



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS - UFGD**  
**FACET- FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E**  
**TECNOLOGIA AMBIENTAL**



## **Dissertação de Mestrado**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS DE PRATA  
E ÓXIDO DE COBRE NA GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE *Sesbania virgata*  
(FABACEAE).**

**ELIENE SILVA DOS SANTOS**

Prof. Dr. Eduardo José de Arruda  
Prof. Dr. Anderson Rodrigues Lima Caires

Dourados –MS

2018

ELIENE SILVA DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS DE PRATA  
E ÓXIDO DE COBRE NA GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE *Sesbania virgata*  
(FABACEAE).**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo José de Arruda

Co-orientador: Prof. Dr. Anderson R. Caires

Dourados - MS

2018

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

S237a Santos, Eliene Silva Dos

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS DE PRATA E ÓXIDO DE COBRE NA GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE *Sesbania virgata* (FABACEAE). / Eliene Silva Dos Santos -- Dourados: UFGD, 2018.

59f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo José de Arruda

Co-orientador: Prof. Dr. 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. Nanomateriais. 2. fluorescência da clorofila. 3. Estresse oxidativo. 4. Germinação. 5. *Sesbania virgata*. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

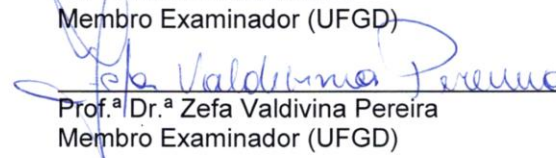


### Termo de Aprovação

Após apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora, foi emitido o parecer APROVADO, para a dissertação intitulada: **“Avaliação dos efeitos de nanopartículas metálicas de prata e óxido de cobre na germinação das sementes de *Sesbania virgata*”**, de autoria de **Eliene Silva dos Santos**, apresentada ao Programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados.

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Eduardo José de Arruda  
Presidente da banca examinadora

  
\_\_\_\_\_  
Dr. William Ferreira Falco  
Membro Examinador (UFGD)

  
\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Zefa Valdivina Pereira  
Membro Examinador (UFGD)

Dourados/MS, 6 de abril de 2018.

*“O que sabemos é uma gota; o que ignoramos é um oceano.”*

(Isaac Newton)

## AGRADECIMENTOS

- ✓ A Deus, pois sem ELE não teria a oportunidade de realizar essa conquista;
- ✓ A minha família, por sempre incentivar e acreditar que seria capaz, principalmente, meu esposo, Ricardo, por todo companheirismo e compreensão nas ausências e neuras;
- ✓ Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental (PPGCTA) por proporcionar a possibilidade de realização desse trabalho;
- ✓ Ao meu orientador Dr. Eduardo José de Arruda pela orientação e, especialmente, por proporcionar o meu desenvolvimento acadêmico e profissional em mais um ciclo de vida profissional;
- ✓ Em especial, ao meu co-orientador Dr. Anderson Rodrigues Lima Caires pelo incentivo, auxílio, orientação e principalmente por acreditar que seríamos capaz de realizar esse trabalho. Gostaria de agradecê-lo por todos os ensinamentos durante esses anos;
- ✓ Ao Prof Dr. Etenaldo Felipe Santiago pelos conhecimentos científicos transmitidos sobre a fisiologia vegetal;
- ✓ Ao Prof Dr Eriton Rodrigo Botero pelo apoio, incentivo e disponibilizar recursos para realização do trabalho;
- ✓ Ao Prof Dr. Rodrigo Garofallo Garcia por permitir a utilização da câmera termográfica nos experimentos realizados;
- ✓ Aos amigos de laboratórios Dr. William Falco, Doutoranda Daniela Graciano e Dra. Amanda Martins pela companhia, ensinamentos, apoio e ajuda nas horas de experimentos;
- ✓ Aos colegas do Grupo de Óptica Aplicada - GOA pelo incentivo e amizade nas horas difíceis;
- ✓ Enfim, agradeço a todos que, direto ou indiretamente, contribuíram para a realização dessa dissertação!

