

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

Danielle Cristine Pedruzzi

**CARACTERIZAÇÃO DAS ALTERAÇÕES  
FISIOLÓGICAS EM *VICIA FABA* INDUZIDA POR  
NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDOS DE COBRE E  
ZINCO**

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

**DOURADOS/MS**

**MARÇO/2017**

Danielle Cristine Pedruzzi

**CARACTERIZAÇÃO DAS ALTERAÇÕES  
FISIOLÓGICAS EM *VICIA FABA* INDUZIDA POR  
NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDOS DE COBRE E  
ZINCO**

**ORIENTADOR: PROF. DR. ANDERSON RODRIGUES  
LIMA CAIRES**

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 de Ciência Ambiental.

**DOURADOS/MS**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).**

P372c Pedruzzi, Danielle Cristine

Caracterização das alterações fisiológicas em Vicia Faba induzida por nanopartículas de óxidos de Cobre e Zinco / Danielle Cristine Pedruzzi -- Dourados: UFGD, 2017.

81f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Anderson Rodrigues Lima Caires

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) - Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal da Grande Dourados.

Inclui bibliografia

1. Espectroscopia ótica. 2. Nanopartículas. 3. Óxido de cobre. 4. Óxido de zinco. 5. Fluorescência da clorofila. I. Título.

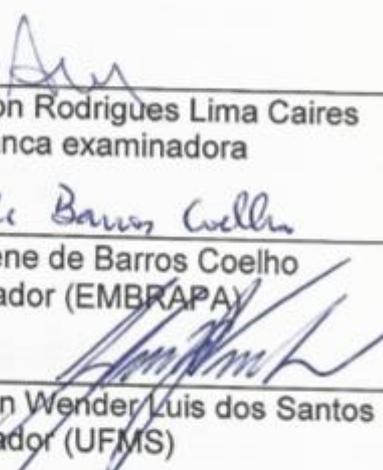


MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL

---

### Termo de Aprovação

Após apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora, foi emitido o parecer APROVADO, para a dissertação intitulada: "**Caracterização das alterações fisiológicas em *Vicia Faba* induzida por nanopartículas de óxidos de cobre e zinco**", de autoria de **Danielle Cristine Pedruzzi**, apresentada ao Programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados.



\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Anderson Rodrigues Lima Caires  
Presidente da banca examinadora

\_\_\_\_\_  
Pesq.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marlene de Barros Coelho  
Membro Examinador (EMBRAPA)

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Heberton Wender Luis dos Santos  
Membro Examinador (UFMS)

Dourados/MS, 10 de março de 2017.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por ter me concedido a vida, me abençoar sempre e colocar pessoas tão especiais em minha trajetória.

Aos meus pais, namorado e amigos pelo enorme carinho, suporte, cuidado constante, que nunca pouparam esforços para tornar os meus sonhos possíveis, sempre apoiando em todas as decisões e buscando comigo esse sonho.

Ao Professor Anderson, pela orientação, ensinamentos, dedicação, me proporcionando grandes desafios tanto na área da pesquisa como na vida.

Ao Willian Falco, pela paciência em explicar, orientar, em me socorre muitas vezes na hora do experimento, pelo suporte técnico e científico. Muito obrigada, sem você esse trabalho não seria possível, a você minha gratidão.

Aos meus colegas de laboratório e aos que passaram pelo GOA: Amanda, Cícera, Flavio, Wilson, Marisa, Prof. Eriton, Esmael, Genilson, Higor, Lene, Herbert, e em especial Daniela e Eliene pelos momentos que passamos juntos, conversas, e a ajuda para que o trabalho fosse possível.

Aos professores e funcionários da UFGD, em especial para o prof. Alexandro Almeida, pelos ensinamentos, por todo o auxílio e disposição, e por engrandecer o sonho de ser docente.

Aos professores Etenaldo Felipe Santiago e Rodrigo Garofalo, pelos equipamentos, e disponibilidade para ensinamentos durante todo o trabalho.

A Capes, pela bolsa concedida.

A UFGD por disponibilizar este mestrado.

A todos que de alguma maneira colaboraram para realização desse sonho e trabalho, muito obrigada.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Cálculo das diferenças entre amostras pareadas.....	28
<b>Tabela 2:</b> Distribuição $t$ de Student. Modificada da referência (MARTINS, 2006).....	30

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Ilustração da escala nanométrica.....	14
<b>Figura 2:</b> Câmera termográfica Testo®, modelo 880 e imagem térmica de uma folha de Fava.....	24
<b>Figura 3:</b> Porometer AP 4, utilizado para medidas de condutância estomática, e realização da medida em uma folha de Fava.....	25
<b>Figura 4:</b> Photon Systems Instruments, FluorCam 800MF, e imagem de fluorescência de clorofila <i>a</i> .....	26
<b>Figura 5:</b> Folhas de Fava com injeção de água destilada na parte direita e na esquerda recebeu a injeção de CuO NPs 50 nm em todas concentrações realizadas no tempo de 144 h.....	31
<b>Figura 6:</b> A folha direita (controle), com injeção de água destilada e a folha esquerda com injeção de 300 mg.L <sup>-1</sup> de CuO NPs<50 nm em solução aquosa.....	31
<b>Figura 7:</b> Folha de Fava com injeção de água destilada na parte direita e na esquerda com injeção de CuO NPs <50 nm, na concentração de 300 mg.L <sup>-1</sup> , no tempo de 144 h.....	32
<b>Figura 8:</b> Histograma da imagem térmica de uma folha que recebeu a injeção de 300 mg.L <sup>-1</sup> de CuO NPs.....	32
<b>Figura 9:</b> Temperatura média de 6 plantas de Fava em função do tempo antes e após serem submetidas a 50, 100, 200 e 300 mg.L <sup>-1</sup> de CuO NPs< 50 nm. * Diferença significativa (teste t, p < 0.05, n = 6).....	33
<b>Figura 10:</b> Condutância estomática média de 6 plantas de Fava em função do tempo antes e após serem submetidas a 50, 100, 200 e 300 mg.L <sup>-1</sup> de CuO NPs< 50 nm. * Diferença significativa (teste t, p < 0.05, n = 6).....	34
<b>Figura 11:</b> Variação percentual da condutância estomática em relação à diferença entre a folha controle e a folha submetida a 300 mg.L <sup>-1</sup> de CuO NPs.....	35
<b>Figura 12:</b> Imagens de Fv/Fm, NPQ_L1 e Rfd_L1, 144 hr após a injeção das NPs, obtidas por meio de imagem de fluorescência da clorofila.....	37
<b>Figura 13:</b> Fv/Fm média de 6 plantas de Fava em função do tempo antes e após serem submetidas a 50, 100, 200 e 300 mg.L <sup>-1</sup> de CuO NPs< 50 nm. * Diferença significativa (teste t, p < 0.05, n = 6).....	37
<b>Figura 14:</b> Fv/Fm em função do tempo. Comparação relativa entre a folha antes da injeção (0 h) com a folha após injeção de H <sub>2</sub> O destilada e de CuO NPs 300 mg.L <sup>-1</sup> .....	38

<b>Figura 15:</b> NPQ_L1 média de 6 plantas de Fava em função do tempo antes e após serem submetidas a 50, 100, 200 e 300 mg.L <sup>-1</sup> de CuO NPs < 50 nm. * Diferença significativa (teste t, p < 0.05, n = 6).....	39
<b>Figura 16:</b> Rfd_L1 média de 6 plantas de Fava em função do tempo antes e após serem submetidas a 50, 100, 200 e 300 mg.L <sup>-1</sup> de CuO NPs < 50 nm. * Diferença significativa (teste t, p < 0.05, n = 6).....	40
<b>Figura 17:</b> Planta Fava após 144 h da injeção de água destilada na folha direita e ZnO NPs < 50 nm na folha esquerda, nas concentrações de 50, 100, 200 e 300 mg.L <sup>-1</sup> .....	41
<b>Figura 18:</b> Evolução em h do efeito de 300 mg.L <sup>-1</sup> de ZnO NPs < 50 nm na folha esquerda, e na folha direita (controle), com injeção de água destilada....	41
<b>Figura 19:</b> Folha de Fava com injeção de água destilada na parte direita e na esquerda com injeção de ZnO NPs < 50 nm, na concentração de 300 mg.L <sup>-1</sup> , no tempo de 144 h. ....	42
<b>Figura 20:</b> Histograma da imagem térmica de uma folha que recebeu a injeção de 300 mg.L <sup>-1</sup> de ZnO NPs.....	42
<b>Figura 21:</b> Temperatura média de 6 plantas de Fava em função do tempo antes e após serem submetidas a 50, 100, 200 e 300 mg.L <sup>-1</sup> de ZnO NPs < 50 nm. * Diferença significativa (teste t, p < 0.05, n = 6).....	43
<b>Figura 22:</b> Condutância estomática média de 6 plantas de Fava em função do tempo antes e após serem submetidas a 50, 100, 200 e 300 mg.L <sup>-1</sup> de ZnO NPs < 50 nm. * Diferença significativa (teste t, p < 0.05, n = 6).....	44
<b>Figura 23:</b> Variação percentual da condutância estomática em relação à diferença entre a folha controle e a folha com 300 mg.L <sup>-1</sup> de ZnO NPs, antes da injeção de NPs e sua evolução até 144 h.....	45
<b>Figura 24:</b> Imagens de Fv/Fm, NPQ_L1 e Rfd_L1, 144 h após a injeção das NPs, obtidas por meio da imagem de fluorescência da clorofila.....	46
<b>Figura 25:</b> Fv/Fm da média de 6 plantas de Fava em função do tempo antes e após serem submetidas a 50, 100, 200 e 300 mg.L <sup>-1</sup> de ZnO NPs < 50 nm. * Diferença significativa (teste t, p < 0.05, n = 6).....	47
<b>Figura 26:</b> Fv/Fm em função do tempo. Comparação relativa entre a folha antes da injeção (0 h) com a folha após injeção de H <sub>2</sub> O destilada e de ZnO NPs 300 mg.L <sup>-1</sup> .....	48
<b>Figura 27:</b> NPQ_L1 da média de 6 plantas de Fava em função do tempo antes e após serem submetidas a 50, 100, 200 e 300 mg.L <sup>-1</sup> de ZnO NPs < 50 nm. * Diferença significativa (teste t, p < 0.05, n = 6).....	49
<b>Figura 28:</b> Rfd_L1 da média de 6 plantas de Fava em função do tempo antes e após serem submetidas a 50, 100, 200 e 300 mg.L <sup>-1</sup> de ZnO NPs < 50 nm. * Diferença significativa (teste t, p < 0.05, n = 6).....	50

<b>Figura 29:</b> Folhas de Fava com injeção de água destilada na parte direita e na esquerda recebeu a injeção de ZnO NPs < 100 nm nas concentrações 50, 100, 200 e 300 mg.L <sup>-1</sup> , realizadas no tempo de 144 h.....	51
<b>Figura 30:</b> A folha direita (controle), com injeção de água destilada e a folha esquerda com injeção de 300 mg.L <sup>-1</sup> de ZnO NPs<100 nm em solução aquosa, no período antes da injeção (0 h) até 144 h após injeção.....	51
<b>Figura 31:</b> Folha de Fava com injeção de água destilada na parte direita e na esquerda com injeção de ZnO NPs < 100 nm, na concentração de 300 mg.L <sup>-1</sup> , no tempo de 144 h.....	52
<b>Figura 32:</b> Histograma da imagem térmica de uma folha que recebeu a injeção de 300 mg.L <sup>-1</sup> de ZnO NPs< 100 nm.....	52
<b>Figura 33:</b> Temperatura média das plantas de Fava em função do tempo antes e após serem submetidas a 50, 100, 200 e 300 mg.L <sup>-1</sup> de ZnO NPs< 100 nm. * Diferença significativa (teste t, p < 0.05, n = 6).....	53
<b>Figura 34:</b> Condutância estomática da média de 6 plantas de Fava em função do tempo antes e após serem submetidas a 50, 100, 200 e 300 mg.L <sup>-1</sup> de ZnO NPs< 100 nm. * Diferença significativa (teste t, p < 0.05, n = 6).....	54
<b>Figura 35:</b> Variação percentual da condutância estomática em relação à diferença entre a folha controle e a folha com 300 mg.L <sup>-1</sup> de ZnO NPs < 100 nm.....	55
<b>Figura 36:</b> Imagens de Fv/Fm, NPQ_L1 e Rfd_L1, após 144 h da injeção de 300 mg.L <sup>-1</sup> de ZnO NPs< 100 nm, obtidas por meio da imagem de fluorescência da clorofila.....	55
<b>Figura 37:</b> Fv/Fm da média de 6 plantas de Fava em função do tempo antes após serem submetidas a 50, 100, 200 e 300 mg.L <sup>-1</sup> de ZnO NPs< 100 nm. * Diferença significativa (teste t, p < 0.05, n = 6).....	56
<b>Figura 38:</b> Fv/Fm em função do tempo. Comparação relativa entre a folha antes da injeção (0 h) com a folha após injeção de H <sub>2</sub> O destilada e de ZnO NPs < 100 nm, 300 mg.L <sup>-1</sup> .....	57
<b>Figura 39:</b> NPQ_L1 da média de 6 plantas de Fava em função do tempo antes após serem submetidas a 50, 100, 200 e 300 mg.L <sup>-1</sup> de ZnO NPs< 100 nm. * Diferença significativa (teste t, p < 0.05, n = 6).....	58
<b>Figura 40:</b> Rfd_L1 da média de 6 plantas de Fava em função do tempo antes após serem submetidas a 50, 100, 200 e 300 mg.L <sup>-1</sup> de ZnO NPs< 100 nm. * Diferença significativa (teste t, p < 0.05, n = 6).....	59
<b>Figura 41:</b> Aumento percentual da temperatura das folhas com CuO NPs < 50 nm e ZnO NPs (<50 e 100 nm) em relação às folhas controles, nas concentrações 50, 100, 200 e 300 mg.L <sup>-1</sup> .....	60

<b>Figura 42:</b> Redução percentual da condutância estomática das folhas com CuO NPs < 50 nm e ZnO NPs (<50 e 100 nm) em relação às folhas controles, nas concentrações 50, 100, 200 e 300 mg.L <sup>-1</sup> .....	61
<b>Figura 43:</b> Redução percentual de Fv/fm, das folhas com CuO NPs < 50 nm e ZnO NPs (<50 e 100 nm) em relação às folhas controles, nas concentrações 50, 100, 200 e 300 mg.L <sup>-1</sup> .....	62
<b>Figura 44:</b> Aumento percentual de NPQ_L1, das folhas com CuO NPs < 50 nm e ZnO NPs (<50 e 100 nm) em relação às folhas controles, nas concentrações 50, 100, 200 e 300 mg.L <sup>-1</sup> .....	63
<b>Figura 45:</b> Aumento percentual de Rfd_L1, das folhas com CuO NPs < 50 nm e ZnO NPs (<50 e 100 nm) em relação às folhas controles, nas concentrações 50, 100, 200 e 300 mg.L <sup>-1</sup> .....	64

*“O êxito da vida não se mede pelo que você conquistou,  
mas pelas dificuldades que superou no caminho.”*

*Abraham Lincoln*

## RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo caracterizar as alterações fisiológicas em plantas de Fava (*Vicia faba*) induzidas por nanopartículas de óxido de cobre (CuO NPs) com dimensões menores que 50 nm, e nanopartículas de óxido de zinco (ZnO NPs) de dimensão menor que 50 e 100 nm. Para realização do estudo foram utilizadas as técnicas de fluorescência da clorofila, termografia de infravermelho e análise da evapotranspiração por meio de medidas de condutância estomática. A metodologia se concentrou em técnicas analíticas não destrutivas, que se mostraram eficientes para monitorar e detectar *in vivo* as alterações geradas pelas nanopartículas (NPs) em plantas. Os resultados para CuO NPs e ZnO NPs, mostraram que o *quenching* não-fotoquímico (NPQ) e o coeficiente de diminuição relativa da fluorescência (Rfd) tiveram seus valores aumentados. O primeiro fator mostrou que houve aumento na quantidade de energia dissipada por vias não-fotoquímicas e o segundo pode ter influência com a atividade fotossintética, estando também diretamente associado à taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> pelas folhas. A condutância estomática diminuiu em função do aumento da concentração das NPs, na qual uma diferença significativa foi observada para a concentração de 200 e 300 mg.L<sup>-1</sup>, revelando a interferência das NPs na transpiração da planta. Como a temperatura da planta esta aliada à taxa de transpiração, observamos também uma elevação da temperatura. Realizando um estudo comparativo entre as nanopartículas, foi observado que as de menores dimensões (ZnO e CuO < 50 nm) foram mais citotóxicas do que as nanopartículas maiores (ZnO < 100 nm), ocorrendo alterações em todos os parâmetros estudados. Em resumo, os resultados indicam que as alterações fisiológicas nas plantas podem estar relacionadas a um dano nos estômatos das folhas submetidas às NPs, bem como a indução de um estresse oxidativo, gerado por espécies reativas de oxigênio (ROS).

**Palavras-chave:** Espectroscopia ótica, Nanopartículas, Óxido de cobre, Óxido de zinco, Fluorescência da clorofila.

## ABSTRACT

The present project work had as objective characterizing the physiologic changes in fava bean plants (*Vicia faba*) motivated for copper oxide nanoparticles (CuO NPs) with smaller dimensions than 50 nm, and zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs) smaller than 50 and 100 nm. For doing the study were employed the chlorophyll fluorescence technicals, infrared thermography and evapotranspiration analysis by way of stomatal conductance. The methodology focused on employing not-destructive analytical techniques, which were shown efficient on monitoring and detecting in vivo the changes caused by nanoparticles (NPs) in plants. The results for CuO NPs and ZnO NPs, showed that the non-photochemical quenching (NPQ) and the relative decreasing coefficient of fluorescence (RFd) had their values increased, the first value showed that the dissipated energy rises by non-photochemical ways and the second might be influenced by photosynthetic activity, being directly associated with the CO<sub>2</sub> assimilation rate by the plants. The stomatal conductance decreased as a result of the NPs concentration increase, which a significant inequality of 200 and 300 mgL<sup>-1</sup> concentration watched, showing the NPs interference on plants transpiration. As the plant temperature is associated with the transpiration rate, we noticed an increase in temperature. Realizing a comparative study beyond nanoparticles, was observed that the smallest dimensions (ZnO and CuO < 50 nm) were more cytotoxic than biggest nanoparticles (ZnO <100 nm), occurring changes in all studied parameters. In short, the results indicate that the physiological changes in plants might be related with stomates damages in leaves that were submitted to NPs, as a oxidative stress induction, caused by oxygen-reactive species.

**Keywords:** Optical spectroscopy, Nanoparticles, Copper oxide, Zinc oxide, Chlorophyll Fluorescence

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS .....	iii
LISTA DE TABELAS .....	iv
LISTA DE FIGURAS .....	v
RESUMO .....	x
ABSTRACT .....	xi
1. INTRODUÇÃO .....	14
1.1 HISTÓRIA DA NANOTECNOLOGIA .....	14
1.2 USO DE NANOTECNOLOGIAS E IMPORTÂNCIA DO ESTUDO .....	15
1.3 ÓXIDO DE COBRE.....	17
1.4 ÓXIDO DE ZINCO .....	17
1.5 AVALIAÇÕES DA TOXIDADE DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDOS DE COBRE E ZINCO.....	18
1.6 MÉTODOS UTILIZADOS NO ENTENDIMENTO DO COMPORTAMENTO DA PLANTA EXPOSTA AS NPS .....	19
2. OBJETIVOS .....	21
2.1 OBJETIVO GERAL .....	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
3.1 NANOPARTÍCULAS .....	22
3.2 PLANTAS DE FAVA .....	22
3.3 PROCESSO DE INJEÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS NA PLANTA DE FAVA ..	23
3.4 IMAGEM TÉRMICA .....	23
3.5 CONDUTÂNCIA ESTOMÁTICA.....	24
3.6 IMAGEM DE FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA <i>a</i> .....	25
3.7 TESTE <i>T</i> DE STUDENT .....	28
4. RESULTADOS .....	31
4.1 ANÁLISES DA PLANTA DE FAVA EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDOS DE COBRE (CUO NPS) .....	31
4.1.1 Imagem visual .....	31
4.1.2 Imagem térmica.....	32
4.1.3 Condutância estomática .....	34
4.1.4 Fluorescência da clorofila <i>a</i> .....	36

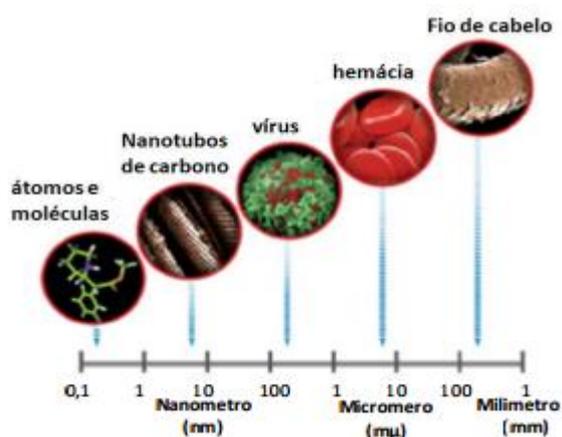
4.2 ANÁLISES DA <i>VICIA FABA</i> EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO < 50 NM (ZnO NPs).....	42
4.2.1 Imagem Visual.....	42
4.2.2 Imagem Térmica .....	43
4.2.3 Condutância estomática .....	45
4.2.4 Fluorescência da clorofila <i>a</i> .....	47
4.3 ANÁLISES DA <i>VICIA FABA</i> EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO < 100 NM (ZNO NPS).....	53
4.3.1 Imagem Visual .....	53
4.3.2 Imagem Térmica .....	54
4.3.3 Condutância estomática .....	56
4.3.4 Fluorescência da clorofila <i>a</i> .....	58
4.4 ANÁLISES DA <i>VICIA FABA</i> EM FUNÇÃO DA COMPARAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDOS DE COBRE E ZINCO.....	63
5. DISCUSSÃO .....	68
6. CONCLUSÃO .....	73
6. BIBLIOGRAFIA .....	74

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 HISTÓRIA DA NANOTECNOLOGIA

Entende-se por nanotecnologia a tecnologia que permite manipular, criar ferramentas, materiais e estruturas em nível molecular, ou seja, átomos em estruturas funcionais de dimensões nanométricas (SCOTT, 2007). Na natureza há uma infinidade de estruturas ou nanoestruturas que estão nas dimensões nanométricas tais como: vírus, organelas celulares, caseína do leite, entre outras (SCOTT, 2005; BRANDÃO et al., 2011).

Figura 1: Ilustração da escala nanométrica. Fonte: TOMA, 2004.



Apesar das pesquisas serem recentes, as aplicações da nanotecnologia estão presentes no planeta desde os primórdios da humanidade, contudo sem as definições e os conceitos atuais (BUZEA et al., 2007).

O físico Richard Feynman, em 1959, que para muitos autores é considerado o “pai da nanotecnologia”, propôs a manipulação de matéria (átomo por átomo) gerando o conhecimento a cerca da nanotecnologia, a fim de desenvolver uma tecnologia atômica e molecular (SINHA et al., 2006; BRANDÃO et al., 2011).

A primeira definição do termo nanotecnologia surgiu em 1974 na Universidade Científica de Tóquio, proposta pelo japonês Norio Taniguchi (BRANDÃO et al., 2011). Segundo Taniguchi (1974), a nanotecnologia consiste principalmente no processo de separação, consolidação e deformação dos materiais atômicos por átomo ou molécula que corresponde a 0,1-0,2 nm de comprimento.

O desenvolvimento de pesquisas voltadas ao ramo da nanotecnologia vem sendo cada vez mais expressivo atualmente. Inclusive os nanomateriais já são utilizados em centenas de produtos tais como protetores solares, cosméticos, têxteis, equipamentos desportivos, entre outros (LALAU, 2014).

No entanto, devido a suas características físico-químicas, essas partículas podem ser transportadas no meio ambiente ou acumuladas ao longo da cadeia alimentar, interferindo nos processos biológicos (QUINA, 2004). Conclusivamente, nanopartículas podem ser úteis, mas também podem desencadear impactos negativos ainda desconhecidos de acordo com a dose ou a superfície de contato que possuem (SANTOS, 2010).

