

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA**

WILLIAM FERREIRA FALCO

**APLICAÇÃO DA FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA *a*
INDUZIDA POR LUZ LASER NO PROCESSO DE
CARACTERIZAÇÃO DA INTERAÇÃO
NANOPARTÍCULA-PLANTA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
AMBIENTAL**

**DOURADOS/MS
FEVEREIRO/2012**

WILLIAM FERREIRA FALCO

**APLICAÇÃO DA FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA *a*
INDUZIDA POR LUZ LASER NO PROCESSO DE
CARACTERIZAÇÃO DA INTERAÇÃO
NANOPARTÍCULA-PLANTA**

**ORIENTADOR: ANDERSON RODRIGUES LIMA CAIRES
CO-ORIENTADOR: EVARISTO ALEXANDRE FALCÃO**

**Dissertação de mestrado submetida ao
programa de pós-graduação em Ciência e
Tecnologia Ambiental, como um dos
requisitos necessários para a obtenção do
título de mestre em Ciência e Tecnologia na
área de concentração Ciência Ambiental.**

**DOURADOS/MS
FEVEREIRO/2012**



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
AMBIENTAL

TERMO DE APROVAÇÃO

Após apresentação, argüição e apreciação pela banca examinadora foi emitido o parecer APROVADO para a dissertação intitulada: **“Aplicação da fluorescência da clorofila *a* induzida por luz laser no processo de caracterização da interação nanopartícula-planta”**, de autoria de WILLIAM FERREIRA FALCO, apresentada ao Programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados.

Prof. Dr. Anderson Rodrigues Lima Caires (Orientador- UFGD)
Presidente da Banca Examinadora

Prof. Dr. Sandro Márcio Lima (UEMS)
Membro Examinador

Prof. Dr. Jean Claude M'Peko (USP)
Membro Examinador

*Dedico este trabalho à minha esposa
Sthefany e ao meu filho Lucas.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo dom da vida e por iluminar meus caminhos;

Aos professores do grupo pelo incentivo, força e pelo auxílio na elaboração desse trabalho, em especial ao Prof. Anderson Caires, que me orientou com compromisso e paciência;

A todos os colegas do grupo, pelo companheirismo e também porque cada um, de alguma forma me ajudou nessa empreitada, principalmente ao Joelson e ao Abdimar, parceiros nos experimentos com a soja, que contribuíram diretamente nos experimentos;

Aos técnicos da UFGD pelo apoio e por estarem sempre dispostos a ajudar;

À minha esposa, Sthefany, por estar sempre ao meu lado em todos os momentos e por me apoiar sempre que preciso;

Ao meu irmão Wesley, pelos momentos de descontração e por também me ajudar nos experimentos quando precisei;

Aos meus pais Rute e Cícero e também à minha irmã Regiane, pelos conselhos, por me apoiarem e sempre me incentivar;

A todos que de maneira direta ou indireta contribuíram no desenvolvimento desse trabalho.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Aplicações de nanopartículas no setor agro-alimentar.....	4
Tabela 2: Toxicidade das nanopartículas.....	6
Tabela 3: Teste t de Student realizado a partir dos espectros das Figuras 16 e 17.....	26
Tabela 4: Tempos de vida obtidos pelo ajuste da curva de decaimento da fluorescência para três amostras de extrato de clorofila com diferentes concentrações de NPs de prata, com emissão em 673 nm e excitação por dois fótons em 800 nm.....	35
Tabela 5: Teste t de Student realizado a partir dos espectros das Figuras 28 e 29.....	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Logotipo da IBM produzido por Donald Eigler e colaboradores em 1989.....	2
Figura 2: Diagrama de Jablonski. S são os níveis de energia no estado singlete, e T no estado tripleto; h é a constante de Planck e ν_A , ν_F e ν_P são as frequências das radiações da absorção, fluorescência e fosforescência, respectivamente.....	8
Figura 3: Plantas de soja BRS 245 RR utilizadas nos experimentos com NPs de ouro e de prata.....	12
Figura 4: Espectrofluorímetro portátil composto por dois lasers, um monocromador, um laptop e uma fibra óptica do tipo Y.....	13
Figura 5: Espectrofotômetro de fluorescência utilizado nas medidas <i>in vitro</i>	14
Figura 6: Espectrofotômetro de absorção molecular no UV-VIS, utilizado nas medidas <i>in vitro</i>	15
Figura 7: Medidas de fluorescência realizadas nas plantas <i>in vivo</i> , utilizando-se o espectrofluorímetro portátil.....	16
Figura 8: Folhas de uma planta de soja: folíolo central do 1º trifólio (A), unifólio (B) e cotilédone (C).....	17
Figura 9: Espectro de absorção do extrato da clorofila da amostra controle.....	18
Figura 10: Espectro de absorção do extrato de Chl em função da concentração de NPs de ouro de 5 nm.....	19
Figura 11: Absorbância do extrato de clorofila em 538 nm com NPs de ouro de 5, 10 e 20 nm.....	20

Figura 12: Fluorescência do extrato de clorofila da amostra controle, com excitação em 405 e 532 nm.....	21
Figura 13: Supressão na intensidade de fluorescência do extrato de clorofila com NPs de ouro de 5 nm, com excitação em 405 nm.....	21
Figura 14: Razão entre os picos de fluorescência em 673 e 723 nm do extrato de clorofila em função da concentração das NPs de ouro de 5, 10 e 20 nm, com excitação em 405 nm.....	22
Figura 15: Razão de F_0/F em 673 nm em função da concentração de NPs de ouro de 5, 10 e 20 nm, com excitação em 405 e 532 nm. F_0 e F são as intensidades de fluorescência da clorofila na ausência e presença de nanopartículas de ouro, respectivamente.....	23
Figura 16: Fluorescência normalizada das folhas cotiledonares, dos unifólios e dos trifólios da planta <i>in vivo</i> , com excitação em 405 nm. Os espectros são as médias das medidas realizadas em 20 plantas de soja.....	25
Figura 17: Fluorescência normalizada das folhas cotiledonares, dos unifólios e dos trifólios da planta <i>in vivo</i> , com excitação em 532 nm. Os espectros são as médias das medidas realizadas em 20 plantas de soja.....	25
Figura 18: Fluorescência normalizada do folíolo central do primeiro trifólio da planta <i>in vivo</i> , com excitação em 405 e 532 nm.....	28
Figura 19: Espectro de absorção do extrato de clorofila em função da concentração de nanopartículas de prata, na região da banda plasmônica da prata...	29
Figura 20: Absorbância do extrato de clorofila em 419 nm em função da concentração de NPs de prata.....	30

Figura 21: Fluorescência do extrato de clorofila com diferentes concentrações de NPs de prata, com excitação em 405 nm.....	31
Figura 22: Razão de F_0/F em 673 nm do extrato de clorofila em função da concentração de nanopartículas de prata, com excitação em 405 nm.....	33
Figura 23: Tempo de decaimento da fluorescência em 673 nm de três amostras de extrato de clorofila em função da concentração de NPs de prata, com excitação por dois fótons em 800 nm.....	34
Figura 24: Razão de F_0/F em 673 nm do extrato de clorofila em função da concentração de nanopartículas de prata na região de 0 a 100 μM , com excitação em 405 nm.....	36
Figura 25: Razão de F_0/F em 673 nm do extrato de clorofila em função da concentração de nanopartículas de prata na faixa entre 100 e 1000 μM , para excitação em 405 nm.....	36
Figura 26: Linearização da curva de F_0/F em 673 nm do extrato de clorofila em função da concentração de nanopartículas de prata na faixa entre 200 e 1000 μM , para excitação em 405 nm.....	37
Figura 27: Razão F_{673}/F_{720} em função da concentração de NPs de prata, com excitação em 405 nm.....	38
Figura 28: Fluorescência normalizada das folhas cotiledonares, dos unifólios e dos trifólios da planta <i>in vivo</i> , com excitação em 405 nm.....	38
Figura 29: Fluorescência normalizada das folhas cotiledonares, dos unifólios e dos trifólios da planta <i>in vivo</i> , com excitação em 532 nm.....	39

Figura 30: Fluorescência normalizada dos folíolos centrais do primeiro trifólio da planta *in vivo*, com excitação em 405 nm..... 41

Figura 31: Fluorescência normalizada dos folíolos centrais do primeiro trifólio da planta *in vivo*, com excitação em 532 nm..... 41

RESUMO

A nanotecnologia é um campo emergente na ciência e na engenharia, apresentando impactos significativos sobre a economia, sociedade e meio ambiente. Atualmente, os materiais em nanoescala são utilizados em diferentes áreas, tais como eletrônica, biomédica, farmacêutica, cosmético, energia, ambiente, produtos e aplicações de materiais. Contudo, a produção, utilização e eliminação dos nanomateriais conduzirão inevitavelmente a sua liberação para a atmosfera, água e solo e ainda existem inúmeras incertezas sobre os efeitos e impactos desses materiais no meio ambiente. Neste contexto, o presente trabalho objetiva avaliar, via fluorescência induzida por luz laser, os efeitos e alterações que nanopartículas metálicas (ouro e prata) podem induzir nas atividades fotossintéticas de plantas de soja. A fluorescência da clorofila é uma técnica precisa e não-destrutiva que tem se mostrado eficaz no estudo da eficiência fotossintética, indicando direta ou indiretamente, os reflexos dos impactos de fatores ambientais e as conseqüentes mudanças no estado fisiológico das plantas. A alteração na emissão da fluorescência da clorofila *a* entre 600 e 800 nm, com excitação em 405 e 532 nm, foi monitorada para estudar os efeitos induzidos pela penetração das nanopartículas nas sementes e nos tecidos da planta *in vivo*. Os resultados obtidos mostraram uma supressão na fluorescência da clorofila na presença das nanopartículas metálicas e sugerem que as nanopartículas foram absorvidas e transportadas pelas plantas.

Palavras-chave: Espectroscopia de fluorescência, planta, clorofila, nanopartícula, ouro, prata, supressão.

ABSTRACT

Nanotechnology is an emerging field in science and technology, with significant impacts on the economy, society and environment. Nowadays, nanoscale materials are used in different areas such as electronics, biomedical, pharmaceutical, cosmetics, energy, environment, products and materials applications. However, the production, use and disposal of nanomaterials will inevitably lead to their release to the atmosphere, water and soil and there are still several uncertainties about the effects and impacts of these materials into the environment. In this context, the present study aimed to investigate the interaction between soybean plants and metal nanoparticles (gold and silver) by using fluorescence spectroscopy. The chlorophyll fluorescence is a precise and non-destructive technique which has been used to evaluate the photosynthetic efficiency, indicating directly or indirectly, the effects of the impacts of environmental factors and changes in plant physiological status. The chlorophyll emission in the range 600 and 800 nm when excited at 405 and 532 nm was monitored to evaluate the effects induced by penetration of nanoparticles in the seeds and plant tissues *in vivo*. The results showed a suppression of chlorophyll fluorescence in the presence of metal nanoparticles and suggest that nanoparticles were absorbed and carried by the plant.

Keywords: Fluorescence spectroscopy, plant, chlorophyll, nanoparticle, gold, silver, quenching.

SUMÁRIO

Capítulo I.....	1
1 Introdução.....	1
1.1 Um Breve Histórico da Nanotecnologia.....	1
1.2 Algumas Aplicações dos Nanomateriais.....	2
1.3 Estudos das Implicações do Uso de Nanomateriais em Áreas Diversas.....	5
1.4 Fluorescência da Clorofila.....	7
Capítulo II.....	10
2 Objetivos.....	10
2.1 Objetivo Geral.....	10
2.2 Objetivos Específicos.....	10
Capítulo III.....	11
3 Materiais e Métodos.....	11
3.1 Nanopartículas de Ouro e de Prata.....	11
3.2 Preparação e Plantio da Soja.....	11
3.3 Extração da Clorofila.....	13
3.4 Medidas de Absorção e Fluorescência Molecular.....	13
3.4.1 Análises <i>in vivo</i>	16
Capítulo IV.....	18
4 Resultados e Discussão.....	18
4.1 Experimentos com Nanopartículas de Ouro.....	18
4.1.1 Análises no Extrato de Clorofila.....	18
4.1.2 Análises <i>in vivo</i>	24
4.2 Experimentos com Nanopartículas de Prata.....	29
4.2.1 Análises no Extrato de Clorofila.....	29
4.2.2 Análises <i>in vivo</i>	38
Capítulo V.....	43
5 Considerações Finais.....	43
Capítulo VI.....	45
6 Referências Bibliográficas.....	45
Apêndice A – Teste <i>t</i> de Student.....	52
Anexo I – Certificado de Premiação.....	56
Anexo II – Artigo Publicado.....	58

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

1.1 Um Breve Histórico da Nanotecnologia

Nos últimos anos, as pesquisas em materiais nanoestruturados proporcionaram um grande avanço tecnológico em diversas áreas, tais como medicina, farmacêutica, cosmética, têxtil, automobilística, agrícola, entre outras [1]. O precursor do conceito da nanotecnologia foi o físico Richard Feynman (Prêmio Nobel de Física em 1965) que, apesar de não utilizar esse termo, discutiu acerca da idéia de manipulação da matéria ao nível atômico, ao proferir uma palestra intitulada ‘Há muito espaço lá embaixo’, no encontro anual da Sociedade Americana de Física, em 29 de dezembro de 1959. Desde então, os progressos no campo da nanociência e em suas aplicações práticas apresentam um ritmo intenso e incessante [2].

Na base de dados do Instituto de Informações Científicas (ISI, na sigla inglesa), os termos nanotecnologia, nanociência e nanomateriais foram incorporados aos textos acadêmicos a partir de 1987. De fato, na década de 80, com a sofisticação das técnicas de microscopia, a fabricação de modernos microscópios e os trabalhos de Kim Eric Drexler, assinalou-se o momento da divulgação dos potenciais usos revolucionários das nanotecnologias. A visualização e a manipulação de átomos individuais foram a grande novidade neste período histórico. A possibilidade de organizar artificialmente os átomos e moléculas propiciou a miniaturização de objetos e a produção de materiais mais resistentes [3]. Em 1989, o físico norte-americano Donald Eigler e colaboradores, pesquisadores de uma das maiores empresas de computadores, a International Business Machines (IBM), foram capazes de produzir um logotipo reunindo 35 átomos de Xenônio depositados sobre uma superfície de prata utilizando um microscópio de tunelamento, como mostrado na Figura 1. A altura da letra I, formado por nove átomos de Xenônio, é da ordem de 5 nm [4].

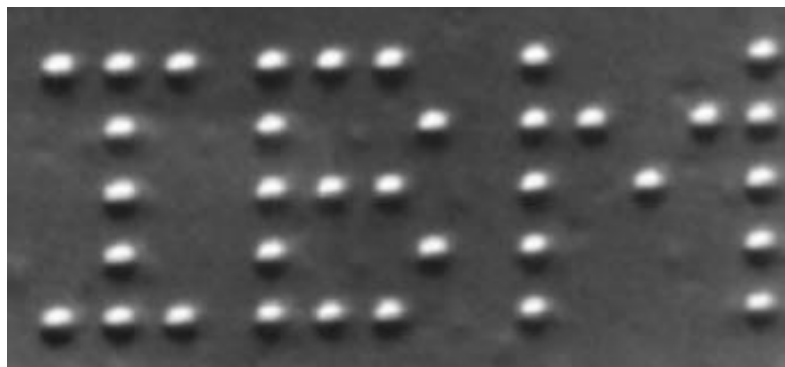


Figura 1: Logotipo da IBM produzido por Donald Eigler e colaboradores em 1989 [4].

Nos anos 90, as nanotecnologias destacaram-se como área estratégica de investimentos em pesquisas básicas sendo também empregadas no setor industrial. Essas novas tecnologias foram as responsáveis pela procura do controle de processos, produtos, materiais e substâncias, interferindo terminantemente na economia mundial [5].

A grande competitividade capitalista é um dos estímulos à disseminação do uso das nanotecnologias. Neste contexto, pesquisas realizadas sobre a aplicação das nanotecnologias em produtos industriais de diversos setores ainda motivam incertezas sobre os verdadeiros benefícios ou possíveis malefícios em relação à utilização dessas inovações [6]. Dessa maneira, cabe à sociedade refletir acerca do uso das nanotecnologias e sua possível influência em uma revolução na vida humana. Os reais impactos econômicos, ambientais e sociais da adesão a esta nova tecnologia devem ser discutidos [3].

1.2 Algumas Aplicações dos Nanomateriais

Os avanços na nanociência têm levado ao desenvolvimento de uma grande quantidade de novos produtos de consumo que contenham nanomateriais e, conseqüentemente, houve um grande aumento na produção em massa e volume de diversos tipos de nanopartículas (NPs). A prata (Ag) em nanopartículas têm sido estudada vastamente, em grande parte, devido aos seus efeitos antimicrobianos [7]. Estas propriedades proporcionam uma ampla variedade de aplicações comerciais das NPs de prata, refletindo em um aumento significativo de sua produção e da conseqüente eliminação ao meio ambiente [8, 9].

Uma das aplicações das nanopartículas representa a nova geração de tecnologias de recuperação ambiental que poderia fornecer soluções de baixo custo a alguns dos mais desafiadores problemas de limpeza ambiental. Partículas em nanoescala têm grandes áreas de superfície e elevada reatividade, oferecendo uma enorme flexibilidade para aplicações *in situ*. Pesquisas têm mostrado que as partículas em nanoescala são muito eficazes para a transformação e desintoxicação de uma grande variedade de contaminantes ambientais comuns, tais como solventes orgânicos clorados e pesticidas organoclorados [10].

