<sub>2</sub>-Nanoparticles: Cyto- and Genotoxic Approach.” *Plant Physiology and Biochemistry* 89–98.
- Silva, S., H. Oliveira, C. Santos, and A. Silva. 2017. “The Cytotoxic Targets of Anatase or Rutile + Anatase Nanoparticles Depend on the Plant Species.” *Biologia Plantarum* 717–25.
- Silva, S., G. Pinto, M. Dias, C. Correia, J. Moutinho-Pereira, O. Pinto-Carnide, and C. Santos. 2012. “Aluminium Long-Term Stress Differently Affects Photosynthesis in Rye Genotypes.” *Plant Physiology and Biochemistry* 105–12.
- Silva, S., C. Santos, A. Silva, J. Serodio, and M. Dias. 2018. “Physiological Performance of Drought-Stressed Olive Plants When Exposed to a Combined Heat–UV-B Shock and after Stress Relief.” *Functional Plant Biology* 1233–40.
- Silva, S., A. Silva, M. Dias, J. Oliveira, and C. Santos. 2019, 380. “Antioxidant Mechanisms to Counteract TiO<sub>2</sub>-Nanoparticles Toxicity in Wheat Leaves and Roots Are Organ Dependent.” *Journal of Hazardous Materials*.
- Sims, D., and J. Gamon. 2002. “Relationships Between Leaf Pigment Content and Spectral Reflectance Across a Wide Range of Species, Leaf Structures and Developmental Stages.” *Remote Sensing of Environment* 337–54.
- Singh, J., K. Sharma, R. Romero, V. Kumar, and S. Singh. 2019. “Applications of Nanoparticles in Wastewater Treatment.” 395–418.
- Smith, K. 2003. “Fundamentals: Ligands, Complexes, Synthesis, Purification, and Structure.” 493–506.
- Soares, C., R. Pereira, and F. Fidalgo. 2018. “Metal-Based Nanomaterials and Oxidative Stress in Plants: Current Aspects and Overview.” *Phytotoxicity of Nanoparticles* 197–227.
- Stancill, J., K. Broniowska, B. Oleson, A. Naatz, and J. Corbett. 2019. “Pancreatic B-Cells Detoxify H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> through the Peroxiredoxin/Thioredoxin Antioxidant System.” *Journal of Biological Chemistry* 4843–53.



- Sukopová, M., J. Matisíková, O. Škorvan, and M. Holba. 2013, 2. “Application of Iron Nanoparticles for Industrial Wastewater Treatment.”
- Sundaria, N., M. Singh, P. Upreti, R. Chauhan, J. Jaiswa, and A. Kumar. 2019. “Seed Priming with Iron Oxide Nanoparticles Triggers Iron Acquisition and Biofortification in Wheat (*Triticum Aestivum* L.) Grains.” *Journal of Plant Growth Regulation* 122–131.
- Swift, T., T. Oliver, M. Galan, and H. Whitney. 2018, 9. “Functional Nanomaterials to Augment photosynthesis: Evidence And considerations for Their Responsible Use in Agricultural Applications.” *Interface Focus: A Theme Supplement of Journal of the Royal Society Interface*.
- Tawfk, M., M. Mohamed, M. Sadak, and A. Thalooh. 2021, 45. “Iron Oxide Nanoparticles Effect on Growth, Physiological Traits and Nutritional Contents of *Moringa Oleifera* Grown in Saline Environment.” *Bulletin of the National Research Centre*.
- Thounaojam, T., T. Meetei, Y. Devi, S. Panda, and H. Upadhyaya. 2021, 43. “Zinc Oxide Nanoparticles (ZnO-NPs): A Promising Nanoparticle in Renovating Plant Science.” *Acta Physiologiae Plantarum*.
- Thunell, S. 2000. “Porphyrins, Porphyrin Metabolism and Porphyrins. I. Update.” 509–40.
- Tighe-Neira, R., E. Carmora, G. Recio, A. Nunes-Nesi, M. Reyes-Diaz, M. Alberdi, Z. Rengel, and Cl. Inostroza-Blancheteau. 2018. “Metallic Nanoparticles Influence the Structure and Function of the Photosynthetic Apparatus in Plants.” *Plant Physiology and Biochemistry* 408–17.
- Tripathi, D. K., S. Gaur, S. Singh, R. Pandey, V. Singh, N. Sharma, S. Prasad, N. Kishore, and D. Chauhan. 2017. “An Overview on Manufactured Nanoparticles in Plants: Uptake, Translocation, Accumulation and Phytotoxicity.” *Plant Physiology and Biochemistry* 2–12.
- Turrens, J. 2003. “Mitochondrial Formation of Reactive Oxygen Species.” *The Journal of Physiology* 335–344.
- Vankar, P., and J. Srivastava. 2010, 6. “Evaluation of Anthocyanin Content in Red and