## RESUMO

A nanotecnologia é um extenso campo que, ao longo dos anos, vem crescendo em diversas áreas de conhecimento\aplicações, tais como: medicina, agricultura, cosméticos, vestuário, entre outros. Estes conhecimentos\aplicações trazem um aumento contínuo de produção, uso e descarte dos materiais nanoparticulados no ambiente. O comportamento, o impacto e a (bio)atividade dos materiais na atmosfera, água e solo, e ambiente de modo geral não são completamente conhecidos. Assim, faz-se necessário uma análise detalhada sobre os riscos de contaminação, possíveis efeitos e impactos que as nanopartículas (NPs) podem causar nos sistemas biológicos. Na tentativa de investigar esses efeitos em plantas, utilizamos NPs de prata metálica (AgNPs) e óxido de cobre (CuONPs) no processo de germinação de sementes de *Sesbania virgata*, para avaliar os possíveis efeitos que estas NPs possam causar ao vegetal no processo de germinação, quando o sistema fotossintético não está completamente formado. Neste estudo foram utilizados a técnica de imagem de fluorescência da clorofila *a*, associada a análises térmicas por imagem e análise do crescimento de raiz. Os resultados experimentais mostraram que as NPs diminuem a emissão da fluorescência máxima da clorofila dependente da concentração de NPs e aumentou a quantidade de energia dissipada por vias não fotoquímicas. Os resultados mostraram, ainda, que houve alteração na temperatura das sementes e redução no tamanho das raízes. Além disso, pode-se observar, de forma adicional, que as sementes quando submetidas a diferentes concentrações de NPs de óxido de cobre (CuONPs) e prata metálica (AgNPs), tiveram modificadas o funcionamento do aparato fotossintético, impactando no desenvolvimento da planta e crescimento das raízes.

**Palavras-chave:** Nanomateriais, fluorescência da clorofila, estresse oxidativo, germinação, crescimento de raiz.

## ABSTRACT

Nanotechnology is an extensive field that, over the years, has been growing in several areas of knowledge and applications, such as: medicine, agriculture, cosmetics, clothing, and others. This knowledge and applications bring about a continuous increase in the production, use and disposal of materials nanoparticulate in the environment. The behavior, impact and (bio) activity of the materials in the atmosphere, water and soil, and environment in general are not completely studied. Furthermore, a detailed analysis is needed on the risks of contamination, possible effects and impacts that nanoparticles (NPs) can cause in biological systems. In order to investigate these effects in plants, we used metallic silver NPs (AgNPs) and copper oxide (CuONPs) in the *Sesbania virgata* seed germination to evaluate the possible effects of these NPs on the germination process, when the photosynthetic system is not completely formed. In this study we used the fluorescence image technique of chlorophyll a, associated to image thermal analysis and root growth. The experimental results showed that the NPs decrease the emission of the maximum fluorescence of the chlorophyll dependent on the concentration of NPs and increased the amount of energy dissipated by non-photochemical pathways. The results showed that there was a change in seed temperature and a reduction in root size. In addition, it can be observed that, when submitted to different concentrations of copper oxide NPNs (CuONPs) and metallic silver (AgNPs), the photosynthetic apparatus has been modified, impacting on plant development and root growth.