No Brasil, as pesquisas relacionadas à Nanociência e Nanotecnologia são apoiadas pelo Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI) juntamente com o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Fundações de Amparo à Pesquisa (FAPs) e Indústrias, desde 1990 (HAYASHI et al., 2006).

## **1.2 USO DE NANOTECNOLOGIAS E IMPORTÂNCIA DO ESTUDO**

O uso da nanotecnologia na indústria obteve um rápido crescimento, com um vasto número de aplicações potenciais, tais como cosméticos, eletrônicos, tintas, dispositivos médicos, embalagens de alimentos, catalisadores, antimicrobianos, tecidos para vestuário, membranas de tratamento de água, etc. (JO et al., 2012).

Em 2004, a produção anual de produtos tecnológicos contendo nanomateriais, foi de 1.000 toneladas, e atualmente, a produção é de 5.000 toneladas, e a estimativa é de um aumento para 100.000 toneladas na próxima década (PASCHOALINO et al., 2010).

O uso de nanomateriais (NM) pode representar importantes riscos aos seres vivos, devido à dificuldade para avaliar os seus possíveis efeitos toxicológicos. Segundo Dhawan e Parmar (2009), o mecanismo de interação entre NM e sistemas biológicos depende do tamanho, forma, composição e propriedades da superfície do NM em questão. De acordo com Zablin (2007), as propriedades dos materiais (ópticas, elétricas, magnéticas, de transporte, catalíticas, etc), são fortemente dependentes do tamanho das suas partículas.

Contudo, apesar de a caracterização da nanopartícula ser um fator importante para elucidar a presente pesquisa, para obter um melhor entendimento dos efeitos provocados pelas nanopartículas, também se faz importante o embasamento teórico de conceitos e elementos relacionados às avaliações de toxicidade (LALAU, 2014).

Os ambientes naturais vêm sendo contaminados por produtos e resíduos nanotecnológicos, durante os processos de produção, transporte e utilização, tanto de maneira direta quanto indiretamente por descarte dos produtos consumidos (THE ROYAL SOCIETY AND ROYAL ACADEMY OF ENGINEERING, 2004; MUELLER e NOWACK, 2008).

Segundo Quina (2004), os nanomateriais possuem características tais como tamanho reduzido, grande área superficial e capacidade de aglomeração e dispersão, que podem facilitar a sua translocação pelos compartimentos ambientais (atmosfera, águas e solo), de forma que podem se tornar disponíveis aos diferentes organismos e ocasionar danos à cadeia alimentar (LOVERN et al., 2007).

Devido às suas características, as nanopartículas (NPs) podem penetrar em tecidos vivos e afetar os seus processos metabólicos (MEDINTZ et al., 2005). Por possuírem uma pequena dimensão, podem ter maior permeabilidade através de mucosas e membranas celulares, e, além disso, por terem uma área superficial grande, os efeitos tóxicos podem ser potencializados (SERVICE, 2004).

Considerando que as plantas estão na base da cadeia alimentar e que materiais em dimensões nanométricas possuem a capacidade de penetrar nas plantas, se transferindo e magnificando seus efeitos nos níveis tróficos, faz-se necessário um estudo aprofundado sobre o real comportamento das plantas na presença de nanomateriais (DE LA TORRE-ROCHE et al., 2013).

Para um estudo mais avançado sobre os efeitos das NPs em plantas, podem ser utilizadas técnicas como a fluorescência da clorofila *a*, termografia vermelha e análise da evapotranspiração por meio de medidas da condutância estomática, assim contribuindo no entendimento dos mecanismos, interações, comportamento e estresse das plantas expostas às NPs.

### **1.3 ÓXIDO DE COBRE**

O cobre é um elemento químico de símbolo Cu, número atômico 29, de massa atômica 63,54, sendo classificado como metal de transição. Em condições fisiológicas apresentam dois estados de oxidação  $Cu^+$  e  $Cu^{+2}$  (BURKHEAD et al., 2009)

Atualmente, nanoestruturas de materiais contendo cobre, incluindo o óxido de cobre, vêm sendo amplamente utilizadas nas mais diversas áreas. Nanopartículas de óxido cobre tem sua importância não somente no campo científico, mas também na indústria, devido á sua aplicação em dispositivos eletrônicos, tais como: placas de circuito impressos e condensadores multicamadas de cerâmica (SAITO et al., 2011).

Para Wang et al., (2011), entre as NPs de óxidos metálicos de transição, o óxido de cobre (CuO) tem atraído especial atenção, pois podem ser utilizadas como supercondutores em aplicações como fotocondutores e fototérmicas, e também vêm sendo utilizadas na composição de tintas anti-incrustantes de embarcações (ICOMIA, 2006; MELEGARI et al., 2013), representando assim uma importante fonte de contaminação aos ecossistemas aquáticos.

As nanopartículas de CuO Nps em meio fluído, tem uma excelente condutividade térmica podendo ser utilizado para transferência de calor em máquinas (CHANG et al., 2005). Assim, as CuO NPs são de significante interesse tecnológico e têm sido cada vez mais utilizadas em várias aplicações (ZHOU et al., 2006).

### **1.4 ÓXIDO DE ZINCO**

Nanopartículas de óxido de zinco (ZnO NPs) são outro tipo de NM muito utilizado na indústria. Estas estão presentes em bloqueadores solares, cremes e loções, como um composto antibacteriano e fungistático, adicionado aos revestimentos transparentes como verniz para superfícies de madeira, revestimento ultravioleta (UV) protetor em filmes de plástico para janelas e óculos e em tecidos feitos a partir de polímeros sintéticos.

As possibilidades de utilização de nanoestruturas baseadas em ZnO são as mais diversas. Merece destaque a utilização na confecção de filmes finos

flexíveis para dispositivos optoeletrônicos e sensores (WEINTRAUB et al, 2008; MITZNER et al, 2003; MERCURIO, 2009).

Na indústria farmacêutica, por exemplo, são usadas em pomadas ou pó antissépticos, porque fecham os poros da pele protegendo-a de agentes externos que possam causar lesões ou inflamações. As ZnO NPs também podem atuar como agente e desodorante eliminando os odores e bactérias que causam a transpiração. O ZnO é de grande utilidade em várias áreas relacionadas ao bem-estar humano, em casos de saúde bucal, por exemplo, este produto químico é utilizado na fabricação de cimento útil na reparação de dentes (MUNOZ, 2013).

As ZnO NPs, também podem ser utilizadas como semicondutores, pois têm propriedades eletro-ópticas, eletrônicas e estruturais, características importantes, com destaque para a área de catálise, fotocatálise, fabricação de células solares, transdutores e micro-sensores (SHIMIZU et al., 2010).

## **1.5 AVALIAÇÕES DA TOXIDADE DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDOS DE COBRE E ZINCO**

Os testes de toxicidade são ensaios laboratoriais que têm como objetivo avaliar os efeitos nocivos das substâncias a serem analisadas, bem como o seu grau de toxicidade. Para tal, organismos vivos são expostos a diferentes concentrações das substâncias de interesse e analisam-se os efeitos adversos causados sobre estes organismos, como por exemplo, imobilidade, morte, alterações físicas e funcionais, entre outros (MATIAS, 2009).

A nanotoxicologia destina-se a avaliar os efeitos toxicológicos de nanopartículas e seus produtos para determinar se, e em que medida, elas podem representar uma ameaça ao ambiente e à saúde humana (ZHAO et al., 2014).

Segundo Paschoalino (2010), alguns estudos sugerem que os NM, por sua pequena dimensão, podem ter uma permeabilidade maior através da pele, mucosa e membranas celulares, podendo ter efeito tóxico ampliado, já que possuem uma reatividade superior, principalmente devido à elevada área superficial.

De acordo com a literatura, a capacidade de absorção, translocação e acumulação de nanopartículas em plantas podem estar relacionadas com a espécie de planta e o tamanho, tipo, composição química e estabilidade das nanopartículas (WANG, B. et al., 2006; BULCKE, F. et al., 2013). Desta forma, o nível de contaminação e, conseqüentemente, os efeitos provocados pelas nanopartículas em plantas também são bastante variáveis.

Um aspecto importante da avaliação dos riscos das nanopartículas é compreender suas interações com as plantas, o componente de base essencial de todos os ecossistemas. Em pesquisa realizada com a planta *Cicer arietinum* L (grão-de-bico) exposta à diferentes concentrações de CuO NPs, demonstrouse que as nanopartículas interferiram no crescimento da planta, causando um retardo no crescimento das raízes e do caule (NAIR, M. et al., 2014).

Em outro estudo, que avaliou o crescimento de arroz sob três diferentes níveis de estresse causados por CuO NPs, concluiu-se que a porcentagem de germinação da planta foi significativamente reduzida. Além disso, erupções oxidativas ficaram evidentes nas folhas (SHAW, A. et al., 2013).

O aumento do teor de ZnO NPs na planta, pode afetar negativamente o aparato fotossintético, reduzindo a eficiência fotossintética das plantas pela inibição da biossíntese de clorofila e diminuição da assimilação de carbono (CHEN et al., 2008; DHIR et al., 2008).

O excesso de Zn pode ainda causar clorose foliar (CASTIGLIONE et al., 2007), o que contribui para a inibição do crescimento das plantas (GIROTTI et al., 2013). Além disso, a toxicidade desse NM pode afetar negativamente a permeabilidade da membrana, a cadeia de transporte de elétrons (DE MAGALHÃES et al., 2004) e a absorção e translocação de nutrientes (JIANG & WANG, 2008; WANG et al., 2009).

## **1.6 MÉTODOS UTILIZADOS NO ENTENDIMENTO DO COMPORTAMENTO DA PLANTA EXPOSTA AS NPS**

A medida da fluorescência da clorofila *a* pode estar relacionada com a capacidade fotossintética das plantas, e é definida como qualquer luz na região do vermelho e infravermelho, produzida nos tecidos vegetais fotossintetizantes,

após excitação das moléculas de clorofila com luz natural ou artificial na faixa visível do espectro eletromagnético.

Segundo Mohammed et al. (2003), a fluorescência é emitida, primariamente, pela clorofila *a*, presente no Fotossistema II (PSII) e se constitui em um modo de dissipação do excesso de energia. Para Baker e Rosenqvist (2004), as relações entre as variáveis de fluorescência da clorofila e o desempenho fotossintético são analisadas no contexto de aplicações das medições da fluorescência, para identificação de plantas com melhor desempenho fotossintético.

A termografia infravermelha, ainda pouco estudada em espécies vegetais, é uma técnica que possibilita a visualização da temperatura da superfície foliar de plantas, por meio da detecção da radiação infravermelha emitida (infravermelho longo 8-14  $\mu\text{m}$ ). A temperatura foliar pode variar, principalmente, por ação dos fatores ambientais, como a incidência de radiação solar e pela transpiração. O processo de análise de dados pode ser realizado por meio de aplicativo computacional, que transforma os dados de radiação emitida em imagens térmicas, em que os níveis de temperatura são indicados pelo gradiente de falsa-cor (NOBEL, 1991).

As modificações do estado hídrico de uma planta podem causar mudanças na transpiração foliar, em função da ativa regulação da condutância estomática. Os resultados dos estudos desenvolvidos por Jones (1999) apontam o potencial da utilização da termográfica por infravermelho, até mesmo como ferramenta de estimativa da condutância estomática.

Alterações na condição hídrica de uma planta, causada por condições adversas, acarreta mudanças na transpiração, como resultado da regulação ativa da abertura estomática. Conforme Nilsson (1995), as mudanças associadas ao modelo padrão de resfriamento da folha podem ser monitoradas de forma instantânea por meio de imagens termográficas. A grande maioria das aplicações da termometria por infravermelho depende da sensibilidade da temperatura foliar e da taxa de evaporação, portanto, da abertura estomática.

De acordo com Mc Dermitt (1990), as plantas, ao absorverem  $\text{CO}_2$ , inevitavelmente, perdem água pelas folhas. Essa perda de água ocorre principalmente através dos estômatos, que apresentam mecanismos para

controlar o seu grau de abertura. Esse controle é atribuído à condutância estomática foliar, que é frequentemente utilizada como indicador da deficiência hídrica.

Os estômatos são estruturas que permitem às plantas transpirem, processo fundamental para o controle da temperatura e, principalmente, para a manutenção da pressão que permite o fluxo contínuo ascendente de água e nutrientes do solo para toda a planta (TAIZ & ZEIGER, 1991).

A combinação das técnicas de fluorescência da clorofila *a*, termografia por infravermelho e condutância estomática podem gerar um considerável conjunto de informações, capazes de fomentar plenamente as investigações sobre as características fisiológico das plantas (BAKER, 2008; MCAUSLAND, L. et al., 2013; LAWSON, T. et al., 2008).

Essas técnicas são efetivas para demonstrar o comportamento da folha expostas às nanopartículas, não sendo necessária a destruição da planta, assim o monitoramento é realizado *in vivo*.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Objetiva-se no presente trabalho, caracterizar as alterações fisiológicas em plantas de Fava (*Vicia faba*) induzidas por nanopartículas de óxidos de cobre e zinco.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Monitorar os possíveis efeitos nocivos das nanopartículas em função da concentração nas plantas;
- Avaliar o processo de absorção das nanopartículas nas plantas;
- Monitorar as mudanças na evapotranspiração na temperatura foliar devido à presença de nanopartículas na planta;
- Caracterizar as alterações no processo fotossintético das plantas induzidas pelas nanopartículas;
- Discutir a viabilidade da técnica de espectroscopia de fluorescência no monitoramento *in vivo* da interação nanopartículas-planta;

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 NANOPARTÍCULAS

As partículas em dimensões nanométricas utilizadas durante a pesquisa foram adquiridas da marca Sigma-Aldrich (Saint Louis/EUA) de diferentes materiais e diâmetros:

- NPs de óxido de zinco (ZnO) em pó com dimensões < 50 nm com pureza maior que 97 %;
- NPs de óxido de zinco (ZnO) em pó com dimensões < 100 nm;
- NPs de óxido de cobre (II) (CuO) em pó com dimensões < 50 nm.

O experimento foi realizado para todos os materiais nas concentrações 50, 100, 200 e 300 mg.L<sup>-1</sup>.

As soluções foram preparadas em água destilada, colocando em banho ultrassônico por 30 minutos. Previamente ao momento da injeção nas plantas, a solução foi sonicada novamente por 5 minutos, com a finalidade de reduzir possíveis agregados de óxidos de metais e evitar decantação.

#### 3.2 PLANTAS DE FAVA

A planta utilizada para o estudo foi da espécie Fava (*Vicia faba*), bastante aplicada em pesquisas sobre o estresse em plantas, por apresentar rápida germinação e emergência, e também devido ao fato de suas folhas serem espessas e macias possibilitando o processo de injeção das soluções com nanopartículas de óxidos metálicos com o uso de seringa e agulha.

Todos os processos experimentais foram realizados no Laboratório de Microscopia Óptica (LaMio), localizado na Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD). O plantio das sementes foi feito em vasos plásticos (200 ml) contendo substrato comercial para horticultura. Para todas as concentrações de ZnO NPs e CuO NPs, foram utilizados a mesma marca de semente (Isla Pro) e substrato (Vida Verde). Os vasos semeados foram mantidos em câmara de germinação com temperaturas de 22/18 °C dia/noite, umidade de 65/70 % dia/noite e fotoperíodo de 12/12 h dia/noite com intensidade actínica de aproximadamente 300  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , fornecendo as condições ideais para a germinação e crescimento. Os vasos foram armazenados dentro de bandejas

(2700 ml), e receberam irrigação, sendo a bandeja preenchida com aproximadamente 1 litro de água a cada 48 horas.

Para cada material estudado (ZnO NPs e CuO NPs) e para cada concentração, foram utilizadas seis plantas. Dessa forma, o resultado para cada análise realizada representa o comportamento médio de seis plantas. As análises *in vivo* foram iniciadas 20 dias após o plantio.

### **3.3 PROCESSO DE INJEÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS NA PLANTA DE FAVA**

Para a injeção das nanopartículas nas plantas, foi utilizado uma seringa de 5 mL e uma agulha fina de 12,7 mm e diâmetro de 0,30 mm, com a finalidade de reduzir o dano mecânico na folha. A agulha foi introduzida na nervura central da folha e assim inserida a solução até a folha estar totalmente preenchida.

A injeção foi feita no primeiro par de folhas expressas, após 20 dias de plantio. As seis plantas receberam a injeção do material de óxido metálico em estudo na folha esquerda. A folha direita foi mantida como controle, recebendo somente a injeção de água destilada.

As análises foram realizadas antes da injeção da solução (0 h) e após 24 h tiveram continuidade, o experimento foi feito todos os dias até 144 h após injeção, totalizando sete dias. Esses procedimentos foram aplicados para cada concentração estudada, no experimento com ZnO NPs e CuO NPs.

### **3.4 IMAGEM TÉRMICA**

As imagens foram coletadas na parte superior da folha e a análise da temperatura se deu pela área total de cada folha, à esquerda com nanopartículas e a direita com água destilada (controle). Antes do início das medidas de imagem térmica as plantas foram retiradas da estufa e deixadas por período de adaptação de trinta minutos a temperatura controlada por ar condicionado de 18 °C. O experimento ocorreu no mesmo horário durante os sete dias.

Figura 2: Câmera termográfica Testo®, modelo 880 e imagem térmica de uma folha de Fava.



As imagens foram obtidas por meio da câmera termográfica Testo®, apresentada na Figura 2, modelo 880, detector infravermelho de 2.3 Megapixels de resolução, onde as escalas de temperaturas são indicadas por gradientes de falsa cor.

O equipamento possui a faixa de temperatura entre -20 a 350 °C e precisão de  $\pm 2$  °C de temperatura. Posteriormente, foi utilizado o software Testo IRSoft 2.23 para tratamento e análise das imagens térmicas das folhas.

### **3.5 CONDUÇÃO ESTOMÁTICA**

A abertura estomática é o fator dominante na condutância difusa da superfície das folhas, que controla a perda de água e a absorção de CO<sub>2</sub> para a fotossíntese. A medição de condutância estomática é um importante indicador da condição hídrica da planta, e fornece informações valiosas sobre o crescimento e adaptação das plantas às variáveis ambientais.

Figura 3: Porometer AP 4, utilizado para medidas de condutância estomática, e realização da medida em uma folha de Fava



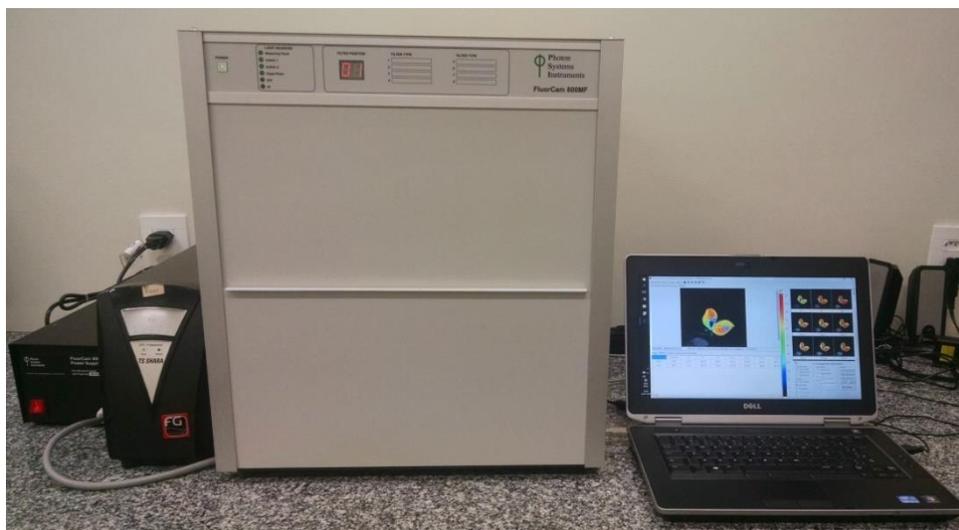
A condutância estomática foi obtida através do equipamento portátil Porometer AP 4 Delta T, apresentado na Figura 3. O aparelho realiza a medida da condutância pela comparação da taxa precisa de umidificação dentro de uma pequena área do sensor.

Antes de cada medida, as plantas foram adaptadas ao ambiente por uma hora. O equipamento foi calibrado, através de uma pequena placa com seis configurações, usando água destilada em papel filtro como padrão e o disseccante (sílica) trocado, garantindo um ambiente controlado e melhorando a precisão das medidas. A aquisição das medidas de condutância estomática foi realizada na parte inferior das folhas, onde se localizam um maior número de estômatos.

### **3.6 IMAGEM DE FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA *a***

Para realizar o estudo da influência das NPs sobre as plantas *in vivo* foi aplicada a técnica de imagem por fluorescência cinética. Antes da realização das medidas, as plantas ficam em período de adaptação de trinta minutos no escuro, garantindo que todos os centros de reação nas folhas estivessem abertos. A imagem foi realizada na parte superior da folha.

Figura 4: Photon Systems Instruments, FluorCam 800MF, e imagem de fluorescência de clorofila *a*.



O equipamento utilizado para as medidas de fluorescência de clorofila *a*, foi o Closed FluorCam FC 800-C, apresentado na Figura 4, da marca Photon Systems Instruments, que é composto basicamente por painéis de *LED* usados como fonte de excitação com intensidade de luz actínica acima de 2500  $\mu\text{mol}(\text{prótons})/\text{m}^2.\text{s}$ , e uma câmera CCD que coleta a fluorescência da planta na região entre 400 a 1000 nm, fornecendo imagens com resolução de 512 x 512 pixels a uma frequência máxima de 50 frames por segundo. O sistema é fechado, propiciando a adaptação da planta ao escuro.

Para a cinética, foi utilizada a luz branca como fonte de excitação e um filtro para selecionar somente a emissão da clorofila, na região de 680 nm. Os parâmetros observados na análise da fluorescência da clorofila foram  $F_v/F_m$  (estimativa da eficiência quântica máxima da atividade fotoquímica do PSII), NPQ\_L1 (indicativo do excesso de dissipação de energia radiante na forma de calor no PSII) e Rfd\_L1 (taxa de decréscimo da clorofila ou índice de vitalidade).

O parâmetro mais importante e o mais citado, no que diz respeito ao estudo do estresse em plantas por meio da fluorescência cinética é o  $F_v/F_m$  (eq. 1), que quantifica a eficiência máxima do fotossistema II (PSII) medida na fase em que a planta está adaptada ao escuro. Esse parâmetro indica a

capacidade fotossintética da planta de maneira muito sensível. Plantas saudáveis geram valores de  $F_v/F_m$  em torno de 0,83. Quando em condições de estresse, esse valor pode sofrer drásticas reduções, decorrentes, na maioria dos casos, de danos que provocam a desativação do PSII, indicando diminuição do processo de fotossíntese (SU, L. et al., 2015; CHANG, R. K. et al., 2015).

$$\frac{F_v}{F_m} = \frac{F_m - F_o}{F_m} \quad (\text{Equação 1})$$

Na fase da cinética em que a luz branca é incidida sobre a planta, há um rápido aumento da dissipação da energia na forma de calor, que é medido utilizando um parâmetro denominado *quenching* não-fotoquímico (NPQ) (eq. 2). É importante notar que a intensidade da fluorescência máxima da planta na fase exposta à luz ( $F_{m-L1}$ ) é menor que a fluorescência máxima na fase adaptada ao escuro ( $F_m$ ). Isso porque na fase clara, parte da energia está sendo consumida pelo NPQ, o que não acontece no primeiro pulso saturante, pelo fato de a planta estar totalmente adaptada ao escuro. Assim, o NPQ é também um importante parâmetro no estudo do aparato fotossintético das plantas, fornecendo informações sobre a dissipação de energia na forma não-fotoquímica (MURCHIE, E. et al., 2013; KALAJI, H. M. et al., 2014).

$$NPQ_{L1} = \frac{(F_m - F_{m-L1})}{F_{m-L1}} \quad (\text{Equação 2})$$

O  $NPQ_{L1}$  quantifica os processos que levam ao decréscimo da fluorescência máxima e indica a dissipação do excesso de energia radiante na forma de calor nos complexos antena do PSII, ou seja, a fotoproteção induzida pela luz através da dissipação térmica de energia, estando intimamente correlacionado com a formação de zeaxantina (ROHÁČEK; BARTÁK, 1999).