- Blue Flowers.” *International Journal of Food Engineering*.
- Vijayaraghavareddy, P., V. Adhinarayanreddy, R. Vemanna, S. Sreeman, and U. Makarla. 2017, 7. “Quantification of Membrane Damage/Cell Death Using Evan’s Blue Staining Technique.” *BIO-PROTOCOL*.
- Walker, F. A., and U. Simonis. 2011. “Iron Porphyrin Chemistry.” *Encyclopedia of Inorganic Chemistry* 1-132.
- Wang, S., Y. Li, M. Ding, X. Wu, J. Xu, R. Wang, T. Wen, W. Huang, P. Zhou, K. Ma, X. Zhou, and S. Du. 2011. “Self-Assembly Molecularly Imprinted Polymers of 17 $\beta$ -Estradiol on the Surface of Magnetic Nanoparticles for Selective Separation and Detection of Estrogenic Hormones in Feeds.” *Journal of Chromatography* 2595–2600.
- Weng, M., L. Cui, F. Liu, and M. Zhang. 2015. “Effects of Drought Stress on Antioxidant Enzymes in Seedlings of Different Wheat Genotypes.” *Pakistan Journal of Botany* 49–56.
- Weraduwege, S., J. Chen, F. Anozie, A. Morales, S. Weise, and T. Sharkey. 2015, 6. “The Relationship between Leaf Area Growth and Biomass Accumulation in *Arabidopsis Thaliana*.” *Frontiers in Plant Science*.
- World Health Organization. 2006. “Guidelines for the Safe Use of Waste Water, Excreta and Grey Water-Volume 2.” Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9241546832>
- World Health Organization. 2019. “Água.” Disponível em: (<https://news.un.org/pt/tags/agua>).
- Xu, P., G. Zeng, D. Huang, C. Feng, S. Hu, M. Zhao, C. Lai, Z. Wei, C. Huang, G. Xie, and Z. Liu. 2012. “Use of Iron Oxide Nanomaterials in Wastewater Treatment: A Review.” *Science of The Total Environment* 1–10.
- Yan, L., P. Li, X. Zhao, R. Ji, and L. Zhao. 2020, 718. “Physiological and Metabolic Responses of Maize (*Zea Mays*) Plants to Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles.” *Science of the Total Environment*.
- Yang, J., W. Cao, and Y. Rui. 2017. “Interactions between Nanoparticles and Plants: Phytotoxicity and Defense Mechanisms.” *Journal of Plant Interactions* 158–69.

- Yang, X., D. Alidoust, and C. Wang. 2020, 42. "Effects of Iron Oxide Nanoparticles on the Mineral Composition and Growth of Soybean (*Glycine Max L.*) Plants." *Acta Physiologiae Plantarum*.
- Yang, Y., Y. Dou, and S. An. 2017. "Environmental Driving Factors Affecting Plant Biomass in Natural Grassland in the Loess Plateau, China." *Ecological Indicators* 250–59.
- Yang, Y., C. Zhang, and Z. Hu. 2013. "Impact of Metallic and Metal Oxide Nanoparticles on Wastewater Treatment and Anaerobic Digestion." 39–48.
- Yasmeen, F., N. Raja, A. Razzaq, and S. Komats. 2016. "Gel-Free/Label-Free Proteomic Analysis of Wheat Shoot in Stress Tolerant Varieties under Iron Nanoparticles Exposur." *BBA - Proteins and Proteomic* 1586–98.
- Yasmeen, F., A. Razzaq, N. Raja, and H. Jhanzab. 2015. "Effect of Silver, Copper and Iron Nanoparticles on Wheat Germination." *Heat Stress Resistance in Wheat* 112–17.
- Yoon, H., Y. Kang, Y. Chang, and J. Kim. 2019, 9. "Effects of Zerovalent Iron Nanoparticles on Photosynthesis and Biochemical Adaptation of Soil-Grown *Arabidopsis Thaliana*." *Nanomaterials*.
- Yoon, M., M. Pangging, M. Jang, Y. Hwang, and Y. Chang. 2018. "Impact of Surface Modification on the Toxicity of Zerovalent Iron Nanoparticles in Aquatic and Terrestrial Organisms." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 436–43.
- Youssef, O., A. Tammam, R. El-Bakatoushi, A. Alframawy, M. Emara, and L. El-Sadek. 2021, 11. "Uptake of Hematite Nanoparticles in Maize and Their Role in Cell Cycle Dynamics, PCNA Expression and Mitigation of Cadmium Stress." *Plant Biology*.
- Yuan, J., Y. Chen, H. Li, J. Lu, H. Zhao, M. Liu, G. Nechitaylo, and N. Glushchenko. 2018, 8. "New Insights into the Cellular Responses to Iron Nanoparticles in *Capsicum Annuum*." *Scientific Reports*.
- Zhang, K., H. Yu, K. Shi, J. Yu, Y. Zhou, and X. Xia. 2010. "Photoprotective Roles of Anthocyanins in *Begonia Semperflorens*." *Plant Science* 202–8.