

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

GUILHERME HENRIQUE GONÇALVES DE ALMEIDA

**EFEITOS DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ALUMÍNIO (Al₂O₃) SOBRE O
CRESCIMENTO E METABOLISMO DE LIGNINA EM PLANTAS DE SOJA
(*Glycine max* L.)**

Maringá

2018

GUILHERME HENRIQUE GONÇALVES DE ALMEIDA

**EFEITOS DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ALUMÍNIO (Al₂O₃) SOBRE O
CRESCIMENTO E METABOLISMO DE LIGNINA EM PLANTAS DE SOJA
(*Glycine max* L.)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (área de concentração - Biologia Celular e Molecular) da Universidade Estadual de Maringá para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Rogério Marchiosi
Coorientador: Prof. Dr. Osvaldo Ferrarese-Filho

Maringá
2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR, Brasil)

A447e

Almeida, Guilherme Henrique Gonçalves de
Efeitos de nanopartículas de óxido de alumínio
(Al_2O_3) sobre p crescimento e metabolismo de lignina
em plantas de soja (*Glycine max L.*) / Guilherme
Henrique Gonçalves de Almeida. -- Maringá, PR, 2018.
41 f.: il. color.

Orientador: Prof. Dr. Rogério Marchiosi.

Corientador: Prof. Dr. Osvaldo Ferrarese-Filho.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2018.

1. Soja (*Glycine max L.*) - Lignificação. 2. Soja
(*Glycine max L.*) - Fenilalanina amônia liase. 3.
Soja (*Glycine max L.*) - Peroxidase. 4. Soja (*Glycine
max L.*) - Monômeros. 5. Soja (*Glycine max L.*) -
Nanopartículas de óxido de alumínio. I. Marchiosi,
Rogério, orient. II. Ferrarese-Filho, Osvaldo,
orient. III. Universidade Estadual de Maringá.
Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

CDD 23.ed. 633.34

Márcia Regina Paiva de Brito – CRB-9/1267

GUILHERME HENRIQUE GONÇALVES DE ALMEIDA

**EFEITOS DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ALUMÍNIO (Al₂O₃) SOBRE O
CRESCIMENTO E METABOLISMO DE LIGNINA EM PLANTAS DE SOJA
(*Glycine max* L.)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (área de concentração - Biologia Celular e Molecular) da Universidade Estadual de Maringá para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovado em: 27/02/2018

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rogério Marchiosi
Universidade Estadual de Maringá (UEM)

Prof. Dr. Paulo Alfredo Feitoza Böhm
Universidade Estadual do Paraná (UNESPAR)

Prof. Dr. Rodrigo Polimeni Constantin
Universidade Estadual de Maringá (UEM)

BIOGRAFIA

Guilherme Henrique Gonçalves de Almeida nasceu em Paranaíba/PR em 26 de setembro de 1994. Possui graduação em licenciatura plena em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual do Paraná (UNESPAR). Tem experiência na área de botânica, atuando principalmente nos temas relacionados à Bioquímica Vegetal com ênfase no Metabolismo Secundário em Plantas. Iniciou o curso de Mestrado no Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas – área de concentração Biologia Celular e Molecular – em Abril de 2016, desenvolvendo o trabalho “Efeitos de nanopartículas de óxido de alumínio (Al_2O_3) sobre o crescimento e metabolismo de lignina em plantas de soja (*Glycine max* L.)” com defesa da dissertação marcada para fevereiro de 2018.

DEDICATÓRIA

*Dedico todo este trabalho a Deus, por ser essencial em minha vida. Sem Ele nada faria sentido.
Ele que é meu guia, meu socorrista sempre presente nas horas de angústia e autor do meu destino.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS pela minha vida e por ser meu guia durante toda minha caminhada até o presente momento, acreditando em mim até nos momentos mais difíceis.

Agradeço imensamente ao meu orientador e mestre Dr. Rogério Marchiosi não somente pelos ensinamentos e orientação, mas por ser minha fonte de inspiração como pessoa e como profissional, sobretudo, pela oportunidade, confiança e persistência com que me preparou para o mundo da ciência.

Ao meu pai Aparecido Ricardo de Almeida por todo esforço e investimento realizado para que eu pudesse estar onde estou hoje.

A todos os professores que me deram a base do conhecimento, a vocês toda minha gratidão. Em especial a professora Franciele Mara Lucca Zanardo Böhm que desde a graduação e iniciação científica me norteou e se fez modelo de profissional.

A Maria Aparecida Dantas, técnica do laboratório por todos os ensinamentos e ajuda, obrigado.

Aos meus amigos Aline Almeida, Danielly Martarello, Gabriele Sauthier e Renato Constantin. Que foram indispensáveis para o desenvolvimento deste trabalho. A eles todo meu agradecimento, pois mais do que parceiros de trabalho são amigos que serão sempre lembrados por todo companheirismo, risos, choros e abraços.

A Rita de Cássia por todo apoio e auxílio. Além de toda ajuda na realização dos experimentos

Ao Arthur Ernandes e Lucas Paulo por todo apoio ao longo desse trajeto, vocês se tornaram meus irmãos.

A Camilla por cada risada, por cada palavra de incentivo e por todos os empurrões que me deu, obrigado por tudo minha wellness preferida.

A Mariana Melo que se faz presente mesmo que indiretamente, cabe dizer aqui que você me motiva a ser uma pessoa melhor todos os dias.

Aos membros da banca examinadora por aceitarem o convite contribuindo grandiosamente para o enriquecimento deste trabalho.

“Elevo os meus olhos para os montes; de onde me vem o socorro? O meu socorro vem do Senhor, que fez os céus e a terra. Não deixará vacilar o teu pé; aquele que te guarda não dormitará. Eis que não dormitará nem dormirá aquele que guarda a Israel. O Senhor é quem te guarda; o Senhor é a tua sombra à tua mão direita. De dia o sol não te ferirá, nem a lua de

noite. O Senhor te guardará de todo o mal; ele guardará a tua vida. O Senhor guardará a tua saída e a tua entrada, desde agora e para sempre.” **Salmo 121:1-8**

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação é composta por um artigo científico que trata dos “Efeitos de nanopartículas de óxido de alumínio (Al_2O_3) sobre o crescimento e metabolismo de lignina em plantas de soja (*Glycine max* L.)”. O artigo será submetido à revista **Environmental and Experimental Botany** (IF = 4,369), Qualis A2.

Guilherme Henrique Gonçalves de Almeida, Rita de Cássia Siqueira-Soares, Thatiane R. Mota, Dyoni Matias de Oliveira, Wanderley Dantas dos Santos, Osvaldo Ferrarese-Filho, and Rogério Marchiosi. Efeitos de nanopartículas de óxido de alumínio (Al_2O_3) sobre o crescimento e metabolismo de lignina em plantas de soja (*Glycine max* L.).

RESUMO GERAL

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS – A nanotecnologia tem sido amplamente aplicada em diversos campos da ciência, especialmente nas áreas médica, farmacêutica, cosmética, dentre outras. Recentemente, uma ampla gama de aplicações potenciais da nanotecnologia tem sido contemplada também na agricultura, levando a pesquisas intensas em nível acadêmico e industrial. As nanopartículas (NPs) ou nanomateriais (NMs) são as maiores novidades neste campo da ciência, sendo definidos como materiais de tamanho muito reduzido (<100 nm) com propriedades singulares, frequentemente com propriedades distintas dos elementos que as constituem. Devido a sua ampla utilização, esses NMs acabam alcançando o solo, a água e o ar, levantando questões sobre os seus possíveis impactos ambientais. Esse questionamento culminou com o desenvolvimento da Nanotoxicologia, que procura não apenas investigar a toxicidade desses NMs sobre os organismos vivos, mas também uma maneira de a resolver. Até o momento, a maioria dos estudos realizados nesta área visam investigar a toxicidade das NPs sobre animais. Entretanto, nos últimos anos tornou-se crescente a preocupação sobre os impactos das NPs sobre a produtividade dos sistemas agrícolas. Dessa forma, o presente estudo objetivou investigar os efeitos de NPs de Al_2O_3 sobre o crescimento e metabolismo de lignina em plantas de soja. A escolha das NPs de Al_2O_3 deve-se ao fato de estarem entre as mais utilizadas industrialmente e por terem sido, até o momento, pouco estudadas. Atualmente, estas NPs são utilizadas em enchimentos cosméticos, ferramentas de corte, materiais de vidro, além de serem constituintes fundamentais de nanofertilizantes e nanopesticidas. Resolvemos monitorar o processo de lignificação porque, frequentemente, ele está associado com reduções de crescimento decorrentes de estresses ambientais.

MATERIAIS E MÉTODOS – Para isso, sementes de soja (BMX-Potência) foram germinadas durante três dias e, em seguida, cultivadas em recipientes contendo vermiculita durante 16 dias. O tratamento das plantas foi realizado a cada dois dias pela adição de 25 mL de solução nutritiva de Hoagland contendo 50, 100, 250, 500 ou 1000 mg L⁻¹ de NPs de Al_2O_3 . As plantas foram mantidas, por todo o tempo de cultivo, em câmara de crescimento de plantas com temperatura de 25°C, fotoperíodo de 12h/12h (claro/escuro) e irradiação de 300 μ mol de fótons m⁻² s⁻¹. No 16º dia de cultivo as

plantas foram retiradas do sistema experimental para determinação dos parâmetros de crescimento (comprimento e biomassa fresca e seca de caules e raízes). As raízes de algumas plantas foram fixadas em tampão para posterior análises microscópicas. Raízes e caules frescos foram utilizados para determinação das atividades da fenilalanina amônia liase (PAL) e das peroxidases (POD) solúvel e ligada a parede celular. Os teores de lignina foram determinados pelo método da lignina solúvel em brometo de acetila, enquanto que os conteúdos de compostos fenólicos foram estimados pelo método de Folin-Ciocalteu. A composição monomérica da lignina foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência após a sua oxidação com nitrobenzeno. A morfologia e o tamanho das NPs de Al_2O_3 foi monitorada através de microscopia eletrônica de transmissão (MET).

RESULTADOS E DISCUSSÃO – Quando vistas por MET as NPs de Al_2O_3 apresentam forma irregular e tamanho variando entre 20 e 60 nm. De modo geral, as NPs de Al_2O_3 reduziram o crescimento das raízes (comprimento e biomassa fresca) sem afetar significativamente o crescimento dos caules (exceto por um estreito estímulo da biomassa seca no tratamento com 500 mg L^{-1}). Danos celulares na superfície das raízes causados pelas NPs foram visíveis por MEV. Análises espectroscópicas de raios X por dispersão em energia acopladas ao MEV revelaram que o elemento alumínio está presente em maiores proporções nos tecidos das plantas tratadas com as NPs do que em plantas controle. A atividade da PAL foi drasticamente reduzida nos caules, apresentando apenas uma tendência de redução nas raízes. Opostamente, a atividade das peroxidases (POD) solúvel e ligada a parede celular foram estimuladas em ambos os órgãos. Os teores de lignina de raízes e caules foi estimulado de forma dose-dependente pelos tratamentos com as NPs de Al_2O_3 . Os teores de compostos fenólicos totais também aumentou em raízes e caules. Nas raízes, a composição monomérica da lignina também foi alterada, sendo esta alteração caracterizada por uma expressiva redução dos teores do monômero H nas menores doses usadas da NP. Os dados sugerem que a redução do crescimento das raízes de plantas de soja expostas às NPs de Al_2O_3 deve-se a um conjunto de fatores. Danos celulares nas raízes podem ter sido causados pela obstrução dos poros da parede celular com consequente interferência na absorção de água e nutrientes, bem como por estresse oxidativo. A presença de NPs com dimensões maiores do que 20 nm pode ser a causa da obstrução dos poros da parede celular. Por sua vez, o estímulo da atividade da POD solúvel, bem como os altos níveis de

compostos fenólicos antioxidantes, fortalece a hipótese do estresse oxidativo. Os compostos fenólicos podem ser responsáveis pela inibição da atividade da PAL nos caules. O aumento da lignificação e a modificação da composição monomérica da lignina podem ter enrijecido a parede celular e, conseqüentemente, limitado a expansão celular e o crescimento.

