



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

LUCAS PIMENTEL PEREIRA

**ANÁLISES MOLECULARES, BIOQUÍMICAS E FISIOLÓGICAS DE
SCAEVOLA PLUMIERI SUBMETIDAS À CONTAMINAÇÃO POR COBRE E
ZINCO: IMPLICAÇÕES PARA A FITORREMEDIAÇÃO DE AMBIENTES
COSTEIROS**

**VITÓRIA
2025**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

LUCAS PIMENTEL PEREIRA

**ANÁLISES MOLECULARES, BIOQUÍMICAS E FISIOLÓGICAS DE
SCAEVOLA PLUMIERI SUBMETIDAS À CONTAMINAÇÃO POR COBRE E
ZINCO: IMPLICAÇÕES PARA A FITORREMEDIAÇÃO DE AMBIENTES
COSTEIROS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Diolina Moura Silva

**VITÓRIA
2025**

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de
Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

P436a Pereira, Lucas Pimentel, 1997-
Análises moleculares, bioquímicas e fisiológicas de scaevola
plumieri submetidas à contaminação por cobre e zinco: implicações
para a fitorremediação de ambientes costeiros / Lucas Pimentel
Pereira. - 2026.
(recurso não paginado). : il.

Orientadora: Diolina Moura Silva.
Coorientadora: Sabrina Garcia Broetto.
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Biotecnologia. 2. Estresse oxidativo. 3. Fotossíntese. 4.
Restinga. 5. Fisiologia vegetal. 6. Metais pesados. I. Silva,
Diolina Moura. II. Broetto, Sabrina Garcia. III. Universidade
Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV.
Título.

CDU: 61



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Ata da 247ª sessão de Defesa de Dissertação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, do discente de mestrado **Lucas Pimentel Pereira**, realizada às quinze horas do dia dezessete de dezembro de dois mil e vinte e cinco. A sessão pública foi realizada em formato de videoconferência, no link:

<https://us06web.zoom.us/j/89039340932?pwd=mRZ83bnuHaSFHf6a7crdpf6XUP6gC.1>. A

presidente da Banca, Prof.ª Dr.ª Diolina Moura Silva (orientadora), apresentou os demais membros da comissão examinadora constituída pelos Doutores: Débora Dummer Meira, examinadora interna; Eugenia Jacira Bolacel Braga, examinadora externa. Em seguida, passou a palavra ao aluno que apresentou a sua proposta de dissertação intitulada **“Análises moleculares, bioquímicas e fisiológicas de *Scaevola plumieri* submetidas à contaminação por Cobre e Zinco: Implicações para a fitorremediação de ambientes costeiros”**. Terminada a apresentação, a presidente retomou a palavra e a cedeu aos membros da Comissão Examinadora, um a um, para procederem à arguição. Em seguida, convidou a Comissão Examinadora a se reunir em separado para deliberação. Ao final, a Comissão Examinadora retornou e o presidente informou aos presentes que a Dissertação havia sido **APROVADA**. A Presidente, então, deu por encerrada a sessão, e lavrou a presente ata, que é assinada pelos membros da Comissão Examinadora. Vitória, 17 de dezembro de 2025.

Diolina Moura Silva
Universidade Federal do Espírito Santo – Orientadora



Documento assinado digitalmente
DIOLINA MOURA SILVA
Data: 19/12/2025 17:45:27-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Débora Dummer Meira
Universidade Federal do Espírito Santo – Examinadora interna



Documento assinado digitalmente
EUGENIA JACIRA BOLACEL BRAGA
Data: 18/12/2025 13:04:10-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Eugenia Jacira Bolacel Braga
Universidade Federal de Pelotas - Examinadora externa



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por
DEBORA DUMMER MEIRA - SIAPE 2020030
Departamento de Ciências Biológicas - DCB/CCHN
Em 19/12/2025 às 15:14

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link: <https://api-lepisma.prod.uks.ufes.br/arquivos-assinados/1261977?tipoArquivo=O>



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

LUCAS PIMENTEL PEREIRA

**ANÁLISES MOLECULARES, BIOQUÍMICAS E FISIOLÓGICAS DE
SCAEVOLA PLUMIERI SUBMETIDAS À CONTAMINAÇÃO POR COBRE E
ZINCO: IMPLICAÇÕES PARA A FITORREMEDIAÇÃO DE AMBIENTES
COSTEIROS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Apresentada em 17 de dezembro de 2025.

Comissão Examinadora:

Profª Drª Diolina Moura Silva
Universidade Federal do Espírito Santo - UFES
Orientadora e Presidente da Comissão

Profª Drª Débora Dummer Meira
Universidade Federal do Espírito Santo - UFES
Examinadora Interna

Profª Drª Eugenia Jacira Bolacel Braga
Universidade Federal de Pelotas - UFPel
Examinadora Externa

Agradecimentos

À Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), pelos conhecimentos, experiências e oportunidades proporcionados ao longo da minha trajetória acadêmica.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBiotec/UFES), pelo apoio institucional, pela infraestrutura e pelo comprometimento dos docentes e servidores técnico-administrativos, que contribuíram decisivamente para minha formação científica.

Agradeço ao Núcleo de Genética Humana e Molecular (NGHM), pelo suporte técnico durante as análises moleculares realizadas ao longo desta pesquisa. Meus agradecimentos a toda a equipe técnica à Prof.^a responsável Débora Dummer Meira, que contribuíram para o desenvolvimento desta dissertação.

Ao CNPq e à FEST pelo apoio financeiro, e pela logística necessária à execução deste projeto que tornaram este estudo possível.

Agradeço a área de Proteção Ambiental (APA) de Conceição da Barra.

À minha orientadora, Profa. Dra. Diolina Moura Silva, expresso minha gratidão pela orientação ao longo dessa caminhada acadêmica. Sua dedicação, rigor científico e sensibilidade foram fundamentais para o meu amadurecimento profissional.

À coorientadora Dra. Sabrina, pelo acompanhamento atento e pela constante disponibilidade em compartilhar conhecimento, e pelo apoio crucial nas análises moleculares.

Aos membros da banca examinadora Dra. Débora Dummer Meira, Dra. Eugenia Jacira Bolacel Braga, pela leitura criteriosa, pelas contribuições valiosas e pelo tempo dedicado à avaliação deste trabalho.

Aos Amigos de laboratório integrantes do Núcleo de Estudos da Fotossíntese, pela parceria, amizade e troca de conhecimentos que enriqueceram cada etapa desta pesquisa.

A minha mãe Josiane, por todo amor, paciência e apoio incondicional em cada momento desta jornada, você é o alicerce que sustentou este sonho.

E, finalmente, a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização desta tese colegas, amigos e familiares.

Resumo

A contaminação por elementos traços em ecossistemas costeiros compromete a biodiversidade e a estabilidade funcional das Restingas. Nesse contexto, avaliou-se plantas de *Scaevola plumieri* quanto às respostas moleculares, bioquímicas e fisiológicas sob a ação dos elementos traços cobre (Cu), zinco (Zn) e à combinação de Cu+Zn, com o objetivo de compreender seus mecanismos de tolerância e seu potencial como espécie fitorremediadora. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com diferentes concentrações dos elementos traços T1 (Controle), T2 (Cu 25 μ M), T3 (Cu 50 μ M), T4 (Cu 100 μ M), T5 (Zn 100 μ M), T6 (Zn 200 μ M), T7 (Zn 400 μ M), T8 (Cu+Zn 25+100 μ M), T9 (Cu+Zn 50+200 μ M), T10 (Cu+Zn 100+400 μ M) e dois períodos de exposição (5° e 25° dia). As análises moleculares, indicaram indução significativa da expressão do gene PCS no 5° dia, especialmente nas menores concentrações dos tratamentos (T3, T5 e T8), seguida de forte redução no 25° dia e supressão completa nas doses mais tóxicas, indicando limitação da resposta de quelação sob estresse prolongado. As análises bioquímicas revelaram aumento inicial de compostos fenólicos, flavonoides, capacidade antioxidante e da peroxidação lipídica, refletindo ativação antioxidante. A análise da fluorescência da clorofila *a* indicou prejuízo progressivo do transporte de elétrons (queda de PI_{abs} , PI_{total} e ϕP_0) acompanhado pelo aumento da taxa de dissipação de energia (DI_0/RC), com colapso fotoquímico nos tratamentos com maiores concentrações. A forte indução inicial da via das PCS demonstra ativação precoce do sistema de quelação para sequestrar Cu e Zn, sustentando a defesa molecular nas fases iniciais da exposição, as respostas bioquímicas acompanham a dinâmica transcricional, com elevação de antioxidantes no início e consumo sob estresse intenso. Esses resultados indicam que as plantas de *S. plumieri* tem capacidade de ativar um sistema integrado de proteção, via fitoquelatinas, rotas antioxidantes e mecanismos fotoprotetores, que lhes confere potencial fitorremediador de elementos traços em ambientes costeiros.

Palavras-chave: *Scaevola plumieri*; elementos traços; fotossíntese; fitoquelatinas; estresse oxidativo; Restinga.

Abstract

Contamination by trace elements in coastal ecosystems compromises biodiversity and the functional stability of Restinga environments. In this context, *Scaevola plumieri* plants were evaluated regarding their molecular, biochemical, and physiological responses under exposure to copper (Cu), zinc (Zn), and the combined treatment of Cu+Zn, aiming to understand their tolerance mechanisms and phytoremediation potential. The experiment was conducted in a completely randomized design with different trace-element concentrations: T1 (Control), T2 (Cu 25 μ M), T3 (Cu 50 μ M), T4 (Cu 100 μ M), T5 (Zn 100 μ M), T6 (Zn 200 μ M), T7 (Zn 400 μ M), T8 (Cu+Zn 25+100 μ M), T9 (Cu+Zn 50+200 μ M), and T10 (Cu+Zn 100+400 μ M), evaluated at two exposure periods (5th and 25th day). Molecular analyses indicated a significant induction of PCS gene expression on the 5th day, especially at lower treatment concentrations (T3, T5, and T8), followed by a marked reduction on the 25th day and complete suppression at the highest doses, indicating a limitation of the chelation response under prolonged stress. Biochemical analyses revealed an initial increase in phenolic compounds, flavonoids, antioxidant capacity, and lipid peroxidation, reflecting activation of antioxidant defenses. Chlorophyll a fluorescence analysis showed a progressive impairment of electron transport (reduction of PI_{abs} , PI_{Total} , and ϕP_0), accompanied by an increase in energy dissipation (DI_0/RC), culminating in photochemical collapse at higher concentrations. The strong early induction of the PCS pathway demonstrates rapid activation of metal chelation mechanisms to sequester Cu and Zn, sustaining molecular defense during the initial exposure phase. Biochemical responses followed this transcriptional pattern, with increased antioxidant activity at early stages and depletion under severe stress. These findings indicate that *S. plumieri* activates an integrated protection system involving phytochelatin synthesis, antioxidant pathways, and photoprotective mechanisms, supporting its potential for phytoremediation of trace elements in coastal environments.

Keywords : *Scaevola plumieri*; trace elements; photosynthesis; phytochelatins; oxidative stress; Restinga.

Lista de Figuras

Figura 1 *Scaevola plumieri* em ambiente de restinga no litoral do Espírito Santo, Brasil. Espécie adaptada a condições extremas de radiação solar, salinidade e baixa disponibilidade de nutrientes, desempenhando papel fundamental na fixação de dunas e na estabilidade ecológica de ecossistemas costeiros. Foto: Lucas Pimentel 14

Figura 2 Delineamento experimental para a avaliação de plantas de *Scaevola plumieri* submetidas a dez tratamentos: T1= Controle, T2= Cu 25 μM , T3= Cu 50 μM e T4= Cu 100 μM , T5= Zn 100 μM , T6= Zn 200 μM e T7= Zn 400 μM e combinações T8= Cu+Zn 25+100 μM , T9= Cu+Zn 50+200 μM e T10= Cu+Zn 100+400 μM . Cada tratamento foi composto por cinco repetições, totalizando 50 unidades experimentais. 17

Figura 3 Variação temporal da expressão relativa do gene da PCS (fitoquelatina sintase) em folhas de *Scaevola plumieri* submetidas a tratamentos com Cu: T2, T3 e T4, Zn: T5, T6 e T7 e à combinação Cu+Zn: T8, T9 e T10 no 5° e 25° dia de exposição. Cada coluna representa a média e as barras verticais indicam o erro padrão. A expressão foi normalizada em relação ao gene de referência 18S e calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$, considerando o controle como referência para os cálculos da expressão relativa. A (†) nos gráficos representa a morte das plantas nos tratamentos de T7 e T10 antes da medida do dia 25. Letras maiúsculas diferentes sobre as barras indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos e letras minúsculas indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos no 5° dia e no 25° dia ($p < 0,05$; Scott-Knott) ($n = 3$)..... 28

Figura 4 Teores de compostos fenólicos totais ($\text{mg } 100 \text{ g}^{-1} \text{ MF}$) em folhas de plantas de *Scaevola plumieri* submetidas a tratamentos com Cu: T2, T3 e T4, Zn: T5, T6 e T7 e à combinação Cu+Zn: T8, T9 e T10 no 5° e 25° dia de exposição. A (†) nos gráficos representa a morte das plantas nos tratamentos de T7 (400 μM) e T10 (100+400 μM) antes da medida do dia 25. As colunas representam a média \pm erro padrão. Letras maiúsculas diferentes sobre as barras indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos e letras minúsculas indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos no 5° dia e no 25° dia ($p < 0,05$; Scott-Knott) ($n = 3$)..... 31

Figura 5 Teores de flavonóis totais ($\text{mg } 100 \text{ g}^{-1} \text{ MF}$) em folhas de *Scaevola plumieri* submetidas a tratamentos com Cu: T2, T3 e T4, Zn: T5, T6 e T7 e à combinação Cu+Zn: T8, T9 e T10 no 5° e 25° dia de exposição. A (†) nos gráficos representa a morte das plantas nos tratamentos de T7 (400 μM) e T10 (100+400 μM) antes da medida do dia 25. As colunas representam a média \pm erro padrão. Letras maiúsculas diferentes sobre as barras indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos e letras minúsculas indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos no 5° dia e no 25° dia ($p < 0,05$; Scott-Knott) ($n = 3$)..... 33

Figura 6 Poder redutor total (FRAP, $\mu\text{mol g}^{-1} \text{ MF}$) em folhas de *Scaevola plumieri* submetidas a tratamentos com Cu: T2, T3 e T4, Zn: T5, T6 e T7 e à combinação Cu+Zn: T8, T9 e T10 no 5° e 25° dia de exposição. A (†) nos gráficos representa a morte das plantas nos tratamentos de T7 (400 μM) e T10 (100+400 μM) antes da medida do dia 25. As colunas representam a média \pm erro padrão. Letras maiúsculas diferentes sobre as barras indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos e letras minúsculas indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos no 5° dia e no 25° dia ($p < 0,05$; Scott-Knott) ($n = 3$). 35

Figura 7 Capacidade sequestradora de radicais livres (método DPPH, %AAO- MF) em folhas de *Scaevola plumieri* submetidas a tratamentos com Cu: T2, T3 e T4, Zn: T5, T6 e T7 e à combinação Cu+Zn: T8, T9 e T10 no 5° e 25° dia de exposição. A (†) nos gráficos representa a morte das plantas nos tratamentos de T7 (400 μM) e T10 (100+400 μM) antes da medida do dia 25. Valores representam média \pm erro padrão. Letras maiúsculas diferentes sobre as barras

indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos e letras minúsculas indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos no 5º dia e no 25º dia ($p < 0,05$; Scott-Knott) ($n = 3$).....37

Figura 8 Teores de malondialdeído (MDA, nmol g^{-1} MF) em folhas de *Scaevola plumieri* submetidas a tratamentos com Cu: T2, T3 e T4, Zn: T5, T6 e T7 e à combinação Cu+Zn: T8, T9 e T10 no 5º e 25º dia de exposição. A (†) nos gráficos representa a morte das plantas nos tratamentos de T7 (400 μM) e T10 (100+400 μM) antes da medida do dia 25. Valores representam média \pm erro padrão. Letras maiúsculas diferentes sobre as barras indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos e letras minúsculas indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos no 5º dia e no 25º dia ($p < 0,05$; ScottKnott)($n=3$)..... 39

Figura 9 Curvas da fluorescência da clorofila *a* (OJIP) obtidas em plantas submetidas a dez tratamentos T1, Cu: T2, T3, T4, Zn: T5, T6, T7 e Cu+Zn: T8,T9 avaliadas em dois momentos distintos da exposição, medida no 5º dia: (A, C, E); medida no 25º dia: (B, D, F). Intensidade absoluta da fluorescência da clorofila *a* (A, B); Fluorescência variável normalizada ($V_t = (F_t - F_0) / (F_m - F_0)$), indicando a dinâmica de fechamento dos centros de reação do FSII (C, D). Curvas diferenciais ($\Delta V_t = V_t(\text{tratamento}) - V_t(\text{controle})$) (E, F) ($n=5$).. 41

Figura 10 Curvas diferenciais da fluorescência da clorofila *a* em plantas submetidas a dez tratamentos T1, Cu: T2,T3, T4; Zn: T5,T6, T7 e Cu+Zn: T8, T9 e T10, avaliadas em dois momentos distintos da exposição medida no 5º dia:(A, C); medida no 25º dia:(B, D). Banda L (ΔWOK), obtida por dupla normalização entre os pontos O (20 μs) e K (300 μs), indicando alterações na conectividade entre antenas e centros de reação do FSII (A, B). Banda K (ΔVOJ), normalizada entre os pontos O (20 μs) e J (2 ms), refletindo inativação do complexo de evolução de oxigênio (OEC) e/ou expansão da antena funcional do FSII (C, D) ($n=5$). da antena funcional do FSII (C, D) ($n=5$). 43

Figura 11 Curvas diferenciais de fluorescência da clorofila *a* obtidas em plantas submetidas a dez tratamentos T1, Cu: T2, T3, T4, Zn: T5, T6, T7 e Cu+Zn: T8, T9 e T10, avaliadas em dois momentos distintos da exposição medida no 5º dia:(A, C); medida no 25º dia:(B, D). Banda H (ΔVJI), normalizada entre os passos J (~2 ms) e I (~30 ms), $\Delta VJI = VJI(\text{tratamento}) - VJI(\text{controle})$, Banda G (ΔVIP), normalizada entre os passos I (~30 ms) e P (~300 ms), $\Delta VIP = VIP(\text{tratamento}) - VIP(\text{controle})$ ($n=5$). 44

Figura 12 Gráficos de radar dos parâmetros do teste JIP que caracterizam o funcionamento do FSII de plantas tratadas com (A) T1 (Controle), T2 (Cu 25 μM); (B) T1, T3 (Cu 50 μM); (C) T1, T4 (Cu 100 μM) no 5º e 25º dia de exposição. Valores representam média \pm erro padrão. Os parâmetros foram normalizados em relação ao controle de cada tratamento. Asteriscos (*) indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle ($p < 0,05$; Scott-Knott) ($n = 5$). 46

Figura 13 Gráficos de radar dos parâmetros do teste JIP que caracterizam o funcionamento do FSII de plantas tratadas com (A) T1 (Controle), T5 (Zn 100 μM); (B) T1, T6 (Zn 200 μM); (C) T1, T7 (Zn 400 μM) no 5º e 25º dia de exposição. O tratamento T7 causou a morte das plantas antes da medida do 25º dia, portanto não foi incluído na análise estatística. Valores representam média \pm erro padrão. Os parâmetros foram normalizados em relação ao controle de cada tratamento. Asteriscos (*) indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle, enquanto dois asteriscos (**) indicam diferenças significativas tanto em relação ao controle quanto entre os tratamentos ($p < 0,05$; Scott-Knott) ($n = 5$)..... 47

Figura 14 Gráficos de radar dos parâmetros do teste JIP que caracterizam o funcionamento do FSII de plantas tratadas com (A) T1 (Controle), T8 (Cu+Zn 25+100 μM), (B) T1 (Controle), T9 (Cu+Zn 50+200), (C) T1 (Controle), T10 (Cu+Zn 100+400 μM) 5^o e 25^o dia de exposição. O tratamento Cu+Zn 100+400 μM causou a morte das plantas, portanto não foi incluído na análise estatística. Valores representam média \pm erro padrão. Os parâmetros foram normalizados em relação ao controle de cada tratamento. Asteriscos (*) indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle, enquanto dois asteriscos (**) indicam diferenças significativas tanto em relação ao controle quanto entre os tratamentos ($p < 0,05$; Scott-Knott) ($n = 5$). 48

Figura 15 Efeitos morfológicos da exposição ao Cu, Zn e sua combinação em *Scaevola plumieri* após 25 dias de tratamento. As imagens mostram os sintomas visuais de toxicidade, como clorose, necrose nas folhas de cada tratamento. A–D (Plantas tratadas com Cu em concentrações crescentes; E–H (Plantas tratadas com Zn em concentrações crescentes); I–L (Plantas tratadas com a combinação de Cu e Zn em concentrações crescentes). T1 (Controle), T2 (Cu 25 μM), T3 (Cu 50 μM), T4 (Cu 100 μM), T5 (Zn 100 μM), T6 (Zn 200 μM), T7 (Zn 400 μM), T8 (Cu+Zn 25+100 μM), T9 (Cu+Zn 50+200 μM), T10 (Cu+Zn 100+400 μM) 51

Figura 16 Resumo das respostas fisiológicas, bioquímicas e fotossintéticas de *Scaevola plumieri* à exposição ao Cu, Zn e Cu+Zn. Observa-se resposta adaptativa inicial (5 dias), com ativação antioxidante e manutenção parcial da fotossíntese, seguida por estresse oxidativo, redução da eficiência fotossintética e danos celulares sob exposição prolongada (25 dias).51

Lista de Tabelas

Tabela 1 Sequências dos oligonucleotídeos (F-forward e R-reverse) empregadas na PCR quantitativa em *Scaevola plumieri* para a amplificação do gene da fitoquelatina sintetase (*PCS*) e do gene ribossomal 18S 21

Tabela 2 Definição de termos e fórmulas usadas pelo teste JIP para a análise do transiente de fluorescência da Chl a OJIP, emitido por amostras fotossintéticas (BUSSOTTI et al., 2020; STRASSER et al., 2004). 25

Tabela 3 Concentração média de Cu, Zn no tecido foliar de *Scaevola plumieri* submetida a diferentes tratamentos com Cu, Zn e a combinação Cu+Zn, avaliados em base de massa seca ($\mu\text{g g}^{-1}$). Os tratamentos consistem no T1 (Controle), T2 (Cu 25 μM), T3 (Cu 50 μM), T4 (Cu 100 μM), T5 (Zn 100 μM), T6 (Zn 200 μM), T7 (Zn 400 μM), T8 (Cu+Zn 25+100 μM), T9 (Cu+Zn 50+200 μM), T10 (Cu+Zn 100+400 μM) ($n = 5$)Valores representam média \pm erro padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$; Scott-Knott) ($n=3$).. 30

Tabela 4 Resultados das medidas do MPM sobre os efeitos dos tratamentos com Cu, Zn e Cu+Zn sobre o pigmento fotossintético clorofila (Chl), sobre os pigmentos antioxidantes flavonoides (Flv), antocianinas (Anth) e sobre o índice de balanço de nitrogênio (NFI) em *Scaevola plumieri*, no 20^o dia de experimento. Valores representam média \pm erro padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatisticamente significativas entre tratamentos ($p < 0,05$ teste de Scott-Knott). Os tratamentos consistem no T1 (Controle), T2 (Cu 25 μM), T3 (Cu 50 μM), T4 (Cu 100 μM), T5 (Zn 100 μM), T6 (Zn 200 μM), T7 (Zn 400 μM), T8 (Cu+Zn 25+100 μM), T9 (Cu+Zn 50+200 μM), T10 (Cu+Zn 100+400 μM) ($n = 5$).. 52

Sumário

1	Introdução	14
2	Hipótese/objetivo	18
2.1	Hipótese	18
2.2	Objetivo geral.....	18
2.3	Objetivos Específicos.....	18
3	Material e metodos.....	19
3.1	Material vegetal e delineamento experimental.....	19
3.2	Análise da expressão relativa do gene da fitoquelatina sintase por PCR em tempo real	22
3.2.1	<i>Prospecção in silico e desenho de primers para o gene da fitoquelatina sintase</i>	22
3.2.2	<i>Extração de RNA total</i>	23
3.2.3	<i>Purificação do RNA</i>	23
3.2.4	<i>Síntese de DNA complementar (cDNA)</i>	23
3.2.5	<i>Amplificação do gene da fitoquelatina sintase (pcs) por RT-qPCR</i>	24
3.2.6	<i>Análise de eficiência e expressão relativa</i>	25
3.3	Análise dos elementos traços no tecido foliar	26
3.4	Capacidade antioxidante	26
3.4.1	<i>Quantificação de Compostos Fenólicos Totais (TPC) e Teor total de Flavonóis (TFV)</i>	26
3.4.2	<i>Ensaio do poder antioxidante</i>	27
3.4.3	<i>Peroxidação lipídica</i>	28
3.5	Fluorescência da clorofila a.....	29
3.6	Conteúdo relativo de clorofila, antocianina, flavonoides e índice de nitrogênio/flavonol	29
3.7	Análise Estatística	31
4	Resultados	31
4.1	Análise da expressão do gene da fitoquelatina sintase putativa.....	31
4.2	Análise dos elementos traços no tecido foliar	34
4.3	Capacidade antioxidante- Quantificação de Compostos Fenólicos Totais (CFT)....	35
4.4	Capacidade antioxidante-Teor total de Flavonóis (TTF)	38
4.5	Ensaio FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)	40
4.6	Sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH)	42
4.7	Peroxidação lipídica	44
4.8	Fluorescência da clorofila a.....	46
4.9	Análise do Teste JIP	49
4.10	Pigmentos (Chl, Flv, Anth) e o Índice de balanço de Nitrogênio (NFI)	54
5	Discussão	57
6	Conclusão	67
7	Referências Bibliográficas.....	69

1 Introdução

A Restinga é um ecossistema que ocorre de maneira descontínua ao longo de todo o litoral brasileiro e exerce papel fundamental como zona de transição entre os ambientes terrestre e marinho. Trata-se de uma formação vegetal tropical associada ao domínio da Mata Atlântica, sujeita à influência direta do mar, à elevada radiação solar, aos ventos constantes e à limitação nutricional dos solos arenosos (PEREIRA, 2003; MAGNAGO et al., 2012). Essa combinação de fatores extremos seleciona espécies com alta plasticidade ecológica, capazes de ajustar seus processos moleculares e fisiológicos para sobreviver sob múltiplos estresses ambientais.