**Keyword:** Nanomaterials, chlorophyll fluorescence, oxidative stress, germination, root growth.



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ag	<b>Prata</b>
AgNPs	<b>Nanopartículas de prata</b>
CCD	<b>Charge-Coupled Device</b>
Cd	<b>Cádmio</b>
Chl	<b>Clorofila</b>
Chl <i>a</i>	<b>Clorofila <i>a</i></b>
Cu	<b>Cobre</b>
CuO	<b>Óxido de Cobre</b>
CuONPs	<b>Nanopartículas de óxido de cobre (II)</b>
DNA	<b>Deoxyribonucleic Acid</b>
EDS	<b>Energy Dispersive X-ray Spectroscopy</b>
Fe	<b>Ferro</b>
Fm	<b>Fluorescência máxima</b>
Fm'	<b>Fluorescência máxima fase clara</b>
FSI	<b>Fotossistema I</b>
FSII	<b>Fotossistema II</b>
HIV	<b>Human Immunodeficiency Virus</b>
MEV	<b>Microscopia Eletrônica de Varredura</b>
NMs	<b>Nanomateriais</b>
NPQ	<b>Non-Photochemical Quenching</b>
NPs	<b>Nanopartículas</b>
TiO <sub>2</sub>	<b>Dióxido de titânio</b>
UV-Vis	<b>Luz Ultravioleta e Visível</b>
Zn	<b>Zinco</b>
ZnO	<b>Óxido de Zinco</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Cinética característica da emissão de fluorescência.  $F_0$ : fluorescência mínima da planta adaptada ao escuro.  $PS$ : pulso saturante.  $F_m$ : fluorescência máxima da planta adaptada ao escuro.  $F_P$ : pico de fluorescência no início da iluminação.  $F'$ : fluorescência da planta adaptada à luz.  $F_m'$ : fluorescência máxima da planta adaptada à luz.  $F_0'$ : fluorescência mínima no término da cinética [39] ..... **20**
- Figura 2:** Arbusto (A), fruto maduro com sementes (B), flores (C) e sementes (D) de *Sesbania virgata* [48]. ..... **22**
- Figura 3:** Sementes de *Sesbania virgata*: (a) semente antes da escarificação, (b) semente escarificada e (c) semente após a embebição de 24h. Foto: Eliene Santos ..... **26**
- Figura 4:** Procedimento de embebição de *Sesbania virgata* em agitação. Foto: Eliene Santos ..... **27**
- Figura 5:** Termográfica Testo 881. Imagem térmica de plântulas de *Sesbania virgata*. Foto: Eliene Santos ..... **28**
- Figura 6:** Photon Systems Instruments, FluorCam 800MF, e imagem de fluorescência de clorofila A. Foto: Eliene Santos ..... **29**
- Figura 7:** Espectro fluorímetro portátil composto por dois lasers, um monocromador, um *laptop* e uma fibra óptica do tipo Y e plântula de *Sesbania virgata* com 72h. Foto: Eliene Santos ..... **29**
- Figura 8:** Paquímetro com medida da raiz das plântulas de *Sesbania virgata*. Foto: Eliene Santos ..... **30**
- Figura 9:** (a) Imagem de MEV das nanopartículas de prata (AgNP), na escala de 8  $\mu\text{m}$ . (b) Análise de EDS..... **31**

<b>Figura 10:</b> (a) Imagem de MEV das nanopartículas de óxido de cobre (CuONP), na escala de 8 $\mu\text{m}$ . (b) Análise de EDS .....	<b>32</b>
<b>Figura 11:</b> Imagem térmica de um lote de plântulas submetida a de 200 $\text{mg L}^{-1}$ de CuONPs .....	<b>33</b>
<b>Figura 12:</b> Temperatura média de 12 sementes de <i>Sesbania virgata</i> em função do tempo em todas as concentrações de CuONPs (< 50nm) comparadas com a controle (0 $\text{mg L}^{-1}$ ). * Diferença significativa (teste T, $p < 0,05$ , $n = 12$ ).....	<b>33</b>
<b>Figura 13:</b> Imagens de $F_m'$ e $NPQ'$ , 120 h após a imersão em 0 e 200 $\text{mg L}^{-1}$ de CuONPs, obtidas por meio de imagem de fluorescência da clorofila <i>a</i> . .....	<b>34</b>
<b>Figura 14:</b> $F_m'$ média de 12 sementes de <i>Sesbania virgata</i> , em função do tempo, após embebição de 24h de solução aquosa de 0, 100, 200, 300 e 400 $\text{mg L}^{-1}$ de CuONPs (< 50nm). * Diferença significativa (teste T, $p < 0,05$ , $n = 12$ ). .....	<b>35</b>
<b>Figura 15:</b> $NPQ'$ da média de 12 sementes de <i>Sesbania virgata</i> em função do tempo após serem submetidas a 0, 100, 200, 300 e 400 $\text{mg L}^{-1}$ de óxido de cobre (CuONPs) (< 50nm). * Diferença significativa (teste T, $p < 0,05$ , $n = 12$ ).....	<b>36</b>
<b>Figura 16:</b> Intensidade de fluorescência das plântulas de <i>Sesbania virgata</i> com diferentes concentrações de NPs de óxido de Cobre (CuONPs), com excitação em 405 nm, as 120h de germinação.....	<b>37</b>
<b>Figura 17:</b> Razão F685/F735 em função da concentração de NPs de óxido de Cobre (CuONPs), com excitação em 405 nm, em 120h de germinação (5 dias). .....	<b>37</b>
<b>Figura 18:</b> Plântulas de <i>Sesbania virgata</i> em todas as concentrações de CuONPs em 72h (3 dias) após embebição. Foto: Eliene Santos .....	<b>38</b>
<b>Figura 19:</b> Sementes de <i>Sesbania virgata</i> em processo de emergência com 0 e 200 $\text{mg L}^{-1}$ CuONPs. Foto Eliene Santos.....	<b>38</b>