O coeficiente de diminuição relativa da fluorescência (Rfd), também denominado índice de vitalidade do PSII, é outro parâmetro que pode ser obtido pela curva da cinética de fluorescência, auxiliando nas interpretações dos processos fotossintéticos, e é determinado pela equação 3. O parâmetro Rfd caracteriza a interação das reações dependentes da luz com as reações da fase escura e é usado para avaliar a atividade do Ciclo de Calvin, que é a fase

não luminosa da fotossíntese. Assim, valores de Rfd trazem informações adicionais sobre o funcionamento da atividade fotossintética, estando também diretamente ligados à taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> pelas folhas, entretanto, apenas nos casos em que os estômatos permanecem abertos (OREKHOV, D. I. et al., 2015; SYNOWIEC, A. et al., 2015).

$$Rfd_{L1} = \frac{F_m - F_t}{F_t} \quad (\text{Equação 3})$$

Os dados de condutância estomática, imagem térmica e imagem de Fluorescência da Clorofila *a* foram tratados no programa estatístico Origin 8.5 e submetidos a análise de variância e as comparações entre médias usando-se o Teste t Student a 5% de probabilidade ( $P < 0,05$ ).

### 3.7 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 (MORETTIN, 2010).

Tabela 1: Cálculo das diferenças entre amostras pareadas.

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

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 (VIEIRA, 1999).

Assim, é possível encontrar a média das diferenças ( $\bar{d}$ ) dado pela Equação 4 e também o desvio padrão das diferenças ( $S_d$ ), dado pela Equação 5. O parâmetro  $n$  é o número de amostras.

$$\bar{d} = \frac{\sum_{i=1}^n d_i}{n} \quad (\text{Equação 4})$$

$$S_d = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (d_i - \bar{d})^2}{n-1}} \quad (\text{Equação 5})$$

O valor de  $t$  calculado ( $t_{calc}$ ) é dado pela Equação 6, 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  $n-1$  (MARTINS, 2006).

$$t_{calc} = \frac{\bar{d}}{\frac{S_d}{\sqrt{n}}} \geq t_{tab(n-1)} \quad (\text{Equação 6})$$

Tabela 2: Distribuição  $t$  de Student. Modificada da referência (MARTINS, 2006).

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
$\infty$	0,674	1,282	1,645	1,96	2,326	2,576	3,09

A Tabela 2 mostra a distribuição  $t$  de Student encontrada na literatura (MARTINS, 2006). 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.

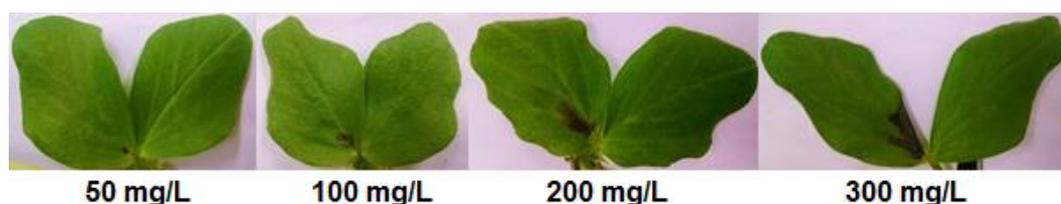
## 4. RESULTADOS

### 4.1 ANÁLISES DA PLANTA DE FAVA EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDOS DE COBRE (CUO NPS)

#### 4.1.1 Imagem visual

A análise da imagem visual de folhas da planta de Fava, tem por objetivo visualizar alterações provocadas pelos óxidos metálicos utilizados, comparando a folha controle (com injeção de água destilada) e a folha com concentração de NPs.

Figura 5: Folhas de Fava com injeção de água destilada na parte direita e na esquerda recebeu a injeção de CuO NPs 50 nm em todas concentrações realizadas, no tempo de 144 h.



A figura 5 ilustra as folhas de Fava que foram submetidas as nanopartículas de CuO, nas concentrações de 50, 100, 200 e 300 mg.L<sup>-1</sup>, 144 horas após a injeção de nanopartículas. É possível observar o efeito visual sendo intensificado conforme aumento da concentração das NPs, ocasionando necrose na parte em que CuO NPs se aglomeram na região em que foi injetada as NPs. Na folha a direita (controle) é possível observar que não houve interferência visível com a injeção de água destilada.

Os efeitos ocasionados pela injeção de CuO NPs se tornaram significativos 24 h após a injeção. A figura 6 mostra o período anterior ao contato da planta com as nanopartículas até 144 h após a injeção. É possível observar que a necrose aumenta em função do tempo e que a folha vai ficando na cor amarelada efeito este que pode estar relacionado com a diminuição da clorofila ativada na planta.

Figura 6: A folha direita (controle), com injeção de água destilada e a folha esquerda com injeção de  $300 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{CuO NPs} < 50 \text{ nm}$  em solução aquosa.



#### 4.1.2 Imagem térmica

A imagem térmica, realizada pela câmera termográfica Testo 880, tem por objetivo, comparar a temperatura da folha controle e da folha com NPs. Realizando um monitoramento a cada 24 h, pelo período de 144 h após a injeção.

Figura 7: Folha de Fava com injeção de água destilada na parte direita e na esquerda com injeção de  $\text{CuO NPs} < 50 \text{ nm}$ , na concentração de  $300 \text{ mg.L}^{-1}$ , no tempo de 144 h.

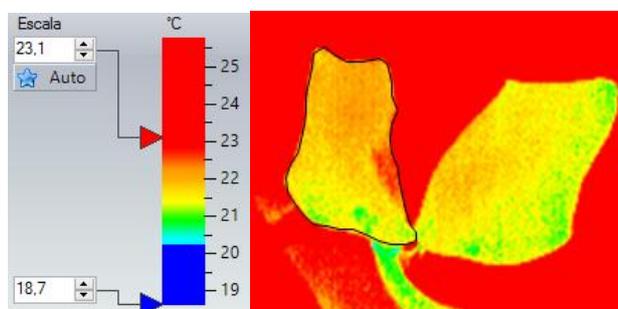
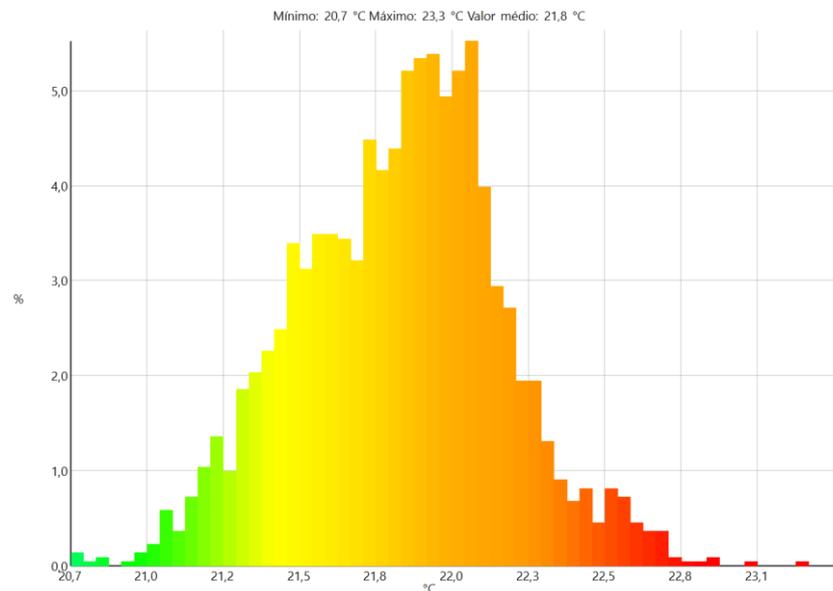


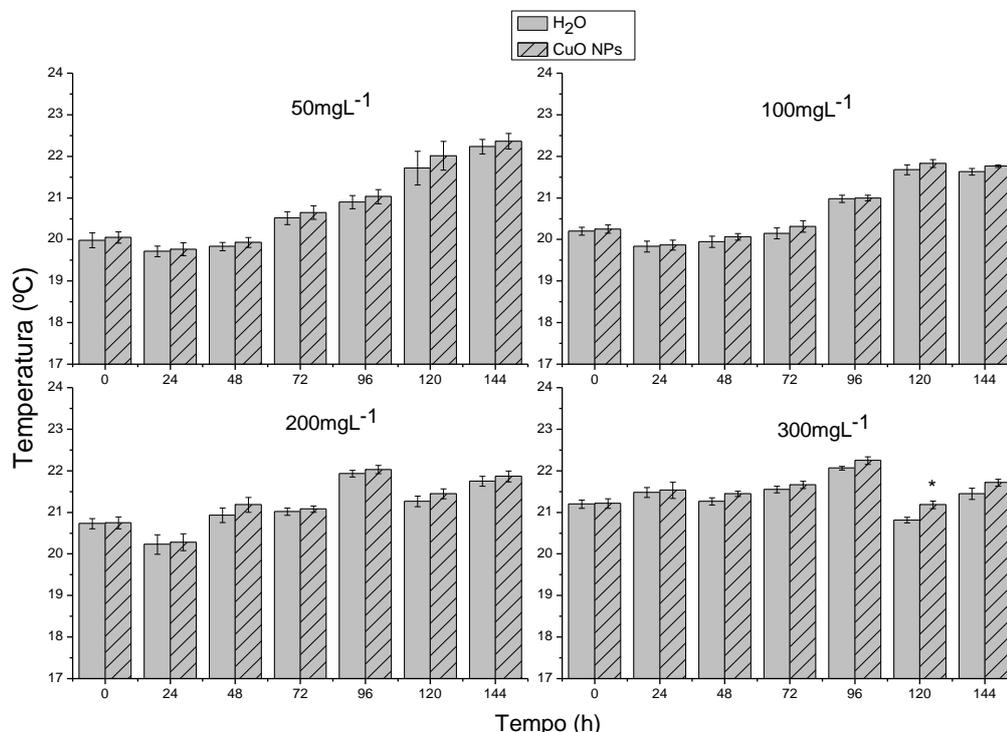
Figura 8: Histograma da imagem térmica de uma folha que recebeu a injeção de 300 mg.L<sup>-1</sup> de CuO NPs.



A figura 7, apresenta uma planta de Fava com injeção de 300 mg.L<sup>-1</sup> na folha esquerda, e na figura 8 apresenta-se o histograma da imagem térmica desta folha, feito no software Testo IRSoft 2.23, correlacionando a porcentagem da área em pixels, com a temperatura em °C. Com a junção dessas imagens é possível observar a elevação da temperatura na área afetada pela injeção das nanopartículas.

As análises térmicas por imagem apresentaram um aumento de temperatura principalmente no local onde a CuO NPs foi injetada (folha esquerda).

Figura 9. Temperatura média de 6 plantas de Fava em função do tempo antes e após serem submetidas a 50, 100, 200 e 300 mg.L<sup>-1</sup> de CuO NPs < 50 nm. \* Diferença significativa (teste t, p < 0.05, n = 6).



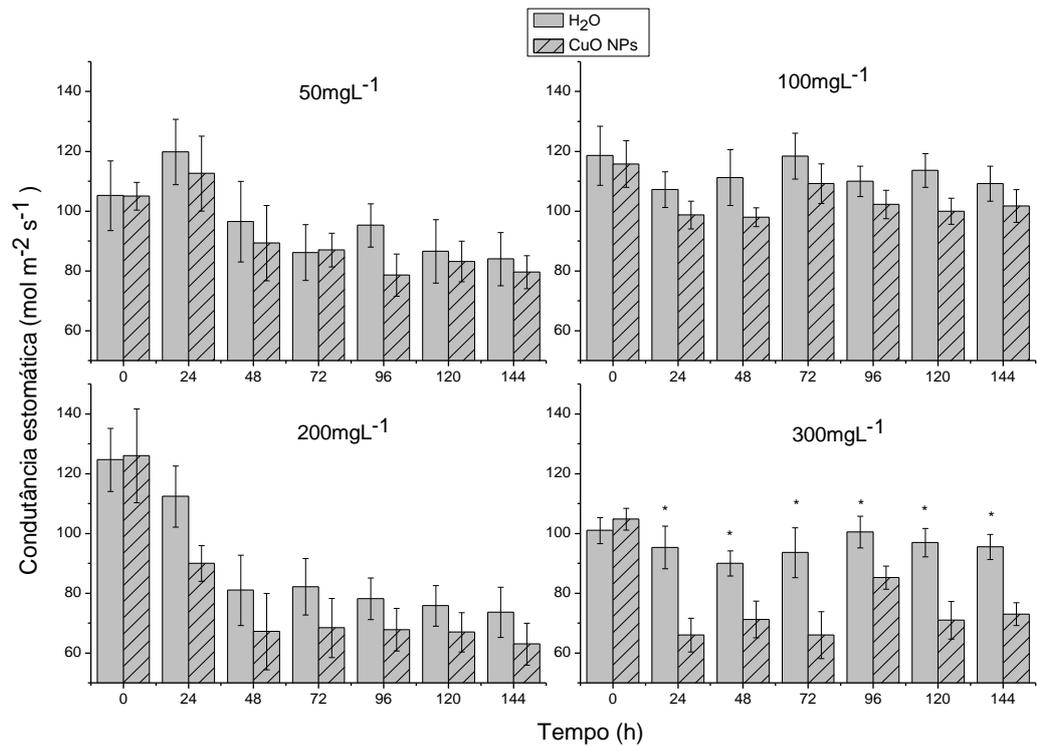
Ao considerar a temperatura média das folhas das 6 plantas analisadas, de cada concentração das NPs, esse valor mostra que o comportamento médio da temperatura das folhas que receberam as CuO NPs não são significativamente diferentes (ao grau de confiança de 95% do Teste t Student) em relação à temperatura média das folhas controle, pois as CuO NPs provocaram um aumento de temperatura localizado em algumas regiões das folhas. Todavia, os resultados apresentados na Figura 9, mostraram apenas uma diferença significativa entre as folhas controle e submetidas à concentração de 300 mg.L<sup>-1</sup> de CuO NPs, em 120 h. A Figura 9 mostra a temperatura média das seis plantas estudadas com as concentrações de 50, 100, 200 e 300 mg.L<sup>-1</sup> de CuO NPs.

#### 4.1.3 Condutância estomática

As medidas de condutância estomática foram realizadas no mesmo horário todos os dias para evitar a interferência devido ao ciclo da fotossíntese. A medição de condutância estomática é um importante indicador da condição

de estresse, e fornece informações valiosas sobre o crescimento e adaptação das plantas às variáveis externas.

Figura 10: Condutância estomática média de 6 plantas de Fava em função do tempo antes e após serem submetidas a 50, 100, 200 e 300 mg.L<sup>-1</sup> de CuO NPs < 50 nm. \* Diferença significativa (teste t, p < 0.05, n = 6).



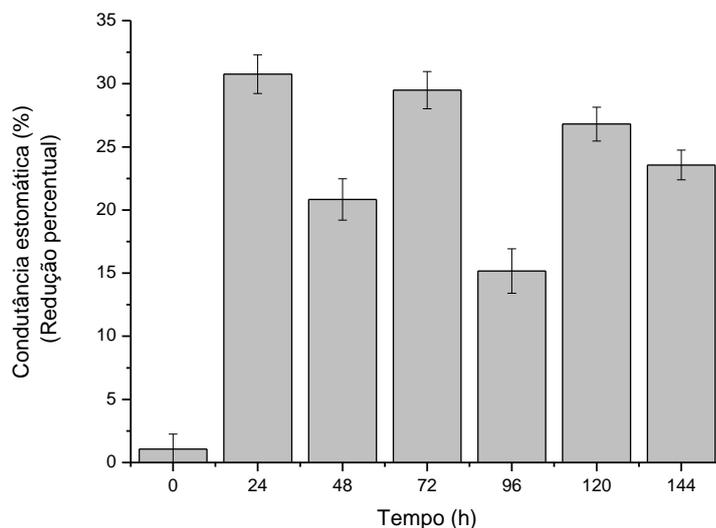
Na Figura 10 estão apresentados os resultados encontrados da condutância estomática, para média das seis plantas em cada concentração. As medidas de condutância apresentaram um desvio padrão elevado devido a cada planta apresentar uma fisiologia fotossintética diferente, porém o comportamento de todas as folhas com CuO NPs foi semelhante ao realizar uma média. Na concentração de 50 mg.L<sup>-1</sup> houve uma elevação na condutância 24 h após à injeção, em 48 h se manteve estável, com a folha esquerda com medidas inferiores a direita (controle). Na concentração de 100 mg.L<sup>-1</sup> as folhas esquerda e direita se mantiveram equilibradas respeitando a margem de erro, o que podemos concluir que não houve grande influência das nanopartículas na planta para este teste.

Com 200 mg.L<sup>-1</sup> de CuO NPs ambas as folhas apresentaram um decréscimo da condutância estomática e se mantiveram estáveis após 48h.

Essa queda pode ser ocasionada por outro fator externo diminuindo a taxa de respiração das plantas, ou a planta respondendo de forma geral a presença de NPs em seu sistema.

Em 300 mg.L<sup>-1</sup> pode-se notar a interferência das nanopartículas na folha esquerda, apresentando uma diferença significativa em relação a controle. Nota-se também na figura 10 que após 96 h de injeção das NPs na folha, a planta pode ter realizado um mecanismo de adaptação a estas condições adversas, porém a condutância estomática voltou a decair quando analisadas após 120 h.

Figura 11: Variação percentual da condutância estomática referente à folha controle e a folha submetida a 300 mg.L<sup>-1</sup> de CuO NPs.



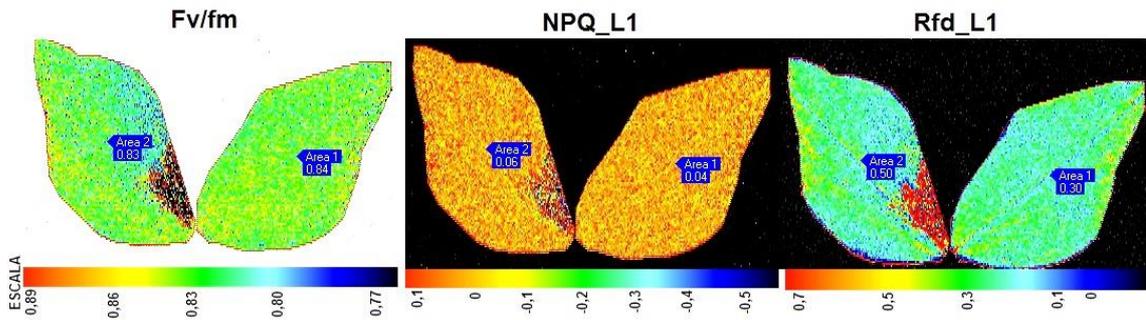
A figura 11 ilustra a variação percentual da condutância estomática em relação à diferença entre a folha controle e a folha submetida a 300 mg.L<sup>-1</sup> de CuO NPs. A maior diferença observa-se após 24 horas da injeção de CuO NPs, cerca de 32% de redução na condutância estomática entre as duas folhas.

#### 4.1.4 Fluorescência da clorofila a

A análise de fluorescência da clorofila a, foi realizado através do monitoramento da comparação entre, folha esquerda (com presença de NPs) e da folha direita (controle), para os parâmetros Fv/Fm (estimativa da eficiência

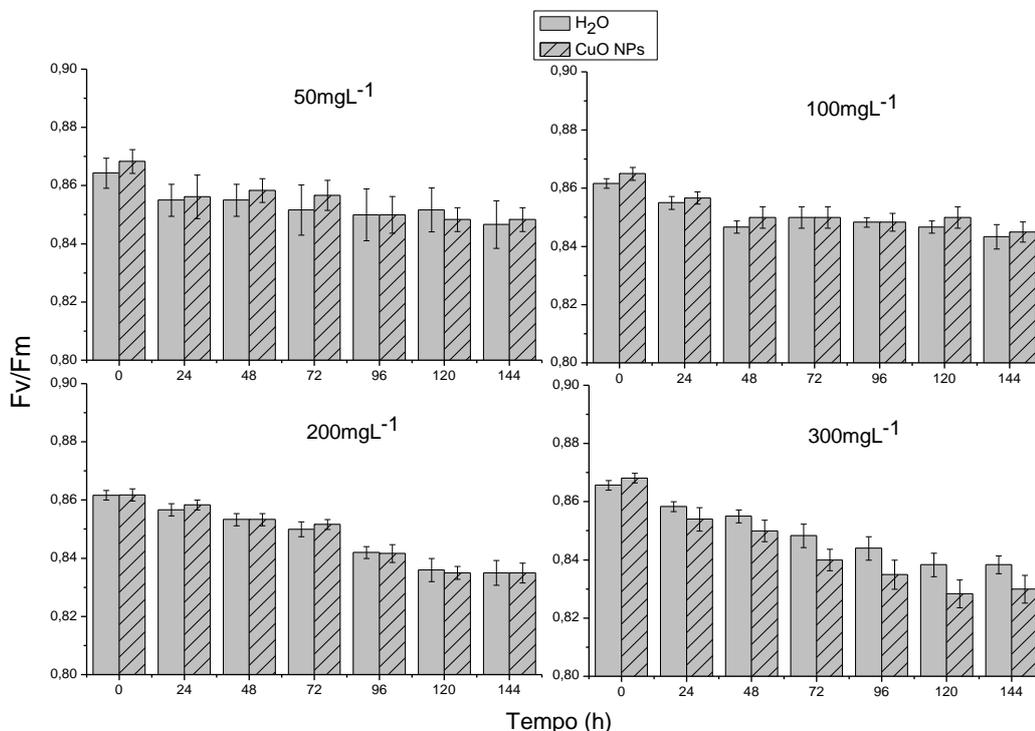
quântica máxima da atividade fotoquímica do PSII), NPQ\_L1 (indicativo do excesso de dissipação de energia radiante na forma de calor no PSII) e Rfd\_L1 (taxa de decréscimo da clorofila ou índice de vitalidade).

Figura 12. Imagens de Fv/Fm, NPQ\_L1 e Rfd\_L1, 144 hr após a injeção das NPs, obtidas por meio de imagem de fluorescência da clorofila.



A Figura 12 apresenta os resultados obtidos da medida de imagem de fluorescência cinética da parte superior das folhas de uma planta de Fava, antes e após as 144 h da injeção de  $300 \text{ mg.L}^{-1}$  de CuO NPs em solução aquosa. Analisando as imagens apresentadas, é possível visualizar as lesões provocadas por CuO NPs, assim como as alterações induzidas nos parâmetros estudados. Após 144 h, na folha esquerda, os valores de Fv/Fm foi reduzido e de NPQ e Rfd foram aumentados.

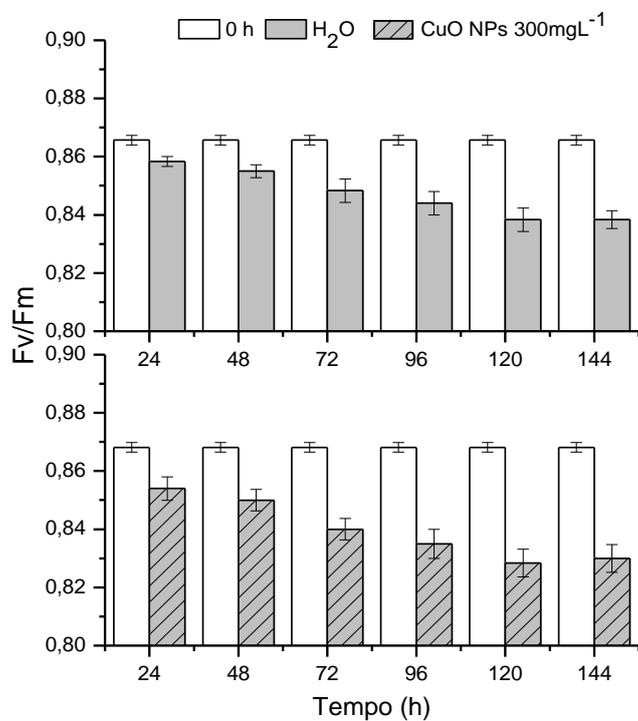
Figura 13: Fv/Fm média de 6 plantas de Fava em função do tempo antes e após serem submetidas a 50, 100, 200 e 300 mg.L<sup>-1</sup> de CuO NPs < 50 nm. \* Diferença significativa (teste t, p < 0.05, n = 6).