PALAVRAS-CHAVE: Lignificação, fenilalanina amônia liase, peroxidase, monômeros, nanopartículas de óxido de alumínio.

GENERAL ABSTRACT

INTRODUCTION AND OBJECTIVES – Nanotechnology has been widely applied in several fields of science, especially in the medical, pharmaceutical, cosmetic, and other fields. Recently, a wide range of potential applications of nanotechnology has also been contemplated in agriculture, leading to intense research at the academic and industrial levels. Nanoparticles (NPs) or nanomaterials (NMs) are the major innovations in this field of science, being defined as materials of very small size (<100 nm) with singular properties, often with properties other than their constituent elements. Due to their wide use, these NMs reach the soil, water and air, raising questions about their possible environmental impacts. This questioning culminated with the development of Nanotoxicology, which seeks not only to investigate the toxicity of these NMs on living organisms, but also a way to solve them. To date, most of the studies conducted in this area aim to investigate the toxicity of NPs on animals. However, in recent years there has been growing concern about the impacts of NPs on the productivity of agricultural systems. Thus, the present study aimed to investigate the effects of Al₂O₃ NPs on the growth and metabolism of lignin in soybean plants. The choice of the NPs of Al₂O₃ is due to the fact that they are among the most used industrially and because they have so far been little studied. Currently, these NPs are used in cosmetic fillers, cutting tools, glass materials, as well as being fundamental constituents of nanofertilizers and nanopesticides. In addition, we have decided to monitor the lignification process because it is often associated with reductions in growth due to environmental stresses.

MATERIALS AND METHODS – For this, soybean seeds, *cv.* BMX-Potência, were germinated for three days and then grown in vermiculite for 16 days. The treatment of plants was performed every other day by the addition of 25 mL of Hoagland nutrient solution containing 50, 100, 250, 500 or 1000 mg L⁻¹ of Al₂O₃ NPs. The plants were grown in a plant growth chamber with a temperature of 25°C, 12h/12h photoperiod (light/dark) and irradiation of 300 μmols of photons m⁻² s⁻¹. On the 16th day of cultivation the plants were removed from the experimental system to determine growth parameters (length and fresh and dry biomass of stems and roots). The roots of some

plants were fixed in buffer for further microscopic analysis. Fresh roots and stems were used to determine the activities of phenylalanine ammonia lyase (PAL) and soluble and cell wall bound peroxidases (POD). The lignin contents were determined by the lignin method soluble in acetyl bromide, while the contents of phenolic compounds were estimated by the Folin-Ciocalteu method. The lignin monomer composition was determined by high performance liquid chromatography after oxidation with nitrobenzene. The morphology and size of the Al₂O₃ NPs were monitored by transmission electron microscopy (TEM).

RESULTS AND DISCUSSION - When viewed by MET the NPs of Al₂O₃ presents irregular shape and size ranging from 20 to 60 nm. In general, Al₂O₃ NPs reduced root growth (length and fresh weight) without significantly affecting stem growth (except for a slight stimulus of dry weight in treatment with 500 mg L⁻¹). Cell damage at the roots surface caused by NPs was visible by SEM. Energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS) analysis coupled to SEM revealed that the aluminum element is present in larger proportions in the tissues of plants treated with NPs than in control plants. The activity of the PAL was drastically reduced in the stems, presenting only a tendency of reduction in the roots. However, the activities of soluble and cell wall bound PODs were stimulated in both organs. The lignin contents of roots and stems were dose-dependently stimulated by treatments with Al₂O₃ NPs. The contents of total phenolic compounds also increased in roots and stems. In the roots, the lignin monomer composition was also altered, being this alteration characterized by an expressive reduction of the levels of monomer H in the lower doses used of the NP. The data suggest that the reduction of the root growth of soybean plants exposed to Al₂O₃ NPs is due to a set of factors. Cell damage in the roots may have been caused by cell wall pore obstruction with consequent interference in water and nutrient uptake as well as oxidative stress. The presence of NPs with dimensions larger than 20 nm may be the cause of cell wall pore obstruction. In turn, the stimulation of soluble POD activity, as well as the high levels of antioxidant phenolic compounds, strengthens the hypothesis of oxidative stress. Phenolic compounds may be responsible for the inhibition of PAL activity in the stems. Increased lignification and modification of lignin monomer composition may have stiffened the cell wall and, consequently, limited the cell expansion and growth.

KEY WORDS: Lignification, phenylalanine ammonia lyase, peroxidase, monomers, aluminum oxide nanoparticles.

Efeitos de nanopartículas de óxido de alumínio (Al₂O₃) sobre o crescimento e metabolismo de lignina em plantas de soja (*Glycine max* L.).

Guilherme Henrique Gonçalves de Almeida¹, Rita de Cássia Siqueira-Soares¹, Thatiane R. Mota¹, Dyoní Matias de Oliveira¹, Wanderley Dantas dos Santos¹, Osvaldo Ferrarese-Filho¹, and Rogério Marchiosi¹.

¹Laboratório de Bioquímica de Plantas, Departamento de Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil.

Resumo

Nanopartículas (NPs) de óxido de alumínio (Al₂O₃) estão presentes em uma variedade de produtos tais como enchimentos de cosméticos, materiais de embalagem, ferramentas de corte, produtos de vidro, produtos metálicos, materiais semicondutores e plásticos, além de serem constituintes fundamentais de nanofertilizantes e nanopesticidas. Entretanto, os impactos dessas NPs sobre as plantas cultivadas são praticamente desconhecidos. Neste trabalho avaliamos os efeitos de NPs de Al₂O₃ sobre o crescimento e metabolismo de lignina em plantas de soja (*Glycine max* L.). Para isso, sementes de soja foram germinadas durante 3 dias e, em seguida, cultivadas por 16 dias em recipientes de 50 mL contendo vermiculita. O tratamento das plantas foi realizado a cada dois dias pela adição de solução nutritiva de Hoagland contendo NPs de Al₂O₃ (50–1000 mg L⁻¹). As dimensões das NPs de Al₂O₃, verificadas por microscopia eletrônica de transmissão, variaram de 20 a 60 nm. As NPs de Al₂O₃ reduziram o comprimento e a biomassa fresca das raízes e estimularam a biomassa seca dos caules. As NPs também induziram danos celulares na superfície das raízes. A atividade da PAL foi severamente reduzida nos caules, enquanto que as atividades das POD solúvel e ligada a parede celular foram fortemente estimuladas em raízes e caules. Houve ainda significativo incremento dos teores de lignina e compostos fenólicos totais em ambos os

órgãos. A composição monomérica da lignina foi alterada nas raízes, sendo esta alteração caracterizada pela redução dos teores do monômero H. Em conclusão, pode-se afirmar que a redução dos parâmetros de crescimento das raízes de plantas de soja expostas às NPs de Al_2O_3 estão relacionadas com: 1) interferência na absorção de água e nutrientes, devido ao possível bloqueio de poros da parede celular, que são de aproximadamente 20 nm; 2) dano celular causado às células radiculares; 3) aumento da lignificação; 4) alteração da composição monomérica da lignina, com possível aumento da recalcitrância da parede celular e 5) aumento da biomassa seca dos caules

Palavras-chave: Lignificação, fenilalanina amônia liase, peroxidase, monômeros, nanopartículas de óxido de alumínio.

Sumário

1. Introdução.....	17
2. Materiais e métodos.....	20
2.1. Caracterização das nanopartículas	20
2.2. Procedimentos gerais	20
2.3. Parâmetros biométricos.....	21
2.4. Alterações morfológicas	21
2.5. Determinação dos teores de lignina e sua composição monomérica	21
2.6. Ensaio enzimáticos	23
2.7. Determinação do teor de compostos fenólicos totais.....	24
2.8. Análise estatística	24
3. Resultados.....	24
4. Discussão	27
5. Conclusões.....	31
6. Referências	31

1. Introdução

Os termos nanociência e nanotecnologia compreendem o estudo aplicado de materiais em nanoescala. Os nanomateriais são, portanto, definidos como substâncias naturais ou de engenharia que apresentam pelo menos uma dimensão menor do que 100 nm (Hatami et al., 2016). Esses materiais apresentam excelentes características devido ao seu pequeno tamanho, e propriedades que os tornam únicos, tais como densidade de configuração magnética, óptica, térmica, mecânica e elétrica quando comparadas às macromoléculas (Yah et al., 2012). De acordo com sua composição química, as NPs podem ser divididas em quatro grupos: 1) NPs inorgânicas, 2) NPs à base de carbono, 3) quantum dots e 4) nano polímeros. Elas podem existir nas formas fundidas, agregadas ou aglomeradas, podendo ser esféricas, tubulares ou irregulares (Nowack e Bucheli, 2007; Hatami et al., 2016).

Industrialmente, as NPs podem ser usadas em cosméticos como protetores solares. NPs de óxido de titânio (TiO_2) e óxido de zinco (ZnO) não absorvem luz visível e bloqueiam a luz ultravioleta (UV), melhorando a eficiência dos protetores solares sem apresentar o aspecto esbranquiçado de outros bloqueadores (Ko et al., 2012). Uma das mais excitantes aplicações das NPs são os sistemas de liberação controlada de drogas, com relevante uso na medicina. Além de proteger os fármacos contra degradação prematura no corpo, a encapsulação em nanossistemas ajuda a direcionar a droga às células alvo no organismo, aumentando sua absorção (Shaffer, 2005; Wilczewska et al., 2012). Na agricultura, NPs aumentam a produtividade, melhora a qualidade do solo, estimula o crescimento das plantas e provê um inteligente sistema de monitoramento para umidade, pH, temperatura e exposição luminosa (Fraceto et al., 2016).