No setor agro-alimentar a nanotecnologia tem o potencial para revolucionar o sistema global. Novos sistemas de segurança agrícolas e alimentares, métodos de entrega de tratamento da doença, ferramentas de biologia molecular e celular, sensores para detecção de patógenos, pesticidas, materiais de embalagem e proteção ambiental são exemplos do impacto positivo que a nanotecnologia poderia trazer sobre a ciência e engenharia dos sistemas agrícolas e alimentares [11-13]. Na Tabela 1 é apresentada uma síntese das aplicações da nanotecnologia nesse setor. Como um exemplo, pode-se citar as NPs de prata que são utilizadas na conservação de produtos alimentares devido ao seu efeito anti-bacteriano.

Tabela 1: Aplicações de nanopartículas no setor agro-alimentar. Modificado da referência [12].

Setor	Aplicação	Nanotecnologia	Função
Produção Agrícola	Nanosensores	Nano-spray de produtos alimentares	Identifica e colore micro-organismos
		Dispositivos portáteis	Detecção de contaminantes, microtoxinas e microorganismo
	Pesticidas	Nano-emulsões, encapsulados	Aumento da solubilidade em água
		Liberação por nano-casulas	Tratamento localizado
	Purificação e limpeza da água e solo	Filtro com nano-poros	Remoção de contaminantes
		NPs	Remoção, catalisação, oxidação de contaminante
Produção e processamento de alimentos	Produção de Alimentos	Dispositivos nano-cerâmica	Grande área de superfície reativa
	Refrigeradores, recipientes de armazenamento, equipamentos de preparação de alimentos	NPs incorporadas de prata e ocasionalmente de óxido de zinco	Revestimento anti - bacteriano
Conservação	Produtos alimentares	Spray de NPs de prata	Ação anti- bacteriana
	Embalagens	Sensores incorporados	Detecção de deterioração e monitoramento das condições de armazenamento
		NPs incorporadas	Aumentar propriedades de barreira, resistência dos materiais
		NPs incorporadas Ativas	Oxigenação, prevenção do crescimento de patógenos
Alimentos funcionais, consumo	Suplementos / aditivos	NPs metálicas coloidais	Aumento da absorção de metal desejável
		Sistemas de entrega " Nano clusters "	Proteger a entrega do conteúdo
		Nutrientes nanoparticulados	Maior captação

Outros materiais nanoparticulados bastante utilizados na nanotecnologia são o dióxido de titânio (TiO₂) e o óxido de zinco (ZnO). Ambos têm sido usados em produtos como protetores solares, produtos farmacêuticos e em revestimentos protetores contra a radiação ultravioleta [14, 15]. Com a ampla gama de aplicação dessas partículas, o seu descarte no meio ambiente em concentrações cada vez maiores será inevitável [8]. Entre os anos de 2005 e 2010, a quantidade de produtos que empregam a nanotecnologia aumentou de 54 para 1015. Como resultado, a quantidade de

nanomateriais que estão entrando nos fluxos de resíduos está aumentando progressivamente [9].

1.3 Estudos das Implicações do Uso de Nanomateriais em Áreas Diversas

As nanopartículas, embora sendo do mesmo elemento químico, comportam-se de forma distinta em relação às partículas maiores, em termos de propriedades químicas, físicas e biológicas. Portanto, o tamanho da partícula é de suma importância em relação aos efeitos que podem produzir, porque muda a natureza das interações das forças entre as moléculas do material e assim, altera os impactos que estes processos ou produtos nanotecnológicos podem causar ao meio ambiente, à saúde humana e à sociedade como um todo [12].

Algumas pesquisas têm sido realizadas no sentido de entender os processos, interações e a toxicidade de nanopartículas de diferentes materiais em várias áreas do conhecimento. Estudos mostram que partículas com dimensões nanométricas (<100 nm) podem modificar as propriedades físico-químicas do material (por exemplo, realizando feitos extraordinários de condutividade, reatividade e sensibilidade óptica) [16]. Portanto, tais materiais podem gerar efeitos biológicos adversos nas células vivas. Estudos têm demonstrado a toxicidade de nanopartículas como o fulereno, nanotubos de carbono e óxidos metálicos para células humanas, bactérias e roedores [17-21]. Um estudo pioneiro demonstrou que fulerenos não revestidos exercem um estresse oxidativo causando uma severa peroxidação lipídica no tecido do cérebro de peixe, um possível impacto negativo dos nanomateriais na saúde dos organismos aquáticos [22-23].

O dióxido de titânio (TiO_2) em dimensões nanométricas é fabricado em grandes quantidades para uso em uma ampla gama de aplicações, incluindo a fabricação e pigmentação de cosméticos. Apesar do TiO_2 ser quimicamente inerte, as nanopartículas de TiO_2 podem causar efeitos negativos à saúde, como câncer do trato respiratório em ratos. No entanto, os mecanismos envolvidos na genotoxicidade e carcinogenicidade induzida por TiO_2 não foram claramente definidos e são pouco estudados *in vivo*. Um estudo realizado em camundongos selvagens investigou a genotoxicidade, o dano oxidativo ao DNA e inflamações induzidas por nanopartículas de TiO_2 . Os resultados mostraram que as nanopartículas de TiO_2 provocaram quebras da cadeia dupla do DNA e também inflamações, possivelmente causadas por um mecanismo genotóxico

secundário associado a um estresse oxidativo. Portanto, dado o crescente uso de nanopartículas, estes resultados levantam preocupações sobre riscos potenciais à saúde associados à exposição de nanopartículas [24].

A Tabela 2 apresenta os sintomas causados por algumas partículas em determinados organismos. Partículas de Zn, por exemplo, de 58 nm em dose de 5 g / kg, podem provocar letargia, vômito, diarreia e até mesmo a morte em ratos [25].

Tabela 2: Toxicidade das nanopartículas. Modificado da referência [23].

Partícula	Tamanho	Dose	Organismo	Sintoma	Referências
Zn	58 ± 16 nm	5 g / kg	Ratos	Letargia, vômitos, diarreia e morte	[25]
Zn	1,08 ± 0,25 µm	5 g / kg	Ratos	Letargia, vômitos e diarreia	[25]
ZnO	19-36 nm	> 15 mg / L	Células humanas e de roedores	Morte	[17]
ZnO	Chorume em pó	5,4-45,5 mg / mL	Bactérias (<i>E. coli</i>)	Inibição do crescimento	[26]
Al	30 nm	0-250 mg / L	Célula do fígado de rato	Não houve efeito significativo	[18]
Al	103 nm	0-250 mg / L	Célula do fígado de rato	Diminuição da função mitocondrial de 250 mg / L	[18]
Al ₂ O ₃	13 nm	2000 mg / L	Cinco espécies de plantas	Inibição do alongamento radicular	[27]
Al ₂ O ₃	Chorume em pó	62,5-250 mg / mL	Bactérias (<i>E. coli</i>)	Sem efeito	[26]
Nanotubos de carbono	Indisponível	5 mg / L	Macrófagos de ratos	Citotóxicos	[21]
Nanotubos de carbono	10-20 nm	3,06 g / cm ²	Macrófagos alveolares	Citotóxicos	[19]
Nanotubos de carbono	5-10 nm	≤ 5 mg / rato	Ratos	Reações inflamatórias e fibrose pulmonar	[28]

Um aspecto importante da avaliação dos riscos das NPs é compreender as interações entre NPs e plantas, um componente de base essencial de todos os ecossistemas. O impacto das NPs nas plantas depende da composição, concentração, tamanho e outras importantes propriedades físico-químicas das NPs e das espécies vegetais. Estudos envolvendo NPs e plantas têm mostrado que NPs podem inibir o crescimento e a germinação de plantas [23, 27, 29]. Outros estudos revelam que as NPs podem potencialmente ser absorvidas pelas raízes das plantas e transportadas para a

parte aérea através dos sistemas vascular, dependendo da composição, forma, tamanho da NPs e da anatomia vegetal [6]. Apesar dos conhecimentos adquiridos através de alguns estudos anteriores, muitas perguntas permanecem não respondidas em relação ao destino e comportamento das NPs em sistemas vegetais, tais como o papel da área ou atividade de superfície das NPs na fitotoxicidade, a rota potencial de entrada nos tecidos vegetais vasculares e o papel das paredes celulares da planta na internalização das NPs.

1.4 Fluorescência da Clorofila

A fluorescência é um fenômeno óptico que ocorre em uma molécula após a incidência de energia luminosa (fótons). Fisicamente os fótons absorvidos pela estrutura eletrônica elevam a energia dos elétrons da molécula a estados quânticos excitados e menos estáveis. A Figura 2 mostra um diagrama de Jablonski típico, que ilustra os estados de energia de uma molécula e as transições entre eles. Para obter maior estabilidade, a molécula dissipa a energia absorvida por processos de decaimento radiativo e/ou não-radiativo. Os processos de decaimento radiativo envolvem a emissão de fótons, sendo que essa emissão pode ocorrer por fluorescência ou fosforescência. Na fluorescência o processo de decaimento possui tempo de vida na ordem de nanosegundos e a multiplicidade não é alterada, enquanto que na fosforescência o tempo de vida é da ordem de segundos e a multiplicidade sofre alteração em um processo denominado cruzamento intersistema. Os processos não-radiativos ocorrem por conversão interna, abrangendo vibrações, rotações e translações da biomolécula ou ainda transferência de energia para as moléculas vizinhas através de colisões. Devido às suas características a fluorescência é conhecida como uma “assinatura molecular” [30].

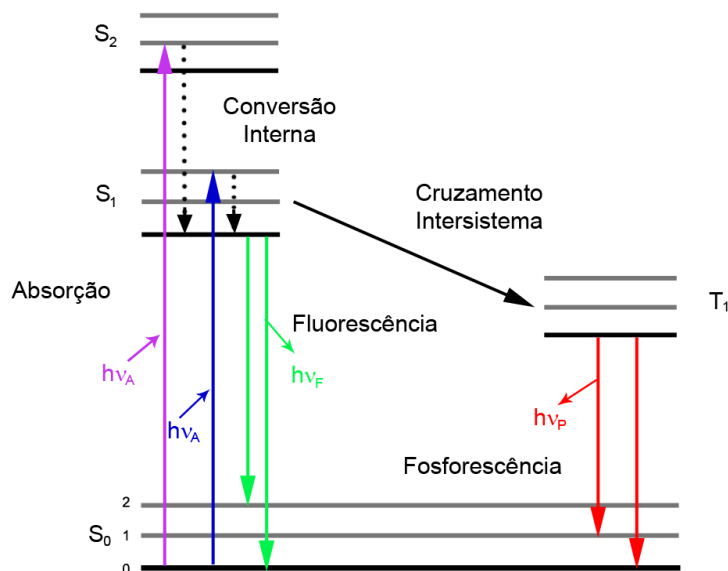


Figura 2: Diagrama de Jablonski. S são os níveis de energia no estado singlete, e T no estado tripleto; h é a constante de Planck e ν_A , ν_F e ν_P são as frequências das radiações da absorção, fluorescência e fosforescência, respectivamente. Modificado da referência [31].

A fluorescência da clorofila tem sido utilizada como uma técnica precisa e não destrutiva no estudo da eficiência fotossintética, indicando direta ou indiretamente os reflexos dos impactos de fatores ambientais e mudanças no estado fisiológico das plantas [32]. A eficiência fotossintética de muitas plantas diminui quando são submetidas a condições de estresse [33, 34]. Portanto, a fluorescência da clorofila tem sido usada como um método eficaz para investigar o conteúdo de clorofila em plantas, identificar classes de plantas e para detectar estresse causado pela deficiência de nutrientes, agentes poluidores, etc [35].

A luz ultravioleta e visível (UV-Vis) absorvida pelas folhas verdes pode induzir duas regiões distintas de fluorescência: as emissões na faixa de comprimentos de onda entre 400 e 600 nm, que está associada a vários fluoróforos, tais como ácidos hidroxicinâmicos, flavonóis, isoflavonas, flavanonas e ácidos fenólicos; e entre 600 e 800 nm que, *in vivo*, é produzida apenas pela clorofila *a* (Chl*a*) [36]. Nesta região, entre 600 e 800 nm, a maioria da fluorescência, com máximos em 685 e 735 nm, é emitida pela Chl*a* presente no fotossistema II (PSII) em temperatura ambiente. No entanto, uma pequena contribuição de fluorescência do fotossistema I (PSI) na faixa entre 710 e 720 nm tem sido relatada [36].

Uma vez que a fluorescência emitida ao meio ambiente pela clorofila da folha depende da concentração de clorofila na amostra e da captura de fótons pelos fotossistemas, pode-se dizer que estudar a fluorescência da clorofila implica estudar, indiretamente, os estados dos aparatos fotossintéticos da planta, e dessa forma é possível identificar a influência das condições ambientais sobre o seu rendimento bioquímico, por exemplo [36-38]. Como as clorofilas estão em abundância nas plantas adultas, seu estudo se torna uma alternativa viável para observar mudanças na planta causadas por agentes bióticos ou abióticos [36].

CAPÍTULO II

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial da espectroscopia de fluorescência induzida a laser no estudo das alterações na resposta fisiológica de plantas induzidas por nanopartículas de ouro e prata.

2.2 Objetivos Específicos

- Estudar as mudanças no processo fotossintético das plantas de soja induzido pelas nanopartículas de ouro e prata, via espectroscopia de fluorescência;
- Caracterizar a interação entre a clorofila e nanopartículas de ouro e prata através de técnicas ópticas;
- Avaliar o efeito da concentração e da dimensão de nanopartículas de ouro e prata na clorofila;
- Analisar os efeitos das nanopartículas de ouro e prata na fluorescência da clorofila *a* em plantas de soja *in vivo*.

CAPÍTULO III

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Nanopartículas de Ouro e de Prata

Foram utilizadas nanopartículas de ouro (Au) adquiridas da Sigma-Aldrich de três diâmetros: 5 nm, 10 nm e 20 nm. A solução coloidal contém, aproximadamente: 0,01% H₂AuCl₄ suspenso em 0,01% ácido tânico com 0,04% citrato trissódico, 0,26 mM carbonato de potássio e 0,02% azida de sódio. Utilizou-se também nanopartículas de prata (Ag) da marca Sigma-Aldrich contendo 10% de nanopartículas < 100 nm suspensas em etilenoglicol.

3.2 Preparação e Plantio da Soja

Neste estudo as sementes foram semeadas em vasos contendo 3,26 dm³ de solo Latossolo Vermelho. O solo foi peneirado e adicionado em cada vaso e posteriormente tratado com calcário, para elevar os teores de cálcio e magnésio e corrigir a acidez. Nesta etapa, após a aplicação do calcário, os vasos foram regados mantendo a quantidade de água a 20% da massa de solo por um período de dez dias.

Para o plantio, foram utilizadas sementes de soja (*Glycine max*) da variedade BRS 245 RR, com percentual de germinação de 92%. Separou-se três grupos de sementes medindo a massa de 200 g. Em cada 200 g de sementes acrescentou-se 0,5 g de inoculante (Biomax 7,2x10⁹ ufc/g) e 0,6 mL de fungicida Derosal Plus. Os inoculantes tem o papel de estimular o crescimento das plantas. No caso da soja, os inoculantes são compostos de duas espécies de bactérias do gênero *Brodythizobium*, que têm a função de fixar nitrogênio em soja por um processo denominado simbiose [39].

As sementes foram divididas em três grupos. O primeiro grupo, denominado *NS* (NPs nas sementes), recebeu a adição de 5 mL de solução contendo 2,26 mL de nanopartículas dissolvido em água destilada antes do plantio. Em um saco plástico, foram acrescentados os 200 g de sementes juntamente com a solução de 5 mL contendo NPs, agitando-se lentamente até que as sementes absorvessem a solução. No segundo grupo, denominado *NF* (NPs nas folhas), foram aplicadas nanopartículas nas folhas da planta adulta após a formação do terceiro trifólio. O terceiro grupo, denominado *SN*

(sem NPs), foi utilizado como controle, ou seja, não recebeu nanopartículas em nenhuma das etapas do experimento.

Juntamente com o plantio, foi feito também a adubagem do solo adicionando-se 0,13 g de KCl e 0,51 g de Superfosfato Triplo. Todas as metodologias empregadas no preparo do solo, das sementes e no plantio da soja, foram realizadas conforme protocolo já estabelecido pelo Laboratório de Fitopatologia da UFGD [40].

Dez sementes de soja foram semeadas por vaso. Duas semanas após a germinação, duas plantas foram deixadas em cada vaso. A Figura 3 mostra as plantas de soja utilizadas nos experimentos. Os vasos foram regados com um volume suficiente de água para manter o solo a 100% da capacidade de campo. As plantas foram cultivadas em uma estufa à temperatura ambiente.



Figura 3: Plantas de soja BRS 245 RR utilizadas nos experimentos com NPs de ouro e de prata.

Todos esses procedimentos foram realizados em dois experimentos distintos: um com NPs de ouro e um segundo experimento com NPs de prata. No experimento com nanopartículas de ouro a concentração de ouro na solução adicionada nas sementes do grupo *NS* foi de 132,88 μM , com NPs de 5 nm. Já no experimento com nanopartículas de prata, sabendo que o diâmetro das NPs de Ag é da ordem de 100 nm, o que diminui a possibilidade de penetração dessas NPs nas sementes, aplicou-se uma solução em *NS* com uma maior concentração de prata, que foi de 419,05 mM.