Na figura 13, o gráfico não apresenta diferença significativa ( $p < 0.05$ ) em nenhuma das concentrações de NPs, porém o comportamento da planta se mostrou semelhante em uma média de 6 plantas. Nas concentrações 50 e 100 mg.L<sup>-1</sup> não houve diferença significativa entre as folhas em função do tempo, mostrando que não à indução no parâmetro Fv/Fm. Em 200 mg.L<sup>-1</sup>, o comportamento da folha esquerda e da direita foi o mesmo em relação ao tempo, ocorrendo uma queda de Fv/Fm em ambas as folhas.

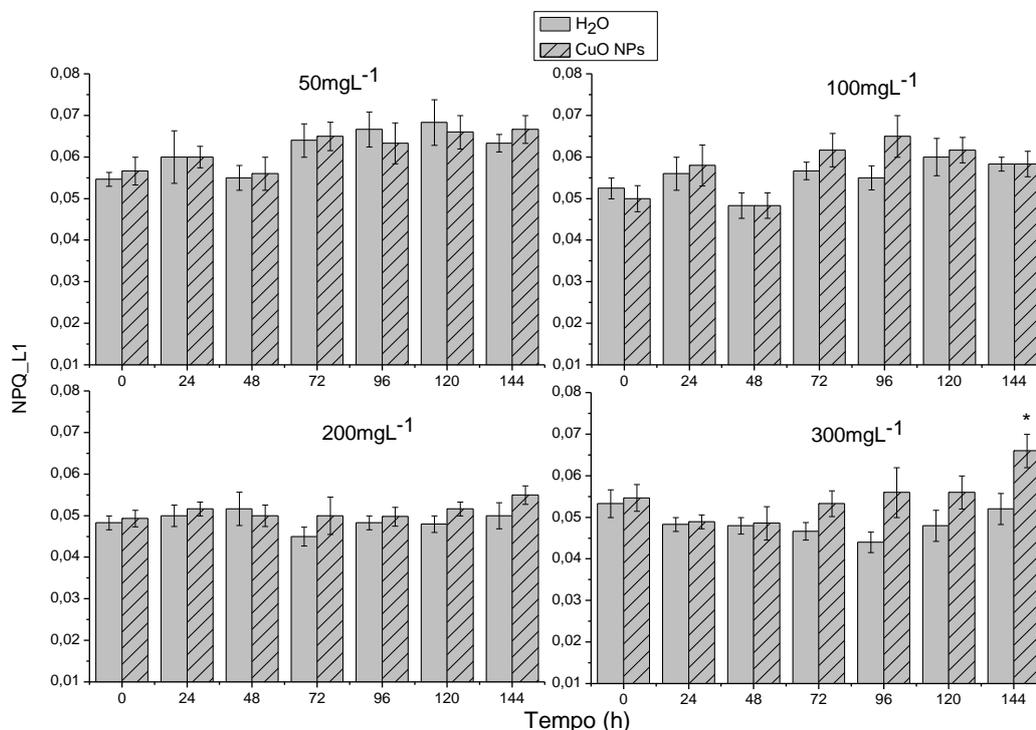
Uma hipótese seria que as CuO NPs afetaram a planta em um todo, não somente a folha injetada. Outra possível explicação é que alguma interferência externa tenha gerado estresse na planta. Na concentração 300 mg.L<sup>-1</sup> houve uma redução de Fv/Fm em ambas as folhas, porém a folha com CuO NPs mostrou valores inferiores, ou seja, as NPs apresentam um potencial efeito danoso nas folhas injetadas e, podendo também ter gerado um estresse no restante da planta.

Figura 14: Fv/Fm em função do tempo. Comparação relativa entre a folha antes da injeção (0 h) com a folha após injeção de H<sub>2</sub>O destilada e de CuO NPs 300 mg.L<sup>-1</sup>.



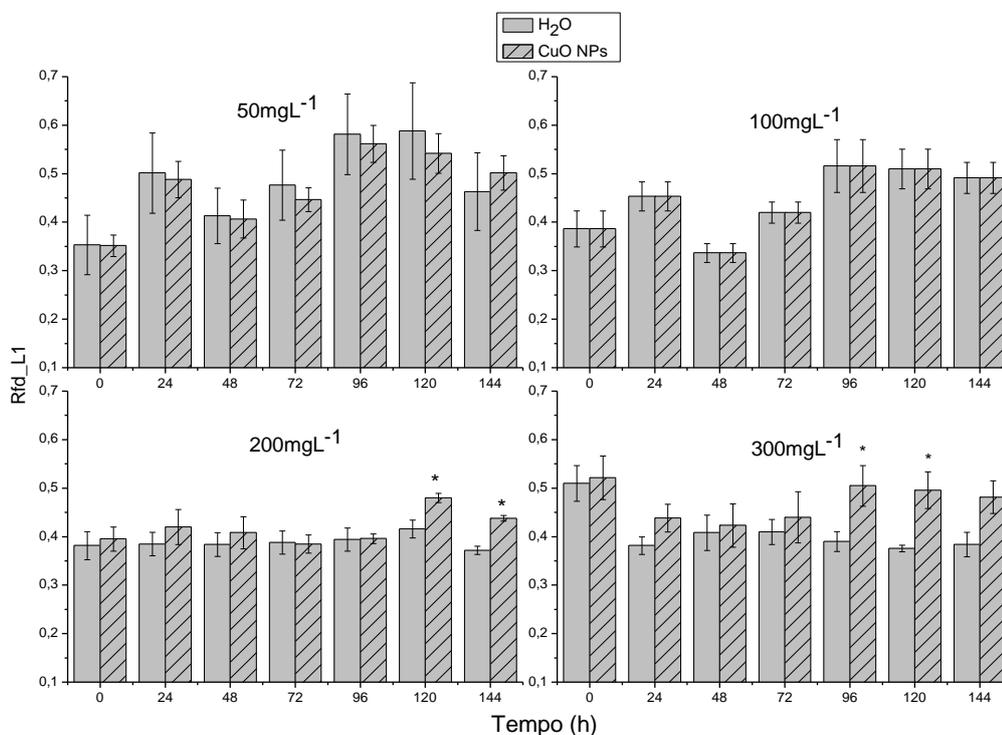
A figura 14 ilustra o comportamento do parâmetro Fv/Fm em função do tempo, em comparação relativa entre a folha antes da injeção (0 h) com a folha após injeção de H<sub>2</sub>O destilada e de CuO NPs 300 mg.L<sup>-1</sup>.

Figura 15: NPQ\_L1 média de 6 plantas de Fava em função do tempo antes e após serem submetidas a 50, 100, 200 e 300 mg.L<sup>-1</sup> de CuO NPs < 50 nm. \* Diferença significativa (teste t, p < 0.05, n = 6).



As análises do *quenching* não foto-químico (NPQ\_L1) mostram que as nanopartículas de óxido de cobre induzem mudanças nesse parâmetro somente para a concentração de 300 mg.L<sup>-1</sup>, provocando um aumento significativo em 144 h. Para as demais concentrações, os valores de NPQ\_L1 oscilam em função do tempo, mas não apresentam diferenças significativas em relação às amostras controle, como pode ser observado na Figura 15.

Figura 16: Rfd\_L1 média de 6 plantas de Fava em função do tempo antes e após serem submetidas a 50, 100, 200 e 300 mg.L<sup>-1</sup> de CuO NPs < 50 nm. \* Diferença significativa (teste t, p < 0.05, n = 6).



O coeficiente de diminuição relativa da fluorescência (Rfd\_L1), mostrado na Figura 16, apresenta resultados similares aos do NPQ\_L1, ou seja, as CuO NPs também induzem aumento no Rfd\_L1. Entretanto, as mudanças em seus valores já são significativas a partir da concentração de 200 mg.L<sup>-1</sup>, indicando que o Rfd\_L1 se mostrou um parâmetro mais sensível às mudanças provocadas pelas CuO NPs nas plantas de Fava. Após 96 h, o Rfd\_L1 das folhas submetidas a 300 mg.L<sup>-1</sup> de CuO NPs teve aumento significativo.

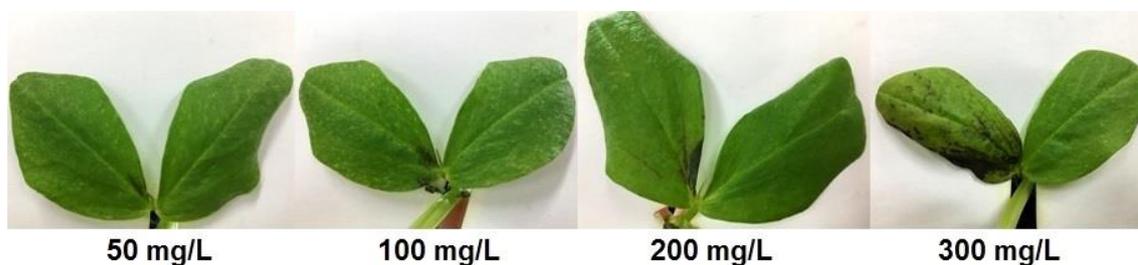
O parâmetro Rfd\_L1 é ligado ao funcionamento da atividade fotossintética, estando também diretamente ligado à taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> pelas folhas, entretanto, apenas nos casos em que os estômatos permanecem abertos. Assim, é possível observar a similaridade entre os gráficos de 300 mg.L<sup>-1</sup> da figura 10 e 16, com queda na condutância estomática e elevação do parâmetro Rfd\_L1.

## 4.2 ANÁLISES DA *VICIA FABA* EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO < 50 NM (ZnO NPs)

### 4.2.1 Imagem Visual

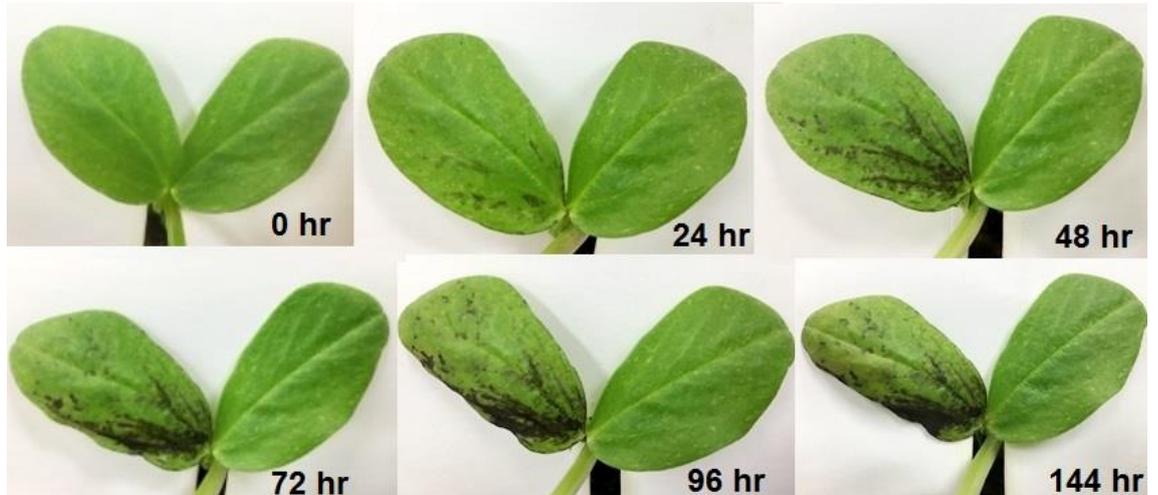
A análise da imagem visual de folhas da planta de Fava, tem por objetivo visualizar alterações provocadas pelos óxidos metálicos utilizados, comparando a folha controle (com injeção de água destilada) e a folha com concentração de NPs.

Figura 17: Planta Fava após 144 h da injeção de água destilada na folha direita e ZnO NPs < 50 nm na folha esquerda, nas concentrações de 50, 100, 200 e 300 mg.L<sup>-1</sup>.



A figura 17 ilustra as folhas de Fava 144 h após da injeção, nas concentrações de ZnO NPs de 50, 100, 200 e 300 mg.L<sup>-1</sup>. Visualiza-se o efeito danoso na folha com presença de nanopartículas (folha esquerda), onde houve necrose na parte em que ZnO NPs se aglomeram. A folha controle (direita) não sofreu interferência visível. O efeito é maior conforme o aumento da concentração, em 300 mg.L<sup>-1</sup> a necrose ocupa parte significativa da folha.

Figura 18: Evolução em h do efeito de  $300 \text{ mgL}^{-1}$  de ZnO NPs < 50 nm na folha esquerda, e na folha direita (controle), com injeção de água destilada.

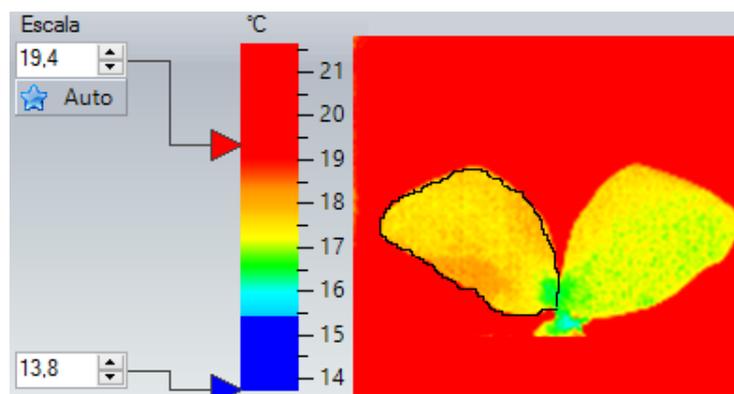


A figura 18 apresenta a planta antes da injeção (0 h) e a evolução do efeito gerado pelas ZnO NPs até 144 h. Os efeitos visuais ocasionados pelas ZnO NPs começam a surgir após 24 h da injeção das nanopartículas. Observa-se que a necrose aumenta com o tempo, sendo sucinta em 24 h e tomando proporções maiores em função do tempo. É verificado também que a folha vai ficando com cor amarelada, efeito este que pode estar relacionado com a diminuição da clorofila ativada na planta.

#### 4.2.2 Imagem Térmica

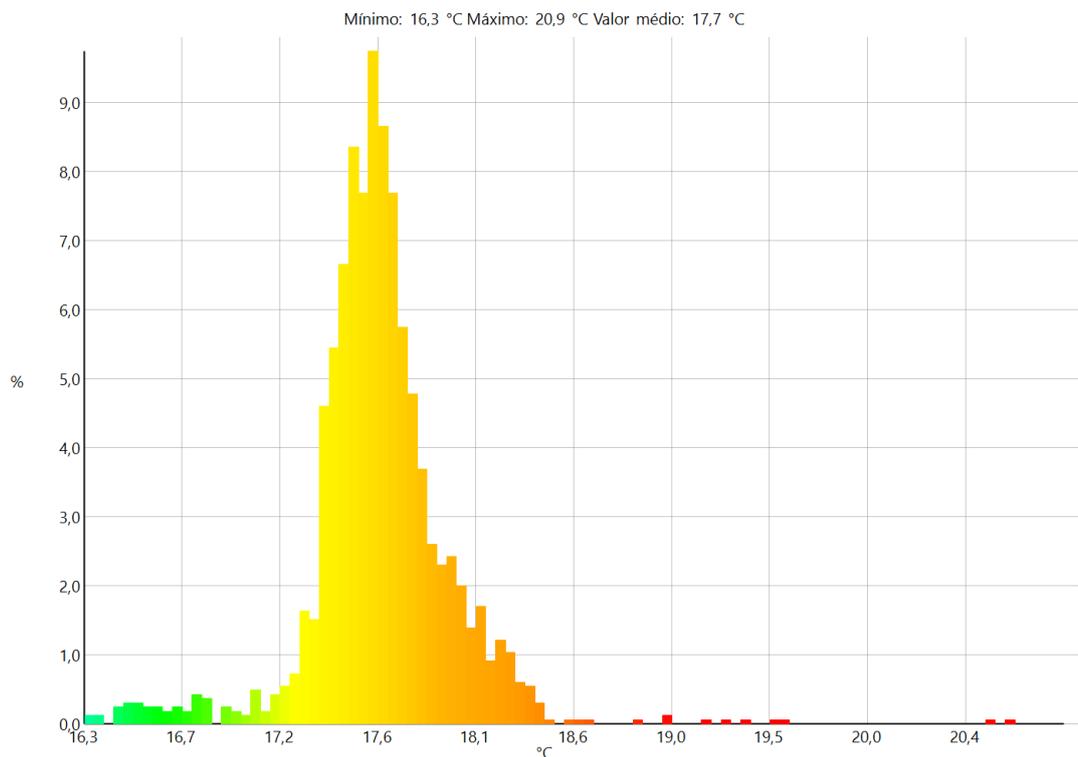
A imagem térmica, realizada pela câmera termográfica Texto 880, tem por objetivo, comparar a temperatura da folha controle e da folha com NPs. Realizando um monitoramento a cada 24 h, pelo período de 144 h após a injeção.

Figura 19: Folha de Fava com injeção de água destilada na parte direita e na esquerda com injeção de ZnO NPs<50 nm, na concentração de  $300 \text{ mg.L}^{-1}$ , no tempo de 144 h.



A figura 19, mostra uma planta de Fava com injeção de ZnO NPs 300 mg.L<sup>-1</sup> na folha esquerda, e água destilada na folha direita (controle). Na figura 20, apresenta-se o histograma da imagem térmica da folha com NPs (esquerda). Com a junção dessas imagens conseguimos observar a elevação da temperatura na área afetada pelas nanopartículas.

Figura 20: Histograma da imagem térmica de uma folha que recebeu a injeção de 300 mg.L<sup>-1</sup> de ZnO NPs.

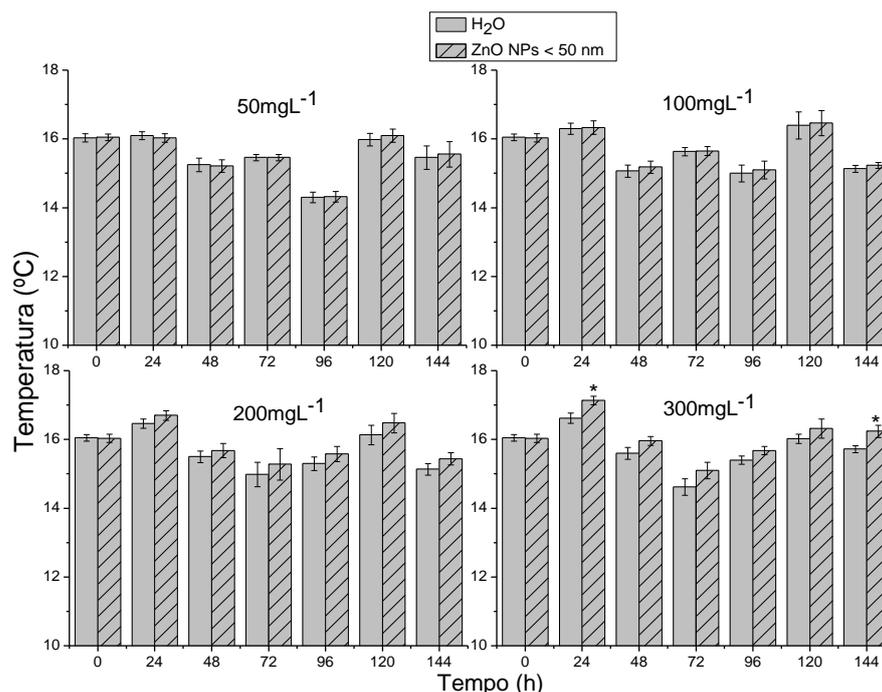


Próximo ao caule na nervura central da folha, a temperatura apresentou valores mais baixos, posteriormente onde as nanopartículas se alastram a temperatura aumentou, tratando da média da temperatura da área foliar, os valores são superiores na folha com ZnO NPs.

Ao considerar a temperatura média de 6 plantas analisadas, para cada concentração, o comportamento médio da temperatura das folhas que receberam as ZnO NPs, não é significativamente diferente (ao grau de confiança de 95% do teste t) em relação à temperatura média das folhas controle, pois as ZnO NPs provocaram um aumento pontual na temperatura das folhas. Porém é possível observar o aumento da temperatura na folha

esquerda, em 200 e 300 mg.L<sup>-1</sup>, após a injeção das NPs. Houve apenas diferença significativa (teste t, p < 0.05) entre as duas folhas na concentração de 300 mg.L<sup>-1</sup>, em 24 e 144 h após a injeção.

Figura 21. Temperatura média de 6 plantas de Fava em função do tempo antes e após serem submetidas a 50, 100, 200 e 300 mg.L<sup>-1</sup> de ZnO NPs < 50 nm. \* Diferença significativa (teste t, p < 0.05, n = 6).



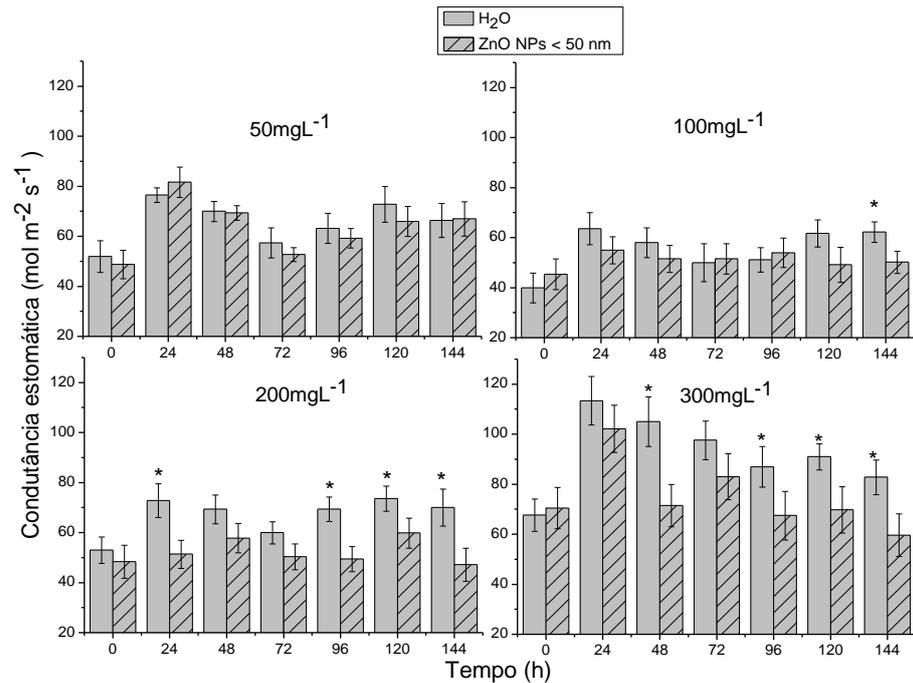
A Figura 21 apresenta a temperatura média de 6 plantas, nas concentrações de 50, 100, 200 e 300 mg.L<sup>-1</sup> de ZnO NPs, observa-se que a temperatura foliar aumentou de NPs. Nas concentrações de 50 e 100 mg.L<sup>-1</sup> a diferença entre as duas folhas não se mostrou visível, já a partir de 200 mg.L<sup>-1</sup> podemos observar iniciando em 24 h o aumento da temperatura. Na concentração de 300 mg.L<sup>-1</sup> a diferença significativa foi em 24 e 144 h após a injeção.

#### 4.2.3 Condutância estomática

As medidas de condutância estomática foram realizadas no mesmo horário todos os dias para evitar a interferência devido ao ciclo da fotossíntese. A medição de condutância estomática é um importante indicador da condição

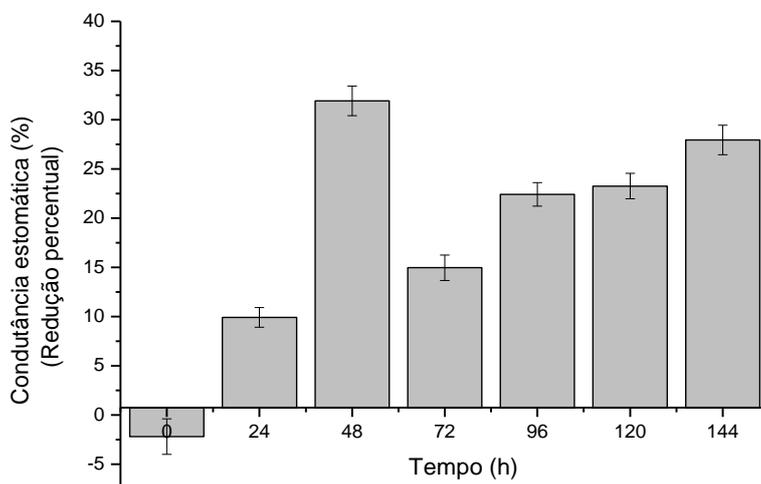
de estresse, e fornece informações valiosas sobre o crescimento e adaptação das plantas às variáveis externas.