Estudos realizados com plantas têm mostrado que as NPs podem ser absorvidas, transportadas e acumuladas em compartimentos celulares específicos tais como

vacúolos, núcleo e plasmodesmas (Wang et al., 2016). De fato, as NPs podem afetar uma diversidade de processos fisiológicos e influenciar o crescimento e o desenvolvimento das plantas, muito embora seus mecanismos de ação não sejam completamente compreendidos. Por exemplo, um estudo realizado com *Arabidopsis* mostrou que NPs anatase de TiO_2 podem entrar no interior das células, acumular nos vacúolos e núcleos de células radiculares e causar reorganização e eliminação de microtúbulos, com conseqüente redução do alongamento das raízes (Kurepa et al., 2010; Wang et al., 2011). Em um estudo similar, Wang et al., (2012) mostraram que NPs de CuO foram transportadas pelo xilema e floema de plantas de milho. Por sua vez, NPs de prata (Ag) e ZnO foram capazes de induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em plantas de *Spirodela punctata* (Thwala et al., 2013). Adicionalmente, Zheng et al. (2005) observaram que NPs de TiO_2 auxiliam a absorção de água por sementes e beneficiam a germinação de espinafre. Esses efeitos positivos sobre a germinação podem ser explicados baseado no papel de regulação que as NPs exercem sobre as aquaporinas, proteínas responsáveis por regular a permeabilidade de membranas, além de ter um papel importante na germinação e crescimento vegetal (Tyerman et al., 1999; Heinen and Chaumont, 2009). Em outro estudo, foi verificado que aplicação de NPs de silício (SiO_2) em plantas de tomate cereja aumentaram a taxa fotossintética (A) e a eficiência do uso da água, além de aprimorar o sistema de defesa das plantas contra o estresse salino (Haghighi e Pessarakli, 2013).

As NPs de alumínio (Al_2O_3) estão entre as menos estudadas, embora esteja entre as mais amplamente utilizadas. Elas estão presentes em uma variedade de produtos tais como enchimentos de cosméticos, materiais de embalagem, ferramentas de corte, produtos de vidro, produtos metálicos, materiais semicondutores e plásticos (Hanemann e Szabó, 2010). Em um estudo recentemente publicado, foi observado que estas NPs não influenciaram a fotossíntese, o crescimento e a peroxidação lipídica em plantas de *Arabidopsis thaliana*. Adicionalmente, a análise do transcriptoma revelou um efeito benéfico para as plantas, aumentando a transcrição de vários genes envolvidos no crescimento e captação de nutrientes (Jin et al., 2017). Corroborando este resultado, a exposição de plantas de soja sob inundação às NPs de Al_2O_3 resultou em um aumento do crescimento das plantas (Mustafa et al., 2015). Segundo os autores, esse resultado se deve a regulação da morte celular e do metabolismo energético. Opostamente, plantas de tabaco expostas à NPs de alumínio apresentaram alterações na expressão de RNA mitocondrial, desenvolvimento de clorose, redução da área foliar e da biomassa das

raízes (Frazier et al., 2014; Burklew et al., 2012). Efeitos tóxicos de NPs de Al₂O₃ também foram observados no crescimento de *Zea mays* (milho), *Cucumis sativus* (pepino), *Glycine max* (soja), *Brassica oleracea* (repolho) e *Daucus carota* (cenoura) (Yang et al., 2005).

A lignina é um heteropolímero amorfo, tridimensional, que está presente nas plantas terrestres e intimamente ligado à celulose na parede celular. É tipicamente sintetizada pelo acoplamento oxidativo de três monolignóis oriundos da via de fenilpropanoides, os álcoois cumarílico, coniferílico e sinapílico. Após polimerizados estes monolignóis tornam-se os monômeros da lignina, respectivamente, *p*-hidroxifenil (H), guaiacil (G) e sirilgil (S) (Chen et al., 2013). Dentre outras funções, a lignina é responsável por conferir à planta resistência mecânica, rigidez e proteção contra ataques de patógenos. O primeiro passo na via de fenilpropanoides é a desaminação da L-fenilalanina pela fenilalanina amônia liase (PAL) para produzir *t*-cinamato. Por sua vez, a cinamato 4-hidroxilase (C4H) converte o *t*-cinamato em *p*-cumarato, que é esterificado com coenzima A (CoA) pela ação da 4-cumarato-CoA ligase (4-CL). Passos subsequentes consistem na hidroxilação e metoxilação dos intermediários da via para sucessivamente produzir cafeato, ferulato, 5-hidroxiferulato e sinapato. Em seguida, cinamil-CoA redutase (CCR) e cinamil álcool desidrogenase (CAD) convertem estes intermediários nos correspondentes monolignóis, *p*-cumaril, coniferil e sinapil álcoois. Pela ação da peroxidase (POD) ligada a parede celular esses monolignóis são polimerizados para formar, respectivamente, *p*-hidroxifenil (H), guaiacil (G) e siringil (S), os monômeros da lignina (Salvador et al., 2013).

Até o momento, poucos são os trabalhos realizados com o intuito de compreender os efeitos das NPs sobre o metabolismo de lignina. Entretanto, nosso grupo de pesquisa mostrou, em um estudo prévio, que a inibição do crescimento de plantas de soja expostas às NPs de óxido de ferro (γ -Fe₂O₃) possui estreita relação com a lignificação e com a modificação da composição monomérica da lignina (Lopes et al., 2017). Dessa forma, o presente estudo objetivou investigar os efeitos de NPs de Al₂O₃ sobre o crescimento e metabolismo de lignina em plantas de soja, avaliando principalmente os teores de lignina, de compostos fenólicos, bem como as atividades da fenilalanina amônia liase (PAL) e das peroxidases (POD) solúvel e ligada a parede celular. O tamanho e a forma das NPs de Al₂O₃ foi determinada por microscopia eletrônica de transmissão (MET), enquanto que as alterações morfológicas das raízes foram visualizadas através de microscopia eletrônica de varredura (MEV).

2. Materiais e métodos

2.1. Caracterização das nanopartículas

Análises de microscopia eletrônica de transmissão (MET) foram realizadas para determinar a forma e o tamanho das NPs de Al_2O_3 adquiridas comercialmente da Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA). Para isso, foi utilizado um microscópio eletrônico de transmissão de alta resolução (JE 1400) com uma tensão de aceleração de 120 kV. Antecedendo a visualização no microscópio, a suspensão aquosa das NPs (15 mg L^{-1}) foi levada ao banho ultrassônico por 15 min. Então, $10 \mu\text{L}$ desta suspensão foi adicionada em uma grade de cobre, a qual foi drenada com auxílio de um papel de filtro para melhor observação no microscópio.

2.2. Procedimentos gerais

Sementes de soja (*Glycine max* L.), cv. BMX-potência, foram sanitizadas com hipoclorito de sódio a 2% (NaClO), lavadas com água deionizada e uniformemente distribuídas sobre uma folha de papel Gernitest® previamente umedecido com água deionizada. Após cobertura das sementes com uma segunda folha de papel, foram preparados rolos, os quais foram colocados em tubos de PVC contendo um pequeno filme de água para manutenção da umidade. Os tubos foram acondicionados em câmaras de germinação a 25°C , onde permaneceram por 72 h na ausência de luz. Após a germinação das sementes, plântulas viáveis e uniformes foram selecionadas e transferidas para uma bandeja de plástico composta por 50 compartimentos de 100 mL previamente preenchidos com substrato vermiculita. Neste momento, as plântulas recém transplantadas foram regadas com 30 mL de água destilada. As bandejas contendo as plântulas foram acondicionadas em sala de crescimento de plantas com irradiação de $300 \mu\text{mol s}^{-1}$, fotoperíodo claro/escuro de 12/12h e temperatura de 25°C , onde permaneceram durante 16 dias. O tratamento das plantas foi realizado a cada dois dias pela adição de 30 mL de solução nutritiva de Hoagland contendo NPs de Al_2O_3 nas concentrações de 50, 100, 250, 500 e 1000 mg L^{-1} , previamente levada ao banho ultrassônico por 10 min. Plantas controle receberam apenas solução nutritiva.

2.3. Parâmetros biométricos

No 16º dia de cultivo, as plantas de soja foram retiradas do sistema experimental e separadas em raízes, caules e folhas. Em seguida, e com auxílio de uma balança analítica, foram determinadas as biomassas frescas. As biomassas secas foram determinadas após a desidratação dos tecidos vegetais em estufa a 70°C durante 72 h.

2.4. Alterações morfológicas

As alterações morfológicas foram monitoradas através de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para isso, segmentos de raízes frescas (coifa e zona pilífera) foram fixados em solução de glutaraldeído 2,5% preparado em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2). Os tecidos foram pós-fixados numa solução contendo 1% de tetróxido de ósmio, ferrocianeto de potássio 0,8% e cloreto de cálcio 5 mM, todos preparados em tampão de cacodilato 0,1 M e, em seguida, numa solução de ácido tânico 1%. Então, as amostras foram desidratadas em soluções com concentrações crescentes de etanol (70, 80, 90 e 100%), secas ao ponto crítico do CO₂, pulverizadas com ouro e examinadas em microscópio eletrônico de varredura Jeol-JSM-5310[®] (dos Santos et al., 2008a). As amostras também foram submetidas a análise espectroscópica de raios X por dispersão em energia (EDS) acoplada ao MEV, para determinar a composição química qualitativa e quantitativa das amostras

2.5. Determinação dos teores de lignina e sua composição monomérica

Para determinação dos teores de lignina total e sua composição monomérica primeiramente foi realizada a obtenção da parede celular isenta de proteínas (Ferrarese et al., 2002). Amostras secas de raízes e caules (0,3 g) foram trituradas em moinho de bolas e, em seguida, homogeneizadas em gral com 7 mL de tampão fosfato 50 mM (pH 7,0). O material foi transferido para tubos de centrífuga de 15 mL e, então, centrifugado a 1400 × g durante 5 min. O precipitado obtido foi ressuspenso com 7 mL de tampão fosfato 50 mM (pH 7,0) e, posteriormente, submetido a lavagens seguidas por centrifugações (1400 × g durante 5 min) como segue: 3 × com Triton X100[®] a 1% (v:v)

preparado em tampão de fosfato 50 mM (pH 7,0); 2 × com 7,0 mL de NaCl 1,0 M, também em tampão de fosfato 50 mM (pH 7,0); 2 × com 7,0 mL de água destilada e 2 × com 5,0 mL de acetona para desidratação do material. O sedimento resultante foi floculado em dessecador à vácuo por 10 min e, em seguida, acondicionado em estufa a 60°C durante 24 h. O material obtido foi definido como a fração de parede celular isenta de proteínas.

A lignina total foi estimada através do método da lignina solúvel em brometo de acetila. Para isso, 0,5 mL do reagente brometo de acetila 25% (preparado em ácido acético glacial gelado) foram adicionados em tubos de vidro com tampa rosqueável contendo 20 mg de parede celular isenta de proteínas de raízes ou caules. Após 30 min em banho maria a 70°C a reação foi interrompida pela adição de 0,9 mL de NaOH 2,0 M. Em seguida, foi adicionado 0,1 mL de hidroxilamina-HCl 7,5 M e 6 mL de ácido acético glacial gelado. As amostras foram centrifugadas a 1000 × g durante 5 min e o sobrenadante diluído e lido em espectrofotômetro a 280 nm. A concentração de lignina foi determinada com base em uma curva padrão realizada com lignina padrão (álcali 2-hidroxiopropil éter, Sigma-Aldrich®, número de produto 37096-7). Os resultados foram expressos em mg × g⁻¹ de parede celular livre de proteína (Moreira-Vilar et al., 2014).