3.3 Extração da Clorofila

O processo de extração de clorofila (Chl) foi realizado baseando-se na metodologia proposta por Richards & Thompson [41]. Foram coletadas as folhas das plantas controle, picotadas e adicionadas 3 g de folhas em 30 mL de Metanol PA, macerando-se por 2 min. Posteriormente, a mistura foi agitada a frio por 20 min e então, centrifugada a 2000 RPM por 5 min. Para utilização nos espectrofotômetros de absorção e de fluorescência, 1 mL do extrato de clorofila foi diluído em 10 mL de Metanol PA.

3.4 Medidas de Absorção e Fluorescência Molecular

Nas análises de fluorescência das folhas da planta *in vivo* foi utilizado um fluorímetro portátil constituído de dois lasers, operantes em 405 e 532 nm, um monocromador (USB 2000 FL – Ocean Optics), uma fibra óptica do tipo Y e um laptop, como mostrado na Figura 4.



Figura 4: Espectrofluorímetro portátil composto por dois lasers, um monocromador, um laptop e uma fibra óptica do tipo Y.

As medidas de fluorescência do extrato de clorofila foram realizadas no espectrofotômetro Cary Eclipse (Varian), mostrado na Figura 5. O espectrofluorímetro possui como fonte de excitação uma lâmpada pulsada de Xenônio (80 Hz), com a largura a meia altura do pulso de aproximadamente 2 μ s e potência de pico equivalente a 75 KW; dois monocromadores, um para a seleção do comprimento de onda de

excitação e outro para a seleção do comprimento de onda emitido pela amostra. A detecção da fluorescência é feita por um tubo fotomultiplicador (R928).



Figura 5: Espectrofotômetro de fluorescência utilizado nas medidas *in vitro*.

Em ambos os sistemas, as amostras foram excitadas em dois comprimentos de onda: em 405 nm coletando os espectros de fluorescência entre 420 e 900 nm; e em 532 nm analisando a emissão de fluorescência de 540 a 900 nm. Nas análises do extrato de clorofila as medidas foram realizadas utilizando-se uma cubeta de quartzo de 10 mm de caminho óptico, com as quatro faces polidas. Nas medidas *in vivo*, os espectros foram coletados diretamente das folhas com auxílio de uma fibra óptica.

No estudo da absorção do extrato de clorofila, foi utilizado o espectrofotômetro Cary 50 UV-VIS (Varian), que pode ser visto na Figura 6. O espectrofotômetro de absorção molecular tem como fonte de excitação uma lâmpada pulsada de Xenônio, um monocromador Czerny-Turner 0,25 m e um detector de diodo de Si. As medidas de absorção foram realizadas de 200 a 900 nm, usando cubeta de duas faces polidas de 10 mm de caminho óptico. Todas as medidas foram realizadas à temperatura ambiente.



Figura 6: Espectrofotômetro de absorção molecular no UV-VIS, utilizado nas medidas *in vitro*.

Através das medidas de absorção molecular, foi calculado o teor da clorofila total [*Chl a + b*] das amostras de extrato de clorofila baseando-se no método de Arnon adaptado por Porra et al [42], para extração metanólica, descrito pela Equação 1, onde [*Chl a + b*] é a concentração das clorofilas *a* e *b*, A^{652} é a absorbância em 652 nm, $A^{665,2}$ é a absorbância em 665,2 nm e as constantes 24,23 e 3,26 são os coeficientes de extinção específica da Chl em 652 e 665,2 nm, respectivamente.

$$[Chl\ a + b] = 24,23A^{652} + 3,26A^{665,2} \quad \text{Equação 1}$$

As medidas de fluorescência resolvida no tempo, para o estudo do tempo de vida no estado excitado de amostras do extrato de clorofila com nanopartículas de prata, foram realizadas no Instituto de Física de São Carlos (IFSC). Foi utilizado um Microscópio Confocal Multifóton LSM 780 Zeiss equipado com Sistema Picoquant Fluortime para medida de decaimento da fluorescência, com objetiva de 20x e detectores SPAD (single photon avalanche diodes) com resolução temporal de 70 ps. Como fonte de excitação foi utilizado um laser Coherent Chameleon sintonizável de 690-1100 nm, pulsado em 140 femtosegundos com taxa de repetição de 80 MHz. As medidas foram tomadas no comprimento de onda de 673 nm com excitação por dois fótons em 800 nm.

3.4.1 Análises *in vivo*

As análises de fluorescência *in vivo* foram realizadas diretamente na parte superior das folhas de 120 plantas, sendo 60 plantas para o experimento com nanopartículas de ouro e 60 para o experimento com nanopartículas de prata. A Figura 7 mostra a aquisição de medidas de fluorescência nas folhas da planta *in vivo*.



Figura 7: Medidas de fluorescência realizadas nas plantas *in vivo*, utilizando-se o espectrofluorímetro portátil.

Em ambos os experimentos, as 60 plantas foram divididas em três grupos: um primeiro grupo de 20 plantas controle (*SN*), onde as sementes receberam a preparação normal como descrito na seção 3.2; um segundo grupo de 20 plantas onde as nanopartículas foram adicionadas a uma solução com volume de 2,26 mL de nanopartículas diluído em 2,74 mL de água destilada que foi aplicada nas sementes antes do plantio (*NS*); e um terceiro grupo de 20 plantas (*NF*) onde a solução de nanopartículas foi aplicada diretamente sobre a superfície foliar por meio de uma seringa. Um volume de 200 μL de solução contendo nanopartículas foi depositado diretamente na superfície inferior do folíolo central do primeiro trifólio, após o desenvolvimento dos terceiros trifólios. A mesma quantidade de solução, livre de nanopartículas (água destilada), foi depositada diretamente na superfície inferior do folíolo central do primeiro trifólio das plantas controle.

No experimento com nanopartículas de ouro a solução aplicada nas folhas possuía uma concentração de ouro de 294 μM . Já no experimento com nanopartículas de prata a concentração de prata na solução aplicada nas folhas foi de 14 μM .

Para cada grupo a média do espectro das 20 plantas foi usada para analisar o comportamento de fluorescência. O sinal de fluorescência foi coletado da parte superior das folhas cotiledonares, dos unifólios e dos folíolos centrais do primeiro trifólio como mostrado na Figura 8.

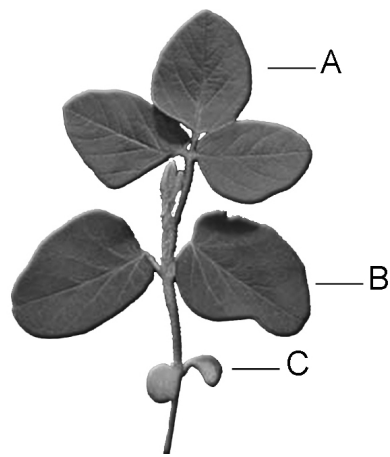


Figura 8: Folhas de uma planta de soja: folíolo central do 1º trifólio (A), unifólio (B) e cotilédono (C).

CAPÍTULO IV

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Experimentos com Nanopartículas de Ouro

4.1.1 Análises no extrato de clorofila

Com o objetivo de caracterizar a interação entre nanopartículas de ouro e moléculas de clorofila (Chl), iniciou-se o estudo analisando-se a interação entre o extrato da clorofila e nanopartículas de ouro em diferentes concentrações. O extrato de clorofila das plantas controle, nas quais não foram aplicadas NPs, foi separado em recipientes nos quais foram adicionadas nanopartículas de ouro nas seguintes concentrações: 3,6, 7,2, 10,6, 14,0 e 17,3 μM . Isso foi feito para três diâmetros de NPs de ouro: 5 nm, 10 nm e 20 nm. Foi mantido um padrão do extrato de Chl denominado Controle, onde não foi acrescentado NPs.

Os resultados obtidos no estudo da absorção do extrato da clorofila, mostrado na Figura 9, indicam duas regiões distintas de absorção: de 400 a 500 nm, região em que além das clorofilas *a* e *b*, outros pigmentos como os carotenóides também absorvem a radiação luminosa, ocorrendo uma sobreposição de bandas [36]; e de 600 a 700 nm, região onde as clorofilas *a* e *b* também absorvem a luz.

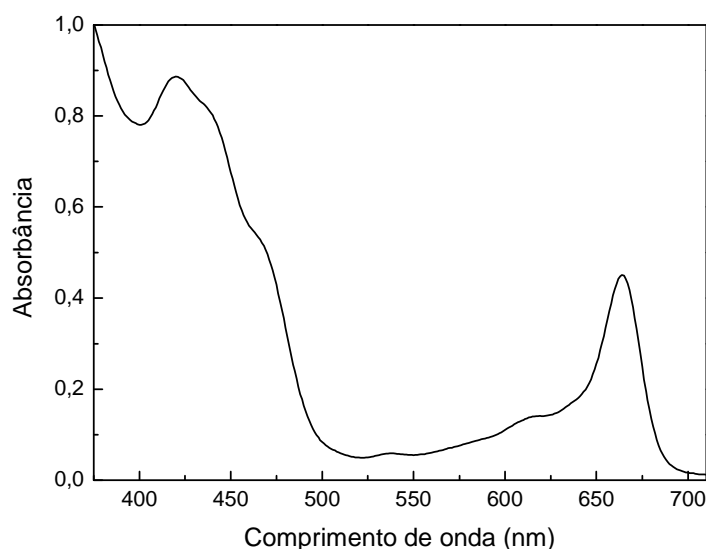


Figura 9: Espectro de absorção do extrato da clorofila da amostra controle.

Ao se adicionar as nanopartículas de ouro em diferentes concentrações no extrato da clorofila controle (3,6, 7,2, 10,6, 14 e 17,3 μM de Au), houve um aumento no sinal de absorbância na região de 538 nm em função da concentração de nanopartículas. O comportamento descrito pode ser visto na Figura 10. Este efeito é resultado da absorção de ressonância de plasmon induzido pela superfície das nanopartículas de ouro; a oscilação cooperativa de elétrons livres na nanoestrutura de Au é ressonante com a luz verde [43].

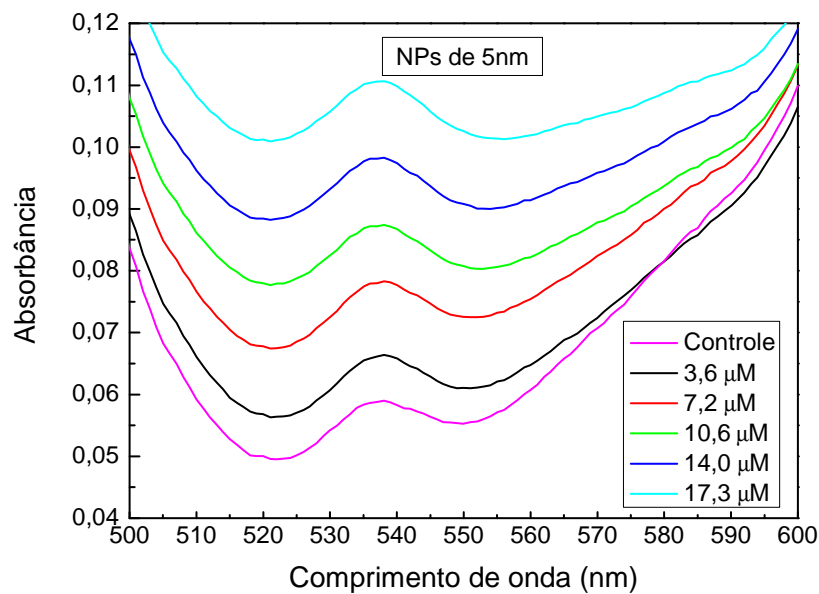


Figura 10: Espectro de absorção do extrato de Chl em função da concentração de NPs de ouro de 5 nm.

Neste intervalo, de 500 a 600 nm, um aumento linear foi observado na intensidade de absorção em função da adição das nanopartículas de 5, 10 e 20 nm de diâmetro, como mostrado na Figura 11. Com a finalidade de comparar esse comportamento entre os três diâmetros de NPs, foi calculado o coeficiente angular da reta (β). As NPs de 20 nm apresentaram a menor variação da absorção em função da concentração de NPs, com um β de $1,1 \times 10^{-3} \mu\text{M}^{-1}$ obtido pelo ajuste dos dados experimentais. As NPs de 5 e 10 nm provocaram um maior aumento na absorção em 538 nm, apresentando β semelhantes de aproximadamente $3,0 \times 10^{-3} \mu\text{M}^{-1}$.

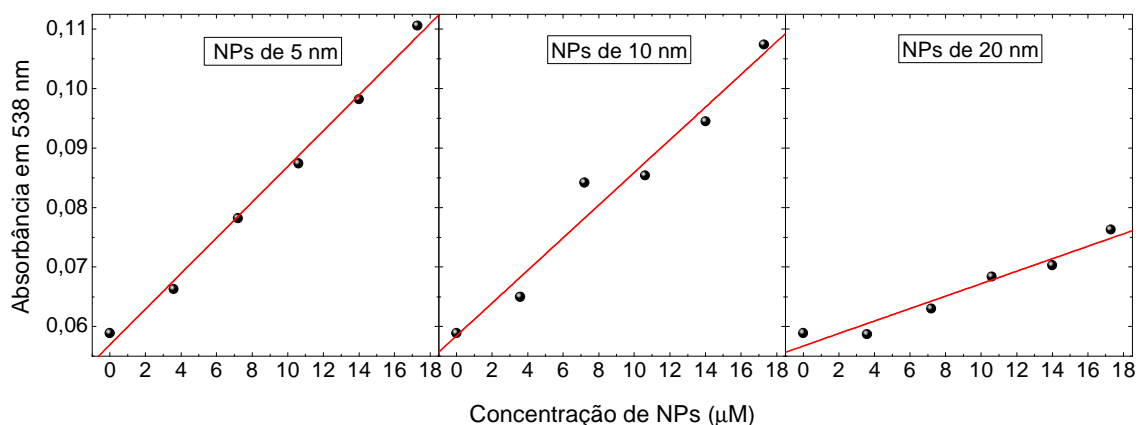


Figura 11: Absorbância do extrato de clorofila em 538 nm com NPs de ouro de 5, 10 e 20 nm.

No entanto, é importante mencionar que a adição de nanopartículas no extrato não alterou o espectro de absorção da clorofila, na região entre 600 e 700 nm. A absorção do extrato de Chl contendo NPs foi a soma das absorções da clorofila e das NPs. Através do método de Arnon adaptado por Porra et al [42], foi feito o cálculo do teor da clorofila total [*Chl a + b*], utilizando-se a Equação 1 (descrito na seção 3.4), e para todas as amostras o valor obtido foi de aproximadamente $8 \mu\text{mol.L}^{-1}$, indicando que a adição das nanopartículas de ouro não alterou o teor de clorofila.

Foram realizadas medidas de fluorescência dessas mesmas soluções de clorofila e NPs de ouro. A Figura 12 mostra os espectros típicos da fluorescência de moléculas de clorofila quando excitado em 405 e 532 nm. Duas bandas de emissão podem ser observadas entre 625 e 800 nm: as bandas no vermelho e no vermelho-distante com máximo em 673 e 723 nm, respectivamente. Embora os resultados tenham mostrado que a fluorescência da clorofila induzida pela luz em 405 nm seja 8 vezes mais intensa que a fluorescência induzida pela luz em 532 nm, ambos os espectros apresentam uma forma semelhante. A diferença observada na intensidade de fluorescência é devido à maior absorbância das amostras em 405 nm. Os resultados das medidas de absorção mostraram que a absorção da clorofila em 405 nm foi cerca de 10 vezes maior do que a absorção em 532 nm.

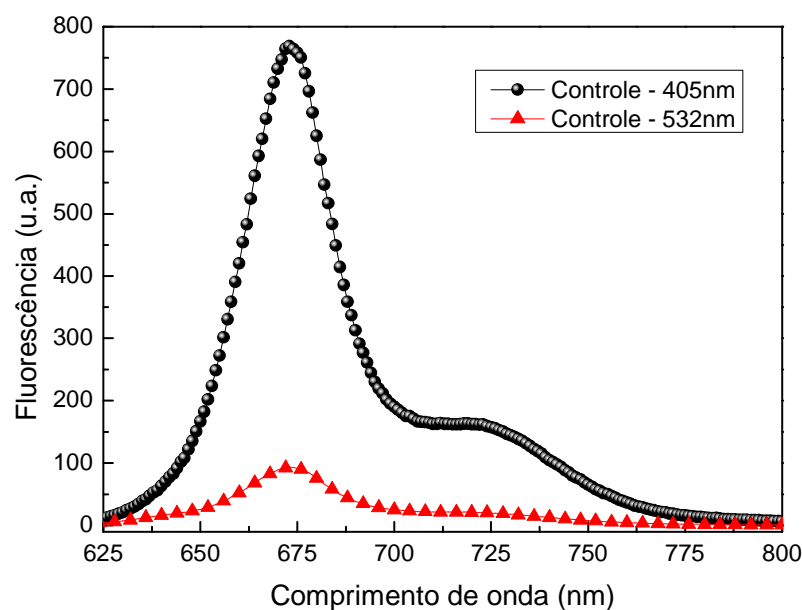


Figura 12: Fluorescência do extrato de clorofila da amostra controle, com excitação em 405 e 532 nm.