As espécies vegetais que compõem as dunas litorâneas são reconhecidas pela capacidade de tolerar condições severas de salinidade, deficiência hídrica e nutricional, variações térmicas acentuadas e, contaminação por elementos traço de origem antrópica, especialmente oriundos de atividades minerárias e industriais. Muitos desses elementos traços como o cobre (Cu) e o zinco (Zn), são requeridos pelas plantas em pequenas quantidades e por isso são classificados como micronutrientes, mas tornam-se tóxicos quando em excesso, afetando processos vitais como a fotossíntese, respiração e integridade das membranas celulares (SOLIS et al., 2016). Os valores de referência dos elementos variam entre 0,5–10 mg kg⁻¹ para Cu e 5–30 mg kg⁻¹ para Zn. Nessas condições, os elementos não caracterizam contaminação ambiental, apresentando-se em níveis compatíveis com a dinâmica geoquímica natural desses ambientes (SEREGIN & KOZHEVNIKOVA, 2025).

Em concentrações normais, o Cu participa do transporte de elétrons na fotossíntese e respiração, além de fazer parte de enzimas oxidases envolvidas na oxidação de açúcares. O Zn é componente estrutural e catalítico de inúmeras enzimas, sendo indispensável para a síntese de clorofila, manutenção da estabilidade de proteínas e integridade de membranas (LUNKES et al., 2022).

A absorção e o transporte desses elementos pelas raízes são processos importantes na fisiologia e desenvolvimento vegetal. Entretanto, as plantas possuem seletividade limitada para discriminar íons essenciais de não essenciais, o que pode levar à absorção de elementos químicos tóxicos ou de micronutrientes em concentrações excessivas. Quando isso ocorre, o acúmulo intracelular de elementos traços desencadeia estresse oxidativo, ambos os elementos traços desestabilizam grupos sulfidril (-SH) de proteínas e comprometem o funcionamento de sistemas metabólicos dependentes de ferro e magnésio, resultando em estresse oxidativo, caracterizado pela produção descontrolada de espécies reativas de oxigênio (EROs) (RAI et al., 2019; ROORKIWAL et al., 2020; VARSHNEY et al., 2020; RAZA et al., 2021).

De acordo com Wang et al. (2024), as EROs, desempenham papel multidimensional nas plantas, em níveis moderados, atuam como moléculas sinalizadoras capazes de ativar respostas fisiológicas e gênicas de defesa, em excesso, provocam danos a lipídios, proteínas e DNA. No caso específico da exposição a excesso de elementos traços, as EROs exercem papel na resposta de defesa. Esse estresse oxidativo é o principal gatilho para a ativação de rotas de desintoxicação e quelação, entre as quais se destaca o metabolismo do enxofre e, particularmente, a via das fitoquelatinas.

As fitoquelatinas são peptídeos ricos em resíduos de cisteína, muito conservados nas plantas, e derivados da glutatona (GSH), sintetizados pela ação da enzima fitoquelatina sintase (PCS) por meio da reação:



Onde, (n+1) GSH expressa a glutatona, γ -Glu representa ácido glutâmico ligado pela sua cadeia lateral, Cys representa a cisteína, seguido por uma glicina (n-Gly). Contém repetições do dipeptídeo Glutamilcisteína (γ -Glu-Cys) seguido por uma Gly terminal, apresentando essa estrutura geral de (γ -Glu-Cys)_n-Gly. Essas moléculas exercem função central na desintoxicação dos elementos traços, formando complexos estáveis com cátions como Cu^{2+} , Zn^{2+} e Cd^{2+} , que são posteriormente sequestrados no vacúolo, reduzindo sua toxicidade citoplasmática (HWANG et al., 2017; THAKUR et al., 2019).

Além disso, as fitoquelatinas interagem com o sistema antioxidante via ciclo ascorbato-glutationa (AsA-GSH), que é um mecanismo de defesa antioxidante crucial, especialmente em plantas, onde atua na desintoxicação de espécies reativas de oxigênio (EROs), como o peróxido de hidrogênio, participando ativamente da manutenção do equilíbrio redox celular (CLEMENS, 2006; FERRARI et al., 2024).

Em espécies como *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* e *Populus tremula*, a expressão do gene PCS1 tem sido associada ao aumento da tolerância à exposição a Cu e Zn, contribuindo indiretamente para a redução dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) e para a atenuação de danos oxidativos às membranas fotossintéticas (WOJAS et al., 2008; GUO et al., 2003). Em condições naturais, para as plantas do ambiente de Restinga, onde há forte pressão ambiental, a ativação rápida dessa via pode representar uma vantagem adaptativa essencial para a sobrevivência vegetal. Su et al. (2020) também já demonstraram a potencialidade de *Ipomoea pes-caprae*, espécie encontrada em Restingas capixabas, como espécie fitorremediadora sob condições de alta salinidade e concentração de elementos traços.

Espécies herbáceas nativas como *Ipomoea imperati* e *Canavalia rosea*, já demonstraram respostas adaptativas e eficazes à contaminação por elementos traços, sugerindo a presença de mecanismos antioxidantes e de sequestro semelhantes aos descritos por Wang et al. (2024) para espécies tolerantes de ambientes áridos e salinos (LANA-COSTA et al., 2021).

Nesse cenário, *Scaevola plumieri* (L.) Vahl (Figura 1), pertencente à família Goodeniaceae, destaca-se como espécie nativa e endêmica das praias arenosas do litoral brasileiro, conhecida por sua alta tolerância à salinidade, soterramento e radiação solar intensa. Além de desempenhar papel ecológico fundamental na fixação de dunas costeiras (BARKER et al., 2003), *S. plumieri* é considerada vulnerável em determinadas regiões, como a Restinga capixaba, e ainda carece de estudos detalhados sobre seus mecanismos fisiológicos e moleculares de tolerância (KUSTER et al., 2010).

Investigar as respostas de *S. plumieri* à exposição de Cu e Zn permite compreender como plantas nativas de Restinga modulam seu sistema antioxidante frente ao estresse por elementos traços. Além do valor ecológico, esse conhecimento possui relevância biotecnológica, podendo subsidiar estratégias de fitorremediação de áreas contaminadas e também se insere em um contexto mais amplo de interesse agrônômico (NAGAJYOTI et al., 2010).

Do ponto de vista molecular, a avaliação da expressão do gene da fitoquelatina sintase, em conjunto com parâmetros fisiológicos e bioquímicos, permite inferir a ativação de mecanismos celulares de defesa frente ao estresse por metais, contribuindo para uma interpretação integrada, ainda que indireta, de seus efeitos sobre o desempenho fotossintético (NAGAJYOTI et al., 2010; AHMAD et al., 2019). Compreender os mecanismos subjacentes à absorção, toxicidade e desintoxicação de elementos traços em plantas de Restinga é importante para o desenvolvimento de estratégias para enfrentar os problemas de contaminação por elementos traços solo-planta.



Figura 1 *Scaevola plumieri* em ambiente de restinga no litoral do Espírito Santo, Brasil. Espécie adaptada a condições extremas de radiação solar, salinidade e baixa disponibilidade de nutrientes, desempenhando papel fundamental na fixação de dunas e na estabilidade ecológica de ecossistemas costeiros. Foto: Lucas Pimentel.

2 Hipótese/objetivo

2.1 Hipótese

Plantas da espécie *S. plumieri* quando expostas a diferentes concentrações de Cobre e/ou Zinco ativam mecanismos moleculares, bioquímicos e fisiológicos mantendo o equilíbrio redox e a eficiência fotossintética. Plantas da espécie *Scaevola plumieri*, quando expostas a diferentes concentrações de cobre e/ou zinco, ativam respostas moleculares, bioquímicas e fisiológicas que contribuem para a regulação do equilíbrio redox e para a modulação da eficiência fotossintética.

2.2 Objetivo geral

Avaliar o potencial de *Scaevola plumieri* como espécie fitorremediadora de ecossistemas costeiros expostos a cobre e zinco, por meio da análise integrada de respostas moleculares, bioquímicas e fisiológicas.

2.3 Objetivos Específicos

- Analisar a expressão relativa do gene da fitoquelatina sintase (*PCS*) em plantas de *S. plumieri*, por PCR em tempo real, em resposta à exposição a diferentes concentrações de Cu e Zn disponibilizadas no meio de cultivo;
- Identificar alterações na concentração de Cu e Zn no tecido foliar de plantas de *S. plumieri* cultivadas em diferentes concentrações dos elementos traços Cu e Zn;
- Determinar a capacidade antioxidante efetiva, usando análises de compostos fenólicos totais, flavonoides, ensaio do poder antioxidante, FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) e peroxidação lipídica, utilizando o teor

de malondialdeído (MDA) como indicador em folhas de plantas de *S. plumieri* cultivadas em diferentes concentrações dos elementos traços Cu e Zn;

- Analisar a eficiência fotossintética, usando parâmetros de fluorescência da clorofila a em plantas de *S. plumieri* cultivadas em diferentes concentrações dos elementos traços Cu e Zn;
- Estimar o conteúdo relativo de pigmentos foliares: clorofila, antocianina, flavonoides e o índice de nitrogênio em plantas de *S. plumieri* cultivadas em diferentes concentrações dos elementos traços Cu e Zn. Material e métodos.

3 Material e metodos

3.1 Material vegetal e delineamento experimental

Sementes de *S. plumieri* foram coletadas na região costeira do Espírito Santo, na Área de Proteção Ambiental (APA) de Conceição da Barra, (Latitude 18°37'29.03" e Longitude 39°44'4.02"), que faz parte do programa de monitoramento da biodiversidade aquática (PMBA-FEST), tendo autorização para atividades com finalidade científica (número: 64459-16), em abril de 2023, e foram levadas para o Núcleo de Estudos da Fotossíntese no Campus Universitário de Goiabeiras, UFES Vitória ES, mantidas sob refrigeração (4°C) até o momento do plantio.

Para a quebra da dormência as sementes foram embebidas em água durante 48h em temperatura ambiente. Posteriormente, com o surgimento da radícula, as sementes germinadas foram plantadas em vasos plásticos de 500 mL, contendo como substrato, areia lavada. As plântulas foram mantidas em ambiente natural, em casa de vegetação com temperatura controlada $26^{\circ}\pm 2$ °C, UR 85% e irrigação automatizada, acionada duas vezes ao dia.

Dois meses antes do início do experimento, as plântulas foram transferidas para vasos de 3,0 L contendo areia lavada. Durante as duas primeiras semanas de aclimatação, as plantas receberam solução nutritiva de Hoagland e Arnon ½ força uma vez por semana. Nas duas semanas seguintes foi aplicada solução nutritiva de Hoagland completa uma vez por semana (HOAGLAND; ARNON,1950), mantendo-se as mesmas condições de temperatura e irrigação.

Após esta aclimatação o experimento foi conduzido na área experimental de Botânica da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Vitória- ES, em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com dez tratamentos (Figura 2) e cinco repetições, totalizando 50 unidades experimentais. Cada unidade experimental correspondeu a uma planta de *S. plumieri* cultivada individualmente em um vaso.

Os tratamentos consistiram na aplicação de solução de Hoagland e Arnon ½ força, com modificações que consistiram na suplementação com diferentes concentrações de Cu (CuSO_4), Zn ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ou da combinação de ambos (Cu + Zn). As soluções foram aplicadas a cada cinco dias, durante um período total de 25 dias, resultando em cinco aplicações. As plantas foram irrigadas diariamente com 100 mL de água deionizada para manter a umidade do substrato, sem interferir na concentração dos elementos em estudo.

As concentrações de cobre (Cu) e zinco (Zn) no solo de onde as sementes foram coletadas, foram determinadas em amostras da área de restinga do ponto da Área de Proteção Ambiental (APA) de Conceição da Barra, no âmbito do Programa de Monitoramento da Bacia do Rio Doce (PMBA). As análises, realizadas pelo LEA–LabPetro/UFES por extração pseudototal, indicaram teores médios de $1,03 \pm 0,14 \mu\text{g g}^{-1}$ para Cu e $4,60 \pm 0,00 \mu\text{g g}^{-1}$ para Zn.

O tratamento controle consistiu exclusivamente na aplicação de solução nutritiva de Hoagland e Arnon ½ força, representando a condição de um ambiente não contaminado, onde a concentração ideal de Zn na solução é de $1,5 \mu\text{M}$ ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e a concentração de Cu é de $1,15 \mu\text{M}$ (CuSO_4). As concentrações utilizadas nos demais tratamentos (Cu: 25, 50 e $100 \mu\text{M}$), (Zn:

100, 200 e 400 μM) e a combinação Cu+Zn, foram definidas com base em estudos ecotoxicológicos que simulam níveis moderados a severos de estresse por elementos traços, compatíveis com áreas costeiras impactadas por deposição de rejeitos de mineração (NAGAJYOTI et al., 2010).

T1 = (controle – solução de Hoagland e Arnon ½ força)
T2 = (solução de Hoagland e Arnon ½ força + Cu 25 μM)
T3 = (solução de Hoagland e Arnon ½ força + Cu 50 μM)
T4 = (solução de Hoagland e Arnon ½ força + Cu 100 μM)
T5 = (solução de Hoagland e Arnon ½ força + Zn 100 μM)
T6 = (solução de Hoagland e Arnon ½ força + Zn 200 μM)
T7 = (solução de Hoagland e Arnon ½ força + Zn 400 μM)
T8 = (solução de Hoagland e Arnon ½ força + Zn 100 μM + Cu 25 μM)
T9 = (solução de Hoagland e Arnon ½ força + Zn 200 μM + Cu 50 μM)
T10 = (solução de Hoagland e Arnon ½ força + Zn 400 μM + Cu 100 μM)

Figura 2 Delineamento experimental para a avaliação de plantas de *Scaevola plumieri* submetidas a dez tratamentos: T1= Controle, T2= Cu 25 μM , T3= Cu 50 μM e T4= Cu 100 μM , T5= Zn 100 μM , T6= Zn 200 μM e T7= Zn 400 μM e combinações T8= Cu+Zn 25+100 μM , T9= Cu+Zn 50+200 μM e T10= Cu+Zn 100+400 μM . Cada tratamento foi composto por cinco repetições, totalizando 50 unidades experimentais.

As variáveis dependentes avaliadas compreenderam parâmetros da expressão relativa do gene da fitoquelatina sintase por PCR quantitativa em tempo real, parâmetros bioquímicos relacionados ao estresse oxidativo, acúmulo de elementos traços, no tecido vegetal, além dos parâmetros fisiológicos de fluorescência da clorofila *a*, índices ópticos de pigmentos (clorofila, flavonoides, antocianinas e índice de nitrogênio/flavonol).

3.2 Análise da expressão relativa do gene da fitoquelatina sintase por PCR em tempo real

3.2.1 Prospecção *in silico* e desenho de primers para o gene da fitoquelatina sintase

A prospecção das sequências gênicas da fitoquelatina sintase foi realizada por meio de análises *in silico* baseadas em homologia, utilizando bancos de dados públicos amplamente consolidados, incluindo o GenBank (NCBI) e o UniProt (SAYERS et al., 2023). Inicialmente, foram selecionadas sequências de fitoquelatina sintase previamente caracterizadas em espécies-modelo amplamente utilizadas em estudos de estresse por metais pesados. Foram priorizadas espécies pertencentes a grupos taxonômicos próximos ou com ocorrência em ambientes de restinga similares aos de *S. plumieri*.

As buscas foram conduzidas utilizando os algoritmos BLASTn e BLASTp, adotando-se como critérios mínimos de similaridade valores de identidade $\geq 60\%$, cobertura de alinhamento $\geq 70\%$. Além desses parâmetros quantitativos, foi priorizada a identificação de regiões com alta similaridade em seus domínios N-terminais, responsáveis pela atividade PCS.

A seleção das espécies de referência incluiu *Arabidopsis thaliana* (WOJAS et al., 2008), *Nicotiana tabacum* (WOJAS et al., 2008), *Ipomoea pes-caprae* (SU et al., 2020) e *Rhizophora mangle* (NUALLA-ONG et al., 2020). Embora essas espécies pertençam a diferentes famílias, sua inclusão foi intencional e direcionada para regiões muito conservadas das sequências de fitoquelatina sintase, especialmente nas regiões estruturais críticas associadas à ligação e detoxificação de metais. Estudos prévios demonstram que essas regiões permanecem altamente conservadas mesmo entre organismos filogeneticamente distantes, permitindo sua utilização como referência para prospecção gênica e desenho de primers em espécies não modelo e na ausência de genoma sequenciado.

Dessa forma, a estratégia metodológica adotada priorizou a conservação funcional e estrutural das metalotioneínas, em detrimento da proximidade taxonômica estrita. Essa abordagem é amplamente empregada em estudos envolvendo plantas nativas e ecologicamente relevantes, nas quais informações genômicas completas ainda não estão disponíveis, e tem se mostrado eficaz para a inferência de padrões de expressão gênica e respostas moleculares a estresses ambientais (CLEMENS, 2006).

3.2.2 Extração de RNA total

Para a extração de RNA total foram utilizadas amostras de folha das plantas submetidas aos tratamentos. Três folhas de cada planta foram coletadas, maceradas em nitrogênio líquido e mantidas em ultrafreezer a -80°C até o momento das análises. Cerca de 100 mg de tecido vegetal foram utilizados para a extração com o RNeasy Plant Mini Kit[®] (Qiagen), seguindo o protocolo do fabricante com adaptações conforme o tipo de amostra.

O material vegetal foi inicialmente homogeneizado em tampão RLT suplementado com β -mercaptoetanol 1%, para inibir RNases e garantir a integridade do RNA. Após etapas de centrifugação e lavagens sequenciais com etanol 96% e com os tampões RW1 e RPE contidos no kit, o RNA foi eluído em 30 μL de água ultrapura livre de RNase e quantificado em espectrofotômetro NanoDrop[®] OneC (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

3.2.3 Purificação do RNA

Após a extração do RNA total, as amostras foram purificadas com a DNase I (Invitrogen, Carlsbad, EUA) conforme o protocolo descrito pelo fabricante, para remoção de traços de DNA presentes na amostra.

3.2.4 Síntese de DNA complementar (cDNA)

A partir 1 μg RNA purificado foi sintetizado o cDNA segundo o protocolo descrito no kit comercial High Capacity cDNA Reverse Transcription[™] (Applied

Biosystems, USA). As amostras foram armazenadas em ultrafreezer a -80°C para as análises posteriores.

3.2.5 Amplificação do gene da fitoquelatina sintase (*pcs*) por RT-qPCR

As reações de PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) foram conduzidas no sistema QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System (Applied Biosystems®), em triplicatas técnicas para cada amostra. O ensaio utilizou o kit Fast SYBR™ Green Master Mix (Invitrogen), preparado em reações de 10 μL , contendo água ultrapura, os primers a 0,5 μM , o corante SYBR™ Green I e ROX como referência passiva e 1 μL de cDNA.

Foram testados diferentes pares de oligonucleotídeos para a amplificação do gene de fitoquelatina sintase (*PCS*). A busca por sequências em outras espécies partiu do fato de que não há na literatura nenhuma sequência de fitoquelatina sintase descrita para *S. plumieri* e esta espécie também não apresenta seu genoma descrito. Considerando que as sequências de fitoquelatina sintase apresentam domínios Cys altamente conservados envolvidos na ligação de elementos traços, a busca inicial concentrou-se em espécies filogeneticamente próximas, cujas sequências foram utilizadas como referência para o desenho dos *primers*.

O programa térmico da reação de qPCR consistiu na ativação inicial há 50°C por 2 minutos, em seguida a ativação da Taq polimerase há 95°C por 2 minutos. Foram 40 ciclos de amplificação com a desnaturação há 95°C por 15 segundos e o anelamento e extensão há 60°C por 1 minuto. Ao final, foi realizada análise da curva de dissociação (*melt curve*) para confirmar a especificidade do produto amplificado e descartar a presença de dímeros de primers ou produtos inespecíficos.

Foram utilizadas sequências derivadas de uma espécie encontrada nas Restingas capixabas, *Ipomoea pes-caprae* (GenBank KX870185.1), para a espécie de manguezal *Rhizophora mucronata* (et al., 2020), mas também foram utilizados oligonucleotídeos já descritos para *Arabidopsis thaliana* (HA et al.,

1999; WOJAS et al., 2008), *Caenorhabditis elegans* (CLEMENS et al., 2001; WOJAS et al., 2008) e tabaco (WOJAS et al., 2008). Como primers de controle endógeno, foram utilizados genes constitutivos como o da ubiquitina (GUO et al., 2016; SU et al., 2020) e o 18S ribossomal (NUALLA-ONG et al., 2020) para normalização das reações (Tabela 1).

Dos diferentes pares de *primers* testados, foi selecionado aquele que resultou em amplificação consistente e produto de tamanho esperado, que foi a sequência determinada para a espécie de manguezal *Rhizophora mucronata* (NUALLA-ONG et al., 2020). As demais combinações testadas apresentaram ausência ou baixa eficiência de amplificação e, portanto, não foram utilizadas nas etapas subsequentes.