Para determinação da composição monomérica da lignina foi utilizado o método de oxidação com nitrobenzeno (Dean, 1997). Em ampolas de vidro contendo 50 mg de parede celular isenta de proteínas de raízes ou caules foram adicionados 1 mL de NaOH 2 M e 100 µL de nitrobenzeno. Com auxílio de um maçarico as ampolas foram seladas e, em seguida, acondicionadas em estufa a 170°C por 150 min, com uma agitação branda na metade do tempo. Após arrefecimento à temperatura ambiente, o conteúdo das ampolas foi transferido para funis de separação e lavado duas vezes com clorofórmio, sendo descartada a fase orgânica. As amostras foram acidificadas a pH 2,0 pela adição de HCl 2 M e, posteriormente, extraídas duas vezes com clorofórmio. Após eliminação do clorofórmio em evaporador rotativo a 30°C as amostras foram ressuspensas em 1 mL de metanol, filtradas através de membranas PVDF com porosidade de 0,45 µm e analisadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC Prominence, Shimadzu®, Tóquio, Japão) equipado com uma bomba de gradiente quaternário (LC-20AT), um autoinjeter (SIL-20A), detector de fotodiodos (SPD-M20A), forno para coluna (CTO-20A), desgasificador (DGU-20A), módulo de comunicação (CBM-20A) e estação de trabalho LcSolution (versão 1.25). A separação de *p*-hidroxibenzaldeído, vanilina e siringaldeído foi realizada com auxílio de uma

coluna de fase reversa CLC-ODS (M) ($150 \times 4,6$ mm, com partículas de $5 \mu\text{m}$) equipada com pré-coluna compatível ($10 \times 4,6$ mm) a 30°C . A fase móvel utilizada foi metanol:ácido acético 4% (20:80, v:v), aplicada sob um fluxo de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$. A absorção foi monitorada a 290 nm utilizando-se padrões correspondentes (Sigma-Aldrich[®], números de produto 54590, V1104, S7602, respectivamente). Os resultados foram expressos como mg de monômero $\times \text{g}^{-1}$ parede celular isenta de proteínas.

2.6. Ensaio enzimáticos

A atividade da fenilalanina amônia liase (PAL, EC. 4.3.1.5) foi determinada como descrito por Ferrarese et al., (2000). Amostras (2,0 g) frescas de raízes e caules foram homogeneizadas com 5,0 mL de tampão borato de sódio 0,1 M (pH 8,8) a 4°C e, em seguida, centrifugadas a $2200 \times g$ durante 15 min. O sobrenadante obtido foi utilizado como extrato enzimático. Tubos de ensaio contendo 1,0 mL de tampão borato de sódio 0,1 M (pH 8,7) e 0,25 mL da preparação enzimática foram incubados em banho maria a 40°C durante 5 min. A reação foi iniciada pela adição de 0,25 mL de L-fenilalanina 50 mM e interrompida, após 60 min, com a adição de 50 μL de ácido clorídrico 5 M (HCl). As amostras foram filtradas em membranas PVDF com porosidade de $0,45 \mu\text{m}$ e, posteriormente, analisadas em cromatógrafo líquido equipado com coluna de fase reversa previamente descritos. A fase móvel utilizada foi metanol:água (70:30, v:v), aplicada com um fluxo de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. A absorção foi monitorada a 275 nm utilizando-se um padrão (Sigma-Aldrich[®], número de produto C80857). Os resultados foram expressos como $\mu\text{mol } t\text{-cinamato} \times \text{h}^{-1} \times \text{g}^{-1}$ de biomassa fresca.

A atividade das peroxidases (POD, EC 1.11.1.7) solúvel e ligada a parede celular foram determinadas conforme descrito por Santos et al., (2008). Amostras frescas (0,5 g) de raízes e caules foram homogeneizadas com 5,0 mL de tampão fosfato 67 mM (pH 7,0) e, em seguida, centrifugadas a $2200 \times g$ durante 5 min a 4°C . O sobrenadante obtido foi utilizado como extrato enzimático da POD solúvel. Por sua vez, o precipitado foi ressuscitado com 2,0 mL de NaCl 1M preparado em tampão fosfato 67 mM (pH 7,0) e incubado a 4°C durante 1 h. Após centrifugação a $2200 \times g$ durante 5 min a 4°C o sobrenadante foi coletado e utilizado como extrato enzimático da POD ligada a parede celular. Então, foram adicionados a tubos de ensaio um volume final de 3 mL, incluindo neste, o meio reacional (2,6 mL), composto por 30 mL de tampão de

fosfato 25 mM (pH 6,8), 10 μ L de guaiacol 2,58 mM e 35 μ L de peróxido de hidrogênio 10 mM (H_2O_2). A reação foi iniciada pela adição de 400 μ L de preparação enzimática apropriadamente diluída. A oxidação do guaiacol foi monitorada em espectrofotômetro a 470 nm por 5 min. A atividade enzimática foi calculada a partir de um coeficiente de extinção molar (ϵ) de 25,5 mM cm^{-1} . Os resultados foram expressos como μ mol de tetraguaiacol $min^{-1} \times g^{-1}$ de biomassa fresca.

2.7. Determinação do teor de compostos fenólicos totais

O conteúdo total de compostos fenólicos foi estimado utilizando-se o reagente de Folin-Ciocalteu. Inicialmente, amostras secas e trituradas (0,25 g) de raízes e caules foram homogeneizadas com 5,0 mL de HCl 2 M e, em seguida, levadas ao banho maria fervente por 30 min. Após resfriamento em banho de gelo por 5 min as amostras foram filtradas em papel de filtro. Então, em tubos de ensaio foram adicionados 2,5 mL das amostras apropriadamente diluídas, 350 μ L de carbonato de sódio 1,9 M e 125 μ L do reagente de Folin-Ciocalteu. A reação ocorreu na ausência de luz durante 1 h. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 750 nm. O conteúdo de fenólicos totais foi calculado a partir de um coeficiente de extinção molar (ϵ) de 13,665 mM \times cm^{-1} , obtido a partir de uma curva padrão de ácido ferúlico (Sigma-Aldrich[®], número de produto 128708). Os resultados foram expressos como mg \times g^{-1} de biomassa seca.

2.8. Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, no qual cada plote representa um recipiente contendo duas plantas. Os dados foram expressos como média de quatro a sete experimentos independentes \pm erro padrão da média. A análise de variância (ANOVA) foi realizada para testar a significância das diferenças observadas usando o pacote de software GraphPad Prism[®] (versão 6.0 GraphPad Software Inc., EUA). As diferenças entre os parâmetros foram avaliadas pelo teste de comparação múltipla de Dunnett e os valores de $p \leq 0,05$ considerados estatisticamente significativos.

3. Resultados

As análises de MET revelaram que as NPs de Al_2O_3 utilizadas no presente estudo possuem uma morfologia irregular e tamanho médio variando entre 20 e 60 nm (Fig. 1), o que está de acordo com as especificações descritas pelo fabricante (Sigma-Aldrich).

Plantas de soja expostas as NPs de Al_2O_3 por 16 dias apresentaram redução significativa do comprimento e da biomassa fresca de raízes, sem qualquer alteração da biomassa seca (Fig. 2). Quando comparado com o controle, o comprimento das raízes das plantas tratadas com 500 mg L^{-1} das NPs foi 15,7% menor (Fig. 2A). Por sua vez, a biomassa fresca das raízes foi reduzida em média 30% nas concentrações de 500 e 1000 mg L^{-1} das NPs (Fig. 2B), quando comparado com o controle. Não foram observadas alterações significativas na biomassa seca das raízes de plantas de soja expostas as NPs de Al_2O_3 (Fig. 2C). As NPs também não influenciaram significativamente o comprimento e a biomassa fresca dos caules (Fig. 2A e B). Entretanto, foi observado um estímulo de 33,7% na biomassa seca dos caules após exposição das plantas a 500 mg L^{-1} das NPs (Fig. 2C), quando comparado com o controle.

As NPs de Al_2O_3 causaram profundas alterações nos tecidos superficiais das raízes das plantas de soja (Fig. 3B, D e F), as quais foram mais visíveis no aumento de 50.000 vezes (Fig. 3F). Foi nítida a desorganização da epiderme radicular induzida pelas NPs (Fig. 3D). As figuras 3A, C e F correspondem as raízes das plantas controle, nota-se que não há alterações visíveis no tecido. As figuras 3G e 3H mostram os espectros de EDS realizados em raízes de plantas controle e tratadas com NPs de Al_2O_3 . Foi possível verificar que o elemento alumínio está presente em uma proporção 16 vezes maior nas plantas tratadas com as NPs (1,6% do peso) do que em plantas controle (0,1% do peso).

A atividade da fenilalanina amônia liase (PAL) de raízes não foi significativamente reduzida pelas NPs, embora tenha sido observada uma tendência de redução, com concentrações de até 250 mg L^{-1} , seguida por recuperação da atividade nas maiores doses (Fig. 6A). Entretanto, houve marcante efeito inibitório das NPs sobre a atividade da PAL nos caules (Fig. 6A). Nas plantas tratadas com doses maiores do que 250 mg L^{-1} das NPs, a atividade da PAL dos caules foi em média 64% menor do que em plantas controle. As atividades das PODs solúvel e ligada foram estimuladas em raízes e caules após tratamento das plantas com as NPs de Al_2O_3 (Fig. 6B e C). Nas raízes, a atividade de ambas as PODs aumentaram com concentrações da NP de até 50, 100, 250

e 500 mg L⁻¹, não sendo observadas alterações de atividade na maior dose utilizada. Quando comparado com o controle, os maiores aumentos de atividade das PODs solúvel e ligada de raízes foram 40,3% e 41,7%, respectivamente na concentração de 250 mg L⁻¹ da NP. Nos caules, a atividade da POD solúvel foi estimulada em todas as concentrações de NPs utilizadas, sendo o maior aumento 44,1% observado na concentração de 1000 mg L⁻¹ (Fig. 6B). Já a atividade da POD ligada de caules aumentou em média 34,5% nos tratamentos realizados com concentrações da NP maiores do que 100 mg L⁻¹ (Fig. 6C).

As NPs de Al₂O₃ também aumentaram o conteúdo de fenólicos totais das plantas de soja (Fig. 4), sendo este aumento mais expressivo nas raízes do que nos caules (Fig. 4A). Nas raízes, o incremento de fenólicos totais foi observado a partir da concentração de 100 mg L⁻¹ das NPs de Al₂O₃, com aumento médio de 124,15% em relação ao controle. Nos caules, o estímulo dos teores de fenólicos totais foi menos acentuado (em média 19%), sendo observado a partir da concentração de 500 mg L⁻¹ das NPs de Al₂O₃. Em relação ao teor total de lignina de raízes e caules, pode-se afirmar que o estímulo causado pelas NPs de Al₂O₃ foi dose-dependente (Fig. 4B). Para as raízes, o maior aumento observado foi de 38,7% na concentração de 1000 mg L⁻¹ de NPs de Al₂O₃, quando comparado com o controle. O estímulo foi ligeiramente menor nos caules, com incremento máximo de 28,5% na concentração de 1000 mg L⁻¹ em relação ao controle.