Quando as NPs foram adicionadas ao extrato de clorofila, não houve mudança na forma do espectro de fluorescência. No entanto, os resultados mostraram que as NPs induziram uma supressão de fluorescência das moléculas de clorofila, como apresentado na Figura 13. A supressão de fluorescência foi observada para ambos os comprimentos de onda de excitação e para todos os diâmetros de NPs.

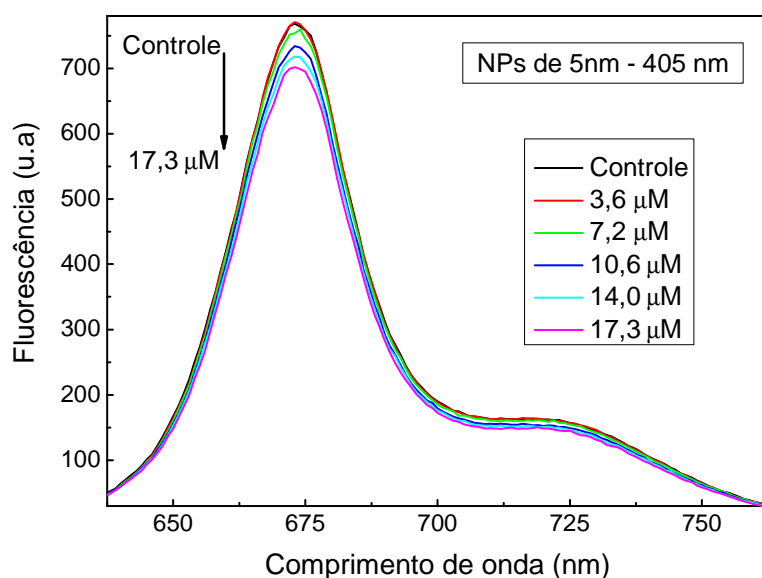


Figura 13: Supressão na intensidade de fluorescência do extrato de clorofila com NPs de ouro de 5 nm, com excitação em 405 nm.

Analisando as razões de F_{673}/F_{723} , observou-se que a intensidade de fluorescência em 673 nm manteve-se em torno de 4,75 vezes mais intensa do que a intensidade de fluorescência em 723 nm, para ambos os comprimentos de onda de excitação (405 e 532 nm), independentemente da concentração de NPs de ouro, como mostrado na Figura 14. Esse índice é calculado com base na razão entre o pico de intensidade de fluorescência em 673 e 723 nm. Esse comportamento mostra que não houve uma alteração no perfil de emissão da fluorescência da clorofila e, de acordo com os resultados obtidos nas medidas de absorção, o teor de clorofila se manteve constante em função da concentração de NPs de ouro.

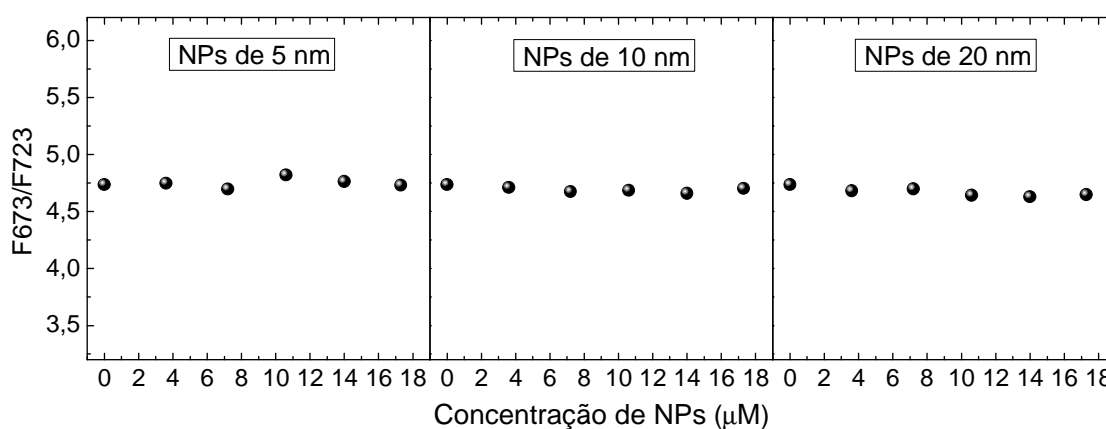


Figura 14: Razão entre os picos de fluorescência em 673 e 723 nm do extrato de clorofila em função da concentração das NPs de ouro de 5, 10 e 20 nm, com excitação em 405 nm.

A Figura 15 mostra que o gráfico de F_0/F em função da concentração de NPs é linear nesse intervalo de concentração de nanopartículas estudado, revelando que a supressão obedece a relação de Stern-Volmer: $F_0/F = 1 + K_{SV} [Q]$, onde F_0 e F são, respectivamente, as intensidades de fluorescência da clorofila na ausência e presença do supressor (nesse caso, as nanopartículas de ouro), K_{SV} é a constante de supressão de Stern-Volmer e $[Q]$ é a concentração do agente supressor [44].

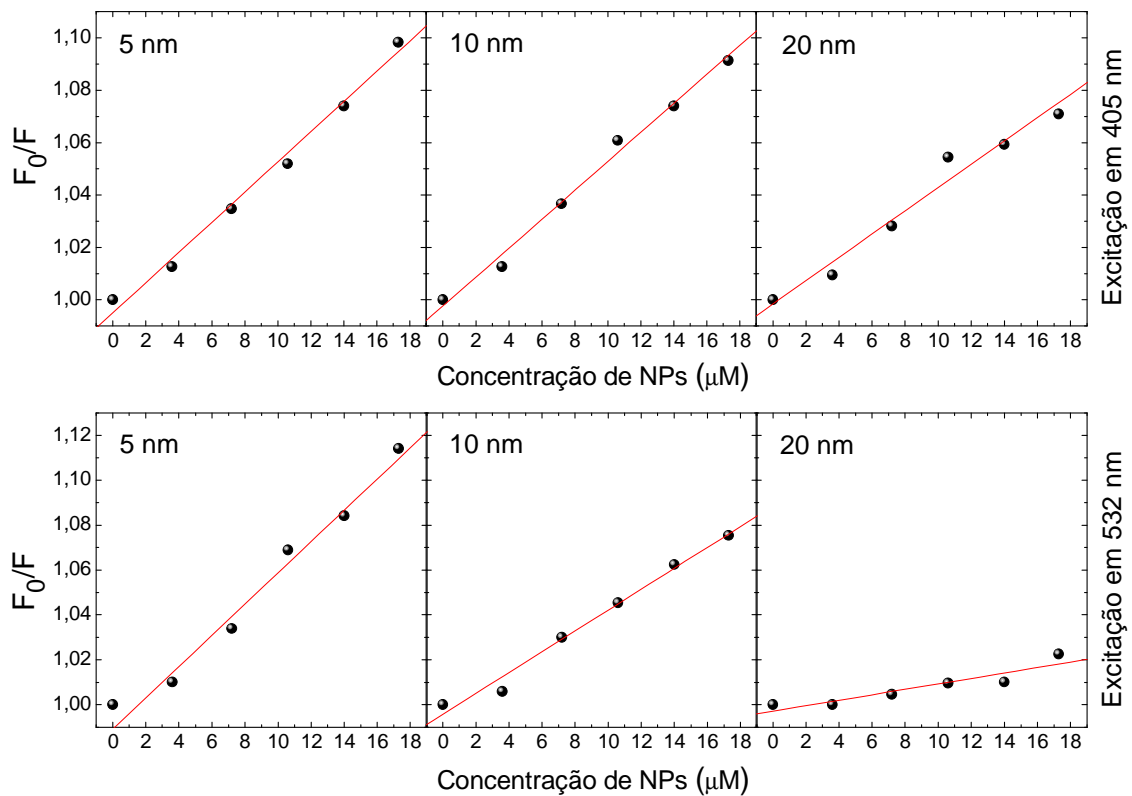


Figura 15: Razão de F_0/F em 673 nm em função da concentração de NPs de ouro de 5, 10 e 20 nm, com excitação em 405 e 532 nm. F_0 e F são as intensidades de fluorescência da clorofila na ausência e presença de nanopartículas de ouro, respectivamente.

A partir da inclinação da reta, pode-se observar que houve uma pequena diminuição na constante de supressão em função do diâmetro das nanopartículas, quando a clorofila foi excitada em 405 nm. No entanto, uma queda maior pode ser observada nas análises realizadas na fluorescência com excitação em 532 nm, onde K_{SV} induzida por nanopartículas de diâmetro de 5 nm foi 6 vezes maior que por NPs de 20 nm.

A supressão de fluorescência de uma solução de clorofila, induzida por NPs de 8nm foi relatado recentemente por Barazzouk e colaboradores, que atribuiu este efeito, principalmente ao processo de transferência fotoinduzida de elétrons da clorofila no estado excitado para as NPs [45], embora o processo de transferência de energia não foi descartado devido a uma pequena sobreposição entre a absorção de NPs e fluorescência da clorofila. Ainda neste trabalho, os autores mostraram que a diferença entre o potencial de oxidação das moléculas de clorofila no estado excitado e o nível de Fermi do ouro, e também a forte ligação entre a clorofila e as NPs proporcionam condições

favoráveis para que a transferência de elétrons possa ocorrer. Portanto, em vez dos elétrons das moléculas de clorofila no estado excitado retornarem ao estado fundamental emitindo radiação luminosa, os elétrons são transferidos para as NPs, o que resulta em uma diminuição do sinal de fluorescência. Assim, a maior supressão observada para a solução com NPs de 5 nm foi devido ao fato de que para uma mesma concentração de NPs, as amostras preparadas com NPs de 5 nm possuíam uma maior área de superfície total de NPs, por terem um maior número de partículas que as amostras com NPs de 10 e 20 nm. Como consequência, um número maior de moléculas de clorofila pode ser adsorvido na superfície das nanopartículas, induzindo a transferência de uma maior quantidade de elétrons da clorofila no estado excitado para as NPs.

4.1.2 Análises *in vivo*

Para realizar as análises *in vivo*, foram usadas nanopartículas de ouro de 5 nm de diâmetro. Este tamanho foi escolhido por duas razões principais: 1) as NPs de 5 nm induziram a maior taxa de supressão de fluorescência da clorofila na análise do extrato; 2) um menor tamanho de nanopartículas poderia induzir uma melhor penetração e translocação das NPs nas plantas.

No processo de germinação e na fase inicial de crescimento da planta, não houve alteração aparente observada, induzida pelas nanopartículas. No entanto, os resultados mostraram que as bandas de fluorescência do extrato de clorofila foram deslocadas 12nm para o azul (comprimentos de onda menores) quando comparado com a emissão da clorofila *in vivo*. Esse deslocamento observado pode estar relacionado com a presença do solvente no extrato de Chl. Os resultados mostraram que as NPs também foram capazes de induzir uma supressão na fluorescência da clorofila nas plantas. A supressão foi observada para todas as plantas submetidas ao tratamento de nanopartículas e para ambos os comprimentos de onda de excitação, 405 e 532 nm, conforme mostrado nas Figuras 16 e 17, respectivamente.

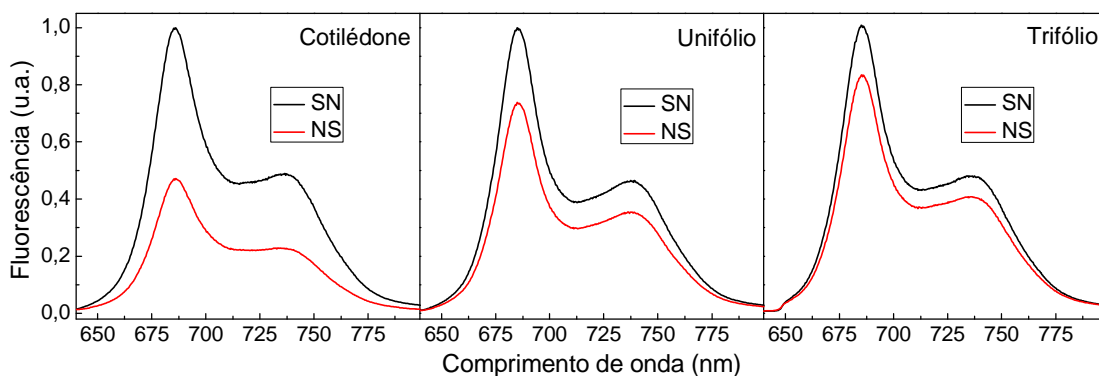


Figura 16: Fluorescência normalizada das folhas cotilédones, dos unifólios e dos trifólios da planta *in vivo*, com excitação em 405 nm. Os espectros são as médias das medidas realizadas em 20 plantas de soja.

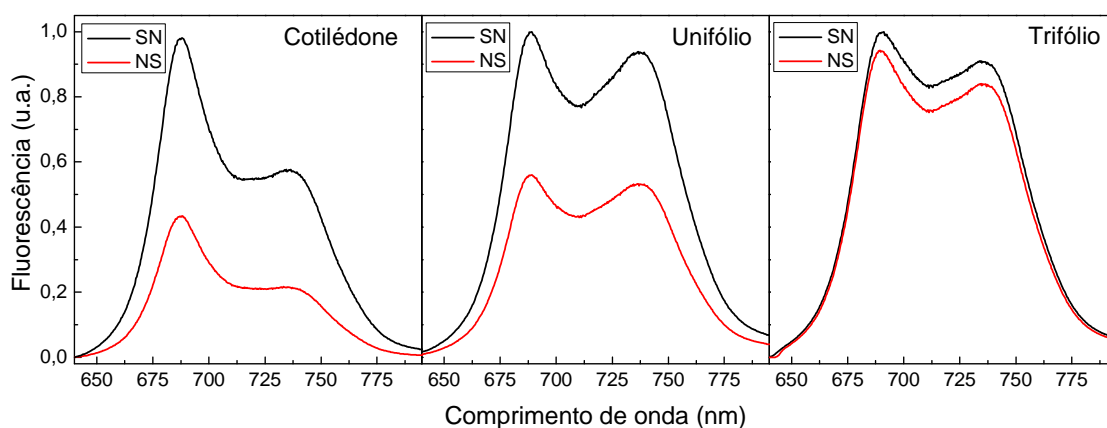


Figura 17: Fluorescência normalizada das folhas cotilédones, dos unifólios e dos trifólios da planta *in vivo*, com excitação em 532 nm. Os espectros são as médias das medidas realizadas em 20 plantas de soja.

Apesar da supressão observada, para ambos os comprimentos de onda de excitação (405 e 532 nm) e em cada tipo de folha (cotilédone, unifólio e trifólio) a supressão aconteceu de forma proporcional quando comparado às folhas controle. Assim, para os três tipos de folhas o valor da razão F_{685}/F_{735} das plantas controle foi aproximadamente o mesmo das plantas submetidas ao tratamento com NPs. Podemos também observar que a forma geral do espectro de fluorescência depende do comprimento de onda da luz de excitação. Marcassa e colaboradores relataram uma dependência similar em seus experimentos, onde a fluorescência da clorofila de laranjeiras (*Citrus aurantium* L.) foi obtida com luz de excitação em 443 e 532 nm [46].

Foi realizado um tratamento estatístico, utilizando-se o Teste t de Student (APÊNDICE A), com intervalo de confiança de 95%, para averiguar se a diferença de intensidade de fluorescência em 685 nm era significativa entre os tratamentos controle

(SN) e os tratamentos com nanopartículas (NS), nas folhas cotiledonares, unifólios e nos trifólios, quando excitadas em 405 e 532 nm. Como pode ser observado na Tabela 3, independentemente do tipo da folha e também do comprimento de onda de excitação, houve diferença significativa na intensidade de fluorescência entre as plantas SN e NS, pois o valor de t calculado é maior que o valor de t crítico (valor tabelado) em todos os casos.

Tabela 3: Teste t de Student realizado a partir dos espectros das Figuras 16 e 17.

		t - calculado	t - tabelado
Teste t com intervalo de confiança de 95%	Excitação em 405 nm	Cotilédone	14,385
		Unifólio	8,826
		Trifólio	2,778
	Excitação em 532 nm	Cotilédone	15,808
		Unifólio	8,263
		Trifólio	2,457
			1,729

Por meio do cálculo da área abaixo das curvas, das Figuras 16 e 17, foi possível determinar que as folhas cotiledonares apresentaram a maior supressão na intensidade de fluorescência, tendo uma supressão na fluorescência de 53 e 57% para a excitação em 405 e 532 nm, respectivamente. As folhas unifolioladas mostraram uma supressão de fluorescência de 26 e 44% para a excitação em 405 e 532 nm, respectivamente. A menor supressão de fluorescência foi observada para as folhas trifolioladas, onde a intensidade de fluorescência das folhas submetidas ao tratamento com NPs sofreu uma redução de 17 e 6% para a excitação em 405 e 532 nm, respectivamente. Estes resultados sugerem que as NPs foram capazes de penetrar as sementes e de se translocar a partir das sementes até às folhas das plantas de soja (*Glycine max*). Um estudo recente mostra que nanotubos de carbono são capazes de penetrar em sementes de tomate [47]. Outro estudo mostrou que plantas de abóbora (*Cucurbita maxima*) cultivadas em um meio aquoso contendo nanopartículas de óxido de ferro foram capazes de absorver, translocar e acumular as nanopartículas nos tecidos vegetais [48]. O estudo mostrou que cerca de 0,6% das nanopartículas fornecidas foram acumuladas nas folhas e 45,4% das nanopartículas foram detectadas nas raízes. Lin e co-autores também mostraram que fulereno C70 poderia ser facilmente absorvido pelas raízes e transportados para a parte aérea, em um experimento utilizando plantas de arroz (*Oryza sativa*) [49].