Tabela 1 Sequências dos oligonucleotídeos (F-forward e R-reverse) empregadas na PCR quantitativa em *Scaevola plumieri* para a amplificação do gene da fitoquelatina sintetase (*PCS*) e do gene ribossomal 18S.

Nome do primer	Número de acesso GenBank	Descrição do gene	Sequência do primer (5'-3')	Tamanho do amplicon	Referência
18S_RNA_F	MT130935	18S ribossomal	5'-CCGTCCTAGTCTCAACCATAAAC-3'	241	Nualla-Ong et al., 2020
18S_RNA_R		RNA (18s)	5'-GCTCTCAGTCTGTCAATCCTTG-3'		
GSP_PCS_F	MT130710	Phytochelatin synthase	5'-GCCTTGGAGATGGTTTGATG-3'	271	Nualla-Ong et al., 2020
GSP_PCS_R		(pcs)	5'-GCCACCAATAGGTGAAAAATG-3'		

3.2.6 Análise de eficiência e expressão relativa

A eficiência das reações foi determinada por meio de curvas de eficiência obtidas a partir de diluições seriadas do cDNA. A equação foi construída considerando o logaritmo da diluição da amostra versus o Ct (*cycle threshold*) obtido para cada gene. A expressão relativa do gene *PCS* foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), utilizando como referência o gene

constitutivo 18S e os resultados foram expressos em relação às plantas controle de cada tratamento.

3.3 Análise dos elementos traços no tecido foliar

A quantificação de elementos químicos foliares foi realizada pelo Laboratório de Espectrometria Atômica do Departamento de Química da Universidade Federal do Espírito Santo (LEA/UFES), seguindo o protocolo utilizado para determinação de elementos químicos no sedimento, por decomposição pseudototal (USEPA 3051A, 2007), e que foram modificados para a análise das amostras foliares.

As amostras foram analisadas por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) e espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES). O material vegetal referente a cada tratamento foi analisado em três repetições, constituídas por amostras mistas de folhas de cinco plantas por tratamento.

3.4 Capacidade antioxidante

A avaliação da capacidade antioxidante permite compreender o potencial redutor e o papel dos compostos bioativos na neutralização de espécies reativas de oxigênio (EROs) geradas sob estresse por elementos traços.

3.4.1 Quantificação de Compostos Fenólicos Totais (TPC) e Teor total de Flavonóis (TFV)

Para quantificação de compostos fenólicos totais, foi utilizada uma folha de cada planta, que foram coletadas, e congeladas em nitrogênio líquido para evitar oxidação das amostras e posteriormente foram maceradas para serem utilizadas nas análises. A extração foi realizada a partir de 0,05 g de tecido vegetal fresco em 1,0 mL de metanol 50% (metanol/água ultrapura).

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu (WOISKY, SALATINO, 1998), com modificações. Uma alíquota

de 25 μL do extrato foi adicionada a 125 μL do reagente de Folin-Ciocalteu (diluição 1:10) e 100 μL de carbonato de sódio a 4%. A reação foi incubada no escuro, por 1 h, à temperatura ambiente, e a absorbância lida a 740 nm em leitor de microplaca (Epoch 2, BioTek, EUA). Os resultados foram expressos como mg de equivalentes de ácido gálico (GAE) por 100 g de massa fresca.

A análise do teor de flavonóis totais foi determinada segundo Dowd (1959), com modificações. Uma alíquota de 50 μL do mesmo extrato utilizado para a quantificação de compostos fenólicos foi misturada a 50 μL de AlCl_3 a 10% e 50 μL de acetato de sódio 1 M, sendo a mistura incubada à temperatura ambiente por 45 min.

A absorbância foi lida a 415 nm em leitor de microplaca Elisa (Epoch 2, BioTek, EUA). A quantificação foi realizada com base em uma curva padrão de quercetina (0–100 $\mu\text{g L}^{-1}$), e os resultados expressos como mg de equivalentes de quercetina (QE) por 100 g de massa fresca.

3.4.2 Ensaio do poder antioxidante

A capacidade antioxidante foi avaliada pelos métodos FRAP e DPPH, que se baseiam em mecanismos diferentes de ação antioxidante. A aplicação de ambos é importante, pois o FRAP quantifica o poder redutor total, enquanto o DPPH estima a capacidade sequestradora de radicais livres, permitindo uma avaliação da capacidade antioxidante.

Para a determinação da capacidade antioxidante por meio da redução férrica (FRAP-Ferric Reducing Antioxidant Power), o ensaio foi realizado de acordo com Rufino et al. (2006). A extração foi realizada a partir de 0,1 g de tecido vegetal macerado em eppendorf de 2,0 mL, e ressuspendido em 2 mL de metanol 50%, seguida de repouso por 1 hora ao abrigo da luz e posteriormente centrifugada (15.000 rpm, 15 min, 4 °C). O reagente FRAP foi preparado pela combinação de 25 mL de tampão acetato 0,3 M (pH 3,6), 2,5 mL de solução de 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) (10 μM em HCl 40 μM) e 2,5 mL de solução aquosa de cloreto férrico 20 μM , preparado no momento do uso. A reação foi

conduzida misturando 45 μL de extrato, 135 μL de água destilada e 1,35 mL do reagente FRAP, seguida de incubação em banho-maria a 37 °C por 30 min. As leituras foram realizadas a 595 nm em leitor de microplaca (Epoch 2, BioTek, EUA). Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol FeSO}_4$ por 100 g de massa fresca.

O mesmo extrato utilizado no FRAP foi empregado para o ensaio com 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) (PIRES et al., 2017). Uma alíquota de 100 μL do extrato foi adicionada a 200 μL da solução de DPPH (80 μM em metanol), e a mistura incubada por 30 min ao abrigo da luz. A absorbância foi lida a 517 nm em leitor de microplaca (Epoch 2, BioTek, EUA). A curva de calibração foi construída com DPPH (0 a 12,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Os resultados foram expressos em μg de equivalentes de Trolox por g de massa fresca.

3.4.3 Peroxidação lipídica

A análise da peroxidação lipídica, isto é, dos danos oxidativos foi realizada por meio da concentração de malondialdeído (MDA), uma espécie reativa do ácido tiobarbitúrico (TBARS). O protocolo de extração utilizado seguiu o que foi descrito por Cakmak; Horst (1991) e Lima et al. (2002), com alterações. Aproximadamente 50 mg de tecido foliar fresco foram macerados em presença de PVPP (~6%) e extraídos em ácido tricloroacético (TCA) 0,1%. As amostras foram homogeneizadas, mantidas em gelo e centrifugadas a 12.000 \times g, 4 °C, por 15 minutos, sendo coletado o sobrenadante.

Para a reação, 500 μL do sobrenadante foram misturados a 1 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5% em TCA 20% e incubados em banho-maria a 90 °C por 30 minutos. Em seguida, as amostras foram resfriadas em gelo (10 min) e centrifugadas a 3.000 \times g, 15 minutos na temperatura de 4°C. Como branco, utilizou-se TCA 0,1% em substituição ao extrato vegetal. A leitura da absorbância foi realizada em microplaca nos comprimentos de onda de 532 nm, com correções em 600 nm e 440 nm. Os valores corrigidos foram convertidos para concentração de MDA e expressos em nmol de MDA g^{-1} de massa fresca.

3.5 Fluorescência da clorofila *a*

Para analisar a eficiência fotossintética foi usada a fluorescência da clorofila *a*, estimada em folhas de plantas de *S. plumieri* submetida a diferentes concentrações de Cu, Zn, e a combinação de Cu+Zn. Foi utilizado um fluorômetro portátil (HandyPEA, Hansatech Instruments, King's Lynn, Norkfolk, UK) em folhas jovens totalmente expandidas, entre 7 e 9h (horário solar). Antes das leituras, as folhas foram adaptadas ao escuro por 40 minutos, utilizando cliques foliares, para a completa oxidação dos centros de reação.

Após esse tempo, as plantas foram expostas por 1 s a um pulso saturante de luz de $3000 \mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, com comprimento de onda de 650 nm, com excitação suficiente para reduzir todos os centros de reação do FSII, (STRASSER e STRASSER., 1995; STRASSER et al., 2004). As medidas foram realizadas duas vezes durante o período do experimento, aos 5 e 25 dias após a primeira aplicação dos tratamentos. Os resultados da cinética de fluorescência foram analisados no software PEA Plus v.1.13 e posteriormente tabulados e analisados graficamente no Microsoft Excel[®] (Microsoft Corporation, Redmond, WA, EUA). Os parâmetros de fluorescência da clorofila *a* que foram analisados estão apresentados na tabela 2.

3.6 Conteúdo relativo de clorofila, antocianina, flavonoides e índice de nitrogênio/flavonol

A estimativa *in vivo* dos teores de clorofila (Chl), flavonoides (Flv), antocianinas (Anth) e índice de nitrogênio/flavonol (NFI) foi realizada utilizando um medidor multi pigmentos (Modelo MPM-100, ADC BioScientific Ltd, Reino Unido) em cinco folhas jovens totalmente expandidas. As medições foram realizadas apenas na região do limbo foliar, evitando a nervura central (CEROVIC et al., 2008). Os resultados baseiam-se na medição da transmitância e reflectância foliar em diferentes comprimentos de onda, combinando bandas do visível e do infravermelho próximo.

Tabela 2 Definição de termos e fórmulas usadas pelo teste JIP para a análise do transiente de fluorescência da Chl a OJIP, emitido por amostras fotossintéticas (BUSSOTTI et al., 2020; STRASSER et al., 2004).

Parâmetro	Fórmula	Significado
F_0	$\approx 20 \mu s$	Fluorescência mínima (obtida de uma amostra adaptada ao escuro) quando todos os centros de reação do FSII estão abertos.
F_M	$= F_P$	Intensidade da fluorescência máxima registrada, no pico P da curva OJIP, quando todos os centros de reação do FSII estão fechados.
V_j	-	Valor relativo da fluorescência no ponto J da curva OJIP.
F_v/F_0	$= (F_M - F_0) / F_0$	Razão entre a fluorescência variável e a fluorescência mínima, reflete a eficiência de doação de elétron para os centros de reação do FSII e a taxa de conversão quântica fotossintética.
dVG/dt_0	-	Taxa de transferência de energia de excitação entre os centros de reação.
ABS/RC	$= M_0 \times (1/V_j) \times (1/\phi P_0)$	Dissipação de energia por centro de reação. Está relacionado a uma energia de excitação maior do que a taxa de transporte de elétrons.
TR_0/RC	$M_0(1/V_j)$	Fluxo de captura da energia luminosa por centro de reação ativo (levando à redução da Quinona A [Q_A]) por Centro de Reação Ativo (RC).
DI_0/RC	$= ABS/RC - TR_0/RC$	Fluxo de dissipação de energia por RC ativo (em $t=0$).
ET_0/RC	$M_0 \times (1/V_j) \times (1 - V_j)$	Fluxo de transporte de elétrons por RC ativo.
ϕP_0	$= TR_0/ABS = [1 - (F_0/F_M)]$	Rendimento quântico máximo do início da etapa fotoquímica em um tempo zero ($t=0$). Indica a probabilidade de capturar a energia dos fótons absorvidos pelos RC do FSII.
ϕE_0	$1 - F_j/F_m = ET_0/ABS$	Rendimento quântico do transporte de elétrons. Indica a fração da energia absorvida que resulta no transporte de elétrons para além do Q_A .
δR_0	$= RE_0/ET_0 = (1 - V_i) / (1 - V_j)$	Eficiência para mover um elétron de uma Plastoquinona reduzida (Q_A^-) para o lado aceitador do FSI.
PI_{ABS}	$(RC/ABS) \times TR_0/DI_0 \times ET_0 / (TR_0 - ET_0)$	Índice de performance com base na absorção. Representa o desempenho potencial do FSII.
PI_{total}	$PI_{ABS} \times \delta R_0 / 1 - \delta R_0$	Índice de desempenho para conservação de energia a partir de fótons absorvidos pelo FSII até a redução dos aceptores de elétrons finais. Índice de Desempenho da Cadeia Transportadora de Elétrons

O equipamento utiliza a razão de fluorescência para medir o conteúdo de antocianina e o conteúdo de flavonol; a transmissão foliar no vermelho distante e no infravermelho próximo para medir o conteúdo de clorofila; e usa as medições resultantes de conteúdo de clorofila e flavonol para determinar o índice de nitrogênio/flavonol (NFI). Este índice reflete o equilíbrio entre o conteúdo de nitrogênio e compostos fenólicos nas folhas.

3.7 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas no software R v.4.5.1 (R Core Team, 2023), os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$), após a verificação dos pressupostos de normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias. Quando constatadas diferenças significativas entre os tratamentos, as médias foram agrupadas pelo teste de Scott-Knott (1974), permitindo a formação de grupos homogêneos. A representação gráfica dos resultados foi elaborada no próprio ambiente R, utilizando recursos de visualização para melhor interpretação dos dados.

4 Resultados

4.1 Análise da expressão do gene da fitoquelatina sintase putativa

A Figura 3 apresenta a variação de temporal da expressão relativa do gene fitoquelatina sintase em *S. plumieri* sob exposição de diferentes concentrações de Cu, Zn e da combinação Cu+Zn, avaliadas aos 5 e 25 dias após o início do tratamento. A análise de expressão gênica por RT-qPCR demonstrou que, no tratamento com Cu, modulou significativamente a transcrição do gene putativo da enzima fitoquelatina sintase, responsável pela síntese de fitoquelatinas. Observou-se, no 5º dia, aumento significativo da expressão nas plantas sob o tratamento T3 (50 µM).

No 25º dia de exposição, verificou-se redução dos níveis de expressão em todos os tratamentos, sendo o menor valor observado em T4 (100 µM). Esse padrão temporal evidencia que houve uma redução da transcrição do gene da

PCS com o aumento da concentração de Cu aplicado, sendo estatisticamente semelhante no mesmo tratamento no 5º dia. Nos tratamentos com Zn (Figura 3B), a expressão relativa do PCS seguiu tendência semelhante ao encontrado no tratamento com Cu. No 5º dia, o tratamento T5 (100 µM) apresentou o maior valor de expressão relativa entre todos os tratamentos avaliados, sendo significativamente maior em relação ao controle. No 25º dia, houve redução significativa em relação ao 5º dia, sob a mesma concentração.

O tratamento de T6 (200 µM) apresentou valores mais baixos em ambos os dias avaliados em comparação a T5, no entanto no 25º dia houve um aumento significativo em relação ao 5º dia. De maneira geral, após 25 dias, houve queda generalizada na expressão confirmando que a forte indução inicial foi transitória e não se manteve ao longo do tempo. O tratamento T7 (400 µM) foi marcado com uma cruz devido à morte das plantas antes da coleta, indicando toxicidade da concentração para as plantas.

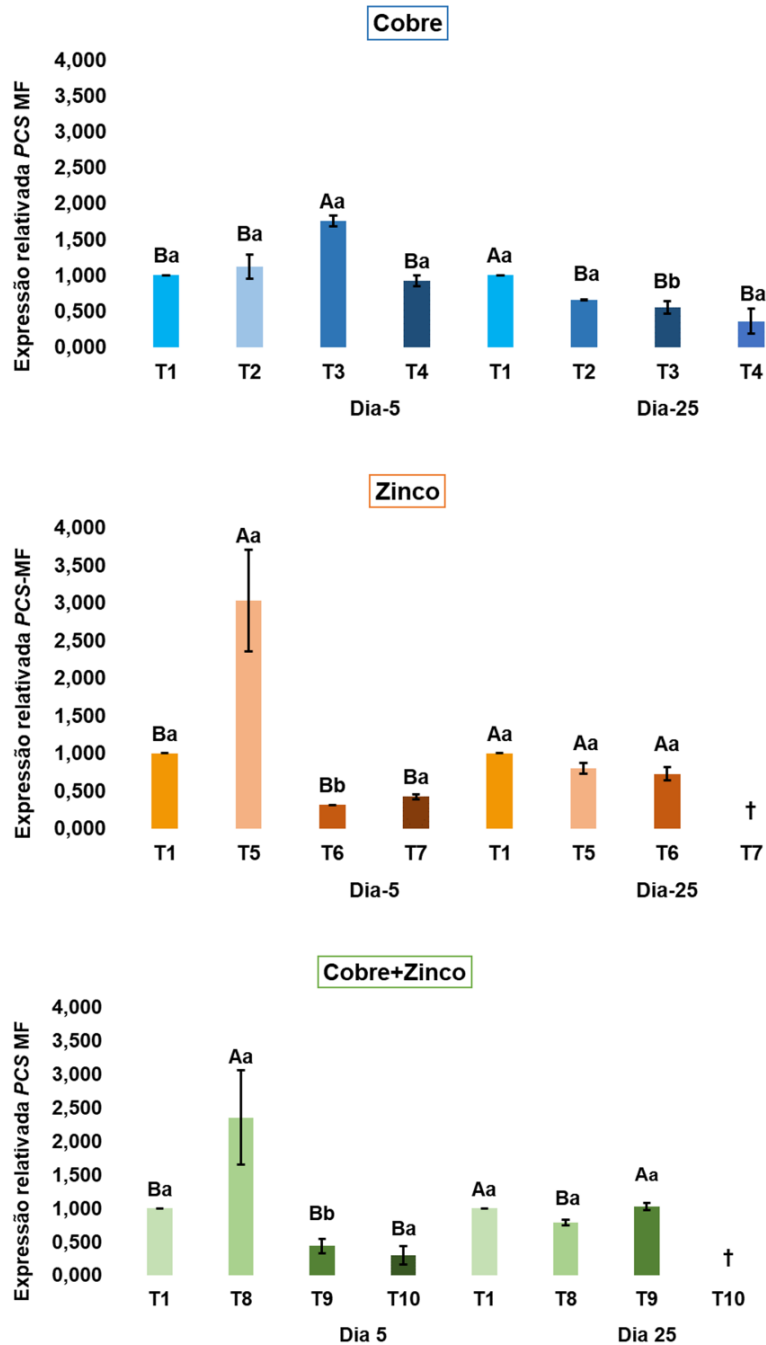


Figura 3 Variação temporal da expressão relativa do gene da PCS (fitoquelatina sintase) em folhas de *Scaevola plumieri* submetidas a tratamentos com Cu: T2, T3 e T4, Zn: T5, T6 e T7 e à combinação Cu+Zn: T8, T9 e T10 no 5º e 25º dia de exposição. Cada coluna representa a média e as barras verticais indicam o erro padrão. A expressão foi normalizada em relação ao gene de referência 18S e calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, considerando o controle como referência para os cálculos da expressão relativa. A (†) nos gráficos representa a morte das plantas nos tratamentos de T7 e T10 antes da medida do dia 25. Letras maiúsculas diferentes sobre as barras indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos e letras minúsculas indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos no 5º dia e no 25º dia ($p < 0,05$; Scott-Knott) ($n = 3$).

Sob a combinação de Cu+Zn (Figura 3C), verificou-se padrão semelhante, com forte indução inicial seguida por redução em concentrações mais elevadas e em períodos prolongados. Aos 5 dias após a aplicação das soluções, o tratamento T8 (25+100 μM) apresentou o valor mais significativamente elevado de expressão relativa, no entanto o mesmo tratamento foi significativamente menor no 25º dia se comparado ao controle, conseqüentemente menor que o mesmo no 5º dia.

Os tratamentos T9 (50+200 μM) e T10 (100+400 μM) não foram significativamente diferentes em relação ao controle, no entanto, no 25º dia, houve um aumento significativo da expressão relativa sob a concentração de 50+200 μM em relação ao controle e ao mesmo tratamento no 5º dia. Por outro lado no 25º dia, observou-se mortalidade de plantas sob a concentração de T10, simbolizada também por com uma cruz.

4.2 Análise dos elementos traços no tecido foliar

A análise da concentração de elementos traços nas folhas de *S. plumieri* evidenciou respostas distintas ao estresse por Cu, Zn e suas combinações (Tabela 3). No experimento com cobre (Cu), as plantas do tratamento T1 (controle) apresentaram teor de Cu de 7,6 $\mu\text{g g}^{-1}$ de massa seca. A aplicação isolada de Cu promoveu um acúmulo expressivo e dependente da concentração desse elemento nos tecidos foliares. Em contraste, nos tratamentos com aplicação isolada de zinco (Zn), os teores de Cu permaneceram baixos.

No experimento com zinco, o tratamento controle apresentou teor foliar de Zn de 12,6 $\mu\text{g g}^{-1}$ de massa seca. Nos tratamentos com aplicação exclusiva de Cu, os teores de Zn permaneceram próximos aos valores do controle. Em contraste, os tratamentos com Zn isolado promoveram acúmulo elevado e dose-dependente, atingindo valores significativos sendo de 8233 $\mu\text{g g}^{-1}$ massa seca no tratamento T7 (400 μM). Nos tratamentos com a combinação dos elementos traços (Cu+Zn), os teores de Cu e Zn separadamente permaneceram elevados.

Tabela 3 Concentração média de Cu, Zn no tecido foliar de *Scaevola plumieri* submetida a diferentes tratamentos com Cu, Zn e a combinação Cu+Zn, avaliados em base de massa seca ($\mu\text{g g}^{-1}$). Os tratamentos consistem no T1 (Controle), T2 (Cu 25 μM), T3 (Cu 50 μM), T4 (Cu 100 μM), T5 (Zn 100 μM), T6 (Zn 200 μM), T7 (Zn 400 μM), T8 (Cu+Zn 25+100 μM), T9 (Cu+Zn 50+200 μM), T10 (Cu+Zn 100+400 μM) (n = 5). Valores representam média \pm erro padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$; Scott-Knott) (n=3).

Tratamentos	Cobre ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Zinco ($\mu\text{g g}^{-1}$)
T1	7,6 \pm 0,8 c	12,6 \pm 4,3 c
T2	1173,2 \pm 36,5 b	43,9 \pm 3,7 c
T3	1428,4 \pm 46,4 a	57,6 \pm 6,9 c
T4	5518,7 \pm 55,5 a	37,0 \pm 7,6 c
T5	6,3 \pm 1,4 c	3453,0 \pm 116,4 b
T6	7,7 \pm 2,1 c	3807,0 \pm 166,3 b
T7	5,8 \pm 1,0 c	8232,8 \pm 168,8 a
T8	530,7 \pm 50,5 c	4733,2 \pm 119,5 b
T9	898,5 \pm 41,9 b	5005,9 \pm 148,9 a
T10	1561,3 \pm 55,6 a	6320,4 \pm 167,9 a

4.3 Capacidade antioxidante- Quantificação de Compostos Fenólicos Totais (CFT)

No tratamento com Cu (Figura 4A), foi possível observar um aumento significativo de compostos fenólicos dependente tanto da dose quanto do tempo de exposição ao elemento. As plantas do controle apresentaram o menor teor de compostos fenólicos, representando o nível mínimo para o metabolismo antioxidante neste experimento, em condições sem estresse. Nos tratamentos com T2, T3 e T4, observou-se, já no 5º dia de exposição um aumento significativo na síntese de compostos fenólicos, sendo todos os tratamentos significativamente maiores que o controle.

Após 25 dias, os valores foram ainda mais expressivos, com todos os tratamentos sendo significativamente maiores em relação a eles mesmo no 5º dia, com destaque para a concentração de T4, que teve o maior valor em relação a T1. Para os tratamentos com Zn (Figura 4B) no 5º dia as plantas exibiram aumento expressivo do conteúdo de compostos fenólicos. O tratamento T5 apresentou o maior valor de concentração de fenólicos, sendo significativamente maior que o controle e as demais concentrações. Os tratamentos de T6 e T7 apresentaram valores significativamente maiores que T1, por outro lado, não significativamente diferentes, quando comparados.