As NPs de Al₂O₃ não influenciaram significativamente os teores dos monômeros G e S nas raízes das plantas de soja (Fig. 5B e C). Entretanto, o teor do monômero H foi reduzido, alcançando 19,1%, 61,8%, 31,9% e 31,9% de inibição nos tratamentos com 50, 100, 250 e 500 mg L⁻¹ das NPs, respectivamente. O teor do monômero H de raízes não foi alterado significativamente no tratamento com 1000 mg L⁻¹ das NPs. Para os caules, foram observados aumentos nos teores dos monômeros H, G e S. Para o monômero H os aumentos mais expressivos foram de 202% e 99% nos tratamentos com 50 e 250 mg L⁻¹ das NPs, respectivamente (Fig. 5A). Também houve aumento no conteúdo do monômero G, porém este aumento (168,9%) foi significativo apenas na concentração de 50 mg L⁻¹ das NPs (Fig. 5B). Por sua vez, os teores do monômero S aumentaram em 268% e 115% nos tratamentos com 50 e 500 mg L⁻¹ das NPs, respectivamente.

4. Discussão

A presença de NPs frequentemente afeta o crescimento das plantas, sendo o efeito final observado dependente 1) da NP em estudo, 2) do órgão/tecido analisado, 3) da concentração de NP e 4) do tempo de exposição. Apesar de serem amplamente utilizadas, os efeitos das NPs de Al_2O_3 sobre as plantas são extensamente desconhecidos. Além disso, os dados obtidos até o momento são contraditórios, isto é, estas NPs podem estimular o crescimento de algumas plantas e inibir o de outras. Não obstante, o relato de efeitos estimulatórios são mais frequentes. Por exemplo, efeitos inibitórios dose-dependentes sobre o comprimento e desenvolvimento das raízes, além da biomassa fresca das mudas foram observados em plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) (Burklew et al., 2012) e trigo (*Triticum aestivum*) expostas às NPs de Al_2O_3 (Riahi., 2012; Yanik et al., 2015). Incremento significativo do alongamento radicular também foi observado em plantas de *Arabidopsis thaliana* crescidas em meio ágar suplementado com 400 a 4000 mg L^{-1} de NPs de Al_2O_3 (Lee et al., 2009). Em um estudo mais recente, plantas de *Arabidopsis thaliana* crescidas durante um mês em meio líquido suplementado com 98 mM (10 mg L^{-1}) destas NPs apresentaram comprimento e biomassa fresca de raízes 39% e 48% maiores do que plantas controle (Jin et al., 2017). Os mesmos autores observaram reduções de 57% e 45% no comprimento das raízes e na biomassa fresca, respectivamente, quando as plantas foram crescidas na presença de alumínio iônico não nanoparticulado na concentração de 196 mM (26,17 mg L^{-1}). Opostamente, as NPs de Al_2O_3 , na concentração de 1000 mg L^{-1} , reduziram em 50% a germinação e em 46% o alongamento das raízes de plantas de milho crescidas em placa de Petri (Karunakaran et al., 2016).

Os resultados obtidos no presente trabalho estão em concordância ao encontrado por Karunakaran et al., (2016) para milho. Em soja, o efeito predominante das NPs de Al_2O_3 foi inibitório sobre as raízes e estimulatório sobre os caules (Fig. 2). Sabe-se que a toxicidade das NPs está diretamente relacionada com a sua absorção pelas plantas. No entanto, ao contrário das células animais, as células das plantas estão cercadas por uma barreira, a parede celular, que pode limitar a entrada das NPs devido ao diâmetro estreito dos poros existentes, que varia de 5-20 nm (Kurepa et al., 2010). Dados mostram que NPs de óxido de ferro com dimensões de 20 nm são capazes de penetrar através da parede celular das plantas de abóbora (*Cucurbita maxima*) (Zhu et al., 2008). No presente estudo, é possível que apenas um pequeno percentual das NPs de

Al₂O₃ aplicadas sobre as plantas de soja tenham sido absorvidas, pois análises de MET sugerem um tamanho de média de aproximadamente 20 a 60 nm para estas NPs (Fig. 1). A análise do tamanho, solubilidade e dispersão são pontos chave para avaliação dos efeitos toxicológicos das NPs. Isso porque os aglomerados ou NPs maiores do que 20 nm poderiam acarretar no entupimento dos poros da parede celular, criando uma barreira de fluxo apoplástico que reduziria a absorção de água e nutrientes, além da produção de EROs devido a interferência nos processos fotossintéticos (Tripathi et al., 2017; Nair et al., 2010).

Os dados de EDS apontam para um teor de alumínio 16 vezes maior nas plantas de soja tratadas com as NPs de Al₂O₃ do que em plantas controle (Fig. 3H). Mais especificamente, as raízes das plantas expostas às NPs possuem 1,6% do peso em alumínio, enquanto que em plantas controle esse elemento representa apenas 0,1% do peso. Esse achado sugere fortemente que as NPs de Al₂O₃ tenham sido captadas pelas raízes das plantas de soja, é possível que este evento não tenha ocorrido tão extensivamente. Por exemplo, análises por EDS de plantas de soja tratadas com NPs de TiO₂ (com tamanho médio de 20 nm), na concentração de 2500 mg L⁻¹, revelaram um percentual muito superior do elemento titânio em sua constituição, aproximadamente 10% (Melo et al., 2018). Dessa forma, as NPs de TiO₂ parecem ter sido mais extensivamente absorvidas pelas plantas de soja do que as NPs de Al₂O₃ devido às suas menores dimensões. Alinhado com este raciocínio está o trabalho de Ma et al., (2010), que afirmam diante dos dados obtidos em seu trabalho, que uma pequena parte das NPs de prata (com aproximadamente 40 nm) aplicadas sobre plantas de *Arabidopsis thaliana* tenha sido absorvida pelas raízes e translocadas para os demais tecidos da planta.

Um dos principais indicativos de toxicidade causados pelas NPs é o aparecimento de espécies reativas de oxigênio (EROs), que por sua vez, podem oxidar lipídios da membrana, proteínas e ácidos nucleicos (Hossain et al., 2015; Zhao et al., 2012 ; Song et al., 2012). Como mecanismo de defesa, as plantas são dotadas de um aporte de enzimas antioxidantes, dentre elas a peroxidase (POD), a catalase (CAT) e a superóxido dismutase (SOD), destinadas a combater e eliminar EROs nocivas para as plantas (Khan et al., 2016; Cox et al., 2017). Frequentemente, as plantas apresentam aumento da atividade das enzimas antioxidantes em resposta à produção exacerbada de EROs. Essa resposta de defesa foi observada em plantas de *Lemma minor* crescidas em meio hidropônico contendo 10–2000 mg L⁻¹ de NPs de TiO₂ durante sete dias. Estas plantas apresentaram estímulo da atividade das enzimas antioxidantes (atividade da

peroxidase [POD], catalase [CAT] e superóxido dismutase [SOD] e teor de malondialdeídos [MDA]), como consequência do aumento observado na produção de EROs, como ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A produção e o acúmulo de EROs, levaram ao aumento de MDA, acusando assim, danos causados nos lipídios da membrana. Plantas de trigo (*Triticum aestivum* L.) tratadas por 96 h com 5, 25 e 50 mg mL⁻¹ de NPs de Al₂O₃ apresentaram atividade de guaiacol POD 1,64, 2,46 e 3,78 vezes maior, respectivamente, do que plantas controle (Yanik et al., 2015). Esses achados estão em concordância com os resultados obtidos no presente estudo, no qual as NPs de Al₂O₃ estimularam a atividade da POD solúvel nas raízes e nos caules das plantas de soja. Dessa forma, não se pode descartar a possibilidade de que as plantas de soja tratadas com as NPs de Al₂O₃ estejam sob uma condição de estresse oxidativo. Essa hipótese é fortalecida pelo incremento massivo dos teores de compostos fenólicos totais nas raízes e caules destas plantas (Fig. 4A), os quais podem atuar como doadores de elétrons afim de eliminar EROs tais como o H₂O₂ (Sakihama et al., 2002, Kováčik et al., 2010).

A lignina é um biopolímero aromático heterogêneo sintetizado a partir de pequenos blocos construtores denominados fenilpropanoides. Ela é predominantemente depositada nas paredes celulares secundárias, tornando-as rígidas e impermeáveis (Rahimi et al., 2014; Vanholme et al., 2010). Muitas das enzimas envolvidas na biossíntese da lignina podem reagir de forma distinta frente a estresses bióticos e abióticos, acarretando em uma alteração na deposição da lignina pela planta (Moura et al., 2010). O acúmulo de lignina foi observado em plantas de tomate e couve-flor crescidas na presença de 10–500 mg L⁻¹ de NPs de óxido de cobre (CuO) (Singh et al., 2017). O acúmulo de lignina também foi observado em plantas de trigo tratadas com NPs de Al₂O₃, porém, somente na maior dose testada (50 mg mL⁻¹) (Yanik et al., 2015).

Nossos resultados revelaram o mesmo padrão de resposta, isto é, aumento dose-dependente do teor de lignina de raízes e caules em resposta à exposição das plantas de soja as NPs de Al₂O₃ (Fig. 4B). É sabido que a deposição de lignina na parede celular pode limitar a absorção de água, nutrientes (Lequeux et al., 2010) e também a expansão celular (Fan et al., 2006). Logo, as reduções de comprimento e biomassa fresca observadas nas raízes das plantas de soja tratadas com NPs de Al₂O₃ pode estar diretamente relacionada com o aumento da lignificação, bem como com os danos celulares (Fig. 3) causados pela aumentada produção de EROs.

A PAL catalisa a primeira reação na via de fenilpropanoides, desaminando a L-fenilalanina para produzir o ácido *t*-cinâmico, que por uma série de etapas dará origem aos três monolignóis formadores da lignina, os álcoois *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico. Estes, por sua vez, passam por um processo de polimerização formando no interior do polímero de lignina os monômeros *p*-hidroxifenil (H), guaiacil (G) e siringil (S), respectivamente (Boerjan et al., 2003). A elevação dos níveis de transcrição dos genes PAL de plantas de soja (*Glycine max* L.), tratadas com NPs-CuO foi acompanhado por um aumento significativo no teor total de lignina (Nair et al., 2014). Porém, tal fato não condiz com os nossos resultados, visto que a atividade da PAL foi abruptamente reduzida nos caules das plantas de soja tratadas com NPs de Al₂O₃, embora não tenha sido influenciada nas raízes (Fig. 6A). Resultados semelhantes foram previamente encontrados por nosso grupo de pesquisa em plantas de soja crescidas na presença de NPs de óxido de ferro (γ -Fe₂O₃) em que a inibição da atividade da PAL de raízes pode ter sido ocasionada por um feedback negativo causado pelo acúmulo de compostos fenólicos (Lopes et al., 2017).