Figura 22: Condutância estomática média de 6 plantas de Fava em função do tempo antes e após serem submetidas a 50, 100, 200 e 300 mg.L<sup>-1</sup> de ZnO NPs < 50 nm. \* Diferença significativa (teste t, p < 0.05, n = 6).



Na Figura 22 estão apresentados os resultados encontrados para média de seis plantas de cada concentração. As medidas foram realizadas no mesmo horário todos os dias para evitar interferência devido ao ciclo da fotossíntese. Os resultados apresentados demonstram uma diminuição nos valores de condutância estomática em função do aumento da concentração de ZnO NPs. Na concentração de 100 mg.L<sup>-1</sup>, os efeitos danosos das NPs na folha são significativos (teste t, p < 0.05) em 144 h. Em 200 e 300 mg.L<sup>-1</sup> após 24 h, apresentou diferença significativa em 4 dos 6 dias de análise, mostrando que a folha diminui o fluxo do vapor de água que os estômatos liberam para o ambiente externo.

Figura 23: Variação percentual da condutância estomática em relação à diferença entre a folha controle e a folha com 300 mg.L<sup>-1</sup> de ZnO NPs , antes da injeção de NPs e sua evolução até 144 h.

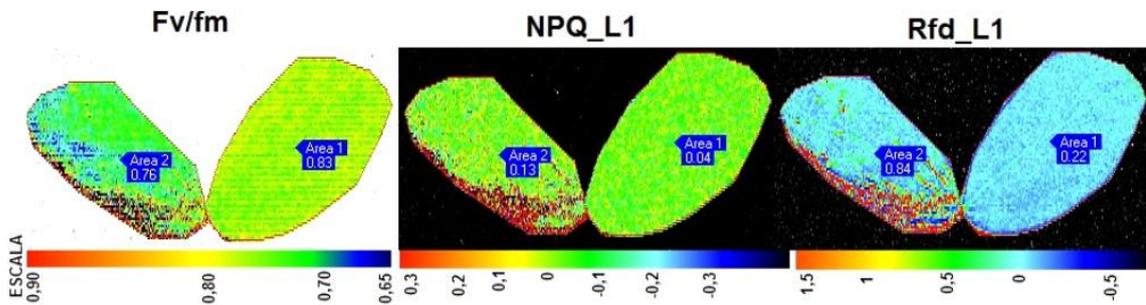


A figura 23 mostra a variação percentual da condutância estomática em relação à diferença entre a folha controle e a folha com 300 mg.L<sup>-1</sup> de ZnO NPs. A diferença mais elevada foi obtida após 48 h da injeção de ZnO NPs, com cerca de 33% de redução na condutância estomática entre as duas folhas.

#### 4.2.4 Fluorescência da clorofila *a*

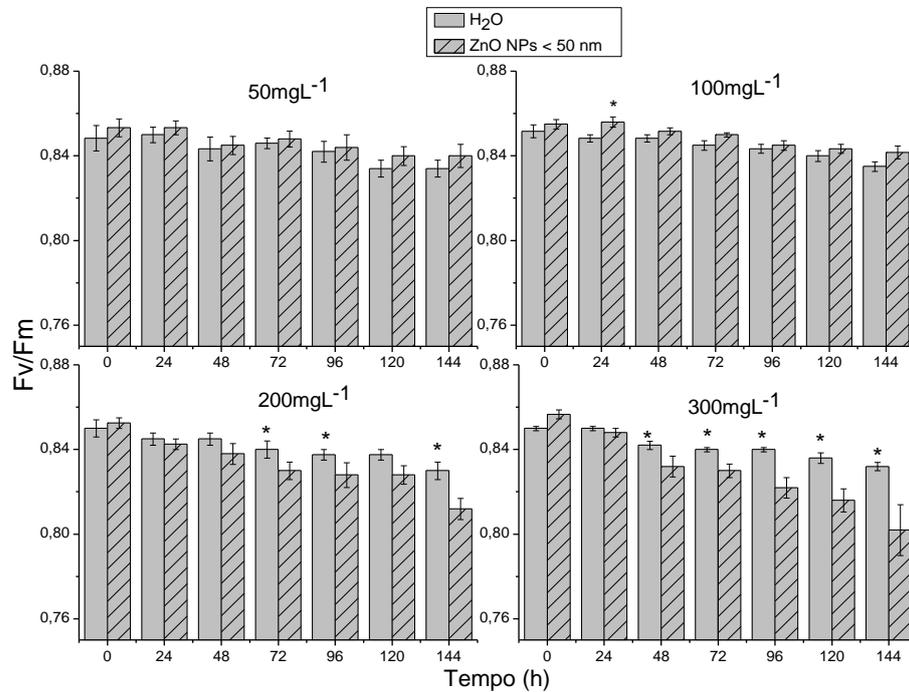
A análise de fluorescência da clorofila *a*, foi realizado através do monitoramento da comparação entre folha esquerda (com presença de NPs) e folha direita (controle), para os parâmetros Fv/Fm (estimativa da eficiência quântica máxima da atividade fotoquímica do PSII), NPQ\_L1 (indicativo do excesso de dissipação de energia radiante na forma de calor no PSII) e Rfd\_L1 (taxa de decréscimo da clorofila ou índice de vitalidade). O estudo se obteve através do comportamento médio de seis plantas em função das concentrações 50, 100, 200 e 300 mg.L<sup>-1</sup>, de ZnO NPs < 50 nm.

Figura 24. Imagens de Fv/Fm, NPQ\_L1 e Rfd\_L1, 144 h após a injeção das NPs, obtidas por meio da imagem de fluorescência da clorofila.



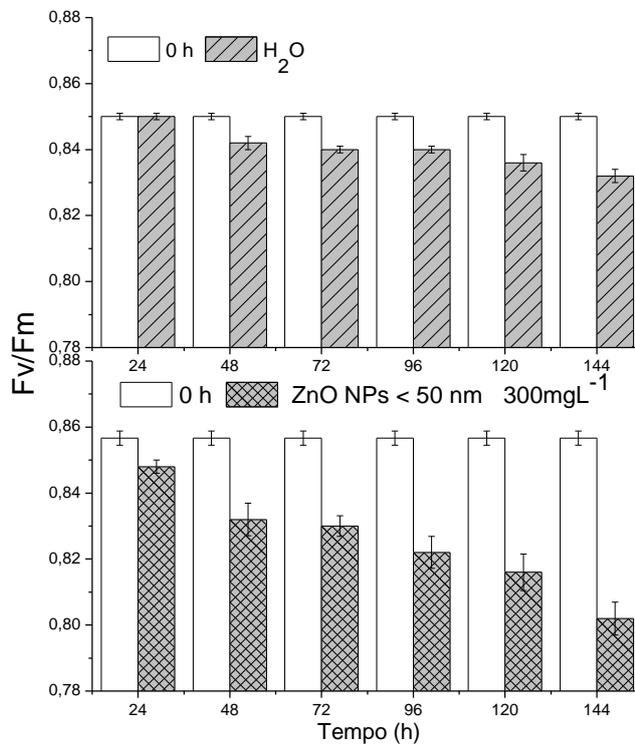
A Figura 24, apresenta os resultados obtidos nos testes de imagem de fluorescência cinética da parte superior das folhas de uma planta de Fava, submetida à injeção de  $300 \text{ mg.L}^{-1}$  de ZnO NPs em solução aquosa na folha esquerda, e água destilada na folha direita, após 144 h. Analisando as imagens, é possível visualizar as lesões provocadas pelas NPs, assim como as alterações induzidas nos parâmetros estudados. Após 144 h, comparando a folha esquerda com a direita, o valor de Fv/Fm foi reduzido e os valores de NPQ e Rfd foram aumentados.

Figura 25: Fv/Fm da média de 6 plantas de Fava em função do tempo antes e após serem submetidas a 50, 100, 200 e 300 mg.L<sup>-1</sup> de ZnO NPs < 50 nm. \* Diferença significativa (teste t, p < 0.05, n = 6).



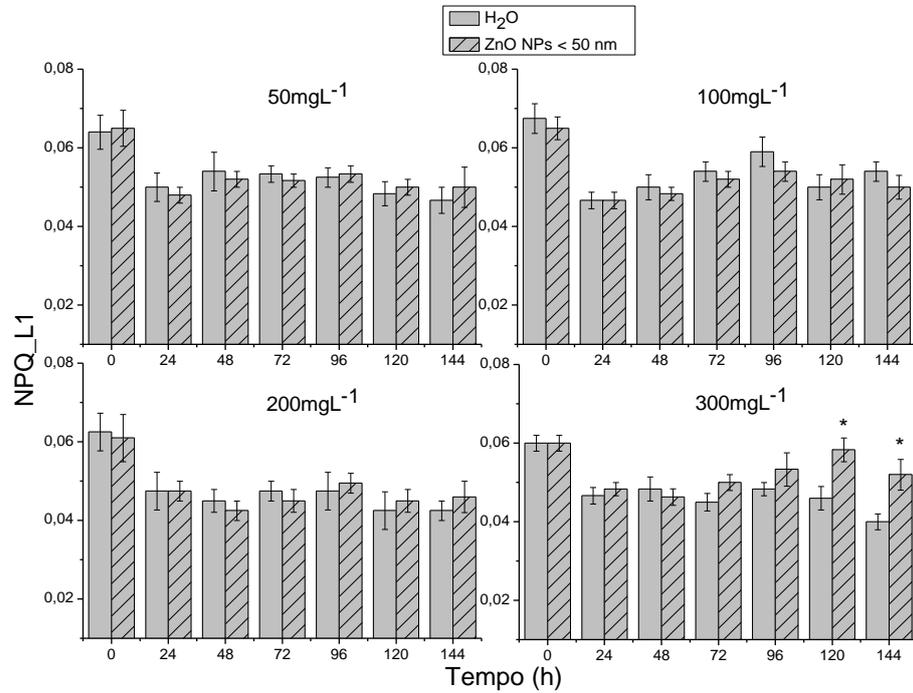
Na Figura 25 é apresentado os valores médios de Fv/Fm, onde pode-se notar a redução do rendimento do aparato fotossintético com valores significativos (teste t, p < 0.05), nas concentrações de 200 e 300 mg.L<sup>-1</sup> de ZnO NPs. Nas concentrações de 50 e 100 mg.L<sup>-1</sup> a folha esquerda, com presença de NPs apresentou pequeno aumento no parâmetro Fv/fm, sendo significativo em 24 h na concentração de 100 mg.L<sup>-1</sup>.

Figura 26: Fv/Fm em função do tempo. Comparação relativa entre a folha antes da injeção (0 h) com a folha após injeção de H<sub>2</sub>O destilada e de ZnO NPs 300 mg.L<sup>-1</sup>.



A figura 26 ilustra a queda do parâmetro Fv/Fm em função do tempo, em comparação relativa entre a folha antes da injeção (0 h) com a folha após injeção de H<sub>2</sub>O destilada e de ZnO NPs 300 mg.L<sup>-1</sup>. É possível observar a queda em ambos gráficos, o gráfico com NPs apresentou queda em 24 h e obteve valores inferiores, mostrando que as nanopartículas afetaram a folha esquerda no aparato fotossintético, podendo ter ocorrido diminuição do processo de fotossíntese. Na folha controle houve também o decréscimo do parâmetro em função do tempo, apresentado após 48 h. Pode-se supor que houve um dano gerado pela presença de NPs.

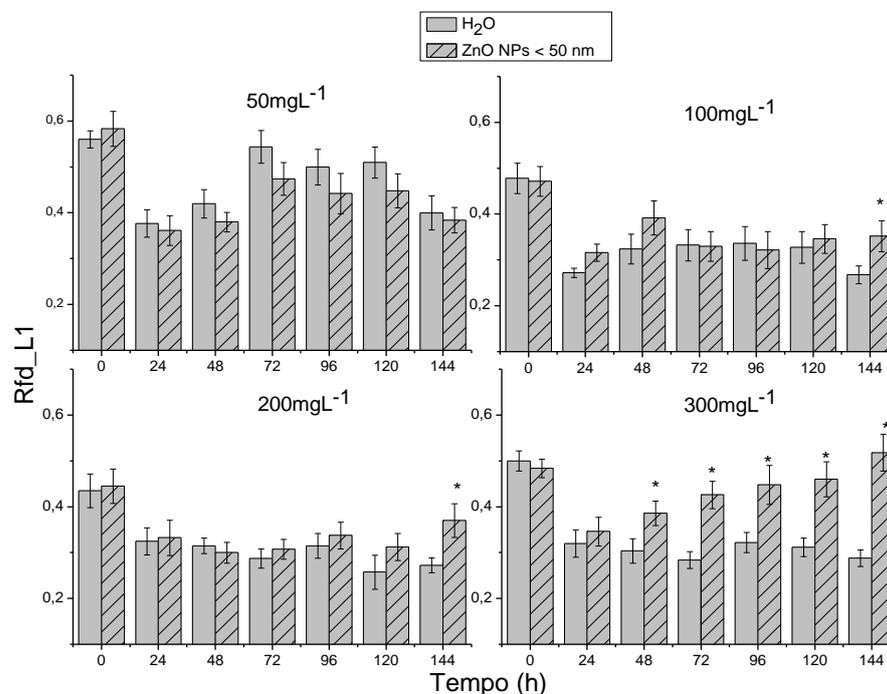
Figura 27: NPQ\_L1 da média de 6 plantas de Fava em função do tempo antes e após serem submetidas a 50, 100, 200 e 300 mg.L<sup>-1</sup> de ZnO NPs < 50 nm. \* Diferença significativa (teste t, p < 0.05, n = 6).



Na Figura 27, o parâmetro *quenching* não-fotoquímico (NPQ), apresentou elevação na folha com injeção de NPs, visíveis nas concentrações de 200 e 300 mg.L<sup>-1</sup>. Na concentração de 300 mg.L<sup>-1</sup> após 120 h, obteve diferença significativa (teste t, p < 0.05).

Para as demais concentrações, os valores de NPQ\_L1 oscilam no tempo, mas não apresentam diferenças significativas em relação às amostras controle.

Figura 28: Rfd\_L1 da média de 6 plantas de Fava em função do tempo antes e após serem submetidas a 50, 100, 200 e 300 mg.L<sup>-1</sup> de ZnO NPs < 50 nm. \* Diferença significativa (teste t, p < 0.05, n = 6).



O coeficiente de diminuição relativa da fluorescência (Rfd), apresentado na Figura 28, também foi aumentado em função da concentração de ZnO NPs. Para 100 e 200 mg.L<sup>-1</sup> de ZnO NPs, em 144 h houve efeito significativo (teste t, p < 0.05). Para 300 mg.L<sup>-1</sup> a partir de 48 h obteve diferença significativa, aumentando os efeitos conforme o tempo.

Rfd\_L1 se mostrou um parâmetro mais sensível que NPQ\_L1, pois com 100 mg.L<sup>-1</sup>, apresentou diferenças significativas às mudanças provocadas pela indução das ZnO NPs nas plantas de Fava.

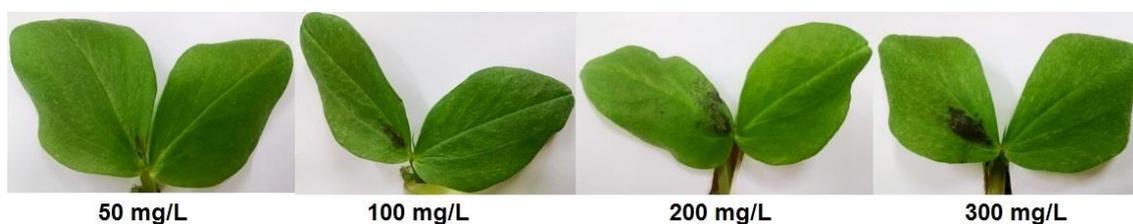
Por estar relacionado ao funcionamento da atividade fotossintética da planta e diretamente ligado à taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> pelas folhas, é possível analisar a similaridade na figura 28, onde os valores de condutância estomática se assemelham aos valores encontrados na figura 22, com diminuição relativa de fluorescência na planta.

## 4.3 ANÁLISES DA *VICIA FABA* EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO < 100 NM (ZNO NPS)

### 4.3.1 Imagem Visual

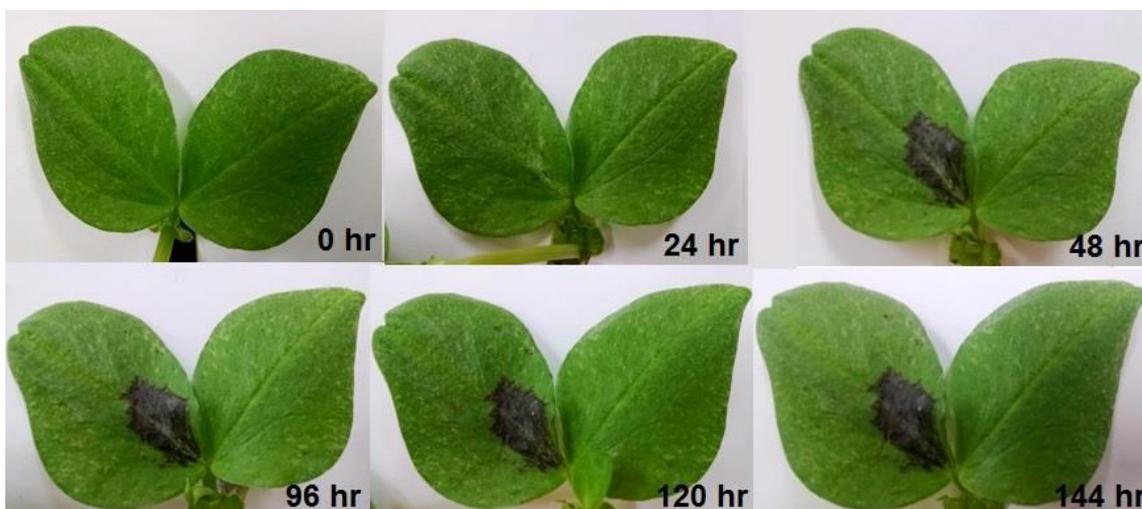
A análise da imagem visual de folhas da planta de Fava, tem por objetivo visualizar alterações provocadas pelos óxidos metálicos utilizados, comparando a folha controle (com injeção de água destilada) e a folha com concentração de NPs.

Figura 29: Folhas de Fava com injeção de água destilada na parte direita e na esquerda recebeu a injeção de ZnO NPs < 100 nm nas concentrações 50, 100, 200 e 300 mg.L<sup>-1</sup>, realizadas no tempo de 144 h.



A figura 29 ilustra as folhas de Fava, em todas as concentrações em que o experimento foi realizado, no tempo de 144 h após a injeção de nanopartículas de óxido de zinco < 100 nm. É possível visualizar o efeito aumentando conforme maior concentração, ocasionando necrose na parte em que ZnO NPs se aglomeram, a folha a direita (controle) não sofreu interferência visível.

Figura 30: A folha direita (controle), com injeção de água destilada e a folha esquerda com injeção de  $300 \text{ mg.L}^{-1}$  de ZnO NPs < 100 nm em solução aquosa, no período antes da injeção (0 h) até 144 h após injeção.



A figura 30 demonstra o período anterior ao contato da planta com as nanopartículas até 144 horas após a injeção, na concentração de  $300 \text{ mg.L}^{-1}$ . Os efeitos gerados pela injeção de ZnO NPs < 100 nm, começam a ser visualizados com 48 h. Sendo que visivelmente este efeito se mantém até 144 h, o que difere das nanopartículas de CuO e ZnO < 50 nm, que em 24 h surgem os efeitos, e esses vão aumentando em função do tempo.

#### 4.3.2 Imagem Térmica

A imagem térmica, realizada pela câmera termográfica Texto 880, tem por objetivo, comparar a temperatura da folha controle e da folha com NPs. Realizando um monitoramento a cada 24 h, pelo período de 144 h após a injeção.

Figura 31: Folha de Fava com injeção de água destilada na parte direita e na esquerda com injeção de ZnO NPs < 100 nm, na concentração de 300 mg.L<sup>-1</sup>, no tempo de 144 h.

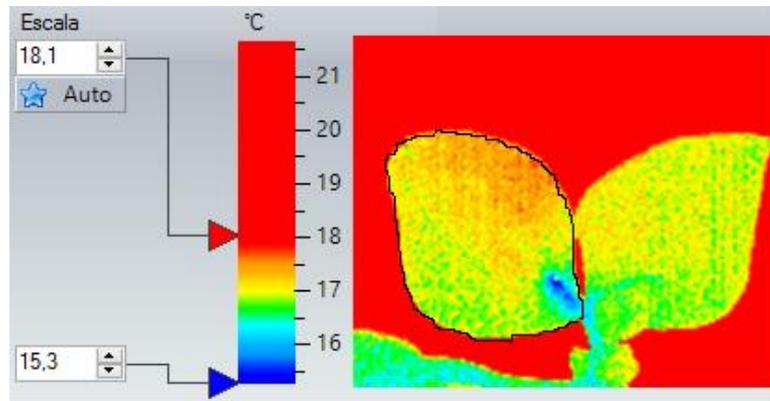
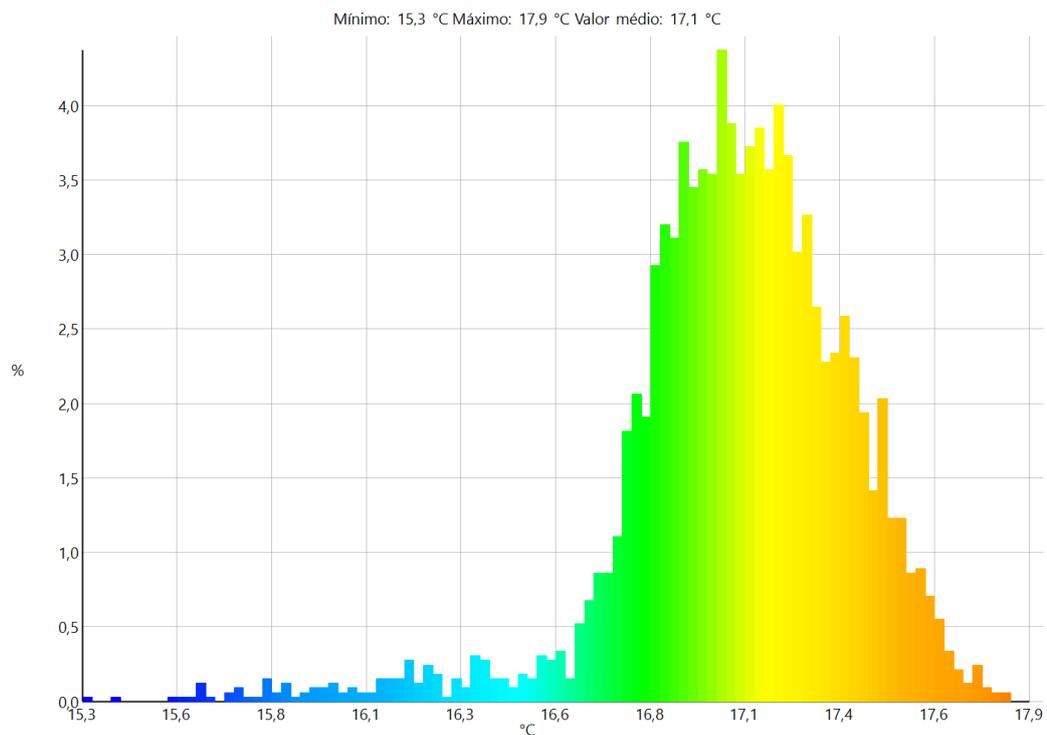
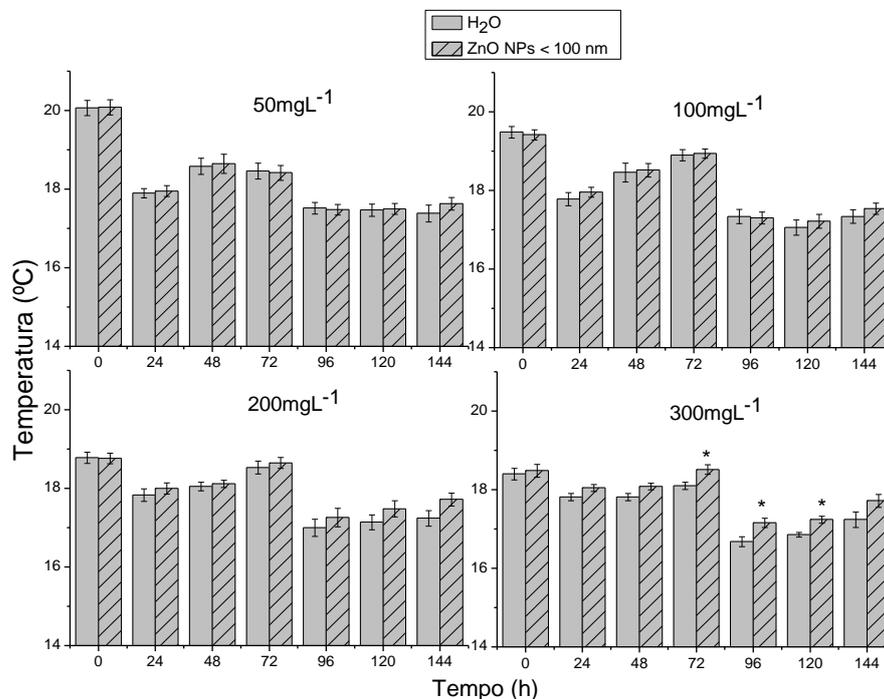


Figura 32: Histograma da imagem térmica de uma folha que recebeu a injeção de 300 mg.L<sup>-1</sup> de ZnO NPs < 100 nm.