Após 25 dias de exposição, o acúmulo foi ainda mais significativo e dependente da dose, com aumento significativo dos valores sob as concentrações de tratamento T5 e T6 em relação ao 5º dia. As plantas do tratamento 400 µM Zn morreram, sugerindo que concentrações muito elevadas de Zn podem limitar a capacidade biossintética ou provocar colapso metabólico.

Já para os tratamentos combinados (Figura 4C), no 5º dia, os tratamentos T8 (25+100 µM), T9 (50+200 µM), T10 (100+400 µM) apresentaram valores dose-dependentes, sendo todos significativamente maiores T1, com o maior valor sendo observado nas plantas tratadas com as maiores concentrações de ambos os elementos (T10). Após 25 dias, a resposta foi ainda mais acentuada, com as plantas do tratamento intermediário T9 atingindo o maior valor dentre os demais, sendo significativamente maior em relação ao controle e ao 5º dia, revelando uma resposta tempo dependente da produção de compostos fenólicos. Assim como no tratamento com Zn, as plantas sob concentração combinada de T10 morreram antes das medidas dos 25º dia.

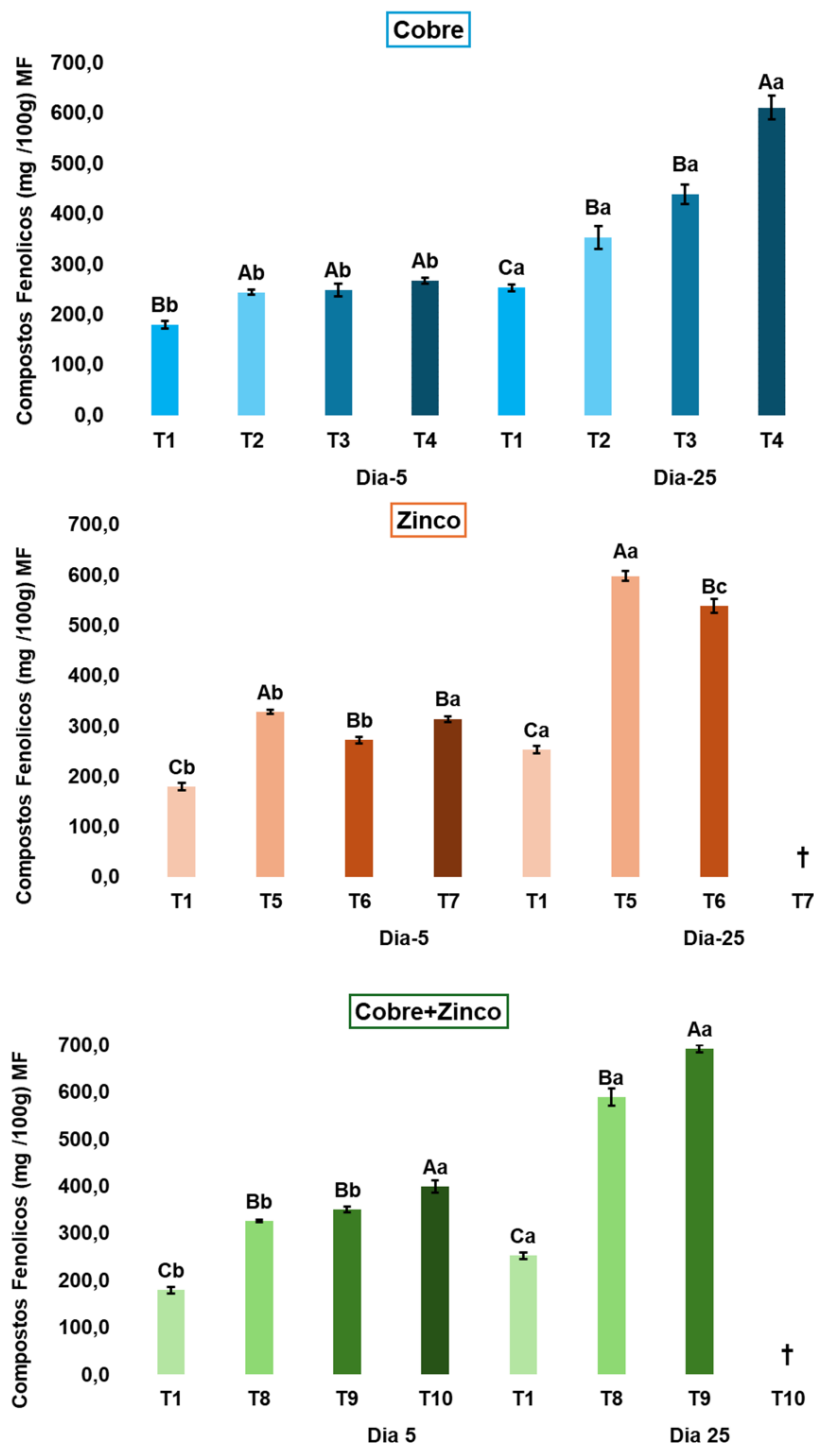


Figura 4 Teores de compostos fenólicos totais ($\text{mg } 100 \text{ g}^{-1} \text{ MF}$) em folhas de plantas de *Scaevola plumieri* submetidas a tratamentos com Cu: T2, T3 e T4, Zn: T5, T6 e T7 e à combinação Cu+Zn: T8, T9 e T10 no 5º e 25º dia de exposição. A (†) nos gráficos representa a morte das plantas nos tratamentos de T7 (400 μM) e T10 (100+400 μM) antes da medida do dia 25. As colunas representam a média \pm erro padrão. Letras maiúsculas diferentes sobre as barras indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos e letras minúsculas indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos no 5º dia e no 25º dia ($p < 0,05$; Scott-Knott) ($n = 3$).

4.4 Capacidade antioxidante-Teor total de Flavonóis (TTF)

A quantificação de flavonóis totais (Figura 5) em *S. plumieri* revelou alterações significativas em resposta aos tratamentos com Cu, Zn e à combinação Cu+Zn (Figura 5). No tratamento com Cu (Figura 5A), após 25 dias, houve um aumento significativo em todos os tratamentos em relação ao controle, sendo o maior valor apresentado pelo Cu 100 μ M, entretanto, não houve diferença significativa entre os tratamentos ao longo dos dias.

Esse resultado sugere que o Cu induziu uma baixa resposta de flavonóis em concentrações menores. No tratamento com Zn (Figura 5B), é possível observar uma indução mais intensa da síntese de flavonóis. No 5º dia, todos os tratamentos apresentaram valores significativamente maiores no teor total de flavanóides. Aos 25 dias, os valores foram relativamente maiores em comparação ao 5º dia, no entanto, não apresentou diferença significativa. Com exceção do o tratamento T7 que as plantas morreram antes da coleta destrutiva. Esses resultados indicam que o Zn foi um indutor mais eficiente da via biossintética de flavonóis.

Na exposição combinada Cu+Zn (Figura 5C), aos 5 dias, o valor de flavonóis em todos os tratamentos foram significativamente maiores em relação a o controle. Após 25 dias, os tratamentos T8 e T9 registraram os maiores valores observados em relação aos flavonóis, sendo significativamente maiores que o controle, e que os mesmos no 5º dia.

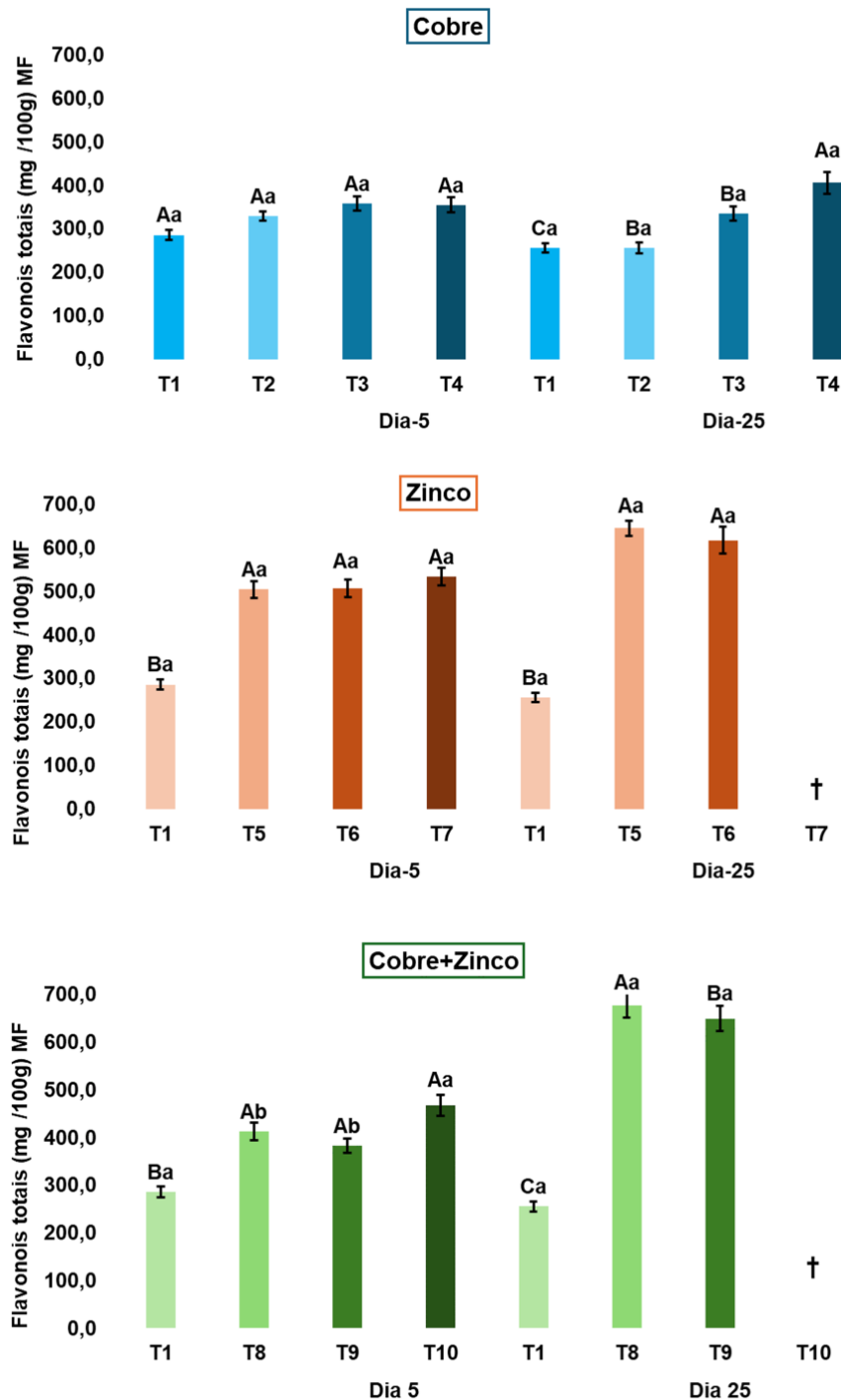


Figura 5 Teores de flavonóis totais ($\text{mg } 100 \text{ g}^{-1} \text{ MF}$) em folhas de *Scaevola plumieri* submetidas a tratamentos com Cu: T2, T3 e T4, Zn: T5, T6 e T7 e à combinação Cu+Zn: T8, T9 e T10 no 5º e 25º dia de exposição. A (†) nos gráficos representa a morte das plantas nos tratamentos de T7 (400 μM) e T10 (100+400 μM) antes da medida do dia 25. As colunas representam a média \pm erro padrão. Letras maiúsculas diferentes sobre as barras indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos e letras minúsculas indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos no 5º dia e no 25º dia ($p < 0,05$; Scott-Knott) ($n = 3$).

4.5 Ensaio FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

A análise do poder antioxidante pelo método FRAP revelou um aumento significativo nos valores em relação ao controle na maioria dos tratamentos com Cu, tanto no quinto quanto no vigésimo quinto dia (Figura 6). No quinto dia, os tratamentos com Cu (Figura 6A) todos os tratamentos apresentaram diferença significativa em relação ao controle. Após 25 dias, a resposta antioxidante se intensificou ainda mais, e nas plantas do tratamento T3 (50 μM) e T4 (100 μM) apresentaram diferença significativa em relação ao controle do mesmo dia.

Nos tratamentos com Zn (Figura 6B), após cinco dias de exposição, observou-se aumento dose-dependente onde a maior atividade antioxidante observada nesse dia foi no tratamento, no entanto, não foi significativamente distinto dos outros tratamentos.

25º dia, os valores de FRAP se mantiveram elevados exceto no tratamento Zn 400 μM onde as plantas morreram antes de chegar aos 25 dias de experimento. Para os tratamentos com variação exclusiva deste elemento, o destaque foi para as plantas tratadas com T5 (100 μM), que apresentaram a maior atividade antioxidante relativa em relação às plantas do controle, e foi significativamente maior se comparado ao 5º dia.

A exposição combinada a Cu e Zn (Figura 6C) resultou em aumento expressivo da capacidade antioxidante com o aumento da dosagem combinada dos elementos. No 5º dia, após, os tratamentos apresentaram elevação gradual em função da concentração, o tratamento T10 (100+400 μM) foi significativamente maior que o controle e os demais tratamentos. No 25º dia, a atividade antioxidante foi ainda mais elevada, com o aumento significativo nas concentrações de T8 (25+100 μM) e T9 (50+200 μM), em relação ao 5º dia.

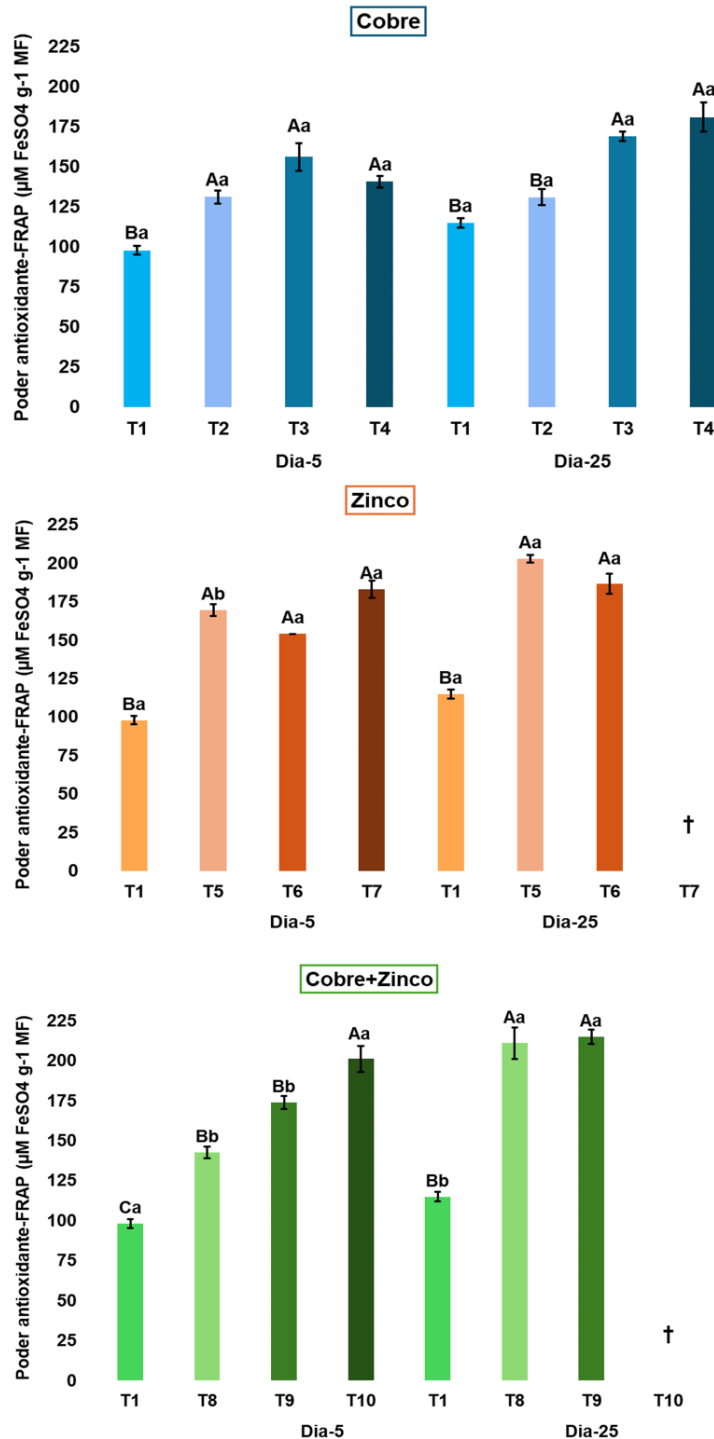


Figura 6 Poder redutor total (FRAP, $\mu\text{M g}^{-1}$ MF) em folhas de *Scaevola plumieri* submetidas a tratamentos com Cu: T2, T3 e T4, Zn: T5, T6 e T7 e à combinação Cu+Zn: T8, T9 e T10 no 5º e 25º dia de exposição. A (†) nos gráficos representa a morte das plantas nos tratamentos de T7 e (400 μM) e T10 (100+400 μM) antes da medida do dia 25. As colunas representam a média \pm erro padrão. Letras maiúsculas diferentes sobre as barras indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos e letras minúsculas indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos no 5º dia e no 25º dia ($p < 0,05$; Scott-Knott) ($n = 3$).

4.6 Sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH)

A capacidade antioxidante avaliada pelo sequestro do radical DPPH, apresentou redução progressiva e significativa em *S. plumieri* submetida ao estresse por Cu (Figura 7). No quinto dia de exposição, os tratamentos com Cu (Figura 7A) já mostraram queda em relação ao controle, onde todos tratamentos foram significativamente menores. Aos 25 dias o comportamento foi semelhante.

Em relação as plantas submetidas ao estresse por Zn (Figura 7B), assim como no tratamento com o Cu, ocorreu uma queda na atividade antioxidante em relação ao controle. As maiores concentrações de Zn refletiram menores valores de DPPH. No 5º dia de exposição, os tratamentos T5, T6 e T7 apresentaram reduções graduais e dose-dependentes. No 25º dia, a atividade antioxidante foi ainda mais comprometida, sobretudo nos tratamentos de maior concentração.

A exposição simultânea a Cu e Zn (Figura 7C), no 5º dia de exposição, mostrou queda nos valores do DPPH, o que indica que a interação entre os dois elementos impôs estresse oxidativo nas plantas. No 25º dia a atividade antioxidante permaneceu comprometida o que indica uma queda progressiva entre o 5º e 25º dia.

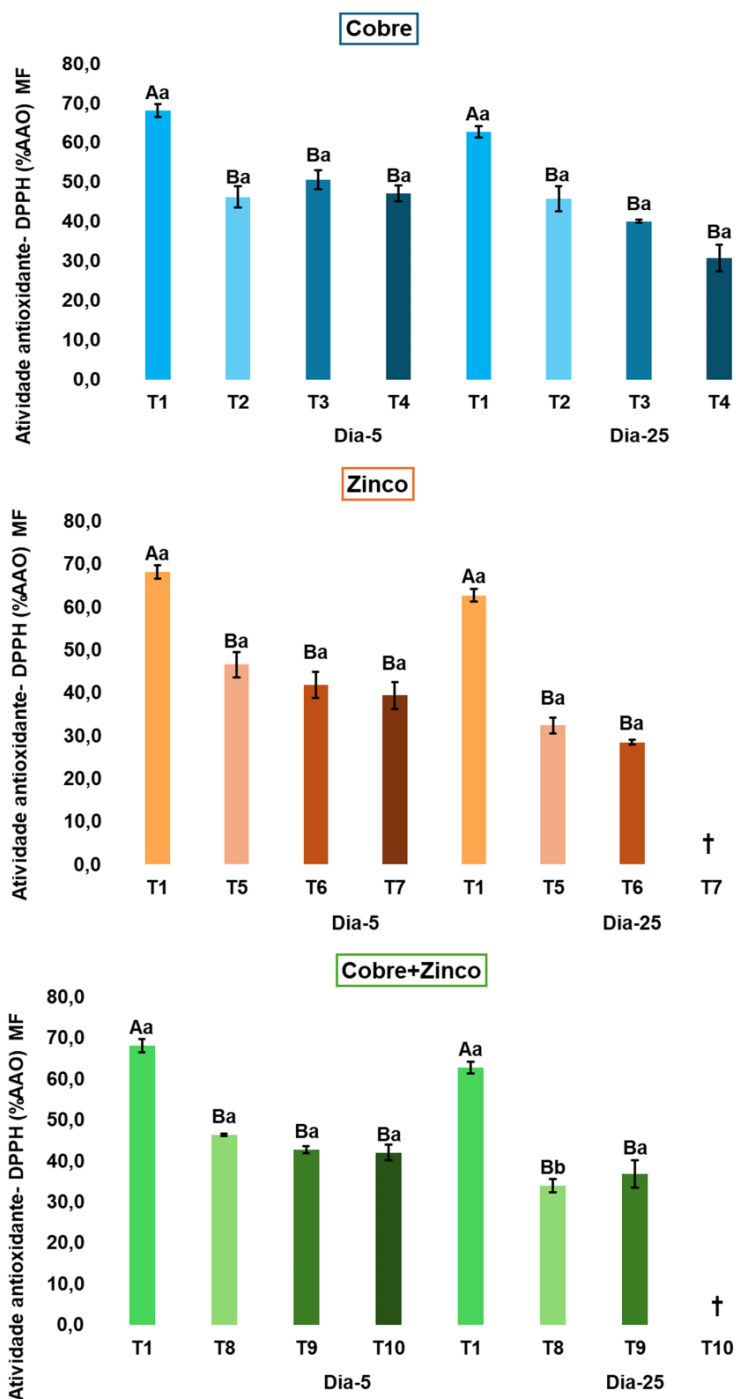


Figura 7 Capacidade sequestradora de radicais livres (método DPPH, %AAO- MF) em folhas de *Scaevola plumieri* submetidas a tratamentos com Cu: T2, T3 e T4, Zn: T5, T6 e T7 e à combinação Cu+Zn: T8, T9 e T10 no 5º e 25º dia de exposição. A (†) nos gráficos representa a morte das plantas nos tratamentos de T7 (400 µM) e T10 (100+400 µM) antes da medida do dia 25. Valores representam média ± erro padrão. Letras maiúsculas diferentes sobre as barras indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos e letras minúsculas indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos no 5º dia e no 25º dia ($p < 0,05$; Scott-Knott) ($n = 3$).

4.7 Peroxidação lipídica

No tratamento com Cu, a quantificação de MDA, que indica peroxidação lipídica, no quinto dia de exposição, os tratamentos T2 e T3 apresentaram níveis de MDA estatisticamente semelhante ao controle, o que indica que em concentrações baixas o Cu não causou elevação expressiva da peroxidação lipídica. Já no tratamento T4 os níveis de MDA foram significativamente maior que o controle.

No vigésimo quinto dia, os efeitos foram mais significativos e as diferenças entre as doses ficaram mais claras. O tratamento T2 (Figura 8A) manteve valores de MDA próximos ao controle, o mesmo ocorreu para as plantas sob o tratamento de T3, contudo, o mesmo apresentou aumento significativo em relação ao 5° dia. Esse mesmo padrão foi observado para o tratamento T4, indicando o aumento da peroxidação com o aumento do tempo de exposição a elevadas concentrações de cobre. Nos tratamentos com Zn, no quinto dia (Figura 8B), os tratamentos não apresentaram diferença significativa em relação ao controle. Indicando que a exposição inicial ao zinco não levou a peroxidação lipídica.

No 25° dia, os níveis de MDA nas plantas tratadas com o tratamento T5 permaneceram próximos ao controle. Em contrapartida, no tratamento T7 as plantas morreram, e no tratamento T6 houve um aumento significativo do conteúdo de MDA em relação as plantas do controle, o que indica que concentrações elevadas provocaram maior extravasamento de eletrólitos devido aos danos causados no plasmalema, prejudicaram o metabolismo das plantas levando ao colapso.