Nossos dados também revelam um efeito estimulatório das NPs de Al₂O₃ sobre a atividade de POD ligada de raízes e caules (Fig. 6C). Esta enzima usa H₂O₂ na polimerização dos monolignóis na parede celular, o qual pode ser gerado mediante condições de estresse. O consumo de H₂O₂ para a polimerização da lignina pode ter regulado indireta e negativamente a atividade da PAL (Bubna et al., 2011; Zanardo et al., 2009). Em concordância com os nossos dados, um aumento dos teores de lignina em soja submetida a NPs de CuO foi relacionado com a redução do crescimento de raízes e caules e com aumentados níveis de transcritos para PODs aniônicas e catiônicas (Nair e Chung, 2014).

Outro achado relevante do presente estudo consiste no fato de as NPs de Al₂O₃ terem alterado a composição monomérica da lignina nas raízes das plantas de soja, mais especificamente por reduzirem o teor do monômero H nas menores concentrações usadas da NP (Fig. 5 A). É possível que esta modificação da composição monomérica possa ter levado a alterações na rigidez do polímero lignina e, dessa forma, da expansão celular, limitando o crescimento. Opostamente, foram observados aumentos nos teores do monômero H, G e S dos caules após exposição das plantas a 50 mg L⁻¹ das NPs. Este resultado está em concordância com o achado de Lopes et al., (2017), que observaram aumento do teor de monômero G em caules de plantas de soja expostas à NPs de γ -Fe₂O₃. Tais resultados encontrados nos caules sugerem a formação de uma lignina mais

rígida com maior número de ligações simples entre os anéis benzênicos e mais ligações carbono-carbono (Cesarino et al., 2012). No entanto, não houve alteração no crescimento dos caules, sugerindo um efeito estabilizador acarretado pelo aumento dos monômeros H e S.

5. Conclusões

Em conclusão, pode-se dizer que a redução dos parâmetros de crescimento das raízes de plantas de soja expostas às NPs de Al_2O_3 estão relacionadas com: 1) interferência nos processos de absorção de água e nutrientes devido ao possível bloqueio de poros da parede celular; 2) dano celular causado às células radiculares devido a presença das NPs e estresse oxidativo; 3) aumento da lignificação e 4) alteração da composição monomérica da lignina, com possível aumento da recalcitrância da parede celular.

6. Referências

- Boerjan, W., Ralph, J., & Baucher M. 2003. Lignin biosynthesis. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 54 (1), 519-546.
- Bubna, G.A et al. 2011. Exogenous caffeic acid inhibits the growth and enhances the lignification of the roots of soybean (*Glycine max*). *J. Plant. Physiol.* 168 (14), 1627-1633.
- Burklew, C. E et al. 2012. Effects of aluminum oxide nanoparticles on the growth, development, and microRNA expression of tobacco (*Nicotiana tabacum*). *PloS. One.* 7 (5), 1-10.
- Cox, A et al. 2017. Reprint of: Silver and titanium dioxide nanoparticle toxicity in plants: A review of current research. *Plant. Physiol. Bioch.* 110, 33-49.
- Dean, Jeffrey F. D. 1997. Lignin analysis. *Methods in plant biochemistry and molecular biology*, 199-215.
- dos Santos, W.D et al. 2008a. Soybean (*Glycine max*) root lignification induced by ferulic acid. The possible mode of action. *J. Chem. Ecol.* 34 (9), 1230-1241.
- Fan, L et al. 2006. Progressive inhibition by water deficit of cell wall extensibility and growth along the elongation zone of maize roots is related to increased lignin metabolism and progressive stelar accumulation of wall phenolics. *Plant. Physiol.* 140 (2), 603-612.

- Ferrarese, M.L.L et al. 2000. Phenylalanine ammonia-lyase activity in soybean roots extract measured by reverse-phase high performance liquid chromatography. *Plant. Biol.* 2, 152-153.
- Ferrarese, M.L.L., Zottis, A., Ferrarese-Filho, O., 2002. Protein-free lignin quantification in soybean (*Glycine max*) roots. *Selec. Biol.* 57, 541-543.
- Fraceto, L. F et al. 2016. Nanotechnology in agriculture: which innovation potential does it have?. *Front. Env. Sci.* 4, 20.
- Frazier, T. P et al. 2014. Titanium dioxide nanoparticles affect the growth and microRNA expression of tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Funct. Integr. Genomics.* 14 (1), 75-83.
- Haghighi, M., & Pessarakli, M 2013. Influence of silicon and nano-silicon on salinity tolerance of cherry tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.) at early growth stage. *Sci. Hort.* 161, 111-117.
- Hanemann, T., & Szabó, D. V 2010. Polymer-nanoparticle composites: from synthesis to modern applications. *Mater.* 3(6), 3468-3517.
- Hatami, M et al. 2016. Engineered nanomaterial-mediated changes in the metabolism of terrestrial plants. *Sci. Total Environ.* 571, 275-291.
- Hossain, Z et al. 2015. Plant responses to nanoparticle stress. *Int. J. Mol. Sci.* 16 (11), 26644-26653.
- Jin, Y et al. 2017. Distinct physiological and molecular responses in *Arabidopsis thaliana* exposed to aluminum oxide nanoparticles and ionic aluminum. *Environ. Pollut.* 228, 517-527
- Karunakaran, G et al. 2016. Influence of ZrO₂, SiO₂, Al₂O₃ and TiO₂ nanoparticles on maize seed germination under different growth conditions. *IET Nanobiotech.* 10(4), 171-177.
- Khan, M. N et al. 2017. Role of nanomaterials in plants under challenging environments. *Plant. Physiol. Bioch.* 110, 194-209.
- Ko, S. H et al. 2007. All-inkjet-printed flexible electronics fabrication on a polymer substrate by low-temperature high-resolution selective laser sintering of metal nanoparticles. *Nanotec.* 18(34), 345202.
- Kováčik, J et al. 2010. Lignification and related parameters in copper-exposed *Matricaria chamomilla* roots: role of H₂O₂ and NO in this process. *Plant Sci.* 179(4), 383-389.
- Kurepa, J et al. 2010. Uptake and distribution of ultrasmall anatase TiO₂ Alizarin red S nanoconjugates in *Arabidopsis thaliana*. *Nano lett.* 10(7), 2296-2302.

- Lequeux, H et al. 2010. Response to copper excess in *Arabidopsis thaliana*: impact on the root system architecture, hormone distribution, lignin accumulation and mineral profile. *Plant. Physiol. Bioch.* 48(8), 673-682.
- Lopes, T. L. Lignin Induced Growth-Inhibition in Soybean (*Glycine max* L.) Exposed to Iron Oxide Nanoparticles (γ -Fe₂O₃). 2017, p. 31. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), Universidade Estadual de Maringá, PR, 2017.
- Ma, X et al. 2010. Interactions between engineered nanoparticles (ENPs) and plants: phytotoxicity, uptake and accumulation. *Sci. Total Environ.* 408(16), 3053-3061.
- Melo, G. S. R. Efeitos de nanopartículas de dióxido de titânio (TiO₂) sobre o crescimento e metabolismo antioxidante em plantas de soja (*Glycine max* L.). 2018, p. 42 . Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), Universidade Estadual de Maringá, PR, 2018
- Moreira-Vilar, F.C et al. 2014. The acetyl bromide method is faster, simpler and presents best recovery of lignin in different herbaceous tissues than Klason and thioglycolic acid methods. *PLoS. One.* 9(10), e110000.
- Moura, J. C. M. S et al. 2010. Abiotic and biotic stresses and changes in the lignin content and composition in plants. *J. Integr. Plant. Biol.*, 52(4), 360-376.
- Mustafa, G et al. 2015. Proteomic analysis of flooded soybean root exposed to aluminum oxide nanoparticles. *J. Proteomics*, 128, 280-297.
- Nair, P. M. G., & Chung, I. M et al. 2014. A mechanistic study on the toxic effect of copper oxide nanoparticles in soybean (*Glycine max* L.) root development and lignification of root cells. *Biol. Trace. Elem. Res.* 162(1-3), 342-352.
- Nair, R et al. 2010. Nanoparticulate material delivery to plants. *Plant. Sci.* 179(3), 154-163.
- Nowack, B., & Bucheli, T. D. et al. 2007. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environ. Pollut.* 150(1), 5-22.
- Rahimi, A et al. 2014. Formic-acid-induced depolymerization of oxidized lignin to aromatics. *Nature.* 515(7526), 249-252.
- Riahi, M. A et al. 2012. Effects of alumina nanoparticles on morphological properties and antioxidant system of *Triticum aestivum*. *Ira. J. Plant. Physiol.* 3, 595-603
- Sakihama, Y et al. 2002. Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology*, 177(1), 67-80.
- Salvador, V.H et al. 2013. Cinnamic acid increases lignin production and inhibits soybean root growth. *PLoS One* 8(7), e69105.

- Shaffer, C. 2005. Nanomedicine transforms drug delivery. *Drug Discov. Today*, 10(23), 1581-1582.
- Singh, A et al. 2017. Effect of biologically synthesized copper oxide nanoparticles on metabolism and antioxidant activity to the crop plants *Solanum lycopersicum* and *Brassica oleracea* var. botrytis. *J. Biotech.* 262, 11-27.
- Song, G et al. 2012. Physiological effect of anatase TiO₂ nanoparticles on *Lemna minor*. *Environ. Toxicol. Chem.* 31(9), 2147-2152.
- Thwala, M et al. 2013. The oxidative toxicity of Ag and ZnO nanoparticles towards the aquatic plant *Spirodela punctata* and the role of testing media parameters. *Environ. Sci: Processes & Impacts*, 15(10), 1830-1843.
- Tripathi, D. K et al. 2017. An overview on manufactured nanoparticles in plants: uptake, translocation, accumulation and phytotoxicity. *Plant Physiol. Bioch.* 110, 2-12.
- Vanholme, R et al. 2010. Lignin biosynthesis and structure. *Plant. Physiol.* 153(3), 895-905.
- Wang, P et al. 2016. Nanotechnology: a new opportunity in plant sciences. *Trends Plant Sci.* 21(8), 699-712.
- Wang, S et al. 2011. Ultra- small TiO₂ nanoparticles disrupt microtubular networks in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ.* 34(5), 811-820.
- Wang, Z et al. 2012. Xylem-and phloem-based transport of CuO nanoparticles in maize (*Zea mays* L.). *Environ. Sci. Technol.* 46(8), 4434-4441.
- Wilczewska, A. Z et al. 2012. Nanoparticles as drug delivery systems. *Pharma. Rep.* 64(5), 1020-1037.
- Yah, C. S et al. 2012. Nanoparticles toxicity and their routes of exposures. *Pak. J. Pharma. Sci.* 25(2).
- Yang, L., & Watts, D. J. 2005. Particle surface characteristics may play an important role in phytotoxicity of alumina nanoparticles. *Toxicol. Lett.* 158(2), 122-132.
- Yanik, F., & Vardar, F. 2015. Toxic effects of aluminum oxide (Al₂O₃) nanoparticles on root growth and development in *Triticum aestivum*. *Water Air Soil Pollut.* 226(9), 296.
- Zanardo, D.I. et al. 2009. Soybean root growth inhibition and lignification induced by p-coumaric acid. *Environ. Exper. Bot.* 66(1), 25-30.
- Zhao, L et al. 2012. Stress response and tolerance of *Zea mays* to CeO₂ nanoparticles: cross talk among H₂O₂, heat shock protein, and lipid peroxidation. *ACS Nano*, 6(11), 9615-9622.