A figura 31, mostra uma planta de Fava com injeção de 300 mg.L<sup>-1</sup> na folha esquerda, e na figura 32 está o histograma da imagem térmica desta folha. Observa-se que próximo à nervura central da folha esquerda, no local onde foram injetadas as nanopartículas de óxido de zinco, a temperatura está mais baixa, enquanto na parte superior da folha a temperatura se eleva.

Figura 33. Temperatura média das plantas de Fava em função do tempo antes e após serem submetidas a 50, 100, 200 e 300 mg.L<sup>-1</sup> de ZnO NPs < 100 nm. \* Diferença significativa (teste t, p < 0.05, n = 6).

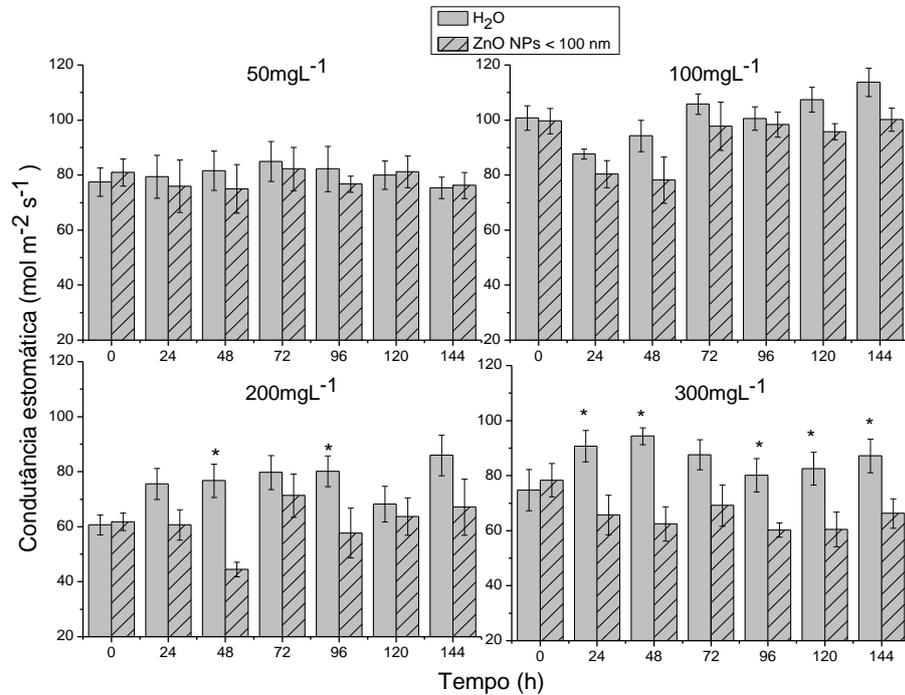


Os gráficos, na figura 33, ilustram a temperatura média das folhas de 6 plantas analisadas, submetidas ao tratamento de quatro concentrações (50, 100, 200 e 300 mg.L<sup>-1</sup>). O comportamento médio da temperatura das folhas que receberam as ZnO NPs < 100 nm não se mostraram significativamente diferentes (ao grau de confiança de 95% do teste t) em relação à temperatura média das folhas controle para as concentrações 50, 100 e 200 mg.L<sup>-1</sup>. Porém é possível observar o aumento da temperatura em todas as concentrações, na folha com presença de NPs. Houve apenas diferença significativa (teste t, p < 0.05) na concentração de 300 mg.L<sup>-1</sup>, em 72, 96 e 120 h.

#### 4.3.3 Condutância estomática

As medidas de condutância estomática foram realizadas no mesmo horário todos os dias para evitar a interferência devido ao ciclo da fotossíntese. A medição de condutância estomática é um importante indicador da condição de estresse, e fornece informações valiosas sobre o crescimento e adaptação das plantas às variáveis externas.

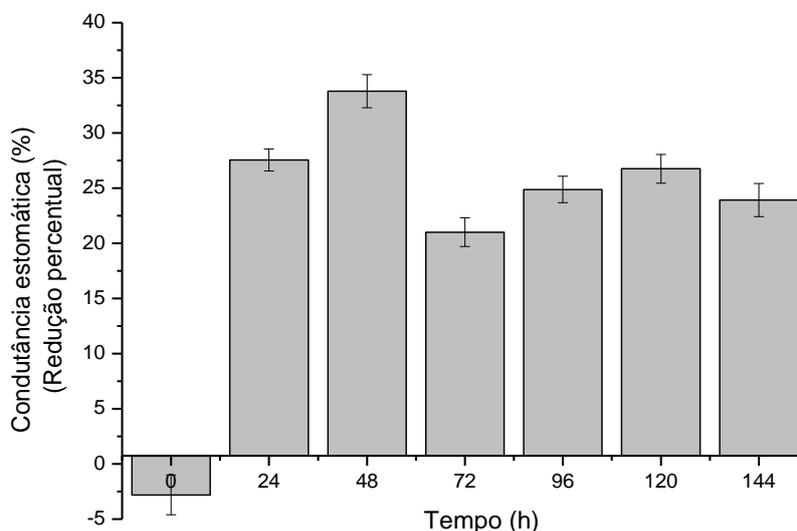
Figura 34: Condutância estomática da média de 6 plantas de Fava em função do tempo antes e após serem submetidas a 50, 100, 200 e 300 mg.L<sup>-1</sup> de ZnO NPs < 100 nm. \* Diferença significativa (teste t, p < 0.05, n = 6).



Na Figura 34 estão os resultados encontrados para média de seis plantas de cada concentração (50, 100, 200 e 300 mg.L<sup>-1</sup>). As medidas foram realizadas no mesmo horário todos os dias para evitar interferência devido ao ciclo da fotossíntese.

Observa-se a redução da condutância estomática na folha com ZnO NPs < 100 nm, a partir da concentração de 100 mg.L<sup>-1</sup>. Nas concentrações de 200 e 300 mg.L<sup>-1</sup> houve diferença significativa (teste t, p < 0.05).

Figura 35: Variação percentual da condutância estomática em relação à diferença entre a folha controle e a folha com 300 mg.L<sup>-1</sup> de ZnO NPs < 100 nm.

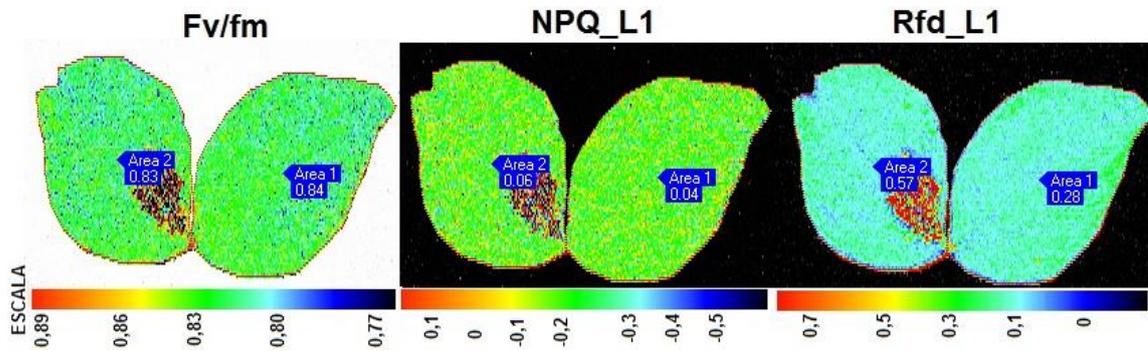


Na figura 35 apresenta-se a variação percentual da condutância estomática em relação à diferença entre a folha controle e a folha com 300 mg.L<sup>-1</sup> de ZnO NPs < 100 nm. A maior diferença observa-se após 48 h da injeção das ZnO NPs, cerca de 33% de redução na condutância estomática entre as duas folhas, se assemelhando à figura 23, que representa ZnO NPs < 50 nm.

#### 4.3.4 Fluorescência da clorofila *a*

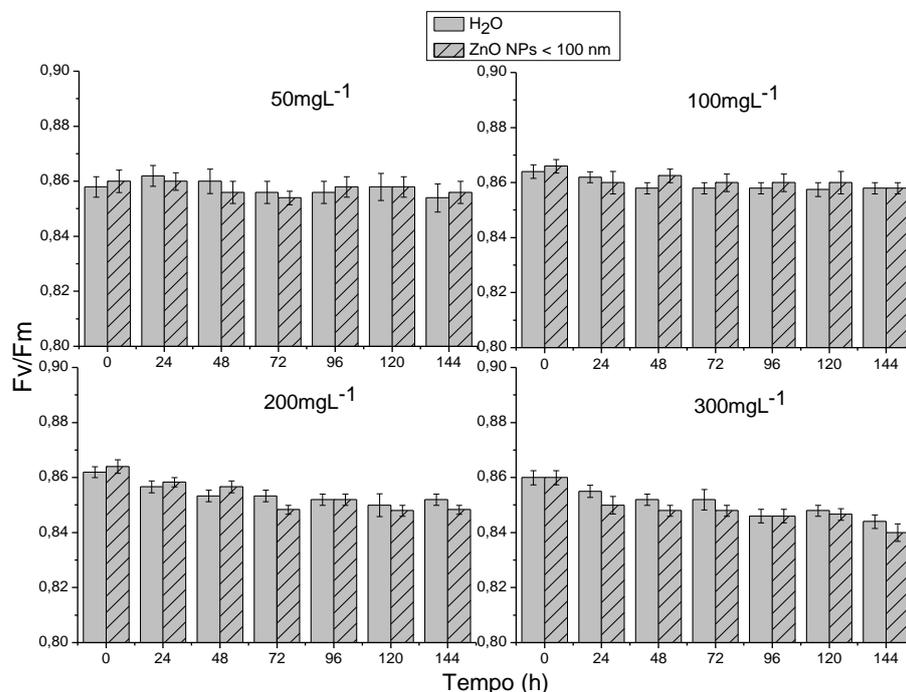
A análise de fluorescência da clorofila *a*, foi realizado através do monitoramento da comparação entre, folha esquerda (com presença de NPs) e da folha direita (controle), para os parâmetros Fv/Fm (estimativa da eficiência quântica máxima da atividade fotoquímica do PSII), NPQ\_L1 (indicativo do excesso de dissipação de energia radiante na forma de calor no PSII) e Rfd\_L1 (taxa de decréscimo da clorofila ou índice de vitalidade).

Figura 36. Imagens de Fv/Fm, NPQ\_L1 e Rfd\_L1, após 144 h da injeção de 300 mg.L<sup>-1</sup> de ZnO NPs < 100 nm , obtidas por meio da imagem de fluorescência da clorofila.



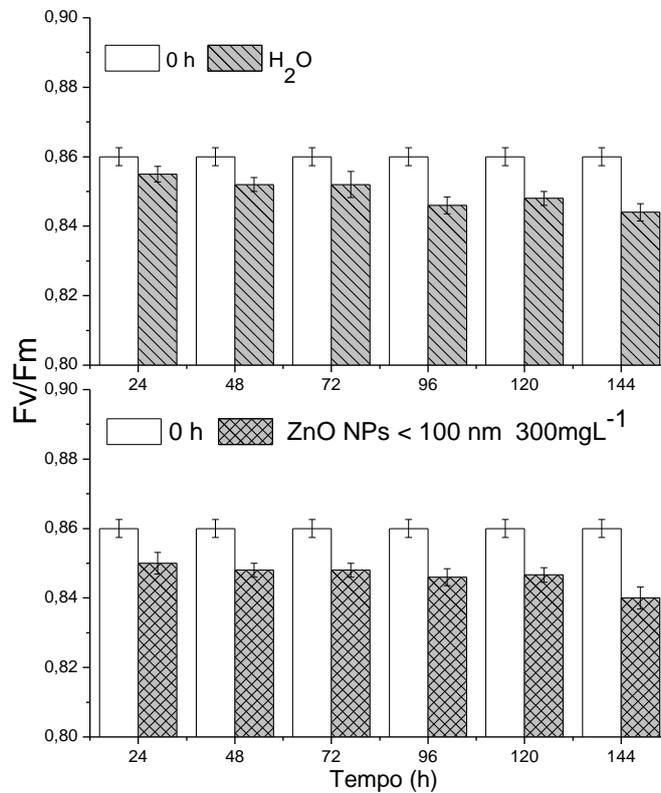
A Figura 36, apresenta os resultados obtidos nos testes de imagem de fluorescência cinética da parte superior das folhas de uma planta de Fava, após 144h da injeção de 300 mg.L<sup>-1</sup> de ZnO NPs < 100 nm em solução aquosa. Analisando as imagens é possível visualizar as lesões provocadas pelas ZnO NPs, assim como as alterações induzidas nos parâmetros estudados. Após 144 h, na folha esquerda, o Fv/Fm foi reduzido e os valores de NPQ e Rfd foram aumentados.

Figura 37: Fv/Fm da média de 6 plantas de Fava em função do tempo antes após serem submetidas a 50, 100, 200 e 300 mg.L<sup>-1</sup> de ZnO NPs < 100 nm. \* Diferença significativa (teste t, p < 0.05, n = 6).



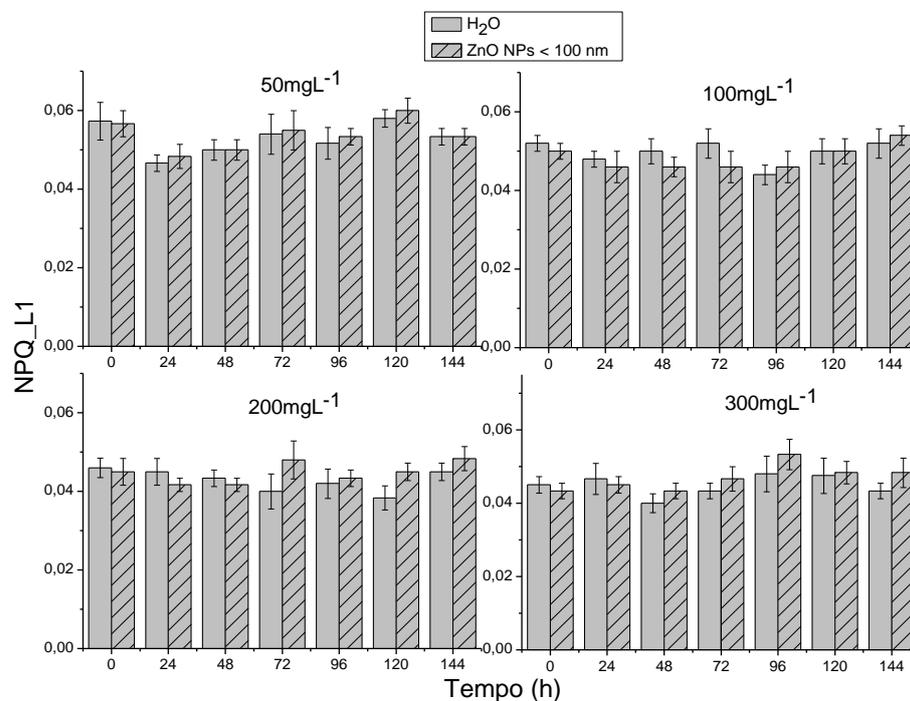
Na figura 37, o gráfico não apresenta diferença significativa (teste t, p < 0.05) em nenhuma concentração de NPs, porém o comportamento da planta se mostrou semelhante em uma média de 6 plantas. Nas concentrações 50 e 100 mg.L<sup>-1</sup> se manteve estável, mostrando que não há indução no parâmetro Fv/Fm. Nas concentrações de 200 e 300 mg.L<sup>-1</sup> houve uma redução em ambas as folhas, porém a folha com ZnO NPs obteve valores inferiores, mostrando que as NPs apresentam um potencial efeito danoso nas folhas injetadas.

Figura 38: Fv/Fm em função do tempo. Comparação relativa entre a folha antes da injeção (0 h) com a folha após injeção de H<sub>2</sub>O destilada e de ZnO NPs < 100 nm, 300 mg.L<sup>-1</sup>.



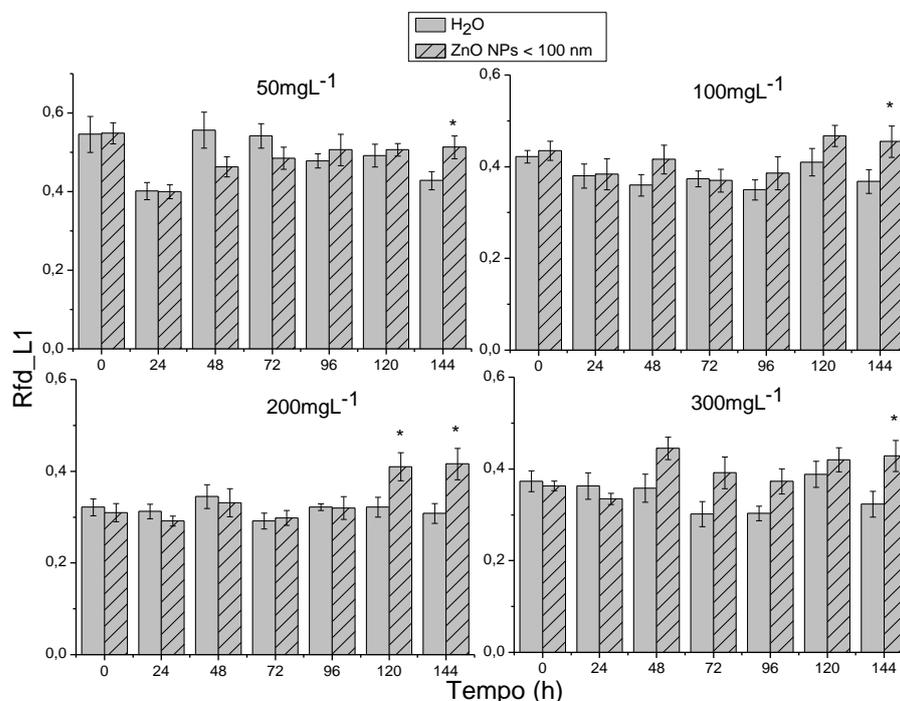
A figura 38 ilustra a redução do parâmetro Fv/Fm em função do tempo, em comparação relativa entre a folha antes da injeção (0 h) com a folha após injeção de H<sub>2</sub>O destilada e de ZnO NPs < 100 nm, 300 mg.L<sup>-1</sup>. É possível observar a queda em ambos gráficos, o segundo gráfico com a presença de NPs mostra uma redução mais elevada, principalmente nas primeiras horas, podendo ser uma interferência do óxido metálico na folha.

Figura 39: NPQ\_L1 da média de 6 plantas de Fava em função do tempo antes após serem submetidas a 50, 100, 200 e 300 mg.L<sup>-1</sup> de ZnO NPs < 100 nm. \* Diferença significativa (teste t,  $p < 0.05$ ,  $n = 6$ ).



Na Figura 39, o parâmetro *quenching* não-fotoquímico (NPQ), não apresentou diferença significativa (teste t,  $p < 0.05$ ), porém, apresentou aumento na folha com injeção de NPs em relação a folha controle, visíveis nas concentrações de 200 mg.L<sup>-1</sup> após 72 h, e 300 mg.L<sup>-1</sup> após 48 h.

Figura 40: Rfd\_L1 da média de 6 plantas de Fava em função do tempo antes após serem submetidas a 50, 100, 200 e 300 mg.L<sup>-1</sup> de ZnO NPs < 100 nm. \* Diferença significativa (teste t, p < 0.05, n = 6).



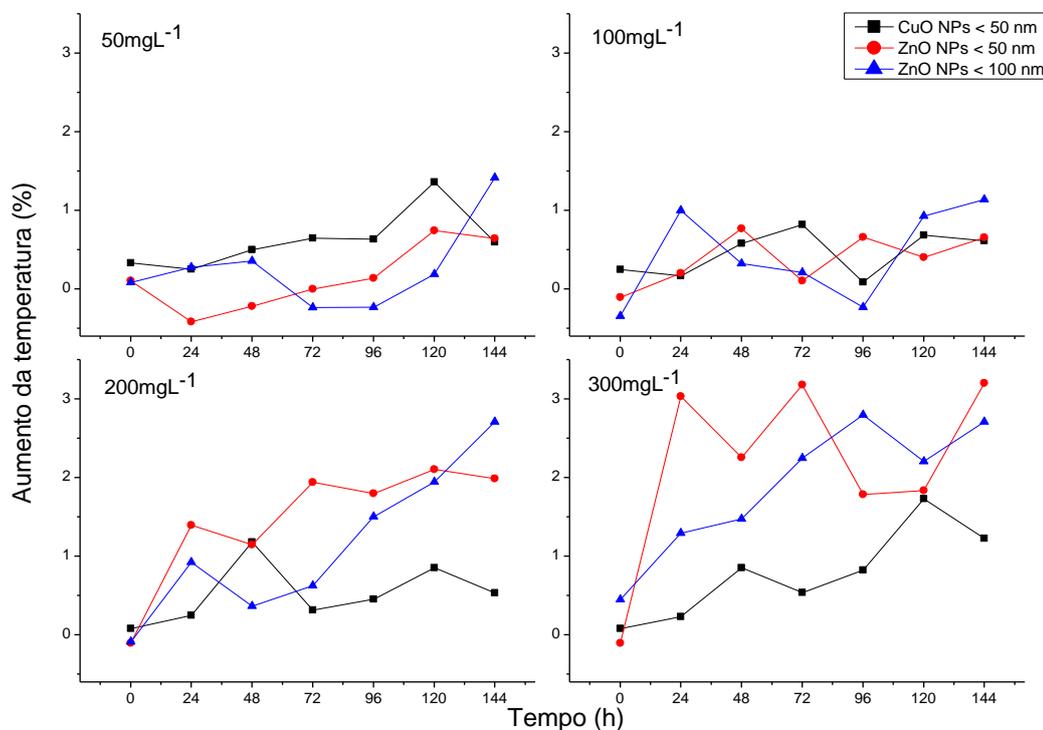
O coeficiente de diminuição relativa da fluorescência (Rfd), apresentado na Figura 40, obteve diferenças significativas (teste t, p < 0.05), e se mostrou o parâmetro mais sensível às mudanças provocadas por ZnO NPs < 100 nm nas plantas de Fava. Em 144 h após a injeção de NPs, em todas as concentrações (50, 100, 200 e 300 mg.L<sup>-1</sup>) houve diferença significativa (teste t, p < 0.05). Observa-se que quanto maior a concentração, maior diferença entre as folhas.