No presente estudo, a maior supressão na intensidade de fluorescência detectada nos cotilédones revela que a concentração de NPs foi maior nessas folhas. Este resultado era esperado, pois as folhas cotiledonares se originam das sementes, e as nanopartículas foram depositadas diretamente nas sementes. Em contraste, a menor supressão de fluorescência foi observada para as folhas trifolioladas, que são as folhas mais altas e as últimas folhas a expandir. A supressão de fluorescência pode ser atribuída à presença de NPs nas folhas, pois, como observado nos resultados anteriores, os elétrons das moléculas de clorofila no estado excitado podem ser transferidos para as NPs, induzindo um aumento da supressão não-fotoquímica nas plantas.

No entanto, na análise *in vivo*, outros mecanismos podem estar envolvidos na supressão da fluorescência. Por exemplo, a presença de nanopartículas pode inibir o transporte fotossintético de elétrons, induzindo uma dissipação de energia através de processos não-fotoquímicos. Mudanças na atividade fotossintética induzidas por NPs em algas verdes (*Chlamydomonas reinhardtii*) foram recentemente apresentados por Saison e co-autores. Eles mostraram que nanopartículas de óxido de cobre cobertas com poliestireno (tipo casca-núcleo) induziram processos de agregação celular, e tiveram um efeito de deterioração sobre a clorofila, induzindo a foto-inibição do fotossistema II. Esta inibição do transporte fotossintético de elétrons induz uma forte dissipação de energia por processos não-fotoquímicos [50].

Nas plantas, a redução da fluorescência da clorofila também pode ser associado a danos nos centros de reação e à eficiência do transporte de elétrons no fotossistema II [51]. De fato, a reorganização do mecanismo de fotossíntese, incluindo mudanças no tamanho do complexo antena e ajustes no conteúdo de clorofila e proteína foram relatados como respostas a agentes supressores [52].

No entanto, o mesmo valor da relação F685/F735 obtidos para as plantas submetidas ao tratamento com nanopartículas e para as plantas controle sugere que o efeito da transferência de elétrons da clorofila no estado excitado para as nanopartículas de ouro foi, provavelmente, o processo dominante na supressão da fluorescência da clorofila. Esta hipótese decorre do fato de que o estresse ambiental pode modificar a concentração de clorofila, e é sabido que a razão F685/F735 é um bom indicador do conteúdo de clorofila e pode ser usado como uma medida não-destrutiva da concentração de clorofila [35]. Em um trabalho recente, nosso grupo mostrou que a

razão F685/F735 pode ser usada para detectar estresse hídrico em plantas de soja e também para distinguir plantas de soja transgênicas e convencionais [53].

Os resultados obtidos na análise das plantas nas quais as nanopartículas foram depositadas diretamente sobre a superfície foliar, mostraram que a presença das NPs nas folhas induziram uma supressão de 22 e 19% na intensidade de fluorescência emitida pelas folhas quando excitadas em 405 e 532 nm, respectivamente, como mostrado na Figura 18.

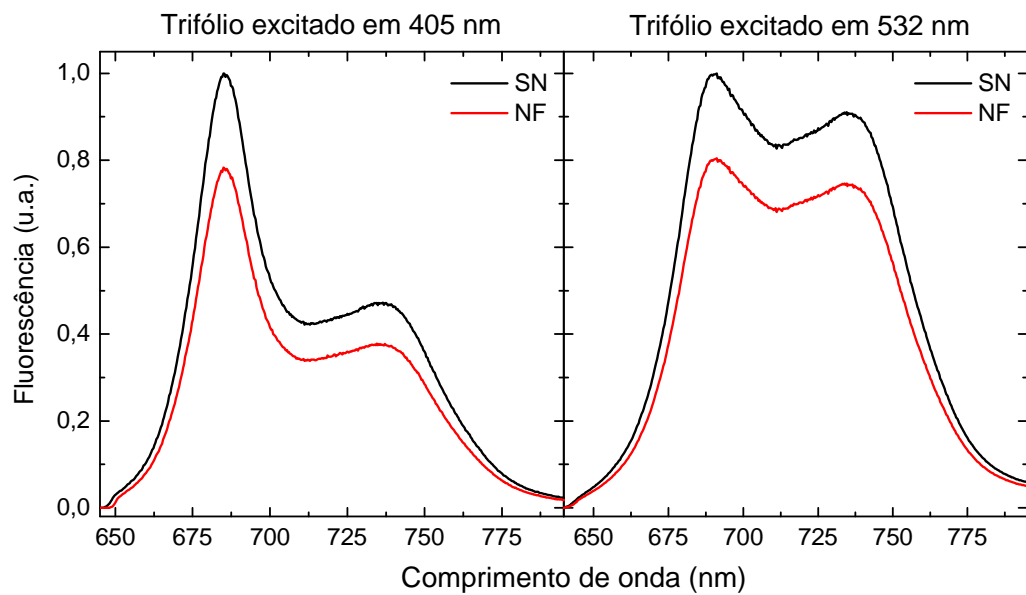


Figura 18: Fluorescência normalizada do folíolo central do primeiro trifólio da planta *in vivo*, com excitação em 405 e 532 nm.

Os resultados obtidos no Teste *t* de Student dos gráficos da Figura 18 também indicaram uma diferença significativa entre as intensidades de fluorescência dos trifólios das plantas *SN* e *NF* em 685 nm, com nível de significância de 95%, em ambos os comprimentos de onda de excitação. Os valores calculados de *t* foram de 4,274 para a excitação em 405 nm e de 3,236 para a excitação em 532 nm. A diferença é significativa, pois esses valores são maiores que 1,729, valor de *t* tabelado.

Estes resultados confirmam que a presença de nanopartículas nas folhas pode ser responsável pela supressão de fluorescência da clorofila. Como as nanopartículas foram depositadas na superfície inferior das folhas e as medidas de fluorescência foram realizadas na superfície superior das folhas, não houve contribuição do efeito de sombra (bloqueando a absorção de luz) na supressão da fluorescência. Portanto, os resultados

sugerem que as NPs foram capazes de penetrar na superfície das folhas, possivelmente através da abertura estomática, e interagir com o aparato fotossintético. Esta hipótese é baseada em estudos recentes que têm relatado que as nanopartículas podem ser absorvidas pelas plantas através dos estômatos [54, 55].

4.2 Experimentos com Nanopartículas de Prata

4.2.1 Análises no extrato de clorofila

No estudo da interação entre nanopartículas de prata com dimensões média de 100 nm e o extrato de clorofila, os procedimentos foram análogos aos adotados no experimento com NPs de ouro. Entretanto, uma análise mais detalhada foi realizada em função da concentração das NPs no extrato de Chl, variando a concentração desde 0 μM até 10000 μM , com diversos intervalos.

Na Figura 19, é apresentado o espectro de absorção do extrato da clorofila com algumas das concentrações de NPs de prata utilizadas. É possível observar um aumento na intensidade da banda de absorção entre 400 e 450 nm, associada à ressonância dos plasmons superficiais da prata, que é referente à NPs de 100 nm [56]. As medidas no extrato de clorofila foram feitas em triplicata.

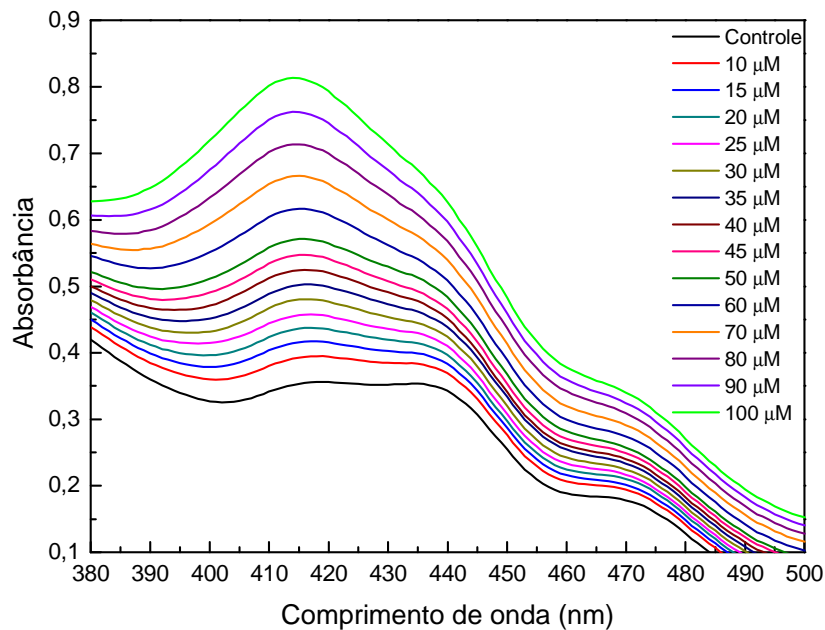


Figura 19: Espectro de absorção do extrato de clorofila em função da concentração de nanopartículas de prata, na região da banda plasmônica da prata.

O acréscimo na absorção foi linear, apresentando um coeficiente angular (β), obtido pelo ajuste dos dados experimentais, de $4,33 \times 10^{-3} \mu\text{M}^{-1}$, como mostrado na Figura 20. Concentrações acima de $200 \mu\text{M}$ provocaram saturação no sinal de absorção nessa região do espectro.

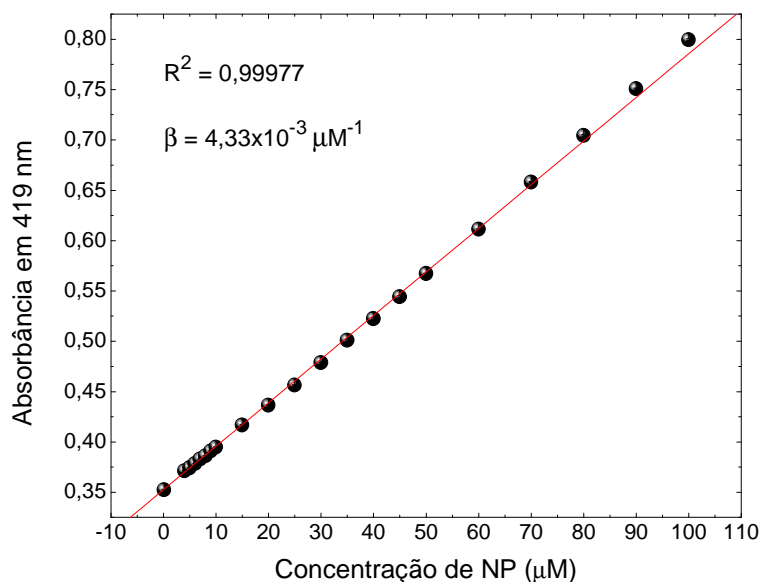


Figura 20: Absorbância do extrato de clorofila em 419 nm em função da concentração de NPs de prata.

Na região de 600 a 700 nm, região de absorção das clorofilas *a* e *b*, não houve alterações significativas na intensidade do sinal de absorbância, indicando que o teor de clorofila se manteve constante em função da concentração das nanopartículas de prata. O valor médio do teor de clorofila encontrado pelo método de Arnon adaptado por Porra et al, descrito na seção 3.4 pela Equação 1, foi de aproximadamente $4 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

Nessas mesmas soluções de clorofila com diversas concentrações de NPs de prata, foram realizadas medidas de fluorescência com excitação em 405 e 532 nm. Os resultados mostraram que para os dois comprimentos de onda de excitação ocorre uma supressão na intensidade de fluorescência da clorofila em função da concentração de NPs de prata. A Figura 21 mostra essa supressão na fluorescência, quando o extrato foi excitado em 405 nm, para algumas concentrações estudadas.

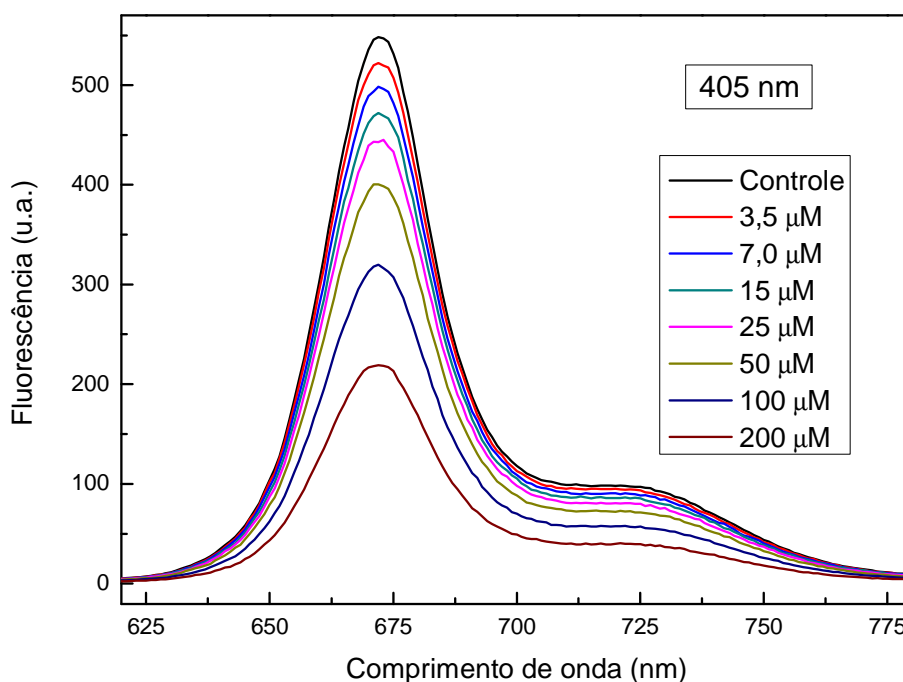


Figura 21: Fluorescência do extrato de clorofila com diferentes concentrações de NPs de prata, com excitação em 405 nm.

Os processos de supressão de fluorescência, também conhecido como *quenching*, podem ocorrer basicamente de duas maneiras: supressão estática ou supressão dinâmica.

A supressão estática consiste na formação de um complexo não-fluorescente entre o fluoróforo e o supressor, no nível fundamental de energia. Quando o complexo absorve a luz, ele retorna ao nível fundamental sem a emissão de fóton. A intensidade de fluorescência decresce com a adição do supressor, entretanto o tempo de vida dos fluoróforos no estado excitado não é afetado. A relação de Stern-Volmer, entre a razão de F_0/F e a concentração do supressor, é dada pela Equação 2 onde $[Q]$ é a concentração do supressor, K_S é a constante de associação do complexo fluoróforo-supressor e F_0 e F é a fluorescência na ausência e presença do supressor, respectivamente [44]. Logo, um gráfico de Stern-Volmer para uma supressão estática se comporta de maneira linear.

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_S [Q] \quad \text{Equação 2}$$

Na supressão dinâmica a diminuição da intensidade de fluorescência consiste na desativação de fluoróforos por processos de colisões entre o agente supressor e a molécula fluorescente durante o tempo de vida no estado excitado. Após o contato entre ambos, o fluoróforo retorna ao estado fundamental de energia sem a emissão de fóton e sem alterações químicas nas moléculas envolvidas. Na supressão dinâmica o tempo de vida no estado excitado é alterado. A relação de Stern-Volmer para a supressão dinâmica é dada pela Equação 3 [44].

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_D [Q] \quad \text{Equação 3}$$

O gráfico de Stern-Volmer para a supressão dinâmica também possui um comportamento linear. No entanto, nesse caso o coeficiente angular da reta é a constante K_D , dada pelo produto entre o tempo de vida no estado excitado na ausência do supressor (τ_0) e a constante bimolecular de supressão (k_q), que está relacionada à eficiência da supressão e à acessibilidade do fluoróforo ao supressor [44].

O comportamento linear de um gráfico de Stern-Volmer não é suficiente para determinar se o tipo de supressão é estático ou dinâmico. O método mais eficiente para distinguir entre uma supressão estática ou dinâmica é o estudo do tempo de vida de fluorescência. A supressão estática inibe uma parte dos fluoróforos da amostra. Fluoróforos complexados não são fluorescentes e dessa forma a fluorescência observada é devida apenas aos fluoróforos não complexados. A parcela de fluoróforos não complexada não é perturbada e o tempo de vida continua constante e igual a τ_0 , que é o tempo de vida na ausência do supressor, ou seja, da amostra controle. Em contraste, a supressão dinâmica é um processo que diminui a população do estado excitado pela adição de uma taxa de decaimento não-radiativo, implicando em um decréscimo do tempo de vida, que é equivalente ao decréscimo da intensidade de fluorescência [57].

As supressões estática e dinâmica podem ocorrer também simultaneamente. Nesse caso, o gráfico de Stern-Volmer perde a linearidade e o seu comportamento passa a ser regido pela Equação 4 [44].

$$\frac{F_0}{F} = (1 + K_D [Q]) \cdot (1 + K_S [Q]) \quad \text{Equação 4}$$

Um comportamento quadrático será observado e os valores de K_D e K_S podem ser calculados pelo ajuste teórico da curva. Uma alternativa é linearizar essa curva fazendo um gráfico de $(F_0/F - 1)/[Q]$ versus $[Q]$. Nesse caso, também é possível determinar os valores de K_D e K_S já que o coeficiente linear da reta é dado pela soma das constantes de supressão dinâmica e estática ($K_D + K_S$) e o coeficiente angular é o produto das mesmas ($K_D \cdot K_S$) [31].