Zhu, H et al. 2008. Uptake, translocation, and accumulation of manufactured iron oxide nanoparticles by pumpkin plants. JEM, 10(6), 713-717.

LEGENDA DAS FIGURAS

Figura 1. Microscopia eletrônica de transmissão (MET) de NPs de Al_2O_3 . As nanopartículas são mostradas nos aumentos de 60 (A), 100 (B), 200 (C), 300 (D) e 500 (E) mil vezes.

Figura 2. Efeitos de NPs de Al_2O_3 sobre o crescimento de plantas de soja. Comprimento (A) e biomassas fresca (B) e seca (C) de raízes e caules de plantas de soja expostas por 16 dias a diferentes concentrações de NPs de Al_2O_3 . Médias ($n = 26 \pm \text{SE}$) seguidas por asterisco (*) são estatisticamente diferentes do controle de acordo com o teste de Dunnet ($p \leq 0,05$).

Figura 3. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de raios X por dispersão em energia (EDS) de raízes de plantas de soja. Os ápices radiculares de plantas controles (A, C e E) ou tratadas com NPs de Al_2O_3 na concentração de

1000 mg L⁻¹ (B, D e F) durante 16 dias foram observadas com ampliações de 400× (A, B), 10.000× (C, D) e 50.000× (E, F). As setas vermelhas indicam as regiões nas quais foram realizadas as análises de EDS (G e H).

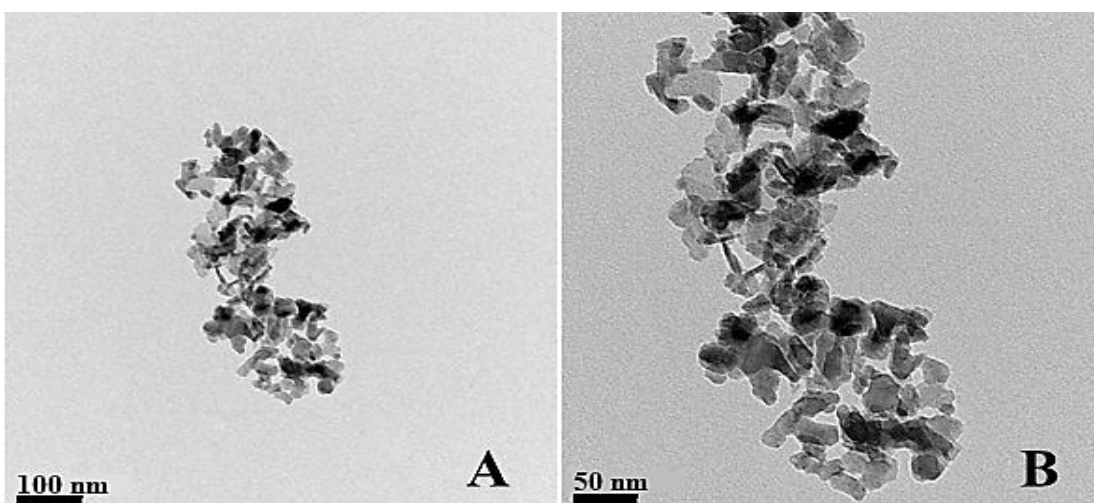
Figura 4. Efeitos de NPs de Al₂O₃ sobre os conteúdos de fenólicos e lignina totais de plantas de soja. Conteúdo de fenólicos (A) e lignina (B) totais de raízes e caules de plantas de soja expostas por 16 dias a diferentes concentrações de NPs de Al₂O₃. Médias (n = 4–7 ± SE) seguidas por asterisco (*) são estatisticamente diferentes do controle de acordo com o teste de Dunnet ($p \leq 0,05$).

Figura 5. Efeitos de NPs de Al₂O₃ sobre a composição monomérica da lignina de plantas de soja. Conteúdo dos monômeros H (A), G (B) e S (C) de raízes de plantas de soja expostas por 16 dias a diferentes concentrações de NPs de Al₂O₃. Médias (n = 4–7 ± SE) seguidas por asterisco (*) são estatisticamente diferentes do controle de acordo com o teste de Dunnet ($p \leq 0,05$). H, *p*-hidroxifenil; G, guaiacil; S, siringil.

Figura 6. Efeitos de NPs de Al₂O₃ sobre atividades enzimáticas de plantas de soja. Atividades da fenilalanina amônia liase (PAL) (A), POD solúvel (B) e POD ligada a parede celular (C) de raízes e caules de plantas de soja expostas por 16 dias a diferentes concentrações de NPs de Al₂O₃. Médias (n = 4–7 ± SE) seguidas por asterisco (*) são estatisticamente diferentes do controle de acordo com o teste de Dunnet ($p \leq 0,05$).