Os níveis de MDA em *S. plumieri* submetida à combinação de Cu e Zn (Figura 8C) mostraram, no quinto dia, uma redução significativa o tratamento T8 em relação ao controle, sugerindo que a combinação em baixa concentração não promoveu aumento de peroxidação lipídica, o mesmo pode se observar para o tratamento T9 que não divergiu significativamente do controle. Em contrapartida, T10 registrou o maior acúmulo precoce, sendo significativamente maior que o controle.

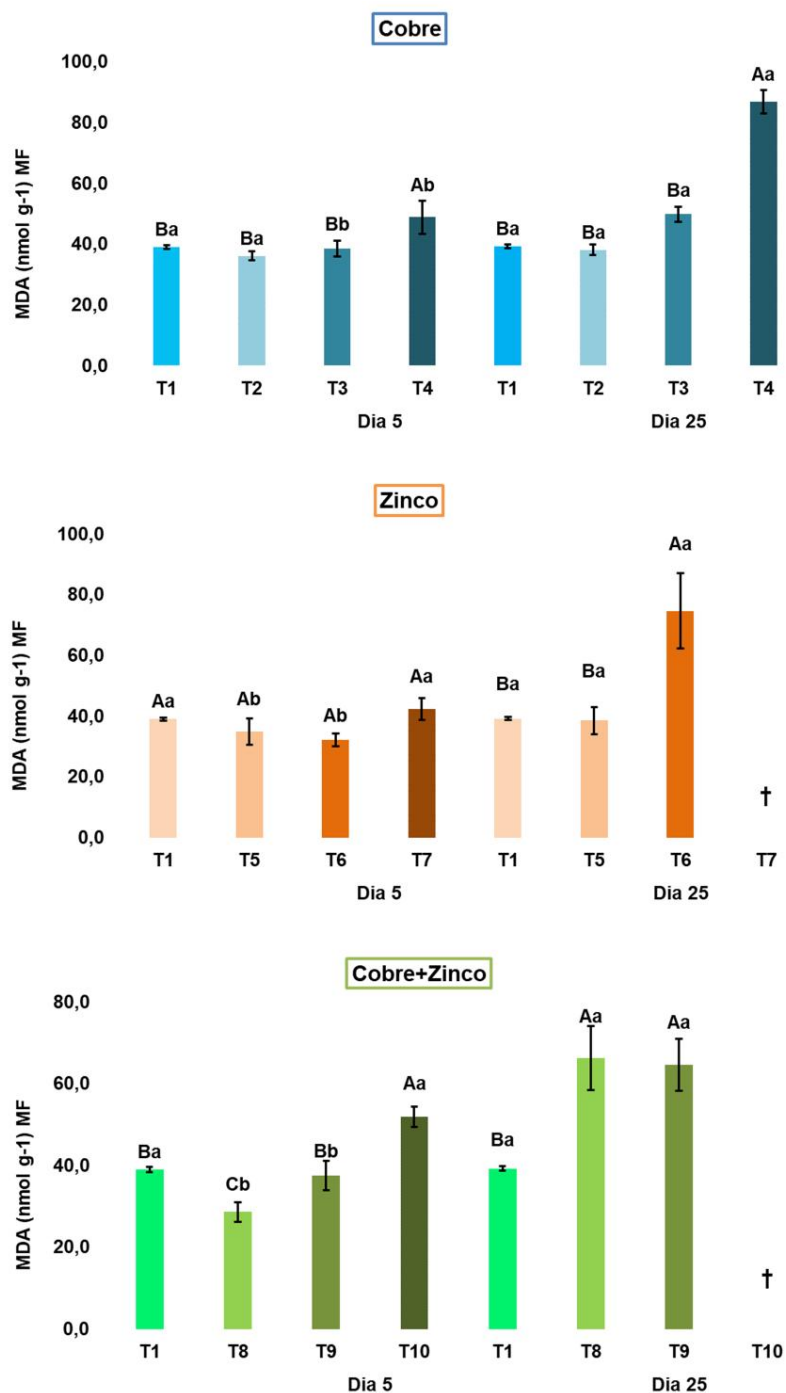


Figura 8 Teores de malondialdeído (MDA, nmol g^{-1} MF) em folhas de *Scaevola plumieri* submetidas a tratamentos com Cu: T2, T3 e T4, Zn: T5, T6 e T7 e à combinação Cu+Zn: T8, T9 e T10 no 5º e 25º dia de exposição. A (†) nos gráficos representa a morte das plantas nos tratamentos de T7 (400 μM) e T10 (100+400 μM) antes da medida do dia 25. Valores representam média \pm erro padrão. Letras maiúsculas diferentes sobre as barras indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos e letras minúsculas indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos no 5º dia e no 25º dia ($p < 0,05$; Scott-Knott) ($n = 3$).

Após 25 dias, a intensidade da resposta aumentou significativamente, principalmente nos tratamentos com maior concentração do elemento traço. Indicando uma resposta influenciada pelo tempo de exposição a altas concentrações dos elementos.

4.8 Fluorescência da clorofila a

As curvas OJIP obtidas pela fluorescência da clorofila a mostram a conformação típica demonstrando que as plantas estavam fotossinteticamente ativas (Figura 9). A normalização dos dados entre o ponto O e o ponto P (Figura 9 E e F) evidencia diferenças positivas no ponto J nos tratamentos com Zn e na combinação de Cu e Zn.

Nos tratamentos T7 e T10 as plantas morreram antes da realização da medida do 25° dia. Na fase I, foi observada variação entre os tratamentos, em especial, T9 que apresentou um aumento mais acentuado da fluorescência, comparando a medida do 5° dia com a do 25°. Os tratamentos T2 (25 μ M), Cu T3 (50 μ M) e T4 (100 μ M), mantiveram menores amplitudes nos pontos J e I, o que sugere maior eficiência no transporte de elétrons.

Além das curvas obtidas após a normalização dos dados (V_t) e dupla normalização se obteve a diferença da fluorescência variável relativa (ΔV_t) a diferenças entre curvas duplamente normalizadas são comumente calculadas o que permite identificar curvas adicionais também chamadas de bandas. Essas novas curvas (bandas) são consideradas relacionadas à componentes específicos da cadeia transportadora de elétrons. Foram encontradas curvas entre os passos O-K (banda L), entre os passos O-J (banda K), entre os passos J-I (banda H) e entre os passos I-P (banda G).

Observa-se na Figura 10A e B a banda L positiva sendo mais positiva no tratamento T8 aos 25 DAT. As bandas K (figuras C,D) possuem quase todas uma diferença positiva destacando-se dentre os diferentes tratamentos o T4 com uma parte da curva negativa e a diferença positiva menor.

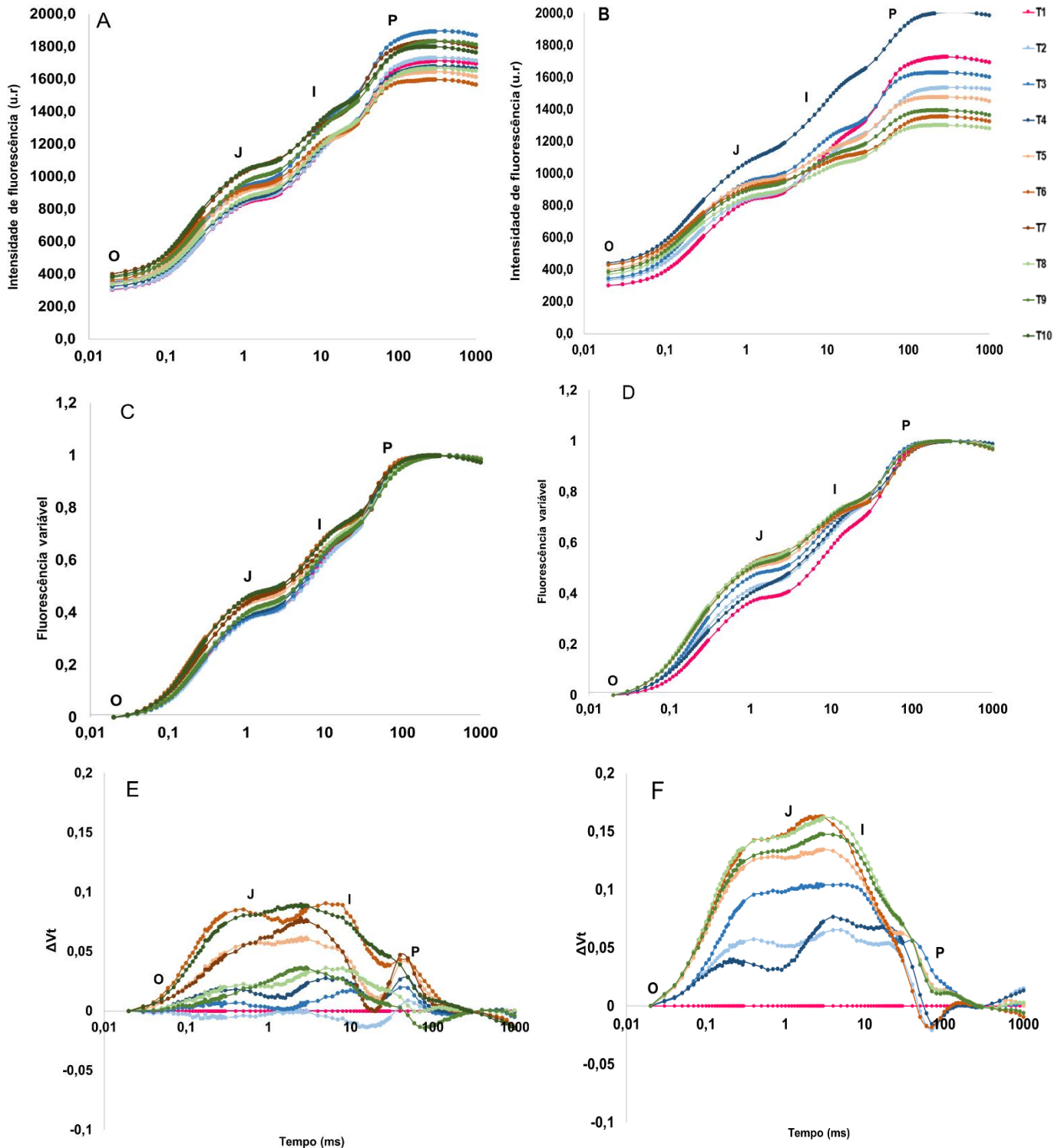


Figura 9 Curvas da fluorescência da clorofila *a* (OJIP) obtidas em plantas submetidas a dez tratamentos T1, Cu: T2, T3, T4, Zn: T5, T6, T7 e Cu+Zn: T8, T9 avaliadas em dois momentos distintos da exposição, medida no 5º dia: (A, C, E); medida no 25º dia: (B, D, F). Intensidade absoluta da fluorescência da clorofila *a* (A, B); Fluorescência variável normalizada ($V_t = (F_t - F_0) / (F_m - F_0)$), indicando a dinâmica de fechamento dos centros de reação do FSII (C, D). Curvas diferenciais ($\Delta V_t = V_t(\text{tratamento}) - V_t(\text{controle})$) (E, F) (n=5).

Os tratamentos com Cu, apresentaram valores negativos ou próximos do valor do controle, assim como no tratamrnto T8 (25+100 μ M) e Cu+Zn 50+ 200 μ M, que apresentaram valores negativos. Na Figura 10B, no 25° dia, é possível observar que quase todas as bandas foram positivas, com valores mais elevados que na medida do quinto dia 10A, diferindo apenas com o tratamento T8 que apresentou uma curva negativa. É possível observar na Figura 11 que tanto a banda H (Figura C,D) quanto a banda G (Figura A,B) mostraram diferenças pequenas entre os tratamentos e que os danos demonstrados ao longo destas diferenças são mais bem delineados aos 25 dias (Figura B,D).

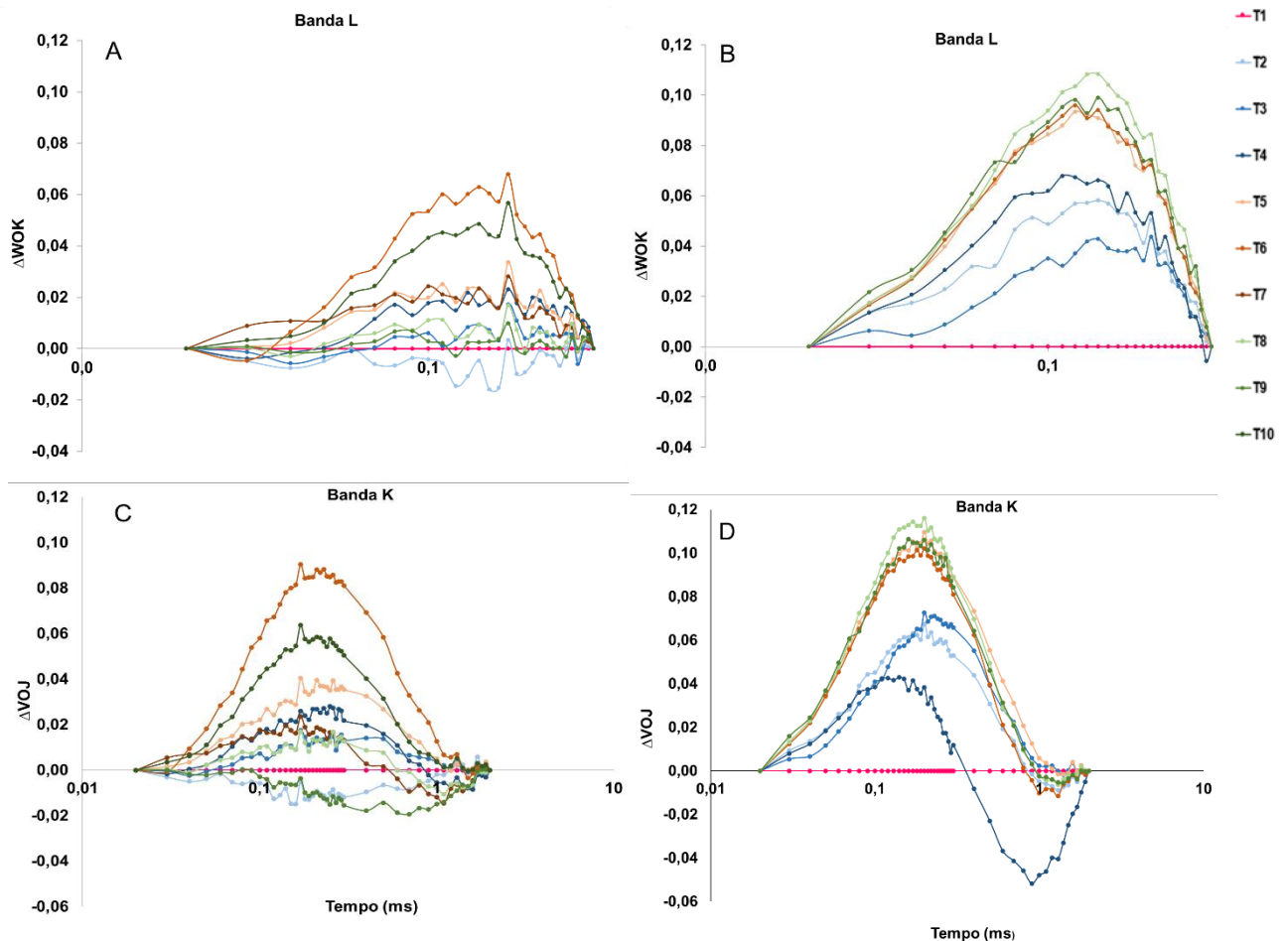


Figura 10 Curvas diferenciais da fluorescência da clorofila a em plantas submetidas a dez tratamentos T1, Cu: T2,T3, T4; Zn: T5,T6, T7 e Cu+Zn: T8, T9 e T10, avaliadas em dois momentos distintos da exposição medida no 5° dia:(A, C); medida no 25° dia:(B, D). Banda L (Δ WOK), obtida por dupla normalização entre os pontos O (20 μ s) e K (300 μ s), indicando alterações na conectividade entre antenas e centros de reação do FSII (A, B). Banda K (Δ VOJ), normalizada entre os pontos O (20 μ s) e J (2 ms), refletindo inativação do complexo de evolução de oxigênio (OEC) e/ou expansão da antena funcional do FSII (C, D) (n=5).

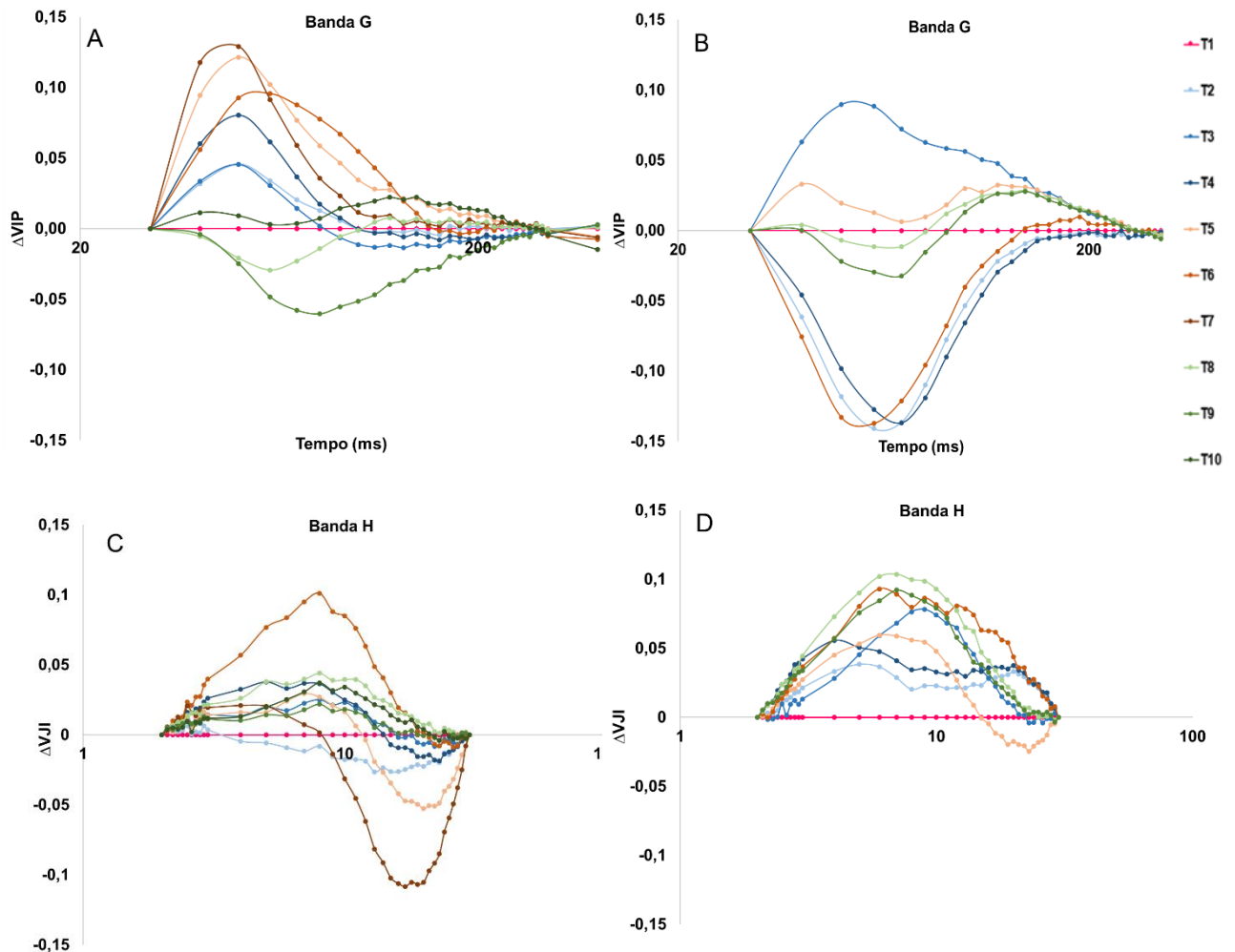


Figura 11 Curvas diferenciais de fluorescência da clorofila a obtidas em plantas submetidas a dez tratamentos T1, Cu: T2, T3, T4, Zn: T5, T6, T7 e Cu+Zn: T8, T9 e T10, avaliadas em dois momentos distintos da exposição medida no 5º dia:(A, C); medida no 25º dia:(B, D). Banda H (ΔVJI), normalizada entre os passos J (~2 ms) e I (~30 ms), $\Delta VJI = VJI$ (tratamento) - VJI (controle), Banda G (ΔVIP), normalizada entre os passos I (~30 ms) e P (~300 ms), $\Delta VIP = VIP$ (tratamento) - VIP (controle) (n=5).

4.9 Análise do Teste JIP

Diversos parâmetros derivados das curvas OJIP mostram mudanças notáveis sob os vários tratamentos. O teste JIP permite avaliar o fluxo de energia dentro do fotossistema II (FSII) e o desempenho global do aparato fotossintético, (TSIMILLI-MICHAEL, 2020).

No quinto dia após os tratamentos (DAT), observa-se que os diferentes tratamentos com Cu (Figura 12A) apresentaram valores dos parâmetros JIP

semelhantes ao T1 (controle). Aos 25 DAT houve aumento no F_M , V_j , dVG/DT_0 , DI_0/RC enquanto que F_V/F_0 , ϕE_0 , PI_{abs} e PI_{total} foram menores do que o T1. No tratamento T3 (50 μM) (Figura 12B), a resposta foi mais significativa. Comparando as medidas do 5° até o 25° DAT, houve elevação em F_0 , V_j , dVG/dt_0 , ΔR_0 , DI_0/RC .

Aos 25 DAT se observa queda nos valores dos parâmetros ET_0/RC , PI_{abs} e PI_{total} . Na Figura 12C observa-se os resultados obtidos no tratamento T4. Já no 5° dia, observou-se elevação dos valores de F_0 e DI_0/RC e redução dos valores de ET_0/RC e PI_{abs} e PI_{total} . No 25° dia, houve redução expressiva em PI_{abs} e PI_{total} , acompanhada da elevação dos valores de DI_0/RC e F_0 .

Os tratamentos com Zn, houve diferenças estatisticamente significativas evidenciando o impacto negativo do Zn na eficiência fotoquímica. No tratamento com 100 μM (Figura 13A), no 5° dia, foram observados aumentos significativos em V_j e DI_0/RC . Já na medida do 25° dia verificou-se queda significativa em ϕP_0 , ϕE_0 , PI_{abs} e PI_{total} .

No tratamento T6 (Figura 13B), na medida do quinto dia, DI_0/RC apresentou valores elevados, acompanhados de reduções significativas em ϕP_0 e nos índices de desempenho (PI_{abs} , PI_{total}). No 25° dia, a queda em ET_0/RC e ϕE_0 foi mais acentuada. No tratamento com T7 (400 μM) no 5° dia (Figura 13C), causou danos em praticamente todos os parâmetros fotossintéticos avaliados, onde ocorreu a morte das plantas antes do 25° dia.

Os tratamentos com T8 (25+100 μM) (Figura 14A), na medida do 5° dia, os parâmetros V_j e DI_0/RC apresentaram valores elevados, com diferença significativa em relação ao controle. No 25° dia, as reduções nos índices PI_{abs} e PI_{total} foram evidentes, observou-se, também elevação em ABS/RC . No tratamento com T9 (Figura 14B), as plantas exibiram efeitos negativos mais expressivos. Aos 5 dias, houve forte aumento em DI_0/RC e V_j , e nos índices de desempenho, e essa tendencia permaneceu nas medidas do 25° dia, junto com aumento acentuado de F_0 .