O estudo da razão de F_0/F em 673 nm dos espectros de fluorescência obtidos para as amostras de extrato de clorofila com diferentes concentrações de NPs de prata, apresentado na Figura 22, mostrou que a supressão de fluorescência comportou-se de maneira diferente em função da concentração de NPs.

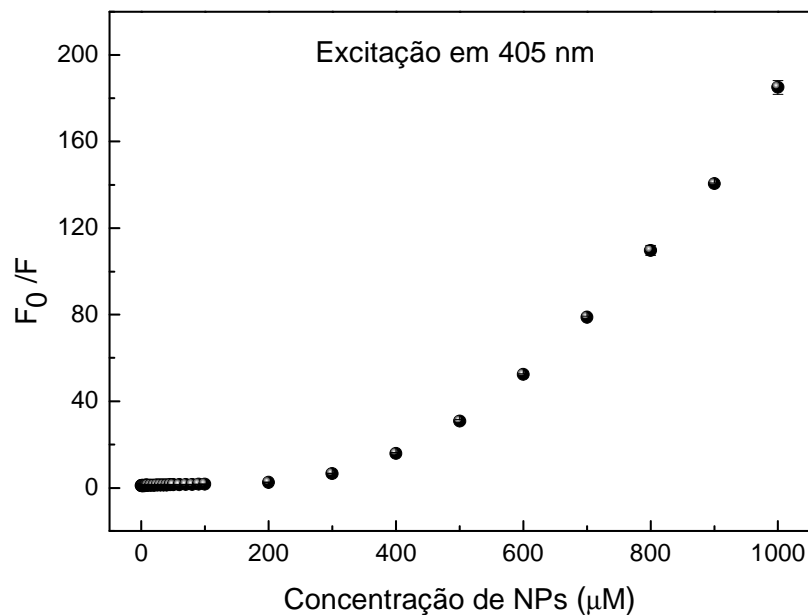


Figura 22: Razão de F_0/F em 673 nm do extrato de clorofila em função da concentração de nanopartículas de prata, com excitação em 405 nm.

Nas concentrações de 0 a 100 μM a razão de F_0/F se comporta linearmente, podendo ser devido à supressão estática ou dinâmica, enquanto que para as concentrações entre 100 a 1000 μM o gráfico perde a linearidade, característica das supressões estática e dinâmica simultâneas. As medidas de fluorescência realizadas nas amostras do extrato de clorofila com NPs de prata nas concentrações acima de 1000 μM apresentaram valores muito próximos de zero, provavelmente devido ao aumento da

turbidez da amostra, uma consequência da grande quantidade de NPs na solução, aumentando o espalhamento elástico e impedindo a absorção da luz incidente.

Para melhor entender os processos de supressão nas duas regiões citadas anteriormente, de 0 a 100 μM e de 100 a 1000 μM (Figura 22), e principalmente para determinar o tipo, se estática ou dinâmica, foram realizadas medidas de tempo de vida da fluorescência de três amostras: uma amostra controle (extrato de Chl sem NPs); outra com 50 μM de NPs e uma terceira com 500 μM de NPs de prata. Esses valores de concentração de NPs foram escolhidos por serem os valores intermediários dentro de cada uma das regiões que apresentaram comportamentos distintos. As amostras foram analisadas medindo-se o tempo de decaimento da fluorescência em 673 nm com excitação por dois fótons em 800 nm, conforme mostrado na Figura 23.

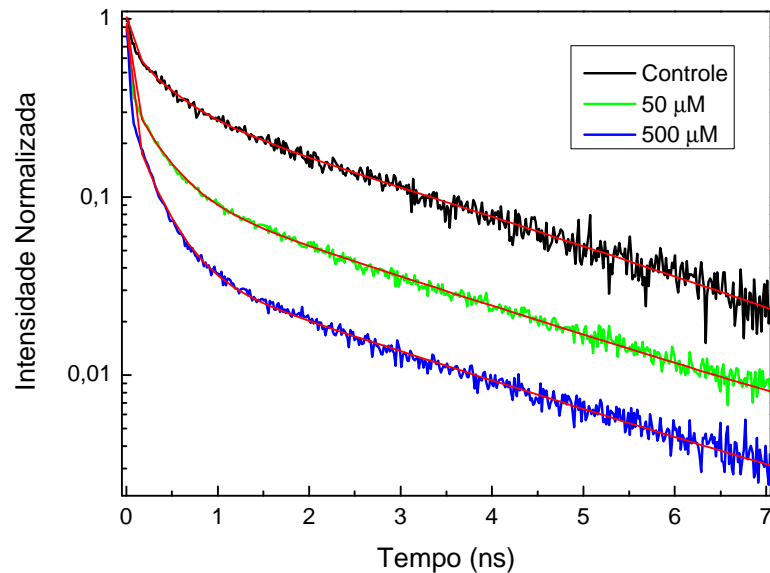


Figura 23: Tempo de decaimento da fluorescência em 673 nm de três amostras de extrato de clorofila em função da concentração de NPs de prata, com excitação por dois fótons em 800 nm.

O ajuste das curvas do tempo de decaimento foi feito utilizando uma equação exponencial de decaimento de terceira ordem, dado pela Equação 5, onde F é a intensidade de fluorescência, A_i são as amplitudes (fatores pré-exponenciais), t é o tempo e τ_i são os tempos de vida da fluorescência [58].

$$F = \sum_{i=1}^3 A_i \exp\left[\frac{-t}{\tau_i}\right] \quad \text{Equação 5}$$

De posse dos dados de ajuste das curvas do tempo de decaimento da fluorescência, calculou-se o tempo de vida médio para cada amostra, que é dado pela Equação 6 [58].

$$\bar{\tau} = \frac{\sum_{i=1}^3 A_i \cdot \tau_i^2}{\sum_{i=1}^3 A_i \cdot \tau_i} \quad \text{Equação 6}$$

Os dados obtidos a partir do ajuste das curvas e os valores calculados para os tempos de vida médio de cada amostra são apresentados na Tabela 4. Os resultados indicaram que a adição de NPs de prata no extrato da clorofila reduz o tempo de vida de fluorescência das amostras, e que essa alteração depende da concentração.

Tabela 4: Tempos de vida obtidos pelo ajuste da curva de decaimento da fluorescência para três amostras de extrato de clorofila com diferentes concentrações de NPs de prata, com emissão em 673 nm e excitação por dois fótons em 800 nm.

Amostra	τ_1 (ns)	A_1	τ_2 (ns)	A_2	τ_3 (ns)	A_3	$\bar{\tau}$ (ns)
Controle	2,76	0,33	0,43	0,34	0,06	0,33	2,39
50 μM	2,57	0,13	0,33	0,28	0,04	0,59	1,98
500 μM	2,57	0,06	0,29	0,24	0,04	0,70	1,68

Como já citado anteriormente (Figura 22), os resultados de F_0/F em 673 nm indicaram dois comportamentos distintos com o aumento da concentração de nanopartículas de prata. Na primeira região, de 0 a 100 μM o comportamento do gráfico se mostrou linear, como pode ser visto na Figura 24. A supressão observada é, certamente, do tipo dinâmica pois baseado nos resultados das medidas de decaimento da fluorescência, o tempo de vida da amostra com 50 μM de NPs de prata (1,98 ns) foi menor que o tempo de vida da amostra controle (2,39 ns). Sendo assim, a partir do coeficiente angular da reta (K_D) e também do tempo de vida da amostra controle (τ_0) foi possível encontrar o valor da constante bimolecular de supressão (k_q). Sabe-se que $K_D = k_q \cdot \tau_0$, logo, $k_q = 2,5 \times 10^{12} \text{ (M}^{-1} \text{ s}^{-1}\text{)}$.

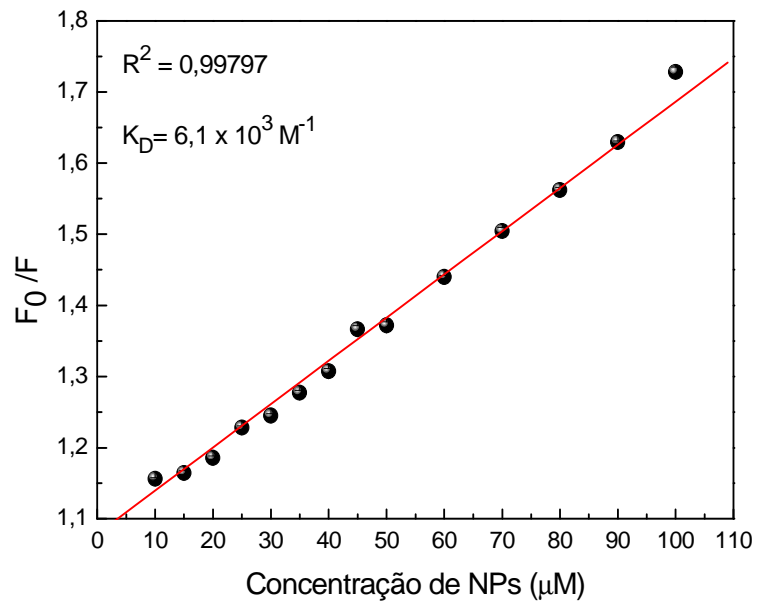


Figura 24: Razão de F_0/F em 673 nm do extrato de clorofila em função da concentração de nanopartículas de prata na região de 0 a 100 μM , com excitação em 405 nm.

Para altas concentrações, de 100 a 1000 μM , o gráfico de F_0/F perde a linearidade em função da concentração de NPs de prata, como mostrado na Figura 25.

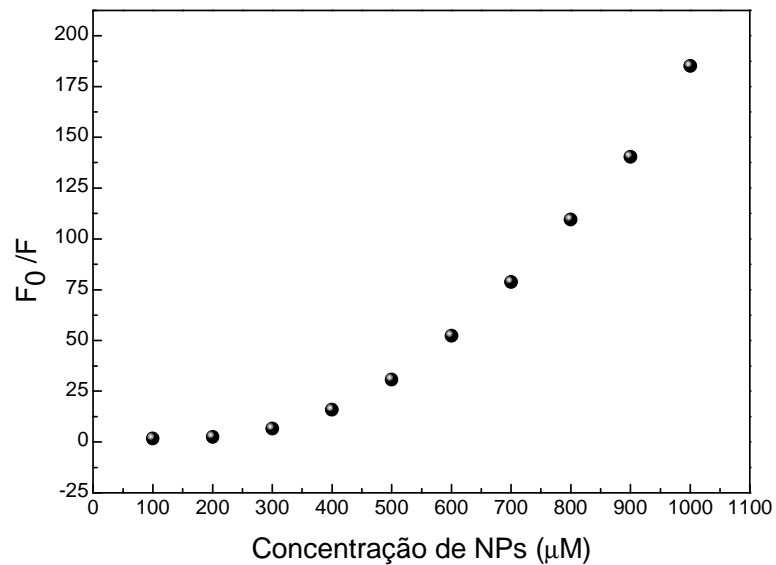


Figura 25: Razão de F_0/F em 673 nm do extrato de clorofila em função da concentração de nanopartículas de prata na faixa entre 100 e 1000 μM , para excitação em 405 nm.

A supressão de fluorescência observada nessa faixa de concentração, de 100 a 1000 μM de NPs de prata, é característica das supressões estática e dinâmica simultâneas pois além de o gráfico de Stern-Volmer perder a linearidade, o tempo de

vida médio da amostra com 500 μM de NPs de prata (1,68 ns) foi menor que o tempo de vida médio da amostra controle (2,39 ns), conforme mostrado na Tabela 6. Dessa maneira, ao ajustar o gráfico linearizado de $(F_0/F - 1)/[Q]$ versus $[Q]$, mostrado na Figura 26, e sabendo que o coeficiente linear da reta é dado pela soma das constantes de supressão dinâmica e estática ($K_D + K_S$) e o coeficiente angular é o produto das mesmas ($K_D \cdot K_S$), foram obtidos os seguintes módulos: $5,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ e $51,9 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$. O módulo da constante de supressão dinâmica (K_D) já calculado anteriormente (mostrado na Figura 24), é da ordem de $6 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$. Portanto, pode-se concluir que a constante de supressão estática é $K_S = 51,9 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$.

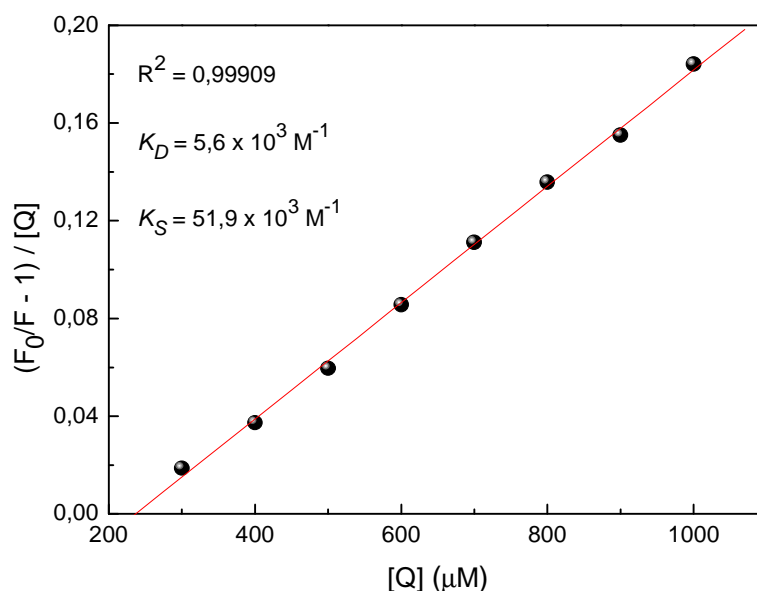


Figura 26: Linearização da curva de F_0/F em 673 nm do extrato de clorofila em função da concentração de nanopartículas de prata na faixa entre 200 e 1000 μM , para excitação em 405 nm

A Figura 27 mostra as razões de F_{673}/F_{720} , obtidas pela razão entre os picos de fluorescência do extrato da clorofila em 673 e 720 nm quando excitado em 405 nm, no intervalo de concentração entre 0 e 100 μM de NPs de prata. Apesar da ocorrência da supressão na fluorescência da clorofila em função da concentração de NPs de prata, o valor da razão F_{673}/F_{720} se manteve sempre próximo de 5,5, valor também encontrado para a excitação em 532 nm, revelando que o perfil da emissão de fluorescência da clorofila não foi alterado.

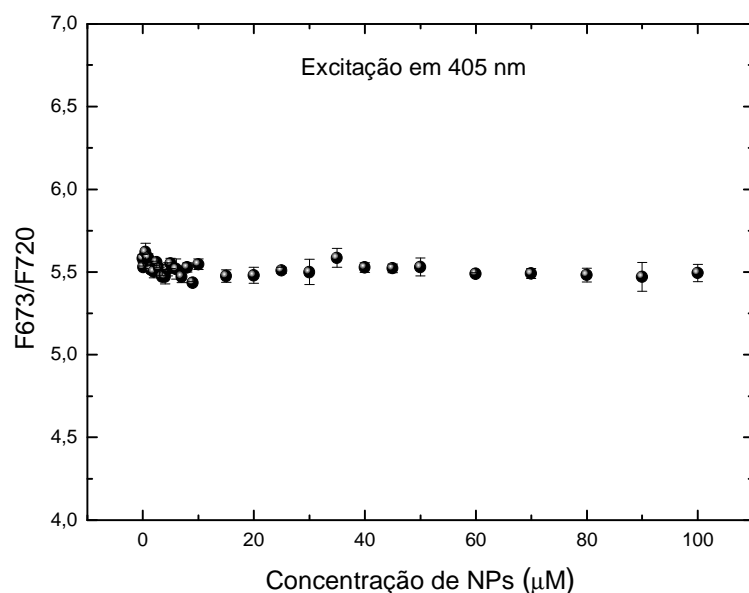


Figura 27: Razão F673/F720 em função da concentração de NPs de prata, com excitação em 405 nm.

4.2.2 Análises *in vivo*

Os resultados dos estudos da interação entre nanopartículas de prata e plantas de soja *in vivo*, revelaram que, da mesma forma como no experimento com nanopartículas de ouro, ocorre uma supressão na intensidade da fluorescência das folhas das plantas submetidas ao tratamento com nanopartículas de prata, tanto quando aplicadas nas sementes antes do plantio (*NS*), quanto nas folhas da planta adulta (*NF*).

Nas Figuras 28 e 29, são apresentados os espectros de fluorescência obtidos das folhas cotiledonares, dos unifólios e dos trifólios de plantas controle (*SN*) e de plantas nas quais as NPs foram adicionadas nas sementes (*NS*), para excitação em 405 e 532 nm, respectivamente.