FIGURAS

Figura 1



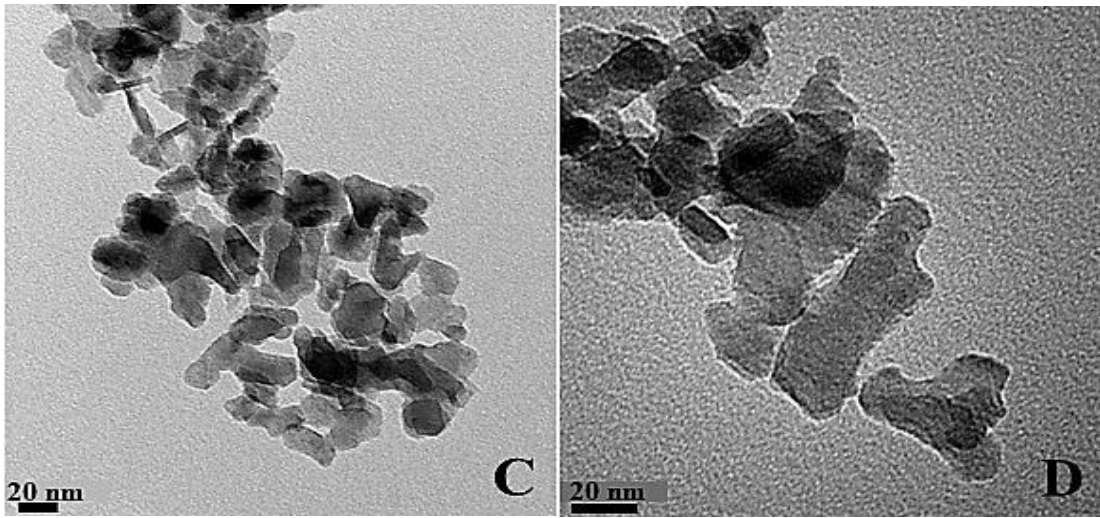


Figura 2

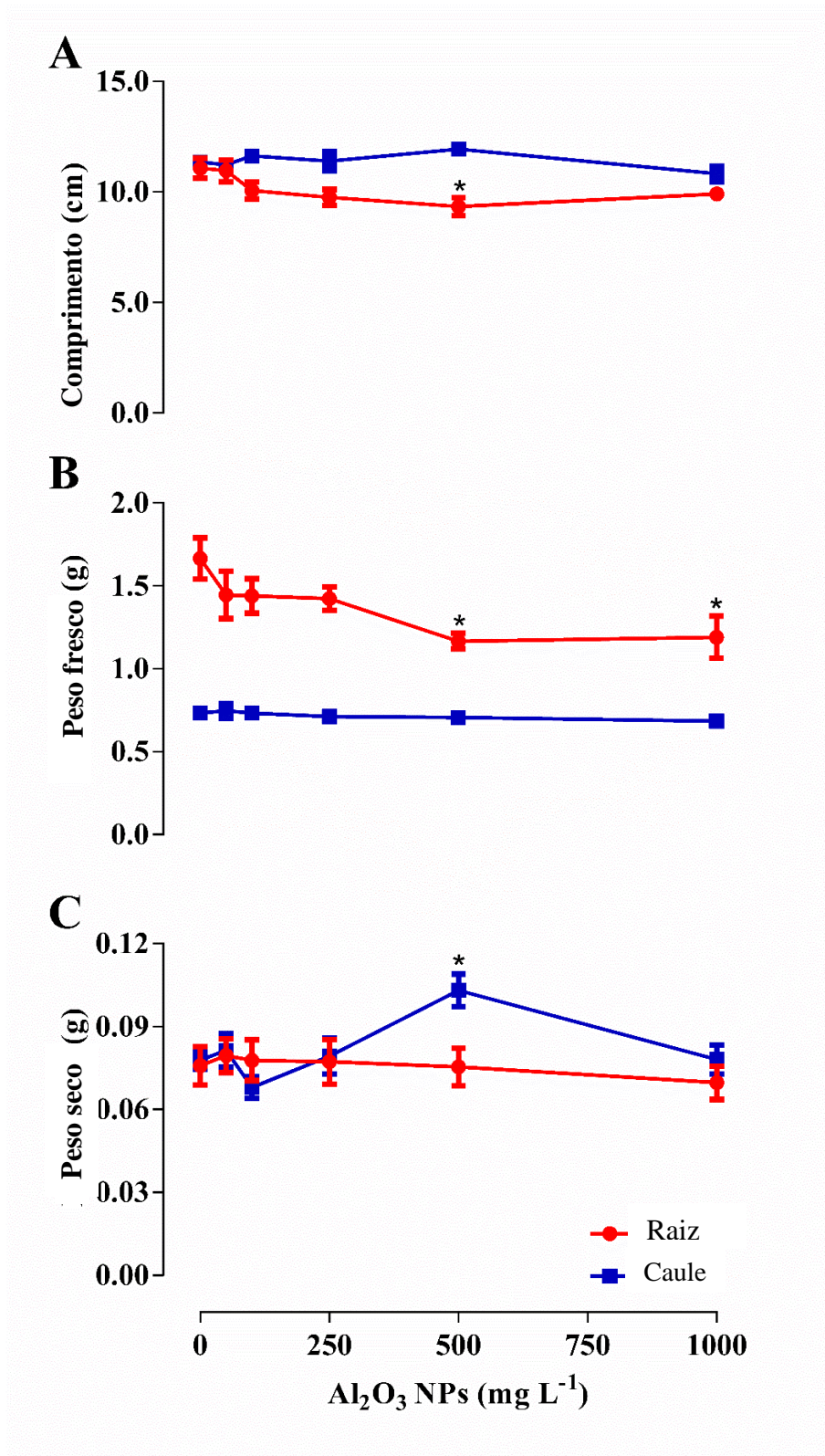


Figura 3

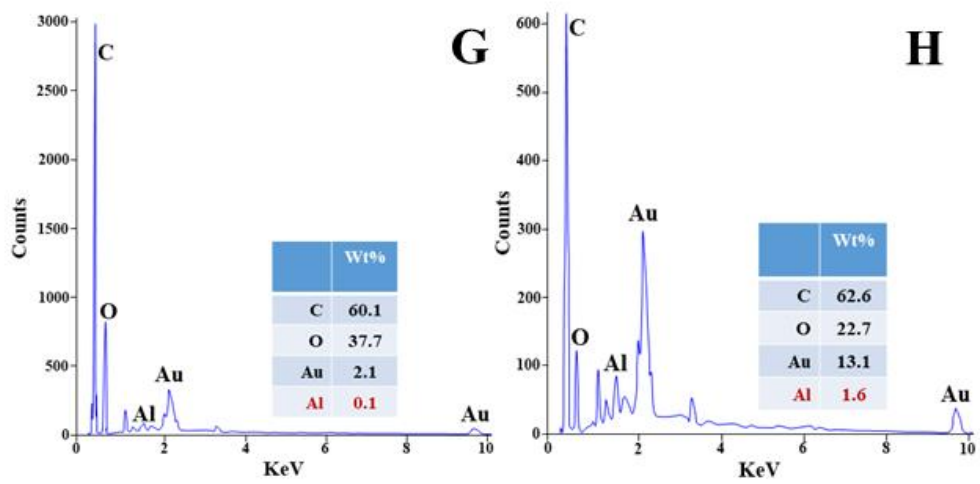
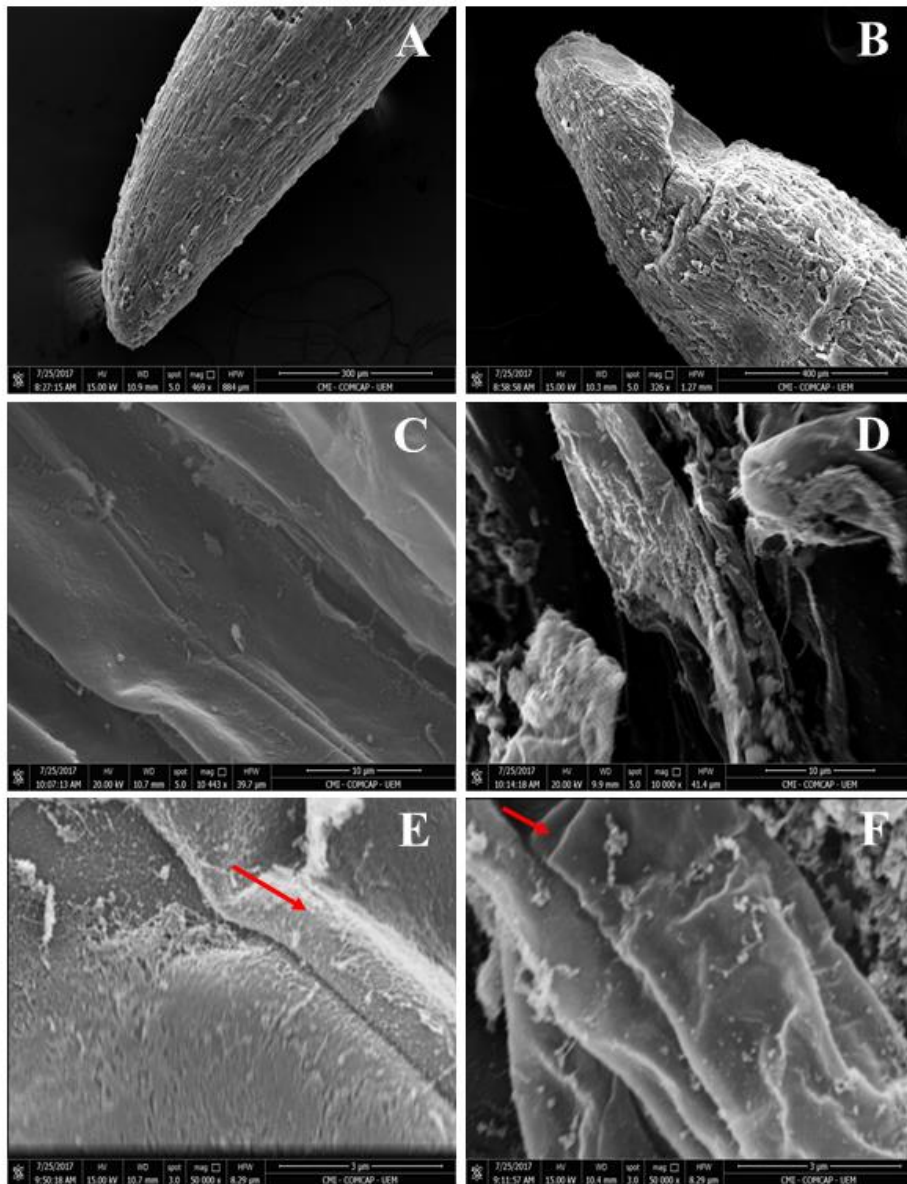


Figure 4

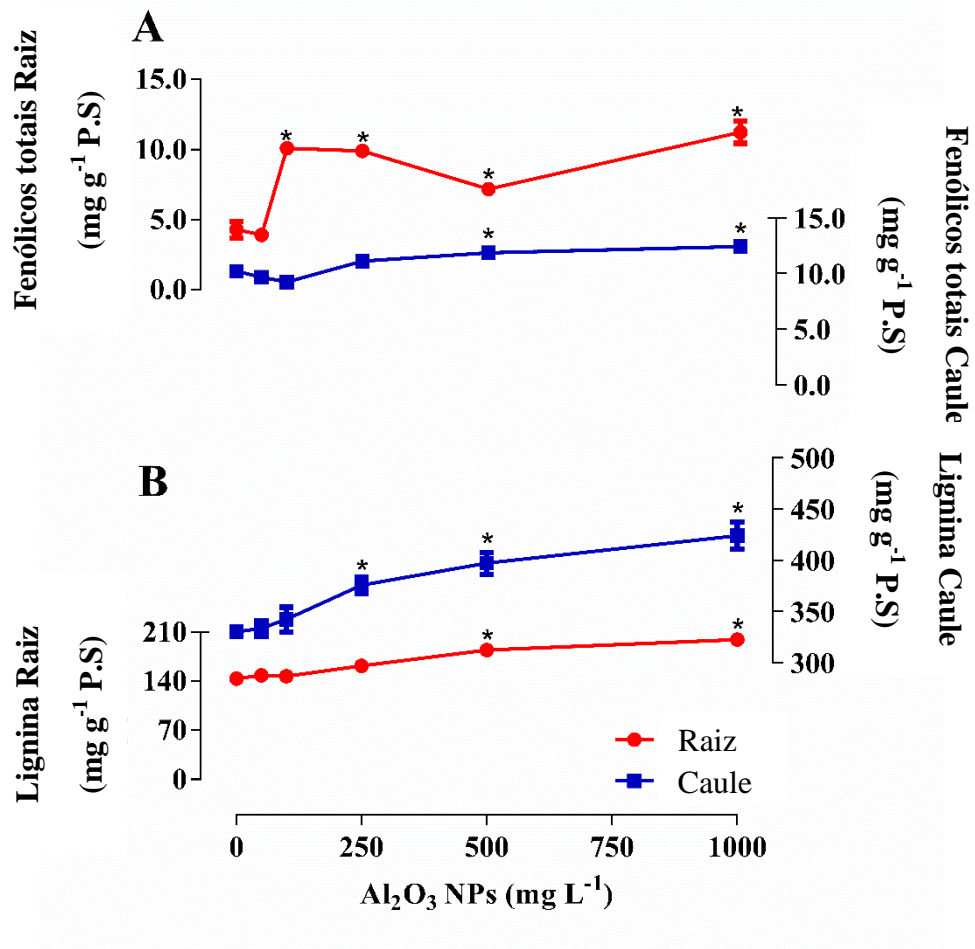


Figura 5

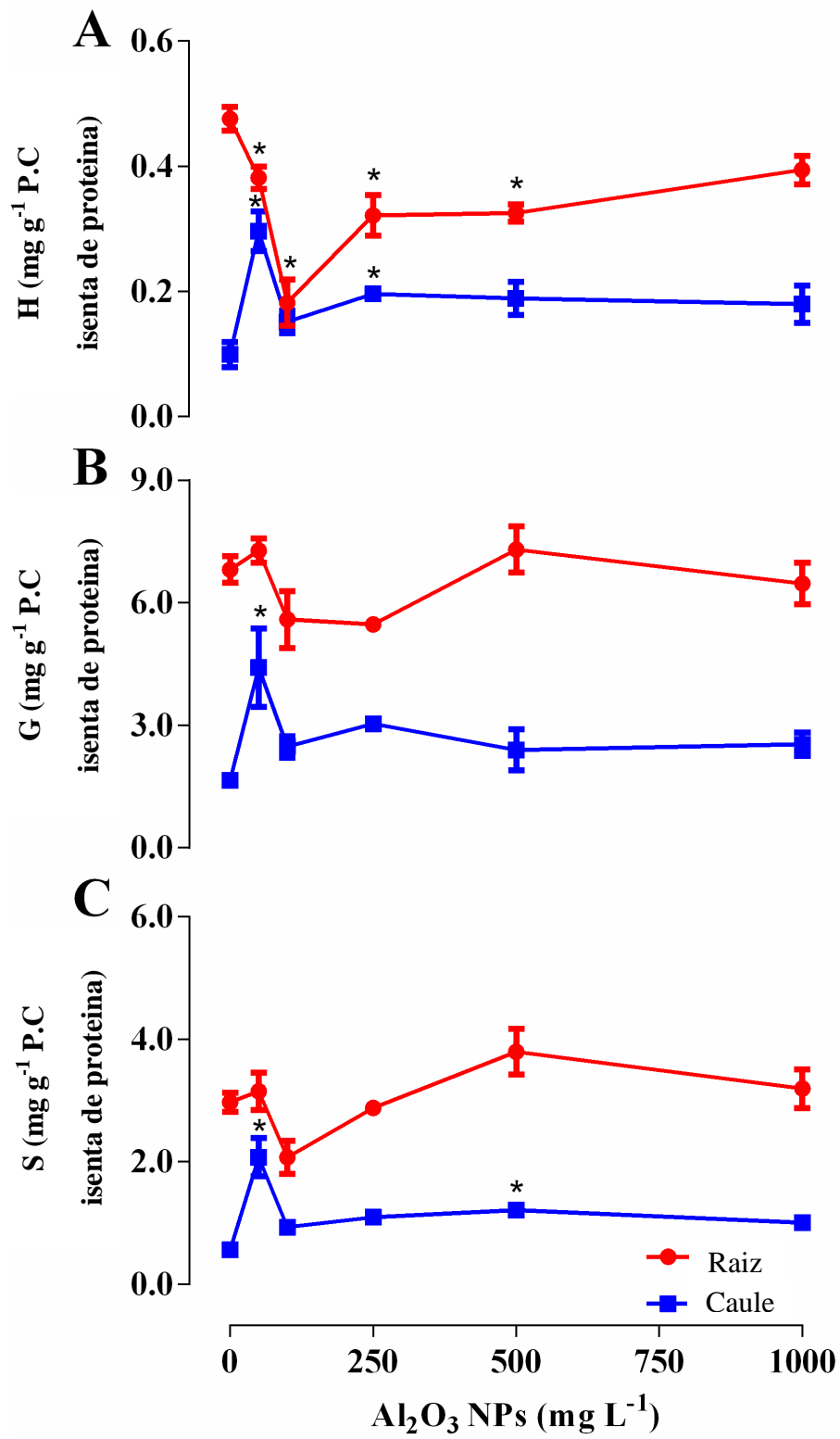


Figura 6