#### 4.4 ANÁLISES DA VICIA FABA EM FUNÇÃO DA COMPARAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDOS DE COBRE E ZINCO.

Para um estudo comparativo entre as nanopartículas metálicas de óxido de cobre (<50 nm), e óxidos de zinco (<50 e 100 nm), realizou-se a diferença entre a folha controle e a folha com injeção de nanopartículas. A diferença condiz no aumento ou redução percentual dos parâmetros utilizados para o monitoramento das alterações fisiológicas na planta Fava induzidos por NPs.

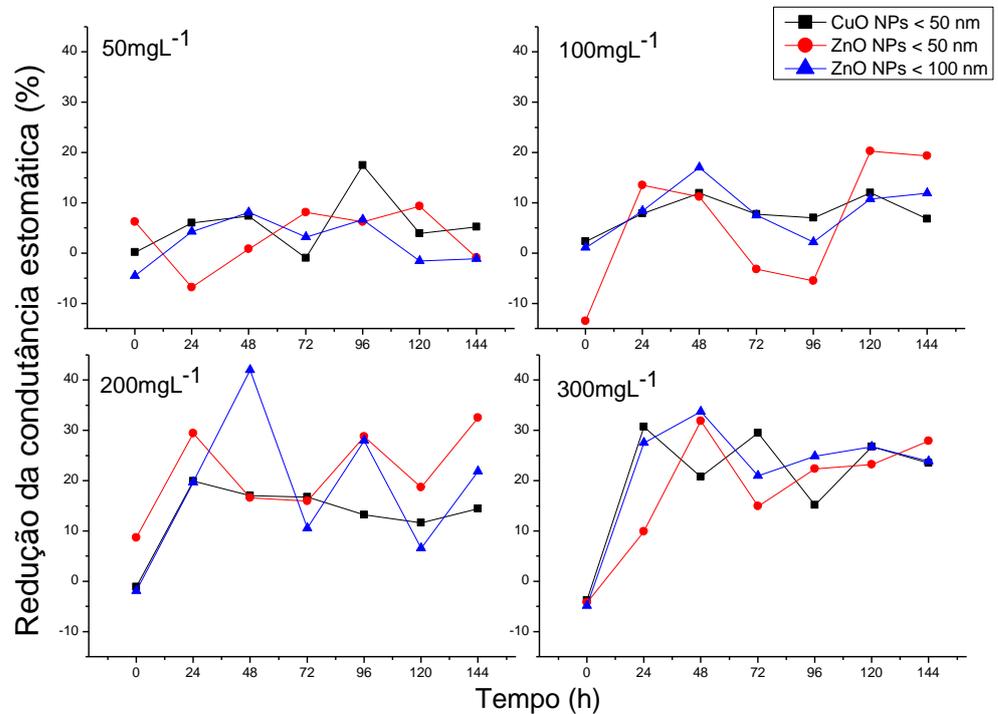
Os gráficos foram elaborados para as quatro concentrações que foram realizadas em experimentação, 50, 100, 200 e 300 mg.L<sup>-1</sup> de NPs de óxidos de Cu < 50 nm, Zn < 50 nm e Zn < 100 nm. A discussão comparativa objetiva-se em analisar a diferença em óxidos metálicos diferentes de tamanho igual, de 50 nm (Cu e Zn), e óxidos metálicos iguais de tamanhos diferentes (Zn < 100 e Zn < 50 nm).

Figura 41: Aumento percentual da temperatura das folhas com CuO NPs < 50 nm e ZnO NPs (<50 e 100 nm) em relação às folhas controles, nas concentrações 50, 100, 200 e 300 mg.L<sup>-1</sup>.



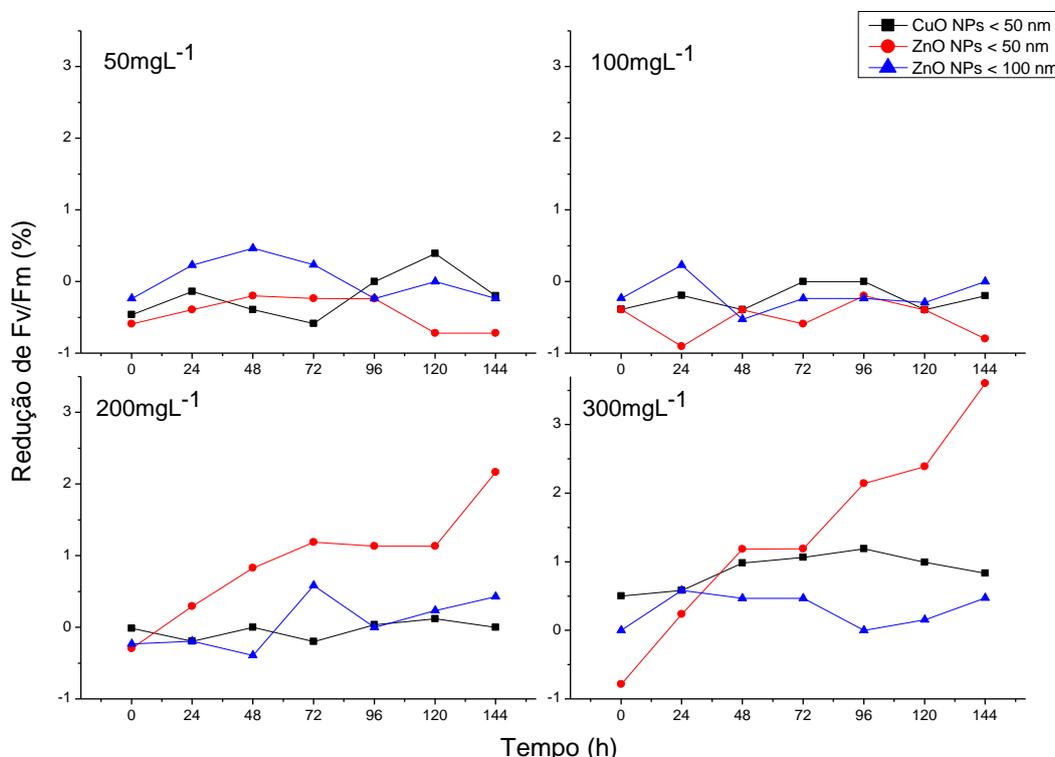
A figura 41 representa a diferença de temperatura entre a folha controle e com NPs nas concentrações 50, 100, 200 e 300 mg.L<sup>-1</sup>. Observa-se que houve aumento da temperatura em todas as concentrações e materiais utilizados. Em 50 e 100 mg.L<sup>-1</sup> o comportamento foi semelhante nos três óxidos metálicos. Em 200 e 300 mg.L<sup>-1</sup> a temperatura das folhas com presença de ZnO NPs teve aumento superior as folhas com CuO NPs. Outra observação possível nas maiores concentrações, entre os compostos de Zn < 50 e < 100 nm, é que o de menor dimensão (50 nm), teve a priori (de 24 a 72 h) um aumento superior, posteriormente encontrando valores semelhantes aos de 100 nm.

Figura 42: Redução percentual da condutância estomática das folhas com CuO NPs < 50 nm e ZnO NPs (<50 e 100 nm) em relação às folhas controles, nas concentrações 50, 100, 200 e 300 mg.L<sup>-1</sup>.



O parâmetro condutância estomática apresentado na figura 42, revela que a partir de 100 mg.L<sup>-1</sup> de ZnO NPs e CuO NPs, a redução percentual após a injeção das nanopartículas na folha de Fava. Em 200 e 300 mg.L<sup>-1</sup> essa redução é mais acentuada, sendo sua diferença mais elevada entre 24 e 48 h. Os três nanomateriais analisados obtiveram comportamento semelhante, apresentando redução da condutância estomática nas folhas com presença de NPs.

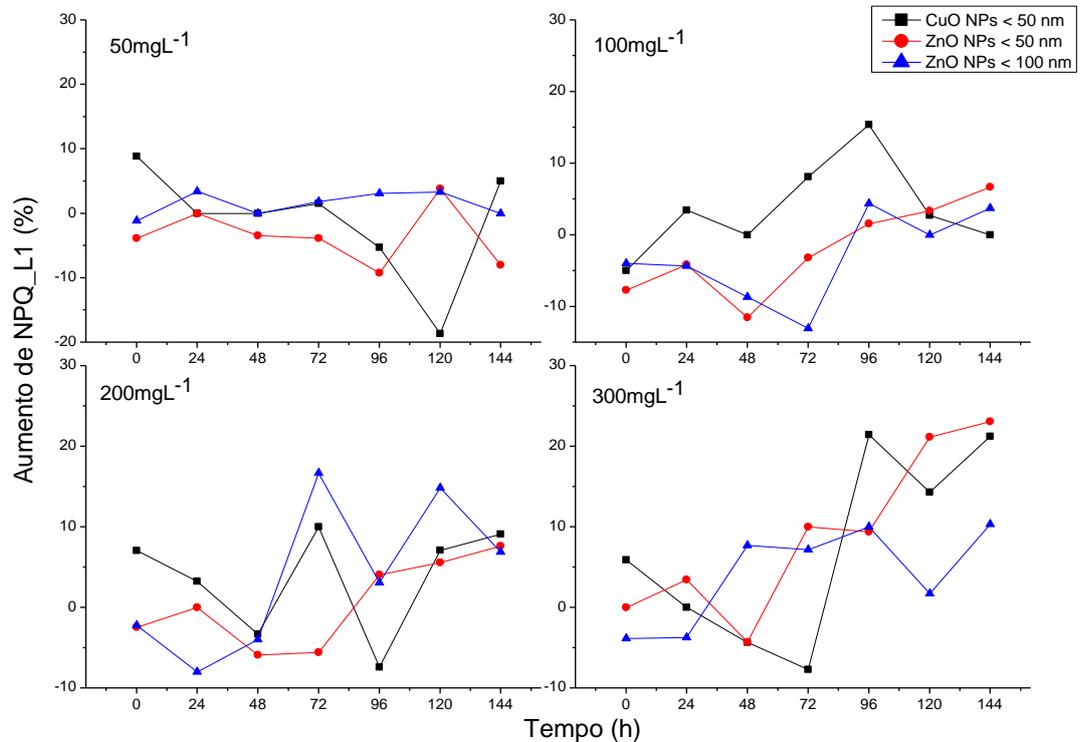
Figura 43: Redução percentual de Fv/fm, das folhas com CuO NPs < 50 nm e ZnO NPs (<50 e 100 nm) em relação às folhas controles, nas concentrações 50, 100, 200 e 300 mg.L<sup>-1</sup>.



O parâmetro Fv/fm foi analisado a redução percentual entre a folha controle e com injeção de nanopartículas. Os gráficos apontam que não houve grande diferença entre as folhas nas concentrações de 50 e 100 mg.L<sup>-1</sup>. Nas concentrações de 200 e 300 mg.L<sup>-1</sup> a nanopartículas metálica que teve maior diferença foi o óxido de zinco < 50 nm, o que caracteriza um estado de fotoinibição crônica segundo Alves et al. (2002).

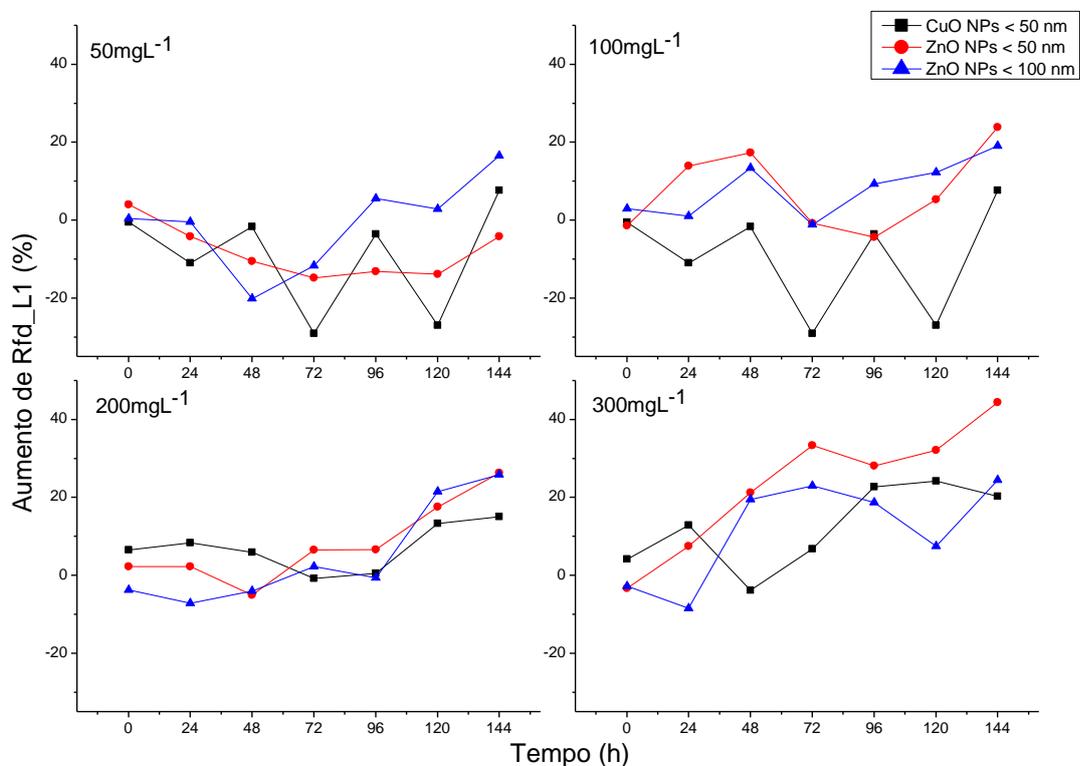
Reiterando os resultados deste trabalho, Cambrollé et al. (2012) encontraram reduções na razão Fv/Fm em plantas cultivadas em solução nutritiva com alto teor de Zn. Na concentração de 300 mg.L<sup>-1</sup>, segue o óxido de cobre com segunda maior redução, mostrando que nanopartículas de menores dimensões obtiveram valores maiores na redução da eficiência máxima do PSII. Comparando o óxido de zinco de 100 e 50 nm, o menor nanomaterial mostrou maior reatividade e maior dano no PSII, indicando diminuição do processo de fotossíntese.

Figura 44: Aumento percentual de NPQ\_L1, das folhas com CuO NPs < 50 nm e ZnO NPs (<50 e 100 nm) em relação às folhas controles, nas concentrações 50, 100, 200 e 300 mg.L<sup>-1</sup>.



O parâmetro de dissipação não fotoquímica (NPQ\_L1) obteve aumento percentual entre a folha com nanopartículas e a folha controle. Com 100 mg.L<sup>-1</sup> a CuO NPs aumentou em torno de 17%, 96 h após injeção. Em 200 e 300 mg.L<sup>-1</sup> houve o aumento dos três óxidos, em 144 h da maior concentração realizada, o ZnO NPs < 100 nm mostrou menor aumento, enquanto CuO NPs e ZnO NPs < 50 nm tiveram comportamento semelhante.

Figura 45: Aumento percentual de Rfd\_L1, das folhas com CuO NPs < 50 nm e ZnO NPs (<50 e 100 nm) em relação às folhas controles, nas concentrações 50, 100, 200 e 300 mg.L<sup>-1</sup>.



O coeficiente de diminuição relativa da fluorescência (Rfd\_L1) teve aumento entre a folha com injeção de nanopartículas e a folha controle, os valores de Rfd podem ser aumentados, na tentativa de aumentar a produção de glicose, também usada na geração de energia química da planta. A partir da concentração de 100 mg.L<sup>-1</sup> ZnO NPs < 50 nm apresentou os valores mais elevados porém todos os óxidos tiveram resultados semelhantes no comportamento das folhas.

## 5. DISCUSSÃO

Nas imagens apresentadas nas Figuras 5, 17 e 29 pode-se observar que para todas as nanopartículas o que aumentou o efeito danoso nas folhas da Fava foi suas concentrações. Quanto maior a concentração, maior dano visual na planta. Nas figuras 6, 18 e 30, que ilustram a evolução do efeito em CuO NPs < 50 nm e ZnO NPs < 50 nm, houve dano gradativo em função do tempo, começando surgir visivelmente em 24 h e em ZnO NPs < 100 nm, começou em 48 h e não houve grande evolução do dano.

Pode-se sugerir que as nanopartículas de maior dimensão (100 nm) se aglomeraram de forma mais concreta, enquanto as menores (50 nm) tiveram maior mobilidade entre os tecidos da planta, gerando assim efeito gradativo em função do tempo. Segundo Liu et al. (2010), estudos demonstram que quanto menor o tamanho das nanopartículas, maior é o seu potencial de toxicidade.

Outro fator observado é que nas plantas tratadas com CuO NPs, houve um amarelamento na folha, o que é discutido por Marques, (2010) que ressalta que plantas cultivadas com altos níveis de cobre, apresentam biomassa reduzida e sintomas de clorose, devido a um menor teor de clorofila e alterações na estrutura dos cloroplastos e composição da membrana dos tilacóides.

As medidas de temperatura apresentadas nas figuras 9, 21 e 33, mostraram que houve o aumento gerado na presença de nanopartículas em concentração acima de  $100 \text{ mg.L}^{-1}$ , sendo essas significativas em altas concentrações ( $300 \text{ mg.L}^{-1}$ ). Khairi & Hall (1976) e Hall et al., (1975) observaram efeitos significativos da temperatura sobre a condutância estomática e fotossíntese.

Além do mais, altas temperaturas foliares estão relacionadas com a redução da fixação de carbono nas diversas etapas da fotossíntese (MEDLYN et al., 2002). Essa variação na temperatura foliar e do dossel foliar podem ser utilizadas para estimar o estresse hídrico das plantas, como observado na cultura do milho por Tilling et al., (2007) e Winterhalter et al. (2011)

O controle de abertura e fechamento dos estômatos é essencial para regulação do equilíbrio entre a perda de água pela transpiração e a assimilação de  $\text{CO}_2$  pela planta (PIMENTEL, 2004). As medidas de condutância estomática apresentada nas figuras 10, 22 e 34, mostraram a redução da condutância estomática em todos os materiais, principalmente em altas concentrações ( $200$  e  $300 \text{ mg.L}^{-1}$ ), sendo ZnO NPs  $< 50 \text{ nm}$  que apresentou mudanças mais significativas, iniciando em  $100 \text{ mg.L}^{-1}$ .

Outras mudanças podem ocorrer juntamente com o fechamento dos estômatos, como a alteração na síntese de clorofila, alterações funcionais e

estruturais em cloroplastos e distúrbios nos processos de acumulação, transporte e distribuição de assimilados (ANJUM et al., 2011)

Os gráficos apresentados nas figuras 13, 25 e 37, demonstram a queda no  $F_v/F_m$ , parâmetro que revela uma estimativa da eficiência quântica máxima da atividade fotoquímica do PSII, quando todos os centros de reação do PSII estão abertos (BAKER; ROSENQVST, 2004). Essa relação tem sido utilizada para detectar perturbações no sistema fotossintético causada por estresse, visto que sua diminuição indica um declínio na eficiência fotoquímica do PSII e um distúrbio ou dano no aparato fotossintético (BELKHODJA et al., 1994; GLYNN et al., 2003; PERCIVAL; FRASER, 2001).

Na figura 26 e 38, é observado a queda no parâmetro  $F_v/F_m$  na presença de ZnO NPs, resultados do presente estudo foram consistentes com outras pesquisas que demonstraram que a taxa de  $F_v/f_m$  são alteradas quando expostas a nanopartículas de óxido de zinco (BRAYNER et al., 2010).

Os baixos valores de  $F_v/F_m$ , na maioria dos casos é explicado por danos na folha que provocam a desativação do PSII, indicando diminuição do processo de fotossíntese, normalmente esta razão decresce em plantas submetidas a algum tipo de estresse (KRAUSE e WEIS, 1991).

Mateos-Naranjo et al. (2008) pesquisando o efeito do cobre no crescimento e fotossíntese de *Spartina densiflora* Brongn. descreveram que a eficiência quântica do PSII, a taxa de fotossíntese líquida, a condutância estomática e a concentração de pigmentos diminuíram com o aumento na concentração de Cu, o que pode-se visualizar na figura 14 e 10, onde os valores de condutância estomática e  $F_v/F_m$  reduzem conforme o aumento de concentração de NPs.

Cambrollé et al. (2011) relatam que o efeito adverso do excesso de cobre na *Glaucium flavum* e a redução da fotossíntese, pode ser atribuída ao efeito tóxico de Cu no aparelho fotossintético das plantas, sendo diretamente, através de uma diminuição na concentração de pigmentos de clorofila, e, indiretamente, através de interferência de íons Cu no PSII.

Baker e Rosenqvist (2004) relatam que os valores deste parâmetro ( $F_v/F_m$ ) se apresentam reduzidos em diversas espécies de plantas submetidas a diferentes tipos de estresse, tais como salinidade, temperaturas altas e baixas, assim como deficiência nutricional, já inibição da fotossíntese segundo Rodea-Palomares et al. (2012) também pode ser consequência da excessiva produção de ROS.

O aumento da dissipação não fotoquímica (NPQ), apresentada nas figuras 15, 27 e 39, indicam que as plantas dissiparam a luz na forma de calor, protegendo assim a folha de danos induzidos pela luz (Maxwell & Johnson, 2000; Cambrollé et al., 2012). Esta dissipação da energia de excitação das clorofilas pode prevenir a formação de moléculas altamente reativas, a partir de oxigênio, que podem danificar irreversivelmente proteínas, lipídeos e pigmentos de membranas fotossintéticas (HORTON & RUBAN, 2004).

O NPQ\_L1 pode ter um aumento devido à perda da energia retida no PSII pela dissipação térmica (EPRON e DREYER, 1991). Segundo Brestic et al. (1995) o aumento dos *quenchings* não-fotoquímico em plantas sob estresse pode ser atribuído a baixa regulação do transporte de elétrons para a produção de ATP e NADPH, combinado com a diminuição da assimilação fotossintética e fechamento estomático.

Com o aumento dos níveis de estresse, a elevação da extinção não-fotoquímica pode ser insuficiente para manter os aceptores de elétrons do PSII parcialmente oxidados e isso leva ao fotodano do PSII, a menos que receptores de elétrons alternativos, tais como oxigênio, sejam utilizados (ORT e BAKER, 2002). Consequentemente, a capacidade de manter a quinona do PSII parcialmente oxidada é um fator chave na tolerância a estresses ambientais (ROSENQVIST, 2001; ORT e BAKER, 2002).

O Rfd\_L1 é um parâmetro da cinética de emissão de fluorescência das clorofilas, que indica a atividade potencial fotossintética (SAAKOV et al., 1992). O parâmetro Rfd, apresentado nas figuras 16, 28 e 40, pode ter se elevado na tentativa de aumentar a produção de glicose, também usada na geração de energia química da planta. A razão de decréscimo da fluorescência (Rfd), que é

determinada pela expressão  $(F_m - F_t)/F_t$ , é denominada de índice de vitalidade e é usada para avaliar a atividade de Ciclo de Calvin e processos relacionados (LICHTENTHALER et al, 1986)

O estudo comparativo apresentado no item 4.4 concluiu que nanopartículas de menores dimensões afetaram mais os parâmetros analisados, a mesma conclusão foi apresentada por Park et al. (2011) que estudando o efeito do tamanho das nanopartículas sobre a citotoxicidade, inflamação, desenvolvimento de toxicidade e genotoxicidade de Ag NPs em linhagens celulares de fibroblastos e macrófagos também observaram que as nanopartículas de menores dimensões foram mais citotóxicas do que as maiores, ocorrendo alterações em todos os parâmetros estudados.

Além de Park et al. (2011) outros autores como Castranova (2011) relataram que fatores como dimensão, forma, características de superfície e taxa de dissolução influenciam na habilidade das nanopartículas de interagir com sistemas biológicos. Da mesma forma, Beer et al. (2012) concluiu que a maior área de superfície em relação ao volume aumenta notavelmente propriedades de superfície de nanopartículas aumentando assim a interação desse material com fluidos biológicos, o que faz essas partículas potencialmente mais reativas do que partículas maiores.