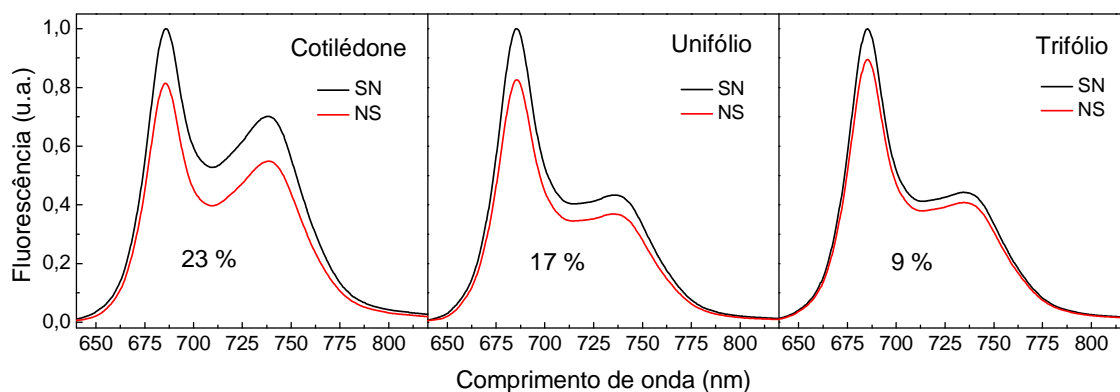


Figura 28: Fluorescência normalizada das folhas cotiledonares, dos unifólios e dos trifólios da planta *in vivo*, com excitação em 405 nm.

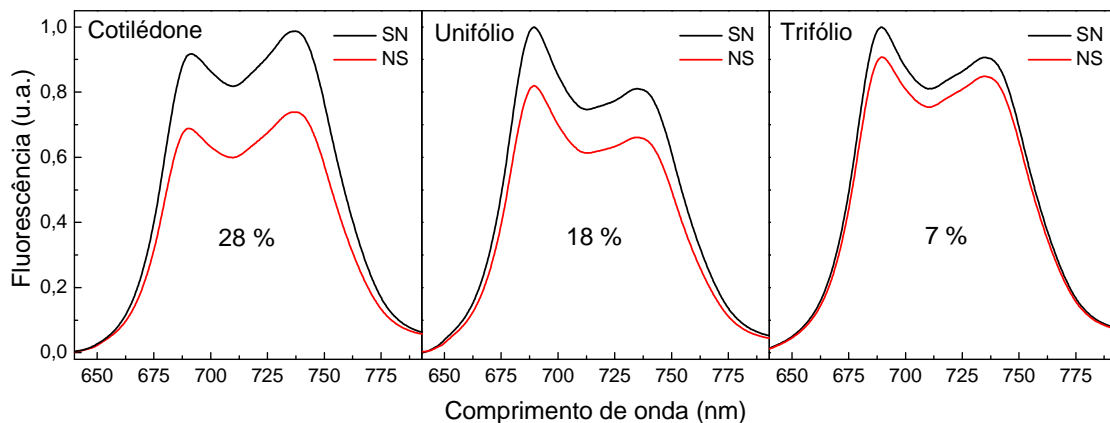


Figura 29: Fluorescência normalizada das folhas cotiledonares, dos unifólios e dos trifólios da planta *in vivo*, com excitação em 532 nm.

Com base no cálculo da área abaixo da curva determinou-se a porcentagem aproximada de supressão em cada tipo de folha e para os dois comprimentos de onda de excitação. A supressão observada para os cotilédones, unifólios e trifólios com excitação em 405 nm foi de 23, 17 e 9%, respectivamente. Para a excitação em 532 nm a porcentagem de supressão foi de 28% para as folhas cotiledonares, 18% para os unifólios e nos trifólios a supressão foi de 7%.

A partir desses dados pode-se supor que as nanopartículas de prata aplicadas nas sementes antes do plantio, foram capazes de se translocar pela planta, alcançando sua parte superior. Além disso, é possível aferir que a concentração de NPs foi maior nas folhas cotiledonares e menor nos trifólios, visto que a supressão de fluorescência teve maior intensidade nos cotilédones, fato que é devido à aplicação direta de NPs nas sementes, sabendo que os cotilédones são as próprias sementes após a emergência da planta.

O estudo da razão de F685/F736, intensidades de fluorescência dos dois picos característicos da clorofila *a*, indicaram que não houve alterações no teor de clorofila das plantas submetidas ao tratamento com nanopartículas de prata, em ambos os comprimentos de onda de excitação, ou seja, a intensidade de supressão foi a mesma para os dois picos de fluorescência. Os valores dessa razão para a excitação em 405 nm das folhas cotiledonares, unifólios e trifólios foram de aproximadamente 1,4, 2,3 e 2,2,

respectivamente. Com a excitação em 532 nm, esses resultados foram, respectivamente: 0,93, 1,2 e 1,1.

Baseando-se nos espectros das Figuras 28 e 29 foi feito um tratamento estatístico pelo Teste t de Student para averiguar se as diferenças de intensidade de fluorescência em 685 nm, entre as amostras SN e NS eram significativas. Conforme os resultados apresentados na Tabela 5, para um intervalo de confiança de 95%, em todos os tipos de folhas e para a excitação em 405 e também 532 nm, houve significância entre os tratamentos SN e NS , pois os valores de t calculados foram maiores que o t tabelado.

Tabela 5: Teste t de Student realizado a partir dos espectros das Figuras 28 e 29.

			t - calculado	t - tabelado
Teste t com intervalo de confiança de 95%	Excitação em 405 nm	Cotilédone	3,713	1,729
		Unifólio	5,651	
		Trifólio	1,950	
	Excitação em 532 nm	Cotilédone	9,832	
		Unifólio	10,615	
		Trifólio	2,102	

Com a finalidade de certificar-se que os efeitos observados na parte superior das plantas NS foram realmente em consequência da presença de NPs de prata, que teriam se translocado das sementes até os cotilédones, unifólios e trifólios, foi feito um estudo onde aplicou-se NPs de prata diretamente nas folhas da planta adulta (NF). Nessas medidas, após a aplicação de NPs de prata no folíolo central do primeiro trifólio, os resultados apontaram uma supressão devido à presença das NPs de prata. Esse comportamento é similar aos resultados encontrados no experimento com NPs de ouro. Possivelmente, as folhas também são capazes de absorver partículas de prata em dimensões nanométricas. Pelo cálculo da área abaixo das curvas determinou-se os valores percentuais de supressão da fluorescência entre as folhas das plantas controle (SN) e das plantas onde foram aplicadas NPs de prata nas folhas da planta adulta (NF). A supressão de fluorescência teve um valor de 8% para os trifólios excitados em 405 nm e para a excitação em 532 nm a supressão foi de 9%. As Figuras 30 e 31 mostram os espectros de fluorescência das plantas controle (SN) e das plantas que receberam a

adição das NPs nas folhas da planta adulta (*NF*), quando excitadas em 405 e 532 nm, respectivamente.

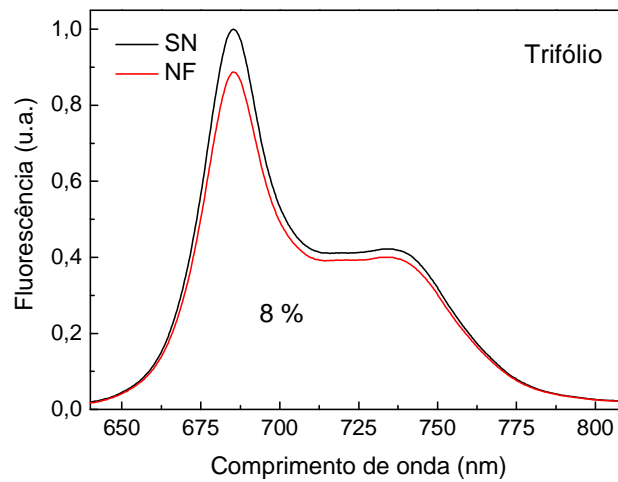


Figura 30: Fluorescência normalizada dos folíolos centrais do primeiro trifólio da planta *in vivo*, com excitação em 405 nm.

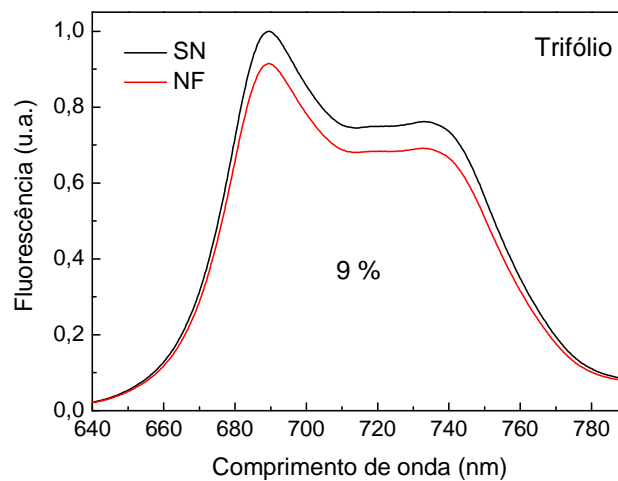


Figura 31: Fluorescência normalizada dos folíolos centrais do primeiro trifólio da planta *in vivo*, com excitação em 532 nm.

O Teste *t* de Student realizado para as plantas *SN* e *NF*, apresentadas nas Figuras 30 e 31, forneceu os seguintes valores para o *t* calculado: para a excitação em 405 nm foi 2,174 e para a excitação em 532 nm esse valor foi de 6,482. Logo, para um intervalo de confiança de 95%, pode-se afirmar que para ambos os comprimentos de onda de excitação, a diferença entre os tratamentos *SN* e *NF* é significativa, pois os valores de *t* calculados foram maiores que o valor de *t* tabelado, que é 1,729.

Apesar da supressão na fluorescência da clorofila ocorrida em todas as folhas submetidas ao tratamento com NPs e em todas as suas etapas de crescimento, a razão F685/F736, entre os picos de fluorescência em 685 e 736 nm, apresentou sempre o mesmo valor quando comparado com a razão dos picos de fluorescência da planta controle. Da mesma forma, a aplicação de NPs de prata diretamente nas folhas também não provocou alterações nesse índice, que foi aproximadamente 2,2, quando excitado em 405 nm e 1,3 em 532 nm, indicando que não houve alterações no teor de clorofila das folhas nas quais foram aplicadas as NPs de prata.

CAPÍTULO V

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados revelaram que as nanopartículas de ouro induzem uma supressão na fluorescência da clorofila, e que essa supressão depende das dimensões da partícula e da concentração. Este fenômeno é atribuído principalmente ao efeito de transferência fotoinduzida de elétrons das moléculas de clorofila no estado excitado para as nanopartículas de ouro, resultando em uma diminuição no sinal de fluorescência da clorofila.

O maior efeito de supressão de fluorescência foi induzido por nanopartículas de ouro de 5 nm de diâmetro. Este efeito foi devido à maior área de superfície disponível para a adsorção das moléculas de clorofila nas nanopartículas, em soluções de amostras com a mesma concentração de NPs. Devido ao fato de a área de superfície disponível das NPs também depender da concentração das nanopartículas, o grau de supressão da fluorescência da clorofila foi dependente da concentração de NPs de ouro.

Os experimentos com nanopartículas de prata em soluções do extrato de clorofila mostraram que essas partículas também provocam supressão na intensidade de fluorescência da clorofila. O comportamento dessa supressão é alterado em função do aumento da concentração de NPs de prata. Para concentrações de NPs abaixo de 100 μM ocorre a supressão dinâmica colisional, resultante do contato entre as NPs e as moléculas de clorofila no estado excitado. Em concentrações de NPs acima de 100 μM ocorre a supressão dinâmica colisional simultaneamente à supressão estática, processo no qual moléculas de clorofila no nível fundamental de energia se complexam às NPs.

Este estudo forneceu a primeira observação *in vivo* da supressão de fluorescência da clorofila induzida por nanopartículas metálicas de ouro e de prata. Os resultados mostraram que a espectroscopia de fluorescência induzida a laser pode ser usada para investigar as alterações na resposta fisiológica de plantas induzidas por nanopartículas de ouro e de prata, e que o estudo com ambos os comprimentos de onda de excitação, 405 e 532 nm, foi capaz de constatar a presença de nanopartículas metálicas nas plantas.

Apesar de as nanopartículas de ouro e de prata terem sido aplicadas nas sementes antes do plantio, foi possível observar a interação entre as nanopartículas e o complexo supramolecular de coleta de luz do fotossistema II da planta, mesmo em

estágios de desenvolvimento mais avançados. Os resultados sugerem que as NPs foram capazes de penetrar nas sementes e de se translocar para as folhas. Os dados também sugerem que diferentes concentrações de nanopartículas foram acumuladas nos cotilédones, unifólios e trifólios. A maior concentração de nanopartículas foi observada nas folhas cotiledonares e o menor acúmulo de nanopartículas foi detectado nas folhas trifolioladas.

CAPÍTULO VI

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] ZHANG, W. X.; KARN, B. Nanoscale environmental science and technology: Challenges and opportunities. **Environmental Science & Technology**, v. 39, n. 5, p. 94A-95A, 2005.

[2] MARTINS, P. R.; RAMOS, S. F. **Impactos das nanotecnologias na cadeia de produção da soja brasileira**. São Paulo: Xamã, 2009.

[3] SCHULZ, P. **A encruzilhada da nanotecnologia: inovação, tecnologia e riscos**. Rio de Janeiro: Vieira & Lent, 2009.

[4] EIGLER, D. M.; SCHWEIZER, E. K. POSITIONING SINGLE ATOMS WITH A SCANNING TUNNELING MICROSCOPE. **Nature**, v. 344, n. 6266, p. 524-526, 1990.

[5] MAYNARD, A. D.; PUI, D. Y. H. Nanotechnology and occupational health: New technologies - new challenges. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 9, n. 1, p. 1-3, 2007.

[6] MA, X. et al. Interactions between engineered nanoparticles (ENPs) and plants: Phytotoxicity, uptake and accumulation. **Science of the Total Environment**, v. 408, n. 16, p. 3053-3061, 2010.

[7] SONDI, I.; SALOPEK-SONDI, B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E-coli as a model for Gram-negative bacteria. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 275, n. 1, p. 177-182, 2004.

[8] GOTTSCHALK, F. et al. Modeled Environmental Concentrations of Engineered Nanomaterials (TiO₂, ZnO, Ag, CNT, Fullerenes) for Different Regions. **Environmental Science & Technology**, v. 43, n. 24, p. 9216-9222, 2009.

- [9] JUDY, J. D.; UNRINE, J. M.; BERTSCH, P. M. Evidence for Biomagnification of Gold Nanoparticles within a Terrestrial Food Chain. **Environmental Science & Technology**, v. 45, n. 2, p. 776-781, 2011.
- [10] ZHANG, W. X. Nanoscale iron particles for environmental remediation: An overview. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 5, n. 3-4, p. 323-332, 2003.
- [11] MORARU, C. I. et al. Nanotechnology: A new frontier in food science. **Food Technology**, v. 57, n. 12, p. 24-29, 2003.
- [12] BOUWMEESTER, H. et al. Review of health safety aspects of nanotechnologies in food production. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 53, n. 1, p. 52-62, 2009.
- [13] GARCIA, M.; FORBE, T.; GONZALEZ, E. Potential applications of nanotechnology in the agro-food sector. **Ciencia E Tecnologia De Alimentos**, v. 30, n. 3, p. 573-581, 2010.
- [14] AITKEN, R. J. et al. Manufacture and use of nanomaterials: current status in the UK and global trends. **Occupational Medicine-Oxford**, v. 56, n. 5, p. 300-306, 2006.
- [15] CROSS, S. E. et al. Human skin penetration of sunscreen nanoparticles: In-vitro assessment of a novel micronized zinc oxide formulation. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 20, n. 3, p. 148-154, 2007.
- [16] NEL, A. et al. Toxic potential of materials at the nanolevel. **Science**, v. 311, n. 5761, p. 622-627, 2006.
- [17] BRUNNER, T. J. et al. In vitro cytotoxicity of oxide nanoparticles: Comparison to asbestos, silica, and the effect of particle solubility. **Environmental Science & Technology**, v. 40, n. 14, p. 4374-4381, 2006.

- [18] HUSSAIN, S. M. et al. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. **Toxicology in Vitro**, v. 19, n. 7, p. 975-983, 2005.
- [19] JIA, G. et al. Cytotoxicity of carbon nanomaterials: Single-wall nanotube, multi-wall nanotube, and fullerene. **Environmental Science & Technology**, v. 39, n. 5, p. 1378-1383, 2005.
- [20] LAM, C. W. et al. A review of carbon nanotube toxicity and assessment of potential occupational and environmental health risks. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 36, n. 3, p. 189-217, 2006.
- [21] SOTO, K. F. et al. Biological effects of nanoparticulate materials. **Materials Science & Engineering C-Biomimetic and Supramolecular Systems**, v. 26, n. 8, p. 1421-1427, 2006.
- [22] OBERDORSTER, E. Manufactured nanomaterials (Fullerenes, C-60) induce oxidative stress in the brain of juvenile largemouth bass. **Environmental Health Perspectives**, v. 112, n. 10, p. 1058-1062, 2004.
- [23] LIN, D.; XING, B. Phytotoxicity of nanoparticles: Inhibition of seed germination and root growth. **Environmental Pollution**, v. 150, n. 2, p. 243-250, 2007.
- [24] TROUILLER, B. et al. Titanium Dioxide Nanoparticles Induce DNA Damage and Genetic Instability In vivo in Mice. **Cancer Research**, v. 69, n. 22, p. 8784-8789, 2009.
- [25] WANG, B. et al. Acute toxicity of nano- and micro-scale zinc powder in healthy adult mice. **Toxicology Letters**, v. 161, n. 2, p. 115-123, 2006.
- [26] SAWAI, J. et al. Evaluation of growth-inhibitory effect of ceramics powder slurry on bacteria by conductance method. **Journal of Chemical Engineering of Japan**, v. 28, n. 3, p. 288-293, 1995.