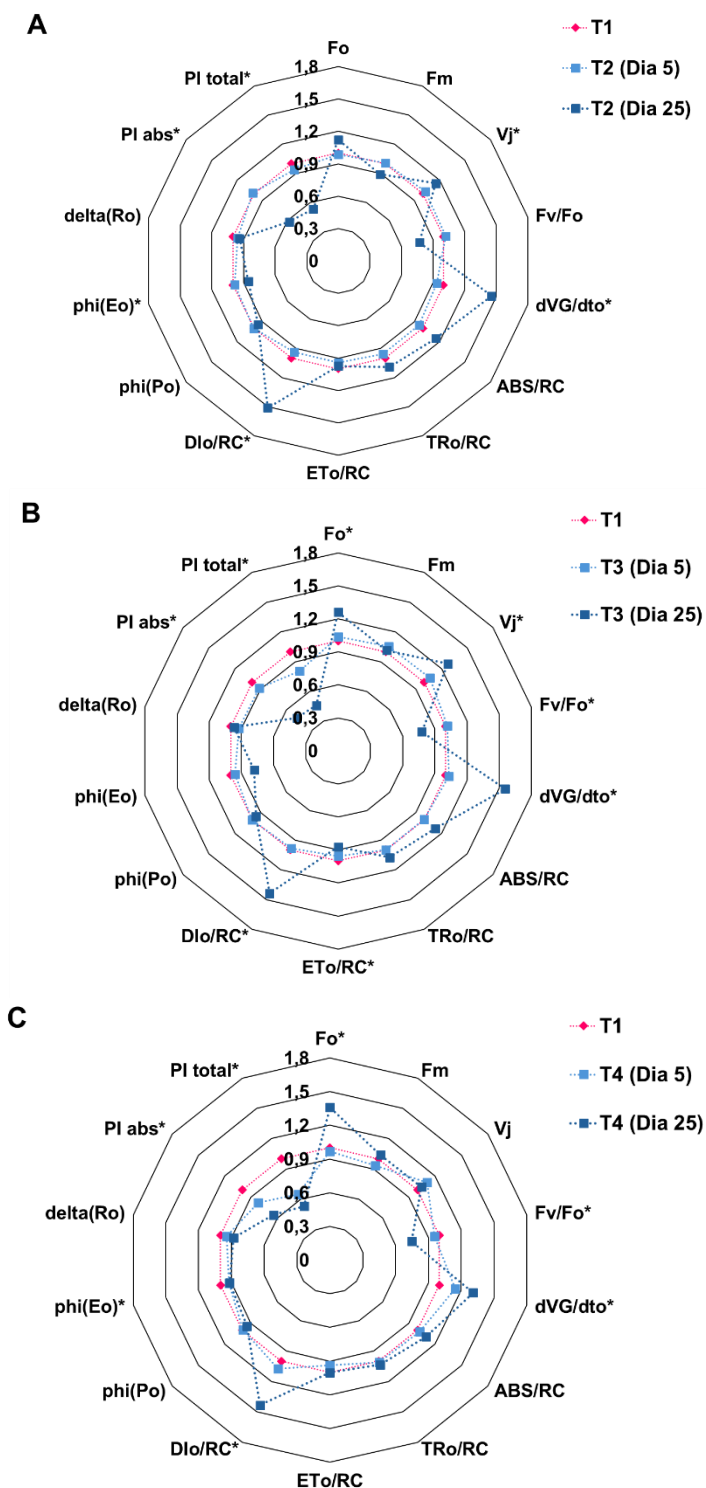


Figura 12 Gráficos de radar dos parâmetros do teste JIP que caracterizam o funcionamento do FSII de plantas tratadas com (A) T1 (Controle), T2 (Cu 25 μ M); (B) T1, T3 (Cu 50 μ M); (C) T1, T4 (Cu 100 μ M) no 5^o e 25^o dia de exposição. Valores representam média \pm erro padrão. Os parâmetros foram normalizados em relação ao controle de cada tratamento. Asteriscos (*) indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle ($p < 0,05$; Scott-Knott) ($n = 5$).

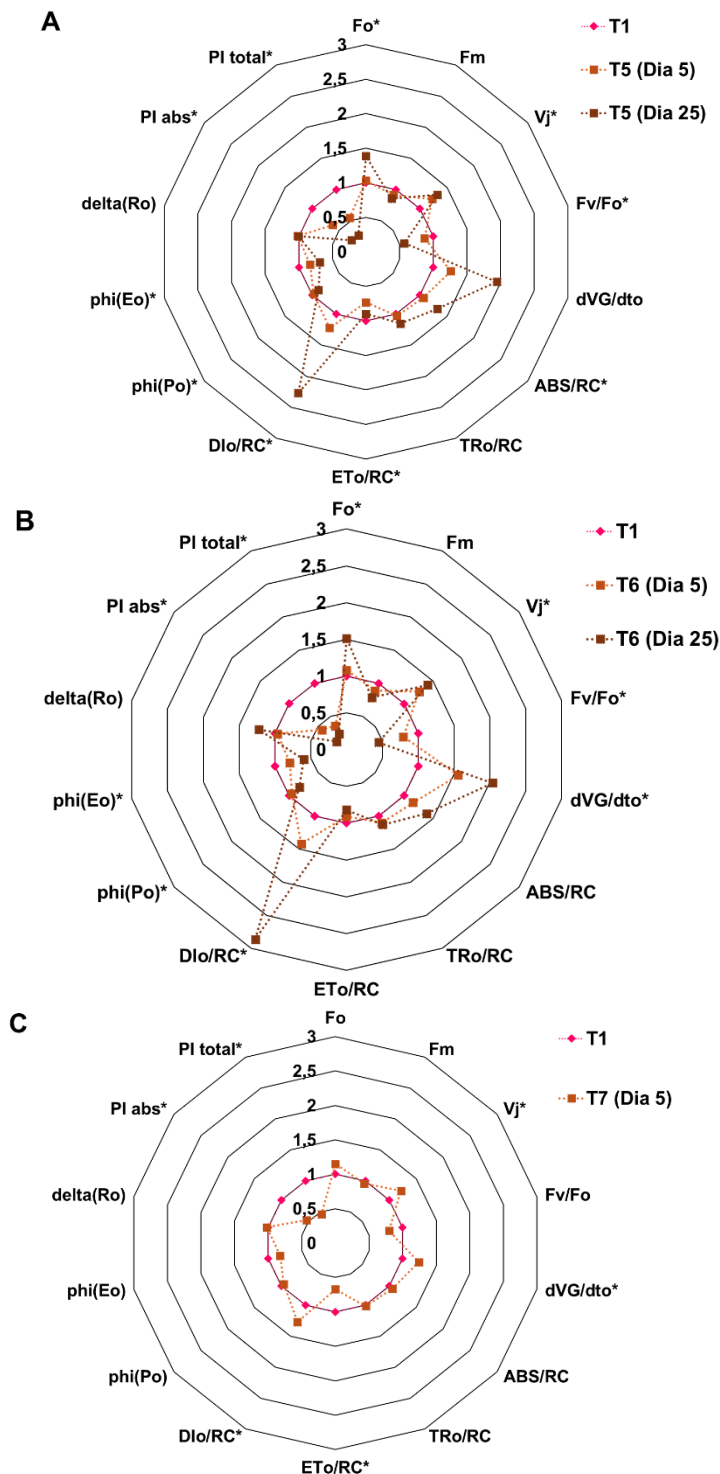


Figura 13 Gráficos de radar dos parâmetros do teste JIP que caracterizam o funcionamento do FSII de plantas tratadas com (A) T1 (Controle), T5 (Zn 100 μM); (B) T1, T6 (Zn 200 μM); (C) T1, T7 (Zn 400 μM) no 5º e 25º dia de exposição. O tratamento T7 causou a morte das plantas antes da medida do 25º dia, portanto não foi incluído na análise estatística. Valores representam média ± erro padrão. Os parâmetros foram normalizados em relação ao controle de cada tratamento. Asteriscos (*) indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle ($p < 0,05$; Scott-Knott) ($n = 5$).

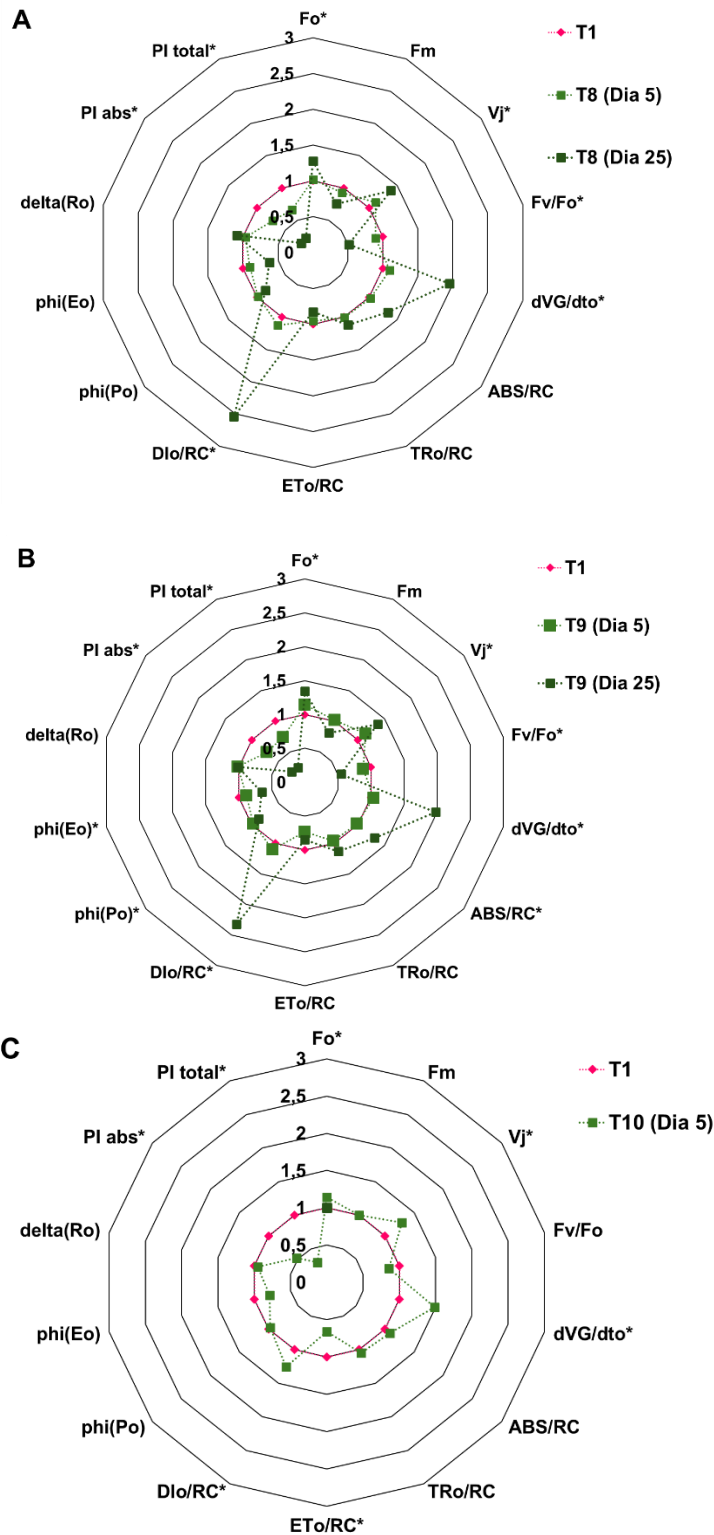


Figura 14 Gráficos de radar dos parâmetros do teste JIP que caracterizam o funcionamento do FSII de plantas tratadas com (A) T1 (Controle), T8 (Cu+Zn 25+100 μ M), (B) T1 (Controle), T9 (Cu+Zn 50+200), (C) T1 (Controle), T10 (Cu+Zn 100+400 μ M) 5^o e 25^o dia de exposição. O tratamento Cu+Zn 100+400 μ M causou a morte das plantas, portanto não foi incluído na análise estatística. Valores representam média \pm erro padrão. Os parâmetros foram normalizados em relação ao controle de cada tratamento. Asteriscos (*) indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle ($p < 0,05$; Scott-Knott) ($n = 5$).

No tratamento com maior concentração (T10) (Figura 14C), já no 5º dia, foi observado parâmetros significativamente reduzidos em relação ao controle (F_v/F_0 , PI_{abs} e PI_{total}), enquanto DI_0/RC se manteve elevado. Nas medidas do 25º dia, observou-se um aumento expressivo nos valores de DI_0/RC e manteve a tendência de redução nos valores de (F_v/F_0 , PI_{abs} e PI_{total}).

4.10 Pigmentos (Chl, Flv, Anth) e o Índice de balanço de Nitrogênio (NFI)

A avaliação dos dados obtidos por meio do medidor multi pigmentos MPM-100 que faz medidas dos pigmentos fotossintetizantes como clorofilas (Chl) e dos pigmentos antioxidantes como os Flavonoides (Flv), Antocianinas (Anth) e o índice de nitrogênio/flavonóis (NFI) estão presentes na tabela 4, e foram realizada no 20º dia de experimento. Os resultados apresentaram as variações significativas nos índices de pigmentos sob diferentes concentrações de Cu, Zn e suas combinações, quando comparados ao tratamento controle.

Houve uma redução nos teores de clorofila com o aumento da concentração de Cu, sendo menor média registrada no tratamento T4, no entanto não houve diferença significativa. Esses efeitos fisiológicos são representados visualmente na Figura 15C e 15D, onde as plantas apresentam clorose, necrose e senescência precoce. Esses efeitos fisiológicos são representados visualmente na Figura 15A/L), que evidencia os sintomas morfológicos progressivos causados pela exposição a Cu, Zn e à combinação Cu+Zn. Nas plantas tratadas com Cu Figura 21(A/D), observou-se clorose foliar inicial e necrose quando submetidas a concentrações mais elevadas (T4).

Nos tratamentos com Zn, o impacto foi semelhante. A clorofila apresentou queda progressiva, atingindo uma redução relativa no tratamento T7. A aplicação de Cu induziu um aumento progressivo na síntese de Flv sendo os tratamentos tratados com diferentes concentrações significativamente maior que o controle, com os maiores teores registrados nos tratamentos T5 e T10. De forma semelhante, o índice de Anth também foi elevado nesses tratamentos. Em contraste, o índice de balanço de nitrogênio apresentou redução significativa em todos os tratamentos com Cu e Zinco, no entanto significativamente maiores nos tratamentos conjugados

T8 e T9.

Nos tratamentos com Zn, houve uma redução progressiva no valor de Chl, sendo observada a menor média nas plantas T7 que foi relativamente , o que revela um efeito tóxico do Zn em altas concentrações. O índice de Flv no tratamento com Zn foi maior que o controle em todas as concentrações, assim como ocorreu no tratamento com o Cu. Esses efeitos fisiológicos são representados visualmente nos tratamentos com Zn Figura 15(E/H), os sintomas incluíram amarelecimento e enrolamento das folhas, associados à redução da área foliar e senescência precoce em T7.

Diferentemente dos tratamentos com Cu, o índice de Anth apresentou aumento significativo em todas as concentrações de Zn, com destaque para o tratamento T6. O NFI, foi negativamente afetado por todos os tratamentos com Zn, já que seu valor médio caiu significativamente com a concentração mais alta de T7. O índice de Flv manteve-se elevado em todas as concentrações combinadas de Cu+Zn, com valores semelhantes aos observados nos tratamentos individuais com Cu ou Zn. Nas combinações Cu+Zn (Figura 15I–L), houve efeito sinérgico, com acentuada perda de pigmentação.

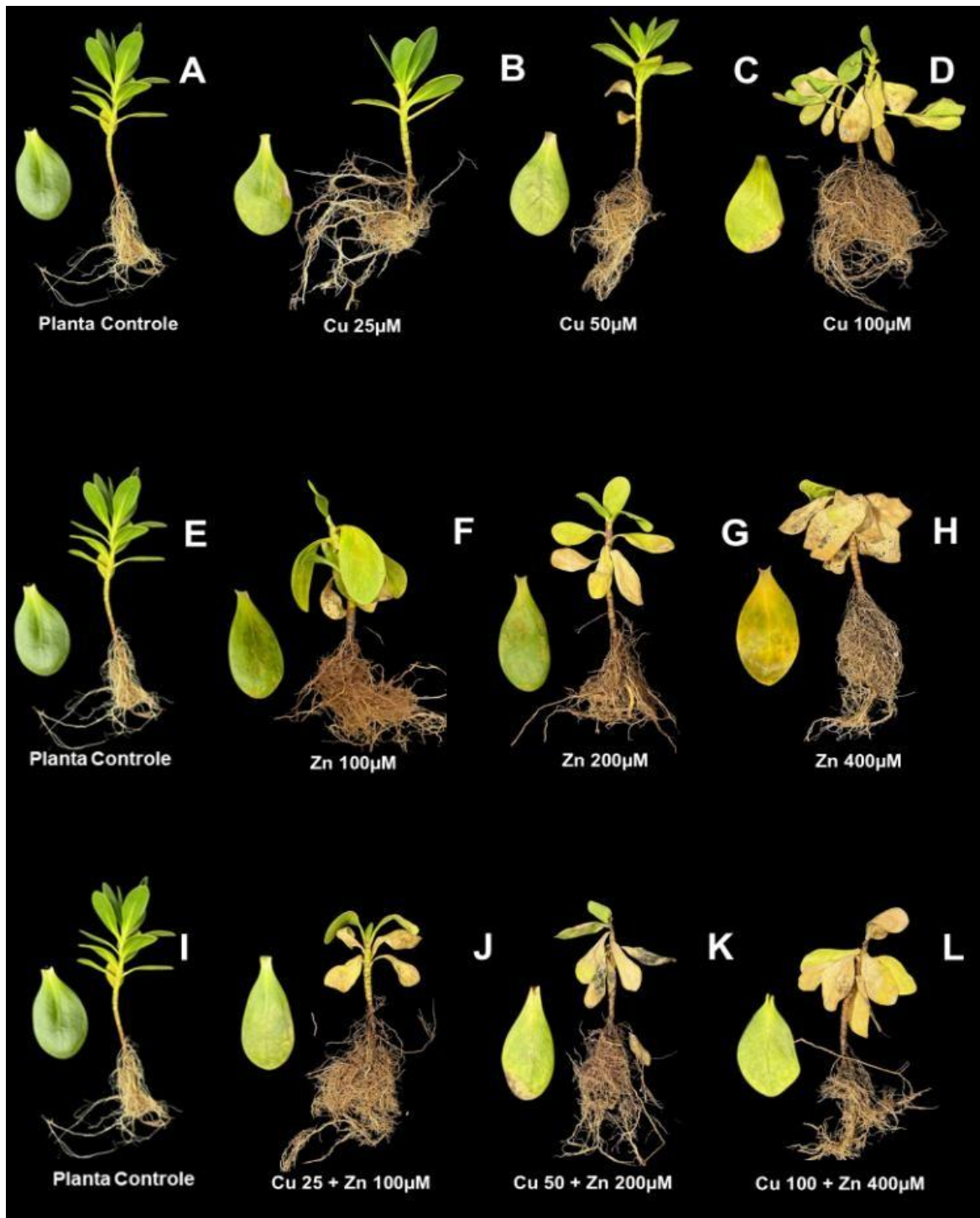


Figura 15 Efeitos morfológicos da exposição ao Cu, Zn e sua combinação em *Scaevola plumieri* após 25 dias de tratamento. As imagens mostram os sintomas visuais de toxicidade, como clorose, necrose nas folhas de cada tratamento. **A–D** (Plantas tratadas com Cu em concentrações crescentes); **E–H** (Plantas tratadas com Zn em concentrações crescentes); **I–L** (Plantas tratadas com a combinação de Cu e Zn em concentrações crescentes). T1 (Controle), T2 (Cu 25 μ M), T3 (Cu 50 μ M), T4 (Cu 100 μ M), T5 (Zn 100 μ M), T6 (Zn 200 μ M), T7 (Zn 400 μ M), T8 (Cu+Zn 25+100 μ M), T9 (Cu+Zn 50+200 μ M), T10 (Cu+Zn 100+400 μ M).

Tabela 4 Resultados das medidas do MPM sobre os efeitos dos tratamentos com Cu, Zn e Cu+Zn sobre o pigmento fotossintético clorofila (Chl), sobre os pigmentos antioxidantes flavonoides (Flv), antocianinas (Anth) e sobre o índice de balanço de nitrogênio (NFI) em *Scaevola plumieri*, no 20º dia de experimento. Valores representam média \pm erro padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatisticamente significativas entre tratamentos ($p < 0,05$ teste de Scott-Knott). Os tratamentos consistem no T1 (Controle), T2 (Cu 25 μ M), T3 (Cu 50 μ M), T4 (Cu 100 μ M), T5 (Zn 100 μ M), T6 (Zn 200 μ M), T7 (Zn 400 μ M), T8 (Cu+Zn 25+100 μ M), T9 (Cu+Zn 50+200 μ M), T10 (Cu+Zn 100+400 μ M) ($n = 5$).

Tratamento	Chl	Flv	Anth	NFI
T1	0,64 \pm 0,03 a	1,19 \pm 0,05 b	0,01 \pm 0,03 b	0,54 \pm 0,03 a
T2	0,59 \pm 0,03 a	1,45 \pm 0,05 a	0,04 \pm 0,03 b	0,35 \pm 0,03 b
T3	0,51 \pm 0,03 a	1,49 \pm 0,04 a	0,04 \pm 0,02 b	0,34 \pm 0,03 b
T4	0,55 \pm 0,03 a	1,46 \pm 0,04 a	0,10 \pm 0,02 a	0,37 \pm 0,03 b
T5	0,58 \pm 0,10 a	1,57 \pm 0,09 a	0,17 \pm 0,06 a	0,25 \pm 0,03 b
T6	0,39 \pm 0,10 b	1,56 \pm 0,09 a	0,28 \pm 0,06 a	0,25 \pm 0,03 b
T7	0,29 \pm 0,11 b	1,27 \pm 0,10 a	0,21 \pm 0,07 a	0,19 \pm 0,03 b
T8	0,56 \pm 0,03 a	1,44 \pm 0,08 a	0,33 \pm 0,05 a	0,59 \pm 0,02 a
T9	0,67 \pm 0,03 a	1,49 \pm 0,08 a	0,17 \pm 0,05 a	0,39 \pm 0,02 a
T10	0,52 \pm 0,03 a	1,56 \pm 0,07 a	0,14 \pm 0,05 a	0,31 \pm 0,02 b

5 Discussão

Após trabalharem com *Sedum alfredii*, *Arabidopsis thaliana* e *Solanum tuberosum*, Ningombam et al. (2024) demonstraram, que em espécies expostas a níveis tóxicos de Cu e Zn, a ativação coordenada de respostas antioxidantes, acúmulo de fitoquelatinas e alterações nos parâmetros fotossintéticos pode ocorrer.

Assim como relatado pelos autores, as respostas integradas (molecular, bioquímico e fisiológico) obtidas neste experimento sugerem uma forma coordenada de diminuir ou neutralizar o estresse oxidativo provocado pelo excesso de elementos traços, preservando a integridade fotossintética de *S. plumieri* diante da toxicidade por elementos traços. o excesso de elementos traço induziu a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), ativando a via molecular da fitoquelatina sintase (PCS) e a síntese de fitoquelatinas, responsáveis pela quelação e sequestro vacuolar dos elementos traços.

A análise molecular confirmou que a via de quelação via fitoquelatinas (*PCs*) foi mobilizada em resposta ao acúmulo foliar de Cu e Zn. Seregin & Kozhevnikova (2023) destacam que esses elementos traços, ativam diretamente a fitoquelatina sintase (*PCS*), promovendo a síntese de fitoquelatinas responsáveis pela formação de complexos estáveis e pelo sequestro vacuolar de íons metálicos.