Liu et al. (2010) também concluiu que as nanopartículas de pequenas dimensões podem gerar uma série de respostas teciduais, em diferentes linhagens celulares, como danos à membrana celular, geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), danos a mitocôndrias, diminuição da atividade metabólica, apoptose, necrose, liberação de marcadores inflamatórios e dano ao DNA.

Por meio da reação de Fenton, o ciclo redox entre  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Cu}^+$  catalisa a produção de radicais hidroxila ( $\text{OH}^-$ ) provenientes de radicais superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) e de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (BRIAT & LEBRUN, 1999). Já o Zn, embora seja um elemento que não é capaz de gerar ROS diretamente através da reação de Fenton, ele pode gerar estresse oxidativo através da interferência com o sistema de defesa antioxidante das plantas (GRATÃO et al., 2005). Assim, a

absorção excessiva de Cu e de Zn por plantas pode causar estresse oxidativo devido ao desequilíbrio entre as respostas antioxidantes e o aumento da produção de ROS (GIROTTTO et al., 2013).

## 6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nos experimentos com as nanopartículas de óxido de cobre e zinco, demonstraram que as técnicas utilizadas tiveram êxito na caracterização das alterações fisiológicas em plantas de Fava (*Vicia faba*).

Pode-se observar que com o aumento da concentração das nanopartículas nas folhas, a temperatura por imagem térmica e os parâmetros fotossintéticos NPQ e Rfd se elevaram, enquanto Fv/fm e a condutância estomática, tiveram seus valores reduzidos em função do tempo e concentração das NPs.

A diminuição do Fv/Fm, indica um declínio na eficiência fotoquímica do PSII e um distúrbio ou dano no aparato fotossintético, combinado com o parâmetro NPQ, que também indica uma diminuição da assimilação fotossintética, e teve aumento devido à perda da energia retida no PSII pela dissipação térmica e fechamento estomático, gerando queda na condutância estomática. Com a diminuição da fotossíntese causada pela presença de NPs, ocorreu aumento da temperatura da folha e consequentemente fechamento estomático. O parâmetro Rfd pode ter se elevado na tentativa de aumentar a produção de glicose, também usada na geração de energia química da planta.

Assim, os resultados obtidos indicam que as alterações fisiológicas nas plantas podem estar relacionadas a um dano nos estômatos das folhas submetidas às NPs, bem como a indução de um estresse oxidativo, gerado por espécies reativas de oxigênio (ROS).

Quanto ao estudo comparativo entre nanopartículas, foi observado que as nanopartículas de menor dimensão foram mais citotóxicas do que as nanopartículas maiores, ocorrendo alterações em todos os parâmetros estudados.

As análises por imagem térmica, condutância estomática e espectroscopia de fluorescência como técnicas analíticas não invasivas, para monitorar e detectar *in vivo* as alterações nas plantas devido à presença de nanopartículas se mostraram viáveis e apresentaram resultados satisfatórios para o experimento.

Tendo em vista a ampla utilização de nanopartículas e sua consequente liberação no meio ambiente, é necessário estudos ecotoxicológicos desses materiais para a determinação de parâmetros, relacionados à sua composição e concentração, que possam indicar o seu uso sem que sejam prejudiciais ao ecossistema.

## 6. BIBLIOGRAFIA

ADREES M et al., The effect of excess copper on growth and physiology of important food crops: a review. **Environmental Science and Pollution Research** 22(11) 8148-8162.2015.

ALVES, P.L., Magalhães, A.C.N., Barja, P.R. The phenomenon of photoinhibition of photosynthesis and its importance in reforestation. **The Bot. Rev.** 68, 193-208, 2002.

ANJUM, S. A. et al. Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. **African Journal of Agricultural Research**, Lesotho, v. 6, n. 9, p. 2026-2032, 2011.

BAKER, N. R. Chlorophyll fluorescence: A probe of photosynthesis in vivo. In: (Ed.). **Annual Review of Plant Biology**, v.59, p. 89-113, 2008.

BAKER, N. R.; ROSENQVIST, E. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. **Journal Experimental Botany**, v. 55, p. 1607-1621, 2004.

BEER, C.; FOLDBJERGA, R.; HAYASHIB, Y.; SUTHERLANDB, D.; AUTRUPA, H. Toxicity of silver nanoparticles—Nanoparticle or silver ion? **Toxicology Letters**, v. 208, n. 3, p. 286– 292, 2012.

BELKHODJA, R. *et al.* Chlorophyll Fluorescence as a Possible Tool for Salinity Tolerance Screening in Barley (*Hordeum vulgare* L.) **Plant Physiology**, v. 104, n. 02, p. 667-673, 1994.

BRANDÃO, H. M. Nanotecnologia: a próxima revolução na agropecuária. **Revista CRMV**, Brasília, v.17, n. 53, p 61-67, 2011.

- BRAYNER et al., ZnO nanoparticles: synthesis, characterization, and ecotoxicological studies. **Langmuir**, v.26, n.9, p.6522-6528, maio 2010.
- BRESTIC, M.; CORNIC, G.; FRYER, M. J.; BAKER, N. R. Does photorespiration protect the photosynthetic apparatus in French bean leaves from photoinhibition during drought stress? **Planta** 196:450–457, 1995.
- BRIAT, J.F., LEBRUN, M. Plant responses to metal toxicity. C. R. Acad. Sci. Paris **Life Sci.** 322, 43-54. 1999.
- BULCKE, F.; THIEL, K.; DRINGEN, R. Uptake and toxicity of copper oxide nanoparticles in cultured primary brain astrocytes. **Nanotoxicology**. v. 8, p. 775-785, 2013.
- BURKHEAD, J. L. et al. Copper homeostasis. **New Phytologist**, v. 182, n. 4, p. 799-816, 2009.
- BUZEA, C.; PACHECO, B.I.; ROBBIE, K. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. **Biointerphases**, New York, v. 2, n. 4, p. 100-103, 2007.
- CAMBROLLÉ J et al., Growth, reproductive and photosynthetic responses to copper in the yellow-horned poppy, *Glaucium flavum* Crantz. **Environmental and Experimental Botany** 71(1) 57-64.2011.
- CAMBROLLÉ, J., MANCILLA-LEYTÓN, J.M., MUÑOZ-VALLÉS, S., LUQUE, T., FIGUEROA, M.E. Zinc tolerance and accumulation in the salt-marsh shrub *Halimione portulacoides*. **Chemosphere**, 86, 867-874.2012.
- CASTIGLIONE, S., FRANCHIN, C., FOSSATI, T., LINGUA, G., TORRIGIANI, P., BIONDI, S. High zinc concentrations reduce rooting capacity and alter metallothionein gene expression in white poplar (*Populus alba* cv. Villafranca). **Chemosphere** 67, 1117-1126. 2007.
- CASTRANOVA, V. Overview of current toxicological knowledge of engineered nanoparticles. **Journal of Occupational and Environmental Medicine**, v. 53, n.6, p.14–17, 2011.
- CHANG, H.; JWO, C. S.; LO, C. H.; TSUNG, T.T.; KAO, M.J. e LIN, H.M.. Rheology of CuO nanoparticle suspension prepared by ANSS. **Rev. Adv. Mater**, Taiwan, v. 10, p.128-132, 2005.
- CHANG, R. K. et al. The Research of Disease Detection Method of Greenhouse Cucumber Leaf Based on Chlorophyll Fluorescence Analysis. **Universal Journal of Agricultural Research** 3(3): 76-80, 2015.
- CHEN, W., YANG, X., HE, Z., FENG, Y., HU, F. Differential changes in photosynthetic capacity, 77 K chlorophyll fluorescence and chloroplast ultrastructure between Zn-efficient and Zn-inefficient rice genotypes (*Oryza sativa*) under low zinc stress. **Plant Physiol.** 132, 89-101. 2008.
- DALCORSO G, MANARA A, PIASENTIN S, FURINI A. Nutrient metal elements in plants. **Metallomics** 6 (10) 1770-1788, 2014.

DE LA TORRE-ROCHE, R. et al. Impact of Ag Nanoparticle Exposure on p,p 'DDE Bioaccumulation by Cucurbita pepo (Zucchini) and Glycine max (Soybean). **Environmental Science & Technology**, v. 47, n. 2, p. 718-725, 2013.

DE MAGALHÃES, C.C.P., CARDOSO, D., DOS SANTOS, C.P., CHALOUB, R.M. Physiological and photosynthetic responses of *Synechocystis aquatilis* f. *aquatilis* (Cyanophyceae) to elevated levels of zinc. **J. Phycol.** 40, 496-504. 2004.

DHAWAN, V. S.; PARMAR, D. Nanomaterials: a challenge for toxicologists. **Nanotoxicology**, v. 3, n<sup>o</sup> 1, pp. 1–9, 2009.

DHIR, B., SHARMILA, P., PARDHA SARAD, P. Photosynthetic performance of *Salvinia natans* exposed to chromium and zinc rich wastewater. **Braz. J. Plant Physiol.** 20, 61-70. 2008.

EPRON, D. E DREYER, E. Effects of severe dehydration on leaf photosynthesis in *Quercus petraea* (Matt.) Liebl.: Photosystem II efficiency, photochemical and nonphotochemical fluorescence quenching and electrolyte leakage. **Tree Physiology** 10:273-284, 1991.

GIROTTO, E., CERETTA, C.A., ROSSATO, L.V., FARIAS, J.G., TIECHER, T.L., DE CONTI, L., SCHMATZ, R., BRUNETTO, G., SCHETINGER, M.R.C., NICOLOSO, F.T. Triggered antioxidant defense mechanism in maize grown in soil with accumulation of Cu and Zn due to intensive application of pig slurry. **Ecotox. Environ. Safe.** 93, 145-155. 2013.

GLYNN, P.; FRASER, C.; GILLIAN, A. Foliar salt tolerance of *Acer* genotypes using chlorophyll fluorescence. **Journal of Arboriculture**, v. 29, n. 02, p. 61-65, 2003.

GRATÃO, P.L., POLLE, A., LEA, P.J., AZEVEDO, R.A. Making the life of heavy metalstressed plants a little easier. **Funct. Plant Biol.** 32, 481-494. 2005.

HALL, A.E.; CAMACHO, B.S.E.; KAUFMANN, M.R. Regulation of water loss by citrus leaves. **Physiologia Plantarum**, v.33, p.62-65, 1975.

HAYASHI, M. C. P. et al. Indicadores de CT&I no Pólo Tecnológico de São Carlos: primeiras aproximações. **Revista Digital de Biblioteconomia e Ciência da Informação**, Campinas, SP, v.3, n.2, p.17-30, 2006.

HOLDEN, P.A.; NISBET, R.M.; LENIHAN, H.S.; MILLER, R.J.; CHERR, G.N.; SCHIMEL, J.O.; GARDEA-TORRESDEY, J.L. Ecological nanotoxicology: integrating nanomaterial hazard consideration across the subcellular, population, community, and ecosystems levels. **Accounts of Chemical Research**, v. 46, n.3, p.813-822, 2013.

HORTON, P., RUBAN, A. Molecular design of the photosystem II light-harvesting antenna: photosynthesis and photoprotection. **J. Exp. Bot.** 56, 365-373. 2004.

INTERNATIONAL COUNCIL OF MARINE INDUSTRY ASSOCIATIONS - ICOMIA. **Factsheet on copper-based antifouling**. 2006.

JIANG, X., WANG, C. Zinc distribution and zinc-binding forms in *Phragmites australis* under zinc pollution. *J. Plant Physiol.* 165, 697-704. 2008.

JO, H. J. et al. Acute toxicity of Ag and CuO nanoparticle suspensions against *Daphnia magna*: The importance of their dissolved fraction varying with preparation methods. **Journal of hazardous materials**, Coréia, p. 301-308, 2012.

JONES, H.G. Use of infrared thermometry for estimation of stomatal conductance as a possible aid to irrigation scheduling. **Rev. Adv. Bot. Res.** 41:107-163, 1999.

KALAJI, HAZEM M. et al. Frequently asked questions about in vivo chlorophyll fluorescence: practical issues. **Photosynthesis research**, v. 122, n. 2, p. 121-158, 2014.

KHAIRI, M.M.A.; HALL, A.E. Temperature and humidity effects on net photosynthesis and transpiration of citrus. **Physiologia Plantarum**, v.36, p.29-34, 1976.

KRAUSE, G.; WEIS, E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, n. 42, p. 313-349, 1991.

LALAU, C.M. Avaliação da toxicidade de nanopartículas de óxido de cobre através de macrófitas da espécie *Landoltia punctata*. **Dissertação (mestrado)**-Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental, Florianópolis, SC, 2014.

LAWSON, T. et al. Reductions in mesophyll and guard cell photosynthesis impact on the control of stomatal responses to light and CO<sub>2</sub>. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, n. 13, p. 3609-3619, 2008.

LICHTENTHALER, H. K. Laser-induced chlorophyll fluorescence of living plants. In: Proc. Internat. Geoscience and Remote Sensing Symposium IGARSS Zurich, vol III, pp 1571-1579, ESA **Publications Division Noordwijk**, 1986.

LIU, W.; WU, Y.; WANG, C.; LI, H.C.; WANG, T.; LIAO, C.Y.; CUI, L.; ZHOU, Q. F.; YAN, B.; JIANG, G. B. Impact of silver nanoparticles on human cells: effect of particle size. **Nanotoxicology**, v.4, n. 1-4, p. 319–330, 2010.

LOVERN, S.B.; STRICKLER, J.R.; KLAPER, R.D. Behavioral and physiological changes in *Daphnia magna* when exposed to nano-particle suspensions (titanium dioxide, nano-C60 and C60HxC70Hx). **Environmental science & technology**, v. 41, n. 12, p. 4465–4470, 2007.

MARQUES, DANIELE MARIA. Morfofisiologia de espécies arbóreas expostas ao cobre. **Dissertação (mestrado)**- Universidade Federal de Alfenas, Pós-graduação em Ciências Ambientais. Alfenas - MG, 2016.

MARTINS, G. A. **Estatística Geral e Aplicada**. 3 ed. São Paulo: Atlas, 2006.

MATEOS-NARANJO E, REDONDO-GÓMEZ S, CAMBROLLÉ J, FIGUEROA MEGrowth and photosynthetic responses to copper stress of an invasive cordgrass, *Spartina densiflora*. **Marine Environmental Research** 66(4) 459-465. 2008.

MATIAS, W. G.. **Apostila de Toxicologia Ambiental**. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental. Universidade Federal de Santa Catarina. 2009.

MAXWELL, K., JOHNSON, G.N.. Chlorophyll fluorescence – a practical guide. **J. Exp. Bot.** 51, 659-668. 2000.

MC DERMIT, D.K. Sources of error in the estimation of stomatal conductance and transpiration from porometer data. **HortScience**, Alexandria, v. 25, n.12, p. 1538-48, 1990.

MCAUSLAND, L. et al. A novel system for spatial and temporal imaging of intrinsic plant water use efficiency. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 16, p. 4993-5007, 2013.

MEDINTZ, I. L. et al. Quantum dot bioconjugates for imaging, labeling and sensing. **Nature Materials**, v. 4, n.6, p. 435–446, 2005.

MEDLYN, B. E. et al. Temperature responses of parameters of a biochemically based model of photosynthesis. I. Seasonal changes in mature maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.). **Plant Cell and Environment**, Oxford, v. 25, n. 9, p. 1155-1165, 2002.

MELEGARI, S.P. et al. Evaluation of toxicity and oxidative stress induced by copper oxide nanoparticles in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. **Aquatic Toxicology** i, v. 142-143, p. 431-440, 2013.

MERCURIO, M. E. Investigação de interações hiperfinas em ZnO e Zn(1-x)Co(x)O pela técnica de correlação angular  $\gamma$ - $\gamma$  perturbada. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

MITZNER, K. D.; STERNHAGEN, J.; GALIPEAU, D. W. Development of a micromachined hazardous gas sensor array. **Sensors and Actuators B; Chemical**, v. 93, n. 1-3, p. 92-93, 2003.

MOHAMMED, G.H., ZARCO-TEJADA, P.J., MILLER, J.R.. Applications of Chlorophyll Fluorescence in Forestry and Ecophysiology, Chapter 9, In: J.R. DeEll (Ed.) **Practical Applications of Chlorophyll Fluorescence in Plant Biology**. **Kluwer Academic Publishers**, ISBN 1-4020-7440-9, pp. 31-78, 2003.

MORETTIN, P. A.; BUSSAB, W. O. **Estatística Básica**. 6 ed. São Paulo: Atual, 2010.

MUELLER, N.C.; NOWACK, B. Exposure modeling of engineered nanoparticles in the environment. **Environmental Science Technology**, v. 42, n.12, p. 4447–4453, 2008.

MUNOZ, M.M. Síntese e caracterização das propriedades estruturais e morfológicas de nanopartículas de ZnO. **Dissertação (mestrado)**. Universidade de Brasília. Programa de pós-graduação em Física, Brasília, DF, 2013.

MURCHIE, Erik H.; LAWSON, Tracy. Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. **Journal of experimental botany**, p. ert208, 2013.

NAIR, PRAKASH M. GOPALAKRISHNAN; CHUNG, Ill Min. Changes in the Growth, Redox Status and Expression of Oxidative Stress Related Genes in Chickpea (*Cicer arietinum* L.) in Response to Copper Oxide Nanoparticle Exposure. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 34, n. 2, p. 350-361, 2014.  
NILSSON, H.E. Remote sensing and image analysis in plant pathology. **Canadian Journal of Plant Pathology** 17:154-166. 1995.

NOBEL, P.S. Physicochemical and environmental plant physiology. San Diego: **Academic Press**, p. 635. 1991.

OREKHOV, D. I. et al. The use of parameters of chlorophyll a fluorescence induction to evaluate the state of plants under anthropogenic load. **Biophysics**, v. 60, n. 2, p. 263-268, 2015.

ORT, R.; BAKER, N. A photoprotective role for O<sub>2</sub> as an alternative electron sink in photosynthesis? **Current Opinion in Plant Biology** 2002, 5:193–198, 2002.

PARK, M.V.D.Z.; NEIGHC, A. M.; VERMEULENB, J. P.; FONTEYNEB, L. J. J.; HENNY W. VERHAREN, H. W.; BRIEDÉA, J. J.; LOVERENA, H.; JONG, W. H. The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles. **Biomaterials**, v. 32, n. 36, p. 9810–9817, 2011.

PASCHOALINO, M. P.; MARCONE, G. P. S.; JARDIM, W. F. Os nanomateriais e a questão ambiental. **Revista Química Nova**, Campinas, v. 33, n.2, p. 421-430, 2010.

PERCIVAL, G. C.; FRASER, G. A. Measurement of the salinity and freezing tolerance of *Crataegus* genotypes using chlorophyll fluorescence. **Journal Arboriculture**, v. 27, n. 05, p.233–245, 2001.

PIMENTEL, C. A relação da planta com a água. Seropédica, RJ: **Edur**, 191p. 2004.

QUINA, F. H. Nanotecnologia e o Meio Ambiente: Perspectivas e Riscos. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 1028-1029, 2004.

RODEA-PALOMARES et al., I. 2012. Na insight into the mechanisms of nanoceria toxicity in aquatic photosynthetic organisms. **Aquatic Toxicol.**, V. 122-123, p. 133-143, out 2012.

ROSENQVIST E. Light acclimation maintains the redox state of PSII electron acceptor QA within a narrow range over a broad range of light intensities. **Photosynthesis Research** 70, 299–310. 2001.

SAAKOV, V.; LANG, M.; SCHINDLER, C.; STOBER, F.; LICHTENTHALER, H. K. Changes in chlorophyll fluorescence and photosynthetic activity of french bean leaves induced by gamma radiation. **Photosynthetica**, Praga, v. 27, n. 3, p. 369-383, July 1992.

SAITO, G. et al. Synthesis of copper/copper oxide nanoparticles by solution plasma. **Journal of applied physics**, Japão, p. 1-7, 2015.

SANTOS, F. F. dos. A encruzilhada da nanotecnologia: Inovação, tecnologia e riscos. **RAC**, Curitiba, n. , p.983-985, 30 set. 2010.

SCOTT, N. R. Nanoscience in Veterinary Medicine. **Veterinary Research Communications**, Dordrecht, v. 31, (supl. 1), p. 139-144, 2007.

SCOTT, N. R. Nanotechnology and animal health. **Revue scientifique et technique: Office international des épizooties**, Paris, v. 24, n. 1, p. 425-432, 2005.

SERVICE, R.F. Nanotechnology grows up. **Science**, v. 304, n. 5678, p. 1732-1734, 2004.

SHAW, Arun Kumar; HOSSAIN, Zahed. Impact of nano-CuO stress on rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. **Chemosphere**, v. 93, n. 6, p. 906-915, 2013.

SHIMIZU, N. et al. Potential uses of titanium dioxide in conjunction with ultrasound for improved disinfection. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, p. 416–423, 2010.

SINHA, R.; KIM, G.; NIE, S.; SHIN, D. Nanotechnology in cancer therapeutics: bioconjugated nanoparticles for drug delivery. **Molecular Cancer Therapeutics**, Birmingham, v. 5, n. 8, p.1909-1917, 2006.

SU, Lingye et al. A novel system for evaluating drought–cold tolerance of grapevines using chlorophyll fluorescence. **BMC plant biology**, v. 15, n. 1, p. 82, 2015.

SYNOWIEC, A.; MOŹDŹEŃ, K.; SKOCZOWSKI, A. Early physiological response of broccoli leaf to foliar application of clove oil and its main constituents. **Industrial Crops and Products**, v. 74, p. 523-529, 2015.

TAIZ, L. & ZEIGER, E. Plant physiology. Benjamin Cummings. Redwood city. 565p, 1991.

TANIGUCHI, N. On the basic concept of “NanoTechnology”. Proc. Intl. Conf. Eng. Tokyo, Part II, Japan, **Society of Precision Engineering**, p. 18-23, 1974.

THE ROYAL SOCIETY AND THE ROYAL ACADEMY OF ENGINEERING. **Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties**. London, 2004.

TILLING, A. K. et al. Remote sensing of nitrogen and water stress in wheat. **Field Crop Research**, Amsterdam, v. 104, n. 1, p. 77-85, 2007

TOMA, H.E. O mundo nanométrico: a dimensão do novo século. **Editora oficina de textos**, p. 102, 2004.

VIEIRA, S. **Estatística Experimental**. 2 ed. São Paulo: Atlas, 1999.

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.

WANG, Z.; LI, J.; ZHAO J.; XING, B. Toxicity and Internalization of CuO Nanoparticles to Prokaryotic Alga *Microcystis aeruginosa* as Affected by Dissolved Organic Matter. **Environment Science Technology**, v. 45, n. 14, p. 6032-6040, 2011.

WEINTRAUB, B. et al. Density-controlled, solution-based growth of ZnO nanorod arrays via layer-by-layer polymer thin films for enhanced field emission. **Nanotechnology**, v.19, p435302, 2008.

WINTERHALTER, L. et al. High throughput phenotyping of canopy water mass and canopy temperature in wellwatered and drought stressed tropical maize hybrids in the vegetative stage. **European Journal of Agronomy**, Amsterdam, v. 35, n. 1, p. 22-32, 2011.

YANG, Y., SUN, C., YAO, Y., ZHANG, Y., ACHAL, V. Growth and physiological responses of grape (*Vitis vinifera* “Combier”) to excess zinc. *Acta Physiol. Plant* 33, 1483-1491. Yruela, I., 2005. Copper in plants. *Braz. J. Plant Physiol.* 171, 145-156. 2011.

YRUELA I. Transition metals in plant photosynthesis. **Metallomics** 5(9) 1090-. 2013.

ZARBIN, A. J. G. Química de (nano)materiais. **Química Nova**, v. 30, nº 6, p.1469-1479, São Paulo, 2007.

ZHAO Y., WANG B., FENG W., BAI C. Nanotoxicology: Toxicological and biological activities of nanomaterials. In *Nanoscience and Nanotechnologies. Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS)* Publishers, Oxford, UK, 2014.

ZHOU, K., WANG, R., XU, B. e LI Y. Synthesis, characterization and catalytic properties of CuO nanocrystals with various shapes. **Nanotechnology**. v. 17, nº 15, p. 3939–3943, 2006.