- [27] YANG, L.; WATTS, D. J. Particle surface characteristics may play an important role in phytotoxicity of alumina nanoparticles. **Toxicology Letters**, v. 158, n. 2, p. 122-132, 2005.
- [28] MULLER, J. et al. Respiratory toxicity of multi-wall carbon nanotubes. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 207, n. 3, p. 221-231, 2005.
- [29] LEE, W. M. et al. Toxicity and bioavailability of copper nanoparticles to the terrestrial plants mung bean (*Phaseolus radiatus*) and wheat (*Triticum aestivum*): Plant agar test for water-insoluble nanoparticles. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 27, n. 9, p. 1915-1921, 2008.
- [30] ATKINS, P.; DE PAULA, J. **Físico-química**. 7. Ed. Rio de Janeiro: LTC-Livros Técnicos e Científicos, 2004. v. 2.
- [31] LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. 3. Ed. Springer, 2006.
- [32] BAKER, N. R. Chlorophyll fluorescence: A probe of photosynthesis in vivo. In: (Ed.). **Annual Review of Plant Biology**, v.59, p. 89-113, 2008.
- [33] ZHAO, C.-M. et al. Effects of groundwater depth variation on photosynthesis and photoprotection of *Elaeagnus angustifolia* L. **Trees-Structure and Function**, v. 21, n. 1, p. 55-63, 2007.
- [34] KAO, W. Y.; TSAI, T. T. Tropic leaf movements, photosynthetic gas exchange, leaf delta C-13 and chlorophyll a fluorescence of three soybean species in response to water availability. **Plant Cell and Environment**, v. 21, n. 10, p. 1055-1062, 1998.
- [35] NDAO, A. S. et al. Analysis of chlorophyll fluorescence spectra in some tropical plants. **Journal of Fluorescence**, v. 15, n. 2, p. 123-129, 2005.

- [36] CEROVIC, Z. G. et al. Ultraviolet-induced fluorescence for plant monitoring: present state and prospects. **Agronomie**, v. 19, n. 7, p. 543-578, 1999.
- [37] PERALTA-VIDEA, J. R. et al. Nanomaterials and the environment: A review for the biennium 2008-2010. **Journal of Hazardous Materials**, v. 186, n. 1, p. 1-15, 2011.
- [38] MAXWELL, K.; JOHNSON, G. N. Chlorophyll fluorescence - a practical guide. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, n. 345, p. 659-668, 2000.
- [39] THUITA, M. et al. Commercial rhizobial inoculants significantly enhance growth and nitrogen fixation of a promiscuous soybean variety in Kenyan soils. **Biology and Fertility of Soils**, v. 48, n. 1, p. 87-96, 2012.
- [40] LOPES, A. S., GUILHERME, L. A. G. Solo sob Cerrado: Manejo da fertilidade para a produção agropecuária. **ANDA Associação Nacional para Difusão de Adubos e Corretivos Agrícolas**, Boletim Técnico nº 5, p. 56, São Paulo, 1994.
- [41] RICHARDS, F. A.; THOMPSON, T. G. The estimation and characterization of plankton populations by pigment analyses: A spectrophotometric method for the estimation of plankton pigments. **Journal of Marine Research**, v. 11, n. 2, p. 156-172, 1952.
- [42] PORRA, R. J. The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b. **Photosynthesis Research**, v. 73, n. 1-3, p. 149-156, 2002.
- [43] ABE, S.; KAJIKAWA, K. Linear and nonlinear optical properties of gold nanospheres immobilized on a metallic surface. **Physical Review B**, v. 74, n. 3, 2006.
- [44] VALEUR, B. **Molecular Fluorescence: Principles and Applications**. Wiley-VCH, 2001.

- [45] BARAZZOUK, S.; KAMAT, P. V.; HOTCHANDANI, S. Photoinduced electron transfer between chlorophyll a and gold nanoparticles. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 109, n. 2, p. 716-723, 2005.
- [46] MARCASSA, L. G. et al. Fluorescence spectroscopy applied to orange trees. **Laser Physics**, v. 16, n. 5, p. 884-888, 2006.
- [47] KHODAKOVSKAYA, M. et al. Carbon Nanotubes Are Able To Penetrate Plant Seed Coat and Dramatically Affect Seed Germination and Plant Growth. **Acs Nano**, v. 3, n. 10, p. 3221-3227, 2009.
- [48] ZHU, H. et al. Uptake, translocation, and accumulation of manufactured iron oxide nanoparticles by pumpkin plants. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 10, n. 6, p. 713-717, 2008.
- [49] LIN, S. et al. Uptake, Translocation, and Transmission of Carbon Nanomaterials in Rice Plants. **Small**, v. 5, n. 10, p. 1128-1132, 2009.
- [50] SAISON, C. et al. Effect of core-shell copper oxide nanoparticles on cell culture morphology and photosynthesis (photosystem II energy distribution) in the green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*. **Aquatic Toxicology**, v. 96, n. 2, p. 109-114, 2010.
- [51] MISRA, A. N.; SRIVASTAVA, A.; STRASSER, R. J. Utilization of fast chlorophyll a fluorescence technique in assessing the salt/ion sensitivity of mung bean and Brassica seedlings. **Journal of Plant Physiology**, v. 158, n. 9, p. 1173-1181, 2001.
- [52] BUSCH, F.; HUENER, N. P. A.; ENSMINGER, I. Increased air temperature during simulated autumn conditions impairs photosynthetic electron transport between photosystem II and photosystem I. **Plant Physiology**, v. 147, n. 1, p. 402-414, 2008.
- [53] CAIRES, A. R. L. et al. Water Stress Response of Conventional and Transgenic Soybean Plants Monitored by Chlorophyll a Fluorescence. **Journal of Fluorescence**, v. 20, n. 3, p. 645-649, 2010.

- [54] CORREDOR, E. et al. Nanoparticle penetration and transport in living pumpkin plants: in situ subcellular identification. **Bmc Plant Biology**, v. 9, 2009.
- [55] EICHERT, T. et al. Size exclusion limits and lateral heterogeneity of the stomatal foliar uptake pathway for aqueous solutes and water-suspended nanoparticles. **Physiologia Plantarum**, v. 134, n. 1, p. 151-160, 2008.
- [56] ASSUMPÇÃO, T. A. A. **Desenvolvimento de técnica para nucleação de nanopartículas metálicas em vidros de germanato dopados com íons de túlio para aplicações em dispositivos fotônicos**. Dissertação de mestrado. Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2010.
- [57] GUEVARA, E. A. C. **Fotodegradação de fenotiazinas e seus efeitos estruturais sobre a Na^+ , K^+ -ATPase: estudo através de fluorescência**. Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física, do Departamento de Física da PUC-Rio. Rio de Janeiro, 2010.
- [58] LAKOWICZ, J. R. **Topics In Fluorescence Spectroscopy: Protein Fluorescence**. v. 6, Kluwer Academic Publishers, 2002.

APÊNDICE A – TESTE t DE STUDENT

Teste t de Student

Nas análises estatísticas utilizadas neste trabalho, foi aplicado um teste de hipóteses para duas médias populacionais, através do Teste t de Student para amostras pareadas, com a finalidade de testar a hipótese nula de que as duas médias das populações são iguais [1]. Para isso, ao invés de considerar os dois conjuntos de observações como amostras distintas, faz-se uma comparação para cada par de dados entre as duas populações, calculando a diferença entre eles (d), como mostrado na Tabela 1 [1, 2].

Tabela 1: Cálculo das diferenças entre amostras pareadas.

População 1	População 2	Diferenças
X_{11}	X_{12}	$d_1 = X_{11} - X_{12}$
X_{21}	X_{22}	$d_2 = X_{21} - X_{22}$
X_{31}	X_{32}	$d_3 = X_{31} - X_{32}$
\vdots	\vdots	\vdots
X_{n1}	X_{n2}	$d_n = X_{n1} - X_{n2}$

Assim, é possível encontrar a média das diferenças (\bar{d}) dado pela Equação 1 e também o desvio padrão das diferenças (S_d), dado pela Equação 2. O parâmetro n é o número de amostras.

$$\bar{d} = \frac{\sum_{i=1}^n d_i}{n} \quad \text{Equação 1}$$

$$S_d = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (d_i - \bar{d})^2}{n-1}} \quad \text{Equação 2}$$

O valor de t calculado (t_{calc}) é dado pela Equação 3, e para que a diferença entre as duas populações seja significativa, o valor de t_{calc} deve ser igual ou maior que o valor de t tabelado (t_{tab}) para um grau de liberdade igual a $n - 1$ [3-5].

$$t_{calc} = \frac{\bar{d}}{\frac{S_d}{\sqrt{n}}} \geq t_{tab(n-1)} \quad \text{Equação 3}$$

A Tabela 2 mostra a distribuição t de Student encontrada na literatura [3]. O valor de t_{tab} é encontrado baseando-se no grau de liberdade (g.l.) e na probabilidade unicaudal de t . Para um intervalo de confiança de 95%, por exemplo, a região unicaudal (região crítica) é de 5%, logo, a probabilidade unicaudal de t é 0,05. Ainda como exemplo, se o número de amostras for 20, o grau de liberdade será 19. Sendo assim, para um grau de liberdade de 19 com um intervalo de confiança de 95%, o valor de t_{tab} é de 1,729. Nos tratamentos estatísticos encontrados na literatura, esse intervalo de confiança (95%) é muito utilizado por proporcionar um alto grau de confiabilidade [5].

Tabela 2: Distribuição t de Student. Modificada da referência [3].

g.l.	Probabilidade unicaudal de t de Student.						
	0,25	0,1	0,05	0,025	0,01	0,005	0,001
1	1,000	3,078	6,314	12,706	31,821	63,657	318,309
2	0,816	1,886	2,920	4,303	6,965	9,925	22,327
3	0,765	1,638	2,353	3,182	4,541	5,841	10,215
4	0,741	1,533	2,132	2,776	3,747	4,604	7,173
5	0,727	1,476	2,015	2,571	3,365	4,032	5,893
6	0,718	1,440	1,943	2,447	3,143	3,707	5,208
7	0,711	1,415	1,895	2,365	2,998	3,499	4,785
8	0,706	1,397	1,860	2,306	2,896	3,355	4,501
9	0,703	1,383	1,833	2,262	2,821	3,250	4,297
10	0,700	1,372	1,812	2,228	2,764	3,169	4,144
11	0,697	1,363	1,796	2,201	2,718	3,106	4,025
12	0,695	1,356	1,782	2,179	2,681	3,055	3,930
13	0,694	1,350	1,771	2,160	2,650	3,012	3,852
14	0,692	1,345	1,761	2,145	2,624	2,977	3,787
15	0,691	1,341	1,753	2,131	2,602	2,947	3,733
16	0,690	1,337	1,746	2,120	2,583	2,921	3,686
17	0,689	1,333	1,740	2,110	2,567	2,898	3,646
18	0,688	1,330	1,734	2,101	2,552	2,878	3,610
19	0,688	1,328	1,729	2,093	2,539	2,861	3,579
20	0,687	1,325	1,725	2,086	2,528	2,845	3,552
21	0,686	1,323	1,721	2,080	2,518	2,831	3,527
22	0,686	1,321	1,717	2,074	2,508	2,819	3,505
23	0,685	1,319	1,714	2,069	2,500	2,807	3,485
24	0,685	1,318	1,711	2,064	2,492	2,797	3,467
25	0,684	1,316	1,708	2,060	2,485	2,787	3,450
26	0,684	1,315	1,706	2,056	2,479	2,779	3,435
27	0,684	1,314	1,703	2,052	2,473	2,771	3,421
28	0,683	1,313	1,701	2,048	2,467	2,763	3,408
29	0,683	1,311	1,699	2,045	2,462	2,756	3,396
30	0,683	1,310	1,697	2,042	2,457	2,750	3,385
40	0,681	1,303	1,684	2,021	2,423	2,704	3,307
60	0,679	1,296	1,671	2,000	2,390	2,660	3,232
120	0,677	1,289	1,658	1,980	2,358	2,617	3,160
∞	0,674	1,282	1,645	1,96	2,326	2,576	3,09

Referências Bibliográficas

- [1] MORETTIN, P. A.; BUSSAB, W. O. **Estatística Básica**. 6 ed. São Paulo: Atual, 2010.
- [2] VIEIRA, S. **Estatística Experimental**. 2 ed. São Paulo: Atlas, 1999.
- [3] MARTINS, G. A. **Estatística Geral e Aplicada**. 3 ed. São Paulo: Atlas, 2006.
- [4] WITTE, R. S.; WITTE, J. S. **Estatística**. 7 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005.
- [5] LARSON, R.; FARBER, B. **Estatística aplicada**. 2 ed. Sao Paulo: Pearson Prentice Hall, 2007.

ANEXO I – CERTIFICADO DE PREMIAÇÃO



16º Encontro Nacional de Química Analítica

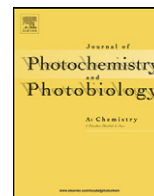
“Química Analítica sem fronteiras”

CERTIFICADO

A Comissão organizadora certifica que o trabalho **“Chlorophyll fluorescence alteration induced by silver nanoparticles: in vivo observation”**, de autoria de “Willian F. Falco, Abdimar Moreno, Joelson Fernandes, Eriton R. Botero, Evaristo A. Falcão e Anderson R. L. Caires”, foi premiado como um dos melhores apresentados do 16º Encontro Nacional de Química Analítica.

Prof. Pedro V. Oliveira
Presidente da Comissão Organizadora
16º ENQA

ANEXO II – ARTIGO PUBLICADO



In vivo observation of chlorophyll fluorescence quenching induced by gold nanoparticles

W.F. Falco^a, E.R. Botero^a, E.A. Falcão^a, E.F. Santiago^b, V.S. Bagnato^c, A.R.L. Caires^{a,*}

^a Grupo de Óptica Aplicada, Universidade Federal da Grande Dourados, CP 533, 79804-970 Dourados, MS, Brazil

^b Centro Integrado de Análise e Monitoramento Ambiental, Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul, CP 523, 79804-970 Dourados, MS, Brazil

^c Grupo de Óptica, Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, CP 369, 13560-970 São Carlos, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 February 2011

Received in revised form 8 August 2011

Accepted 27 September 2011

Available online 4 October 2011

Keywords:

Chlorophyll

Fluorescence spectroscopy

Gold nanoparticle

Plant

In vivo

ABSTRACT

To our knowledge, the present work reports the first in vivo observation of chlorophyll *a* fluorescence quenching induced by gold nanoparticles. Laser-induced fluorescence spectroscopy was used to collect in vivo chlorophyll *a* fluorescence, using a portable optical fiber-based spectrofluorimeter. Fluorescence quenching was observed for all plants submitted to the gold nanoparticle treatment, and both excitation wavelengths, 405 nm and 532 nm, were capable of detecting interactions between gold nanoparticles and plants. Our results also suggest that gold nanoparticles were able to translocate and accumulate in the soybean plants after seed inoculation.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Chlorophyll fluorescence has been used as an accurate and non-destructive probe of photosynthetic efficiency, which can directly or indirectly reflect the impacts of environmental factors and changes in the physiological state of the plants [1]. The photosynthetic efficiency of many plants decreases when they are subjected to stress conditions [2,3]. Therefore, chlorophyll fluorescence has been used as a standard method to investigate the chlorophyll content in plants, identify plant class, and detect plant stresses caused by nutrient deficiency, polluting agents, etc. [4].

Ultraviolet and visible (UV–Vis) light absorbed by green leaves can induce two distinct regions of fluorescence, emissions in the range of wavelengths between 400 nm and 600 nm (blue/green fluorescence) and between 600 nm and 800 nm (red/far-red fluorescence). The blue/green fluorescence is associated with several leaf fluorophores such as hydroxycinnamic acids, flavonols, isoflavones, flavanones, and phenolic acids; while, in vivo, the red/far-red fluorescence is produced only by chlorophyll *a* (Chl_a) [5]. In the red/far-red region, most of the fluorescence, with maxima at 685 nm and 735 nm, is emitted by Chl_a in photosystem II (PSII) at room temperature. Nevertheless, a small fluorescence contribution

from photosystem I (PSI) in the range between 710 nm and 720 nm has been reported [5].

Engineered nanoparticles (ENPs) have recently received much attention because of their industrial applications. A large number of ENPs are already used in a wide range of consumer products; more than 60% are in the field of health and fitness, including cosmetics and personal-care products. Paints, coatings, textiles, electronics, pharmaceuticals, environmental remediation, food, and food packaging are other important applications [6]. An exponential growth in the development, manufacture, and use of nanomaterials over the past decade has followed the development of several beneficial applications in a diverse range of products and areas, including health and medicine, food production, energy, and environment [7–9]. However, the production, use, and disposal of nanomaterials will inevitably lead to their release into the atmosphere, water, and soil, and there are still uncertainties about the fate, behavior, impacts, and toxicity of release into the environment [7–13]. In this context, plants will not be able to avoid the environmental stress that may be induced by the increased release of ENPs into the biosphere. Although a few papers have reported the impact of ENPs on plants in recent years, many questions about the behavior and fate of ENPs in plants remain unanswered [14]. Both positive and negative effects have been reported, and the impact of ENPs on plants varies, depending on the composition, concentration, size, and physical and chemical properties of ENPs and plant species [15].

* Corresponding author. Tel.: +55 67 34102088; fax: +55 67 34102072.

E-mail address: andersoncaires@ufgd.edu.br (A.R.L. Caires).