Esse mecanismo, considerado central para a detoxificação, corrobora os padrões observados em *S. plumieri*, onde a indução do transcrito putativo de *PCS* coincidiu com o aumento do conteúdo foliar de Cu e Zn. Embora o genoma de *S. plumieri* ainda não esteja descrito, o transcrito identificado neste estudo apresentou elevada similaridade com sequências de *PCS* já caracterizadas em espécies-modelo discutidas por Seregin & Kozhevnikova (2023), como *Arabidopsis thaliana* e *Brassica juncea*. Nessas plantas, a fitoquelatina sintase foi funcionalmente associada à biossíntese de fitoquelatina sob estresse com elementos traços, reforçando que o gene identificado aqui se alinha estrutural e funcionalmente ao perfil evolutivo da enzima nessas espécies.

As fitoquelatinas, oligopeptídeos derivados da glutathiona (GSH), são sintetizadas pela enzima PCS a partir do substrato γ -Glu-Cys-Gly e exercem papel essencial na quelação de íons metálicos, formando complexos estáveis no citoplasma que posteriormente são transportados ao vacúolo (INOUE., 2005). A análise de expressão gênica revelou que o gene da *PCS* foi rapidamente induzido no 5º DAT, principalmente nos tratamentos T3 (Cu 50 μ M), T4 (Zn 100 μ M) e T8 (Cu+Zn 25+100 μ M), atingindo níveis de expressão até três vezes superiores ao controle. Inouhe (2005) ressalta que a via das fitoquelatinas constitui um dos mecanismos iniciais acionados pelas plantas diante do aumento de Cu^{2+} e Zn^{2+} , uma vez que esses elementos traços induzem rapidamente a expressão da *PCS* e promovem a formação de complexos PC com o elemento traço responsáveis por reduzir sua toxicidade celular.

Ferrari et al. (2024) demonstram que a *PCS* apresenta ativação dependente de elementos traços, sendo funcionalmente estimulada por cátions bivalentes como Cu^{2+} e Zn^{2+} , que promovem mudanças conformacionais no sítio catalítico e permitem a síntese rápida de PCs. Os autores mostram que

isoformas com resíduos estruturais específicos, semelhantes aos identificados no transcrito de *S. plumieri*, são particularmente sensíveis à presença de elementos traços e respondem precocemente ao estresse. Esses resultados reforçam diretamente o padrão encontrado neste estudo, no qual a ativação rápida da via das fitoquelatinas funcionou como resposta inicial de defesa frente ao acúmulo foliar de Cu^{2+} e Zn^{2+} .

O padrão bifásico observado em *S. plumieri*, marcado por forte indução inicial da PCS no 5º DAT seguida de queda acentuada no 25º DAT, é coerente com os mecanismos descritos por Seregin & Kozhevnikova (2023). Segundo esses autores, a produção de fitoquelatinas costuma apresentar cinética rápida, com picos iniciais seguidos de declínio. Nos tratamentos T4, T6, T7, T9 e T10 minimizaram a indução, e no 25º dia observou-se declínio acentuado da expressão em todos os tratamentos, com letalidade precoce nas combinações nos tratamentos T7 e T10. Esses resultados estão em concordância com a dinâmica relatada por Seregin & Kozhevnikova (2023), que descrevem redução natural da síntese de PCs após o pico inicial devido ao reequilíbrio redox, saturação da capacidade de complexação e avanço de danos fisiológicos nas condições mais severas.

Nos tratamentos com Cu, a maior expressão de PCS ocorreu no tratamento T3, indicando o limiar em que a planta ainda sustenta a ativação do sistema de desintoxicação sem prejuízo transcricional. Em concentrações mais altas T4 (Cu 100 μM), entretanto, observou-se queda acentuada da expressão, um padrão que é coerente com o descrito por Lovato et al. (2024) para *Cordia americana*, onde doses elevadas de Cu promoveram forte estresse oxidativo, acúmulo de H_2O_2 e alterações fisiológicas associadas à toxicidade celular.

No tratamento T4, o excesso de Cu ultrapassa a capacidade redox e causa danos diretos às estruturas nucleares e ribossomais, o mecanismo descrito por Yruela (2009), que demonstra que o Cu é altamente redox-ativo, catalisa reações tipo Fenton ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \cdot\text{OH} + \text{OH}^-$) e gera radicais hidroxila capazes de oxidar proteínas, membranas e DNA. Assim, a queda da expressão da PCS

nos tratamentos mais severos reflete a inibição transcricional em condições de alta toxicidade.

Assim como ocorreu nos tratamentos com Cu, os tratamentos com o Zn as concentrações do tratamento T5 (100 μM) induzirão a expressão das PCS, mas as concentrações maiores (T6 e T7) levaram a inibição da expressão, refletindo efeitos tóxicos não redox do Zn, que desloca cofatores essenciais como Mg^{2+} e Mn^{2+} de enzimas redox e fotossintéticas. Esse comportamento encontra forte paralelo com os resultados de Kühnlenz et al. (2016), que demonstraram que plantas de *Arabidopsis thaliana* dependem da síntese de fitoquelatinas para manter o acúmulo controlado de Zn nas folhas e sobreviver em solos contaminados. Os autores mostraram que mutantes deficientes em PCS1 acumulam menos Zn nas folhas e apresentam sensibilidade ao excesso de Zn.

Na condição combinada Cu+Zn, observou-se em *S. plumieri* um efeito sinérgico no tratamento T8, compatível com o que Vurro et al., (2011) que relata que quando os elementos traços estão em níveis moderados, PCs conseguem atuar simultaneamente na homeostase de Cu e Zn. Porém, na dose mais alta (T10), houve colapso transcricional, resultado que reforça ambos os autores de que, embora as PCs sejam determinantes para tolerância a elementos traços, existe um ponto crítico em que a demanda por quelação supera a capacidade do sistema, levando à falha metabólica.

A forte indução inicial de PCS coincide com o aumento nos valores de FRAP, flavonóis e compostos fenólicos, indicando que a via de desintoxicação de elementos traços está metabolicamente integrada ao sistema antioxidante não enzimático. A biossíntese de fitoquelatinas compartilha precursores de enxofre e NADPH com a produção de GSH e compostos fenólicos, formando um circuito redox coordenado entre as vias do enxofre e do fenilpropanóide (MAURY et al., 2020; NINGOMBAM et al., 2024).

De forma complementar, os resultados de Rizvi et al. (2020) demonstraram que a ativação inicial das vias antioxidantes é acompanhada por elevação de FRAP e redução eficiente de radicais, como DPPH, funcionando como uma fase de contenção do estresse oxidativo antes que danos estruturais se instalem. Esse comportamento descrito pelos autores se alinha ao padrão observado em *S. plumieri*, no qual o aumento de FRAP e de compostos fenólicos nos estágios iniciais coincide com a fase de maior expressão da PCS, reforçando a interpretação de que a planta mobilizou simultaneamente quelação e antioxidantes para estabilizar o ambiente redox.

Os tratamentos com Cu mostraram queda na concentração de compostos fenólicos. Segundo Agati et al. (2012) as respostas mais intensas em doses elevadas e ao longo do tempo indicam que o aumento de compostos fenólicos está diretamente associado à severidade do estresse, sendo responsivo ao tempo e à magnitude. No experimento realizado as respostas sugerem que embora tenha ocorrido uma ativação inicial dos compostos fenólicos, a forte demanda antioxidante levou ao consumo acelerado das moléculas neutralizantes, reduzindo a capacidade de sequestro de radicais livres disponível.

Nos ensaios testando o poder redutor, presente nas folhas (FRAP e DPPH), observou-se elevação significativa do potencial redutor (FRAP) porém DPPH apresentou redução nos tratamentos mais severos. Esse comportamento é compatível com o modelo descrito por Rizvi et al. (2020), que demonstraram que, sob estresse metálico intenso, compostos antioxidantes são rapidamente utilizados no sequestro de EROs, levando à redução da capacidade de neutralização de radicais à medida que o estresse se intensifica.

Em *S. plumieri*, a queda do DPPH nos tratamentos de maior toxicidade confirma essa dinâmica, sugerindo que os antioxidantes foram empregados de forma efetiva para contrabalançar o aumento de EROs, coincidindo com o declínio da PCS e o aumento do MDA. Esse padrão também converge com Yadav (2010) e Zhu et al. (2021), que apontam que o esgotamento do estoque redutor ocorre quando a produção de EROs supera a capacidade antioxidante, caracterizando

a transição de uma fase protetora para uma fase de dano oxidativo progressivo.

A análise dos pigmentos mostrou que, no 5º dia de exposição, houve aumento expressivo de flavonoides e antocianinas em *S. plumieri*. Esse padrão é consistente com Kumari et al. (2019), que demonstraram que estresses metálicos intensificam a rota dos fenólicos e aumentam a síntese de flavonoides e antocianinas como estratégia fotoprotetora e antioxidante, reforçando a estabilidade dos pigmentos fotossintéticos.

Da mesma forma, Janczak-Pieniazek et al. (2023) relataram que o acúmulo de Cu em trigo promove aumento inicial de compostos fenólicos e flavonoides, ampliando a capacidade antioxidante e reduzindo danos por EROs. Esse comportamento é semelhante ao observado nas plantas de *S. plumieri* estudadas, que mostraram teores elevados de compostos fenólicos e flavonoides nas fases iniciais como parte de um reforço redutor sistêmico.

No tratamento T8 (25+100 μM), o aumento de antocianinas sugere ativação de rotas biossintéticas voltadas à fotoproteção e ao tamponamento redox, compatível com modelos recentes sintetizados por Wang et al. (2024), que destacam as antocianinas como moduladores essenciais do equilíbrio dos antioxidantes durante a adaptação ao estresse. O acúmulo de flavonóis, em especial, está associado à quelação de elementos traços e à redução de danos oxidativos gerados pela produção excessiva de EROs. Observou-se aumento acentuado de flavonóis em tratamentos com Zn e com Cu+Zn, indicativo de incremento de moléculas com capacidade antioxidante (JANCZAK-PIENIAZEK et al., 2023; WANG et al., 2024).

Em relação aos pigmentos fotossintéticos, observou-se redução significativa nos teores de clorofila, particularmente nos tratamentos com Zn, indicando possível limitação na biossíntese de pigmentos e de enzimas associadas ao aparato fotossintético. Essa resposta é compatível com o que descrevem Xia & Tian (2009), que demonstraram que elementos traços, como Cu^{2+} e Zn^{2+} , podem deslocar o Mg^{2+} do anel porfirínico da clorofila, formando metaloporfirinas instáveis e levando à perda funcional do pigmento.

Da mesma forma, Taiz et al. (2017) relatam que a substituição do Mg^{2+} por cátions metálicos de maior afinidade desestabiliza a estrutura da clorofila, acelerando sua degradação e reduzindo a capacidade fotossintética foliar. Esses mecanismos explicam a queda observada em *S. plumieri*, cujo declínio de clorofilas sob excesso de Zn sugere comprometimento direto da integridade do aparato fotossintético.

O balanço de Nitrogênio (NFI) apresentou queda em todos os tratamentos, com destaque para a redução mais acentuada no tratamento T7 (400 μM). Essa diminuição no NFI indica um desequilíbrio no metabolismo nitrogenado, possivelmente associado tanto à inibição da assimilação de nitrato quanto ao aumento da degradação de proteínas sob estresse por excesso de Zn. O nitrogênio é essencial para a biossíntese de clorofilas e para a formação das principais enzimas do ciclo fotossintético (KALAJI et al., 2018).

A capacidade de *S. plumieri* em ativar rapidamente a via de fitoquelatinas sob exposição a Cu e Zn demonstra um mecanismo molecular de tolerância e detoxificação altamente eficiente. Em conjunto os dados fisiológicos e morfológicos confirmam que a planta apresenta respostas adaptativas ao estresse por elementos traços, principalmente nos tratamentos T2 e T3.

A concentração foliar de elementos traços em *S. plumieri* revelou padrões distintos de acúmulo entre Cu, Zn e suas combinações. O Cu aplicado isoladamente promoveu forte acúmulo dose-dependente, especialmente no tratamento T4, comportamento compatível com a rápida indução inicial da expressão de PCS observada no 5º DAT. Esse padrão se assemelha ao observado por Yruela (2009), que demonstra que o Cu é prontamente absorvido, altamente redox-ativo e capaz de desencadear respostas imediatas de detoxificação, incluindo a ativação de sistemas de quelação como as fitoquelatinas.

De forma semelhante, Seregin & Kozhevnikova (2023) destacam que espécies tolerantes a excesso de elementos traços, apresentam indução precoce da via das fitoquelatina sintase, logo após o aumento do Cu intracelular.

Resultados semelhantes também foram observados por Nualla-Ong et al. (2020) em plântulas de *Rhizophora mucronata* onde o tratamento com Cu levou à redução da expressão de PCS sob tratamento prolongado.

Observou-se que o Zn promoveu grande acúmulo, alcançando valores superiores a $8000 \mu\text{g g}^{-1}$ no tratamento T7. Esse padrão é coerente com o colapso fotoquímico registrado nos parâmetros OJIP, uma vez que o excesso de Zn pode deslocar cofatores essenciais, como Mn^{2+} , do complexo de evolução de oxigênio (OEC), comprometendo a atividade do FSII (TSIMILLI-MICHAEL & STRASSER, 2008). Resultados semelhantes foram descritos por Dang et al. (2024), que, ao avaliar o efeito do Zn em plantas de arroz sob estresse salino, reportaram que a presença de Zn alterou significativamente pontos críticos da curva OJIP.

A relação temporal entre o pico de expressão de PCS e o aumento inicial do FRAP indica que a via de quelatação atuou como defesa de resposta rápida, garantindo proteção antioxidante nas fases iniciais do estresse. No entanto, o aumento subsequente de MDA demonstra que essa proteção é limitada no tempo. Seregin & Kozhevnikova (2023) descrevem exatamente esse comportamento: a síntese de fitoquelatinas depende do estoque de glutatona, e quando a taxa de entrada de elementos traços supera a capacidade de regeneração do sistema GSH/PCs, ocorre exaustão do pool redutor, perda da eficiência da quelatação e intensificação do estresse oxidativo.

A análise dos pigmentos revelou redução nos teores de clorofilas totais, particularmente nos tratamentos de maior concentração de Zn e Cu+Zn. O resultado da análise das clorofilas também reflete a ocorrência da substituição do Mg^{2+} por íons metálicos tóxicos, como Cu^{2+} e Zn^{2+} , no centro porfirínico da molécula de clorofila o que inativa a molécula como sugerido por Xia e Tian (2009). Isso sugere que a combinação dos elementos induziu as plantas a se defenderem, por isso um grande aumento foi observado nessa concentração.

Comparando as medidas do 5^o e 25^o DAT verifica-se uma transição de um estado funcional, com o fotossistema ainda operante, para um estado de estresse acentuado, caracterizado por danos progressivos ao FSII (TSIMILLI-

MICHAEL & STRASSER, 2008). No 25º dia, houve queda do rendimento fotossintético primário (ϕP_0), redução do transporte de elétrons (ET_0/RC ; ϕR_0) e aumento das rotas dissipativas (DI_0/RC), evidenciando que o aparato fotossintético passou a priorizar a dissipação de energia como calor mitigando os danos acumulados.

Esse comportamento coincide diretamente com os resultados de Dang et al. (2024), que ao investigar *Oryza sativa* expostas a excesso de Zn observaram, redução de ϕP_0 e ϕR_0 , confirmando prejuízo à eficiência fotoquímica do FSII e ao fluxo de elétrons. O aumento de DI_0/RC , marcando a ativação de rotas dissipativas como mecanismo de proteção. A exposição de *S. plumieri* a concentrações crescentes de Cu, Zn e à combinação Cu+Zn desencadeou alterações fisiológicas e bioquímicas indicativas de estresse, com impacto direto na eficiência fotossintética (DUBEY et al., 2018).

As respostas fotoquímicas, bioquímicas e moleculares interligados, evoluíram de ajustes protetores das plantas até a falha fisiológica de acordo com o aumento da dose e o tempo de exposição. As respostas variaram conforme o elemento, concordando com Dubey et al. (2018) que sugerem que uma vez que os elementos traços contaminantes possuem locais de ação diferentes em diferentes espécies, o impacto direto nas alterações moleculares, bioquímicas e fisiológicas também podem variar.

As curvas OJIP e os parâmetros derivados do teste JIP indicam uma redução da eficiência fotoquímica do FSII, evidenciada pela queda de F_m e de F_v/F_m , e pelo aumento de F_0 , V_j e DI_0/RC . Esse padrão de resultados aponta para o acúmulo do aceptor primário reduzido (QA^-), com conseqüente restrição no fluxo de elétrons entre QA e QB, caracterizando inativação parcial dos centros de reação do FSII e desconexão entre as unidades coletoras e os centros reativos (TSIMILLI-MICHAEL & STRASSER, 2008; KALAJI et al., 2018).

O aumento simultâneo de ABS/RC e DI_0/RC nos tratamentos mais tóxicos indica um cenário típico de sobrecarga energética sobre os centros de reação ativos. De acordo com Kalaji et al. (2018), isso ocorre quando parte dos centros

de reação do FSII é inativado ou danificado pelo estresse da ação tóxica do Cu e Zn, reduzindo o número de centros de reação disponíveis para processar a energia em excesso. Entretanto, essa energia extra não pode ser eficientemente utilizada no transporte de elétrons, levando ao aumento compensatório de dissipação térmica (DI_0/RC), (STRASSER et al., 2004).

Esses efeitos são visíveis pelas curvas de ΔVt e bandas L e K, nas quais os tratamentos com T6 (200 μM), T7 (400 μM) e T10 (100+400 μM) apresentaram picos positivos, evidenciando perda de conectividade entre as antenas e os centros de reação. O acúmulo de energia luminosa não utilizada é um indicador de fotoinibição, conforme descrito por Strasser et al. (2004) e corroborado por estudos com *Cordia americana* sob estresse por Cu (LOVATO et al., 2024).

Esses resultados corroboram que o aparato fotossintético é um dos primeiros alvos da toxicidade por elementos traços. Os danos começam na cadeia de transporte de elétrons e evoluem para desorganização estrutural dos tilacoides, comprometendo processos como fotofosforilação e assimilação de carbono (FOYER & HANKE, 2022). Assim, as plantas apresentaram limitações sob estresse severo, ativando rotas antioxidantes que podem evitar colapso metabólico. O trabalho com plantas de *S. plumieri* mostram respostas semelhantes àquelas observada por Li et al. (2010) em *Citrus grandis* sob estresse por manganês.

A capacidade de *S. plumieri* em ativar rapidamente a via de fitoquelatinas sob exposição a Cu e Zn demonstra um mecanismo molecular de tolerância e detoxificação altamente eficiente, em conjunto, os dados fisiológicos e morfológicos confirmam que a planta apresenta respostas adaptativas ao estresse por elementos traços, principalmente em concentrações moderadas de Cu 25 e 50 μM . Esses mecanismos conferem à espécie um potencial papel como fitorremediadora em ecossistemas litorâneos, particularmente em áreas impactadas por rejeitos de minérios ricos em Cu e Zn, como as Restingas do Espírito Santo.

6 Conclusão

A capacidade de *S. plumieri* em ativar rapidamente a via das fitoquelatinas e acumular Cu e Zn nas folhas reforça seu potencial biotecnológico. Apesar das concentrações aplicadas representarem níveis de exposição elevados cerca de dezenas a centenas de vezes superiores aos teores normalmente usados na solução nutritiva aplicadas nas plantas a espécie manteve respostas fisiológicas iniciais que indicam tolerância relativa ao estresse pelos elementos traços. O aumento da capacidade antioxidante total demonstrou a ativação de mecanismos de defesa contra o estresse oxidativo, os resultados estão apresentados em um resumo integrado dos resultados na Figura 16.

Entretanto, o incremento de peroxidação lipídica nas fases tardias evidencia que, sob toxicidade intensa, ocorre limitação natural na contenção das espécies reativas de oxigênio, resultando em danos às membranas. A indução transitória do gene *PCS* confirmou a ativação da rota de desintoxicação por fitoquelatinas, seguida de redução na expressão em estágios posteriores, caracterizando a saturação do sistema de defesa.

Dessa forma, os resultados confirmam o potencial de *Scaevola plumieri* como espécie tolerante a ambientes com contaminação moderada por Cu e Zn, destacando sua relevância ecológica e seu potencial biotecnológico para aplicações em programas de fitorremediação e recuperação de áreas costeiras degradadas. Além disso, o estudo contribui para o avanço do conhecimento sobre os mecanismos de tolerância ao estresse metálico em espécies nativas de restinga, um ecossistema ainda pouco explorado sob a perspectiva fisiológica e molecular.

De forma integrada, a indução inicial do gene *PCS*, o acúmulo de antioxidantes não enzimáticos, a dissipação controlada de energia no FSII e o ajuste nos pigmentos fotossintéticos evidenciam que a espécie aciona múltiplos níveis de proteção para preservar a funcionalidade metabólica sob estresse. Embora esses mecanismos apresentem limites sob os tratamentos com maiores concentrações e exposição prolongada aos elementos traços, a manutenção parcial da atividade fotoquímica e do equilíbrio redox demonstra a capacidade

de tolerância fisiológica de *S. plumieri* mesmo em condições de elevada toxicidade, confirmando seu potencial biotecnológico futuros estudos e aplicações como planta fitorremediadora.

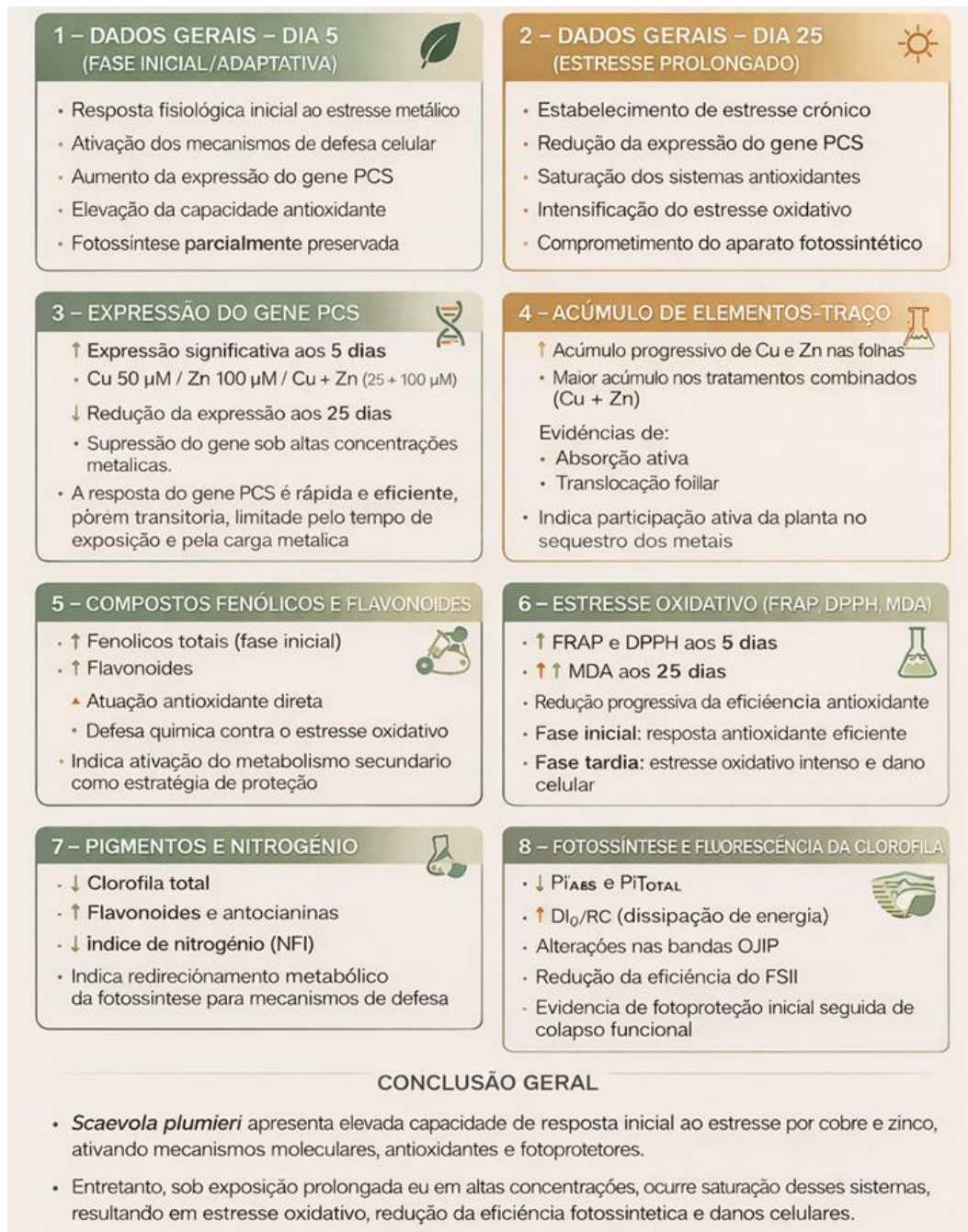


Figura 16 Resumo das respostas fisiológicas, bioquímicas e fotossintéticas de *Scaevola plumieri* à exposição ao Cu, Zn e Cu+Zn. Observa-se resposta adaptativa inicial (5 dias), com ativação antioxidante e manutenção parcial da fotossíntese, seguida por estresse oxidativo, redução da eficiência fotossintética e danos celulares sob exposição prolongada (25 dias).

7 Referências Bibliográficas

AGATI, G. et al. Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. *Plant Science*, 196:67–76, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.07.014>.

AGUIRRE, G.; PILON, M. (2016). Copper Delivery to Chloroplast Proteins and its Regulation. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1250. DOI: [10.3389/fpls.2016.01250](https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01250).

AHMAD, P.; AHANGER, M. A.; ALYEMENI, M. N.; ALAM, P.; SOURI, Z.; CARDOSO, A. A. et al. Heavy Metals and Photosynthesis: Recent Developments. Book Chapter — Phytoremediation of Heavy Metals. *Recent Trends in Wastewater Treatment*, p. 423–442, 2019. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-030-99858-5_18.

BARKER, BARKER, N.; HARMAN, K.; RIPLEY, B.; BOND, J. The genetics of *Scaevola plumieri* (Goodeniaceae), an indigenous dune colonizer, as revealed by ISSR fingerprinting. *South African Journal of Botany*, v. 68, n. 4, p. 532–541, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0254-6299\(15\)30381-1](https://doi.org/10.1016/S0254-6299(15)30381-1).

BUSSOTTI, F.; GEROSA, G.; DIGRADO, A.; POLLASTRINI, M. (2020). Selection of chlorophyll fluorescence parameters as indicators of photosynthetic efficiency in large-scale plant ecological studies. *Ecological Indicators*, 108. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2019.105686>.

CAZALE, A. C., & Clemens, S. (2001). Arabidopsis thaliana expresses a second functional phytochelatase synthase. *Febs Letters*, 507(2), 215-219

CAKMAK, I.; HORST, W. J. Effect of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiologia Plantarum*, v. 83, p. 463–468, 1991. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1991.tb00121.x>

CEROVIC, Z. G.; MASDOUMIER, G.; GHOZLEN, N. B.; LATOUCHE, G. (2008). New portable optical sensors for the assessment of winegrape phenolic maturity based on berry fluorescence. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(8), 650–654. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2008.03.012>.

CLEMENS, S. Evolution and function of phytochelatin synthases. *Planta*, v. 223, n. 1, p. 1-19, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2005.11.010>

CLEMENS, S.; KIM, E. J.; NEUMANN, D.; SCHROEDER, J. I. Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthases from plants and yeast. *EMBO Journal*, v. 18, n. 12, p. 3325-3333, 1999. DOI: [10.1093/emboj/18.12.3325](https://doi.org/10.1093/emboj/18.12.3325).

DANG, K.; MU, J.; TIAN, H.; GAO, D.; ZHOU, H.; GUO, L.; SHAO, X.; GENG, Y.; ZHANG, Q. “Zinc regulation of chlorophyll fluorescence and carbohydrate metabolism in saline-sodic stressed rice seedlings.” *BMC Plant Biology*, vol. 24, article 464, 2024. DOI : [10.1186/s12870-024-05170-w](https://doi.org/10.1186/s12870-024-05170-w).

DESOTGIU, R. et al. Chlorophyll fluorescence analysis in plants under stress. *Environ. Exp. Bot.*, 73:165–177, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2011.12.002>

DOWD, L. E. Spectrophotometric determination of quercetin. *Analytical Chemistry*, v. 31, n. 7, p. 1184–1187, 1959. DOI: <https://doi.org/10.1021/ac60151a024>

DUBEY, S., Shri, M., Gupta, A., Rani, V., Chakrabarty, D., 2018. Toxicity and detoxification of heavy metals during plant growth and metabolism. *Environ. Chem. Lett.* <https://doi.org/10.1007/s10311-018-0741-8>.

DUARTE, C. I.; MARTINAZZO, E. G.; BACARIN, M. A. et al. (2020). Seed germination, growth and chlorophyll a fluorescence in young plants of *Allophylus edulis* in different periods of flooding. *Acta Physiologiae Plantarum*, 42(5). DOI: <https://doi.org/10.1007/s10311-018-0741-8>

[10.1007/s11738-020-03063-7](https://doi.org/10.1007/s11738-020-03063-7).

FALQUETO, A. R.; SILVA JÚNIOR, R. A.; GOMES, M. T. G.; MARTINS, J. P. R.; SILVA, D. M.; PARTELLI, F. L. (2017) Effects of Water Stress on Chlorophyll a Fluorescence in Two Clones of Rubber Tree. *Scientia Horticulturae*, v. 224, p. 1-10. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.06.019>.

FERRARI, M.; MARIESCHI, M.; COZZA, R.; TORELLI, A. (2024) Phytochelatin Synthase: An In Silico Comparative Analysis in Cyanobacteria and Eukaryotic Microalgae. *Plants* 2024, 13, 2165. <https://doi.org/10.3390/plants13152165>

FOYER, C. H.; HANKE, G. (2022). EROs production and signalling in chloroplasts: cornerstones and evolving concepts. *Plant Journal*, 111(3), 642–661. DOI : <https://doi.org/10.1111/tpj.15856>.

GAO, Y. et al. (2018). Comparative phytotoxicity of usnic acid, salicylic acid, cinnamic acid and benzoic acid on photosynthetic apparatus of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 128, 1–12. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.04.037>.

GUO, W.-J.; BUNDITHYA, W.; GOLDSBROUGH, P. B. Characterization of the Arabidopsis metallothionein gene family: tissue-specific expression and induction during senescence and in response to copper. *New Phytologist*, v. 159, n. 2, p. 369–381, 2003. DOI: [10.1046/j.1469-8137.2003.00813x](https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00813x).

HA, S. B.; SMITH, A. P.; HOWDEN, R.; DIETRICH, W. M.; BUGG, S.; O'CONNELL, M. J.; GOLDSBROUGH, P. B.; COBBETT, C. S. Phytochelatin synthase genes from Arabidopsis and the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *The Plant Cell*, v. 11, n. 6, p. 1153-1164, jun. 1999. DOI: [10.1105/tpc.11.6.1153](https://doi.org/10.1105/tpc.11.6.1153).

HERNÁNDEZ-ALLICA, J. et al. Synthesis of low molecular weight thiols in response to Cd exposure in *Thlaspi caerulescens*. *Plant, Cell and Environment*,

v. 29, n. 7, p. 1422–1429, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2006.01525.x>

HÖHNER, R.; PRIBIL, M.; HERBSTOVÁ, M.; et al. “Plastocyanin is the long-range electron carrier between photosystem II and photosystem I in plants.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 117, no. 26, 2020, pp. 15354-15362. DOI: [10.1073/pnas.2005832117](https://doi.org/10.1073/pnas.2005832117).

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. (1950). The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station*, Berkeley. Disponível em: <https://archive.org/details/waterculturemeth347hoag>

HWANG, S. G. et al. (2017). Genome-wide transcriptome profiling of genes associated with arsenate toxicity in an arsenic-tolerant rice mutant. *Plant Physiology and Biochemistry*, 120, 40–51. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.09.019>.

ISHTIYAQ, S. et al. (2021). Role of secondary metabolites in salt and heavy metal stress mitigation by halophytic plants: an overview. In: *Handbook of Bioremediation: Physiological, Molecular and Biotechnological Interventions*, 307–327. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819382-2.00020-X>.

INOUE, M. (2005). Phytochelatins. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17(1), 65–78. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1677-04202005000100006>

JAHAN, M. S. et al. (2020). Melatonin alleviates nickel phytotoxicity by improving photosynthesis, secondary metabolism and oxidative stress tolerance in tomato seedlings. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 197, 110593. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110593>.

JANCZAK-PIENIAZEK, M.; CICHONSKI, J.; MICHALIK, P.; CHRZANOWSKI, G. Effect of heavy metal stress on phenolic compounds accumulation in winter

wheat plants. *Molecules*, v. 28, n. 1, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules28010241>.

KALAJI, H. M. et al. (2018). Chlorophyll fluorescence as a tool for nutrient status identification in rapeseed plants. *Photosynthesis Research*, 136(3), 329–343. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11120-017-0467-7>.

KUMARI, A.; GOYAL, V.; SHEOKAND, S. (2019). Oxidative stress and antioxidant defence under metal toxicity in halophytes. In: *Ecophysiology, Abiotic Stress Responses and Utilization of Halophytes*. Springer. 115–155. DOI: https://doi.org/10.1007/978-981-13-3762-8_6.

KUSTER, V. C. (2010). Anatomy and ecological aspects of plant species occurring in the Restinga of Paulo César Vinha State Park (ES). Master's dissertation. Universidade Federal de Viçosa. Disponível em: <http://locus.ufv.br/handle/123456789/2521>.

KÜHNLENZ, T.; HOFMANN, J.; URAGUCHI, S.; et al. Phytochelatin synthesis promotes leaf Zn accumulation of *Arabidopsis thaliana* plants grown in soil with adequate Zn supply and is essential for survival on Zn-contaminated soil. *Plant Cell Physiology*, v. 57, n. 11, p. 2342-2352, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1093/pcp/pcw148>

LANA-COSTA, J. et al. (2021). Biochemical and physiological aspects of Restinga herbaceous plants' tolerance to iron ore tailing plume along the coastal region of Espírito Santo, Brazil. *Environmental and Experimental Botany*, 191, 104618. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2021.104618>.

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 Physiology and Biochemistry*, [S.l.], v. 48, n. 8, p. 673–682. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.05.005>.

LI, Q. et al. (2010). Effects of manganese-excess on CO₂ assimilation, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, carbohydrates and photosynthetic electron transport of leaves, and antioxidant systems of leaves and roots in *Citrus grandis* seedlings. *Plant Biology*, 10. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-42>.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ΔΔCt method. *Methods*, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

LOVATO, L. DA R.; AGUILAR, M. V. M.; ROSA, F. C. R. DA.; PEIXOTO, T. W.; WERTONGE, G. S.; VALSOLER, D. V.; AZEVEDO, T. D. DE.; SILVA, L. C. DA.; TABALDI, L. A. (2024). Tolerance of *Cordia americana* plants exposed to excess copper. *Ciência Florestal*, 34(4). DOI : <https://doi.org/10.5902/1980509885568>.

LUNKES, A. M. Z. et al. (2022). Growth and tolerance of *Ilex paraguariensis* seedlings cultivated in copper-contaminated soil. *Ciência Florestal*, 32(4), 1948–1963. DOI: <https://doi.org/10.5902/1980509864216>.

LUO, Y. et al. (2017). Salt tolerance response revealed by RNA-Seq in a diploid halophytic wild relative of sweet potato. *Scientific Reports*, 7, 1–13. DOI : <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09241-x>.

MAGNAGO, L. F. S. et al. (2012). Restinga forests of the Brazilian coast: richness and abundance of tree species on different soils. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 84, 807–822. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0001-37652012000300023>.

MAURY, G. L.; RODRÍGUEZ, D. M.; HENDRIX, S.; ARRANZ, J. C. E.; BOIX, Y. F.; PACHECO, A. O.; DÍAZ, J. G.; MORRIS-QUEVEDO, H. J.; DUBOIS, A. F.; ALEMAN, E. I.; BEENAERTS, N.; MÉNDEZ-SANTOS, I. E.; RATÓN, T. O.; COS, P.; CUYPERS, A. Antioxidants in Plants: A Valorization Potential Emphasizing the Need for the Conservation of Plant Biodiversity in Cuba. *Antioxidants*, v. 9, n.

11, p. 1068, 2020. [DOI: 10.3390/antiox9111048](https://doi.org/10.3390/antiox9111048).

NAGAJYOTI, P. C.; LEE, K. D.; SREEKANTH, T. V. M. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environmental Chemistry Letters*, v. 8, p. 199–216, 2010. [DOI: https://doi.org/10.1007/s10311-010-0297-8](https://doi.org/10.1007/s10311-010-0297-8).

NINGOMBAM, L.; HAZARIKA, B. N.; YUMKHAIBAM, T.; HEISNAM, P.; SINGH, Y. D. Heavy metal priming plant stress tolerance deciphering through physiological, biochemical, molecular and omics mechanism. *South African Journal of Botany*, v. 168, p. 16–25, 2024. [DOI: 10.1016/j.sajb.2024.02.032](https://doi.org/10.1016/j.sajb.2024.02.032).

NUALLA-ONG, A.; PHONGDARA, A.; BUAPET, P. (2020). *Copper and zinc differentially affect root glutathione accumulation and phytochelatin synthase gene expression of Rhizophora mucronata seedlings: Implications for mechanisms underlying trace metal tolerance*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.205,111175. [DOI: 10.1016/j.ecoenv.2020.111175](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111175)

PEREIRA, O. J. (2003). Restinga: origin, structure and diversity. In: JARDIM, M. A. G. et al. (Eds.). *Challenges of Brazilian Botany in the New Millennium: Inventory, Systematization and Conservation of Plant Diversity*. Belém: MPEG, UFRA, Embrapa, Museu Paraense Emílio Goeldi. p. 177–179. Disponível: <https://repositorio.museu-goeldi.br/handle/mgoeldi/1319>.

PIRES, J.; TORRES, P. B.; dos SANTOS, D. Y. A. C.; CHOW, F. Microplate assay of antioxidant potential through the DPPH free-radical scavenging method for extracts of algae. São Paulo: Institute of Biosciences, University of São Paulo, 2017. ISBN 978-85-85658-71-7.

RAI, P. K. et al. (2019). Heavy metals in food crops: health risks, fate, mechanisms, and management. *Environmental International*, 125, 365–385. [DOI : https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.01.067](https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.01.067).

RAZA, A. et al. (2021). Genetic engineering of plants to tolerate toxic metals and metalloids. In: HASANUZZAMAN, M.; PRASAD, M. N. V. (Eds.). *Handbook of Bioremediation*. Cambridge, MA: Academic Press. 411–436. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819382-2.00026-0>.

RIZVI, A. et al. Heavy metal-induced stress on wheat: phytotoxicity and defense responses. RSC Adv., 10:38379–38403, 2020. <https://doi.org/10.1039/D0RA05610C>

ROORKIWAL, M. et al. (2020). Integrating genomics for chickpea improvement: achievements and opportunities. *Theoretical and Applied Genetics*, 133, 1703–1720. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00122-020-03584-2>.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Determination of total antioxidant activity in fruits by the ferric-reducing antioxidant power (FRAP) method. Embrapa: Comunicado Técnico, 2006. On-line ISSN 1679-6535.

SAYERS, E. W. et al. GenBank. *Nucleic Acids Research*, v. 51, n. D1, p. D141–D145, 2023. DOI: [10.1093/nar/gkac1030](https://doi.org/10.1093/nar/gkac1030).

SEREGIN, I. V.; KOZHEVNIKOVA, A. D. (2023) *Phytochelatins: sulfur-containing metal(loid)-chelating ligands in plants*. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 3, p. 2430. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms24032430>.

SEREGIN, I. V.; KOZHEVNIKOVA, A. D. Plant responses to heavy metals: From deficiency to excess. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(5), 2064, 2025. <https://doi.org/10.3390/ijms26052064>

SIMONELLI, M.; FRAGA, C. N. (2007). Threatened plant species of Espírito

Santo State. Vitória: IPEMA. 144 p. Disponível:
<https://www.researchgate.net/publication/268214174>.

SITKO, K. et al. (2022). Effect of drought and heavy metal contamination on growth and photosynthesis of silver birch trees growing on post-industrial heaps. *Cells*, 11(1). <https://doi.org/10.3390/cells11010053>.

SHAHBAZ, M.; RAVET, K.; PEERS, G.; PILON, M. (2015). Prioritization of copper for the use in photosynthetic electron transport in developing leaves of hybrid poplar. *Frontiers in Plant Science*, 6, 407. DOI: [10.3389/fpls.2015.00407](https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00407).

SHOMALI, A.; AHMAD, P.; ASHRAF, M.; et al. (2022). Diverse physiological roles of flavonoids in plant responses to abiotic stresses. *Plants*, 11(22), 3158. DOI: [10.3390/plants11223158](https://doi.org/10.3390/plants11223158).

SHAHBAZ, M., et al. (2015). Prioritization of copper for the use in photosynthetic electron transport: plastocyanin, A pivotal copper protein in the chloroplasts of higher plants. *Frontiers in Plant Science*, 6, 445. DOI: [10.3389/fpls.2015.00445](https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00445)

SOLIS, J. et al. (2016). Transcriptome profiling of beach morning glory (*Ipomoea imperati*) under salinity and its comparative analysis with sweetpotato. *PLoS ONE*, 11(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147398>.

SOUZA, V. C.; MAGOSSO, R. (2002). Goodeniaceae. In: WANDERLEY, M. G. L. et al. (Eds.). *Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo*. São Paulo: Instituto de Botânica, v. 2, p. 121–122. Disponível:
<https://repositorio.usp.br/item/001284575>.

STRASSER, B. J.; STRASSER, R. J. (1995). Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: the JIP-test. In: MATHIS, P. (Ed.). *Photosynthesis: from light to biosphere*. Dordrecht: KAP Press. p. 977–980. Disponível: <https://www.researchgate.net/publication>.

STRASSER, R. J.; TSIMILLI-MICHAEL, M.; SRIVASTAVA, A. (2004). Analysis

of the Chlorophyll a fluorescence transient. In: *Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis*. Springer. p. 321–362. DOI : https://doi.org/10.1007/978-1-4020-3218-9_12.

SU, H., ZOU, T., LIN, R., ZHENG, J., JIAN, S., & ZHANG, M. (2020). Characterization of a phytochelatin synthase gene from *Ipomoea pes-caprae* involved in cadmium tolerance and accumulation in yeast and plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 155, 743-755.

SUSLICHENKO, I. S.; TRUBITSIN, B. V.; VERSHUBSKII, A. V.; TIKHONOV, A. N. (2022) Non-invasive monitoring of the redox state of photosynthetic electron transport chains in leaves of *Hibiscus rosa-sinensis* and *Tradescantia*. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 185, p. 233–243,. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2022.06.002>.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I. M.; MURPHY, A. *Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal*. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2021. 888 p. ISBN: 9786558820059.

THAKUR, S. et al. (2019). Comparative transcriptome profiling reveals the reprogramming of gene networks under arsenic stress in Indian mustard. *Genome*, 62, 12. DOI: <https://doi.org/10.1139/gen-2018-0152>.

TSIMILLI-MICHAEL, M. Photosystem II fluorescence transients: The JIP-test and beyond. *Photosynthetica*, v. 58, n. 2, p. 275–292, 2020. DOI : [10.32615/ps.2019.150](https://doi.org/10.32615/ps.2019.150).

TSIMILLI-MICHAEL, M.; STRASSER, R. J. (2001). Fingerprints of climate changes on the photosynthetic apparatus' behaviour, monitored by the JIP-test. In: *"Fingerprints" of Climate Change – Adapted Behaviour and Shifting Species Ranges*. Boston, MA: Springer. p. 229–247. DOI : https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8692-4_14.

VARSHNEY, R. K. et al. (2020). 5Gs for crop improvement. *Current Opinion in Plant Biology*, 56, 190–196. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2019.12.004>.

VOIGT, R. A. L.; MACFARLANE, G. R. (2024). Tolerance of the Australian halophyte, beaded samphire, *Sarcocornia quinqueflora*, to Pb and Zn under glasshouse conditions: evaluating metal uptake and partitioning, photosynthetic performance, biomass, and growth. *Aquatic Toxicology*, 270. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2024.106887>.

VURRO, E.; RUOTOLO, R.; OTTONELLO, S.; ELVIRI, L.; MAFFINI, M.; FALASCA, G.; ZANELLA, L.; ALTAMURA, M. M.; TOPPI, L. S. Phytochelatins govern zinc/copper homeostasis and cadmium detoxification in *Cuscuta campestris* parasitizing *Daucus carota*. *Environmental and Experimental Botany*, v. 72, p. 26–33, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2010.04.008>

XIA, J; TIAN, Q. (2009) Early-stage toxicity of excess copper to photosystem II of *Chlorella pyrenoidosa* – OJIP chlorophyll a fluorescence analysis. *Journal of Environmental Sciences*, v. 21, n. 11, p. 1569–1574. DOI : [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(08\)62457-2](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(08)62457-2).

XIAO, Z. et al. (2020). Effects of exogenous manganese on its plant growth, subcellular distribution, chemical forms, physiological and biochemical traits in *Cleome viscosa* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 198, 110696. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110696>.

WANG, P; LIU, W-C; HAN, C; WANG, S; BAI, M-Y; SONG, C-P. Reactive oxygen species: Multidimensional regulators of plant adaptation to abiotic stress and development. *Journal of Integrative Plant Biology*, v. 66, n. 3, p. 529–553, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1111/jipb.13601>.

WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and

procedures for chemical quality control. *Journal of Apicultural Research*, v. 37, n. 2, p. 99–105, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1080/00218839.1998.11100961>

WOJAS, S.; CLEMENS, S.; HENNIG, J.; SKŁODOWSKA, A.; KOPERA, E.; SCHAT, H.; ... ANTOSIEWICZ, D. M. (2008). Overexpression of phytochelatin synthase in tobacco: distinctive effects of AtPCS1 and CePCS genes on plant response to cadmium. *Journal of Experimental Botany*, v. 59, n. 8, p. 2205-2219, DOI: [10.1093/jxb/ern092](https://doi.org/10.1093/jxb/ern092).

YADAV, S. K. (2010). Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *South African Journal of Botany*, 76(2), 167–179. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2009.10.007>.

YRUELA, I. (2009). Copper in plants: acquisition, transport and interactions. *Functional Plant Biology*, 36(5), 409–430. DOI: [10.1071/FP08288](https://doi.org/10.1071/FP08288)

ZUSHI, K.; MATSUZOE, N. (2017). Seasonal and cultivar differences in photosynthetic capacity and chlorophyll fluorescence in tomato (*Solanum lycopersicum*) grown in open-field conditions. *Environmental and Experimental Botany*, v. 139, p. 168–178. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.05.005>.

ZHU, S. et al. Overexpression of BnPCS1 enhances tolerance to cadmium by decreasing H₂O₂ and MDA in Arabidopsis. *Front. Plant Sci.*, 12:639189, 2021. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.639189>.