<b>Figura 20:</b> Raiz de plântulas de <i>Sesbania virgata</i> com diferentes concentrações de CuONPs. Foto: Eliene Santos.....	<b>39</b>
<b>Figura 21:</b> Valores médios de comprimento das raízes de plântulas de <i>Sesbania virgata</i> para quatro concentrações de CuONPs, comparadas com as médias do comprimento do controle (H <sub>2</sub> O). * Diferença significativa (teste T, p < 0,05, n = 12).....	<b>39</b>
<b>Figura 22:</b> Imagem térmica das 12 plântulas de <i>Sesbania virgata</i> que foram submetidas a 300 mg L <sup>-1</sup> de AgNPs. ....	<b>41</b>
<b>Figura 23:</b> Temperatura média de 12 sementes de <i>Sesbania virgata</i> em função do tempo após serem submetidas a 0, 100, 200 e 300 e 400 mg L <sup>-1</sup> de AgNPs (< 100nm). * Diferença significativa (teste T, p < 0.05, n =12).....	<b>42</b>
<b>Figura 24:</b> Imagens de Fm' e NPQ', das plântulas de <i>Sesbania virgata</i> 120 h após a embebição em concentrações de 0 e 300 mg L <sup>-1</sup> de AgNPs, obtidas por meio de imagem de fluorescência cinética da clorofila .....	<b>42</b>
<b>Figura 25:</b> Fm', média de 12 sementes de <i>Sesbania virgata</i> , em função do tempo, após embebição de 0, 100, 200, 300 e 400 mg L <sup>-1</sup> de AgNPs (< 100nm). * Diferença significativa (teste T, p < 0,05, n = 12).....	<b>43</b>
<b>Figura 26:</b> NPQ' da média de 12 sementes de <i>Sesbania virgata</i> em função do tempo após serem submetidas a 0, 100, 200, 300 e 400 mg L <sup>-1</sup> de AgNPs (< 100nm). * Diferença significativa (teste T, p < 0,05, n = 12).....	<b>44</b>
<b>Figura 27:</b> Intensidade de fluorescência das plântulas de <i>Sesbania virgata</i> com diferentes concentrações de NPs de prata metálica (AgNPs), com excitação em 405 nm, após 120h (5 dias) de emergência. ....	<b>45</b>
<b>Figura 28:</b> Razão F685/F735 em função da concentração de NPs de prata (AgNPs), com excitação em 405 nm, após 120h de emergência.....	<b>45</b>

**Figura 29:** Plântulas de *Sesbania virgata* em todas as concentrações em 72h (3 dias) após embebição. Foto: Eliene Santos..... **46**

**Figura 30:** Plântulas de *Sesbania virgata* em processo de germinação com água e 300 mg L<sup>-1</sup> AgNPs, durante a germinação. Foto: Eliene Santos ..... **46**

**Figura 31:** Raiz das plântulas de *Sesbania virgata* com diferentes concentrações de AgNPs. Foto: Eliene Santos. .... **47**

**Figura 32:** Valores médios de comprimento para quatro concentrações de AgNPs, comparadas com as medias do controle (H<sub>2</sub>O). \* Diferença significativa (teste *t*, *p* < 0,05, *n* = 12)..... **47**

## SUMÁRIO

CAPÍTULO I .....	12
1. INTRODUÇÃO .....	12
1.1. História da nanotecnologia .....	12
1.2. Propriedades das nanopartículas .....	12
1.3. Aplicações dos nanomateriais .....	13
1.4. Questões ambientais e nanomateriais .....	15
1.5. Estudo de plantas como (bio)indicadores ambientais .....	16
1.6. Técnicas para estudo e detecção de estresse de plantas. ....	18
1.6.1. Fluorescência da clorofila <i>a</i> .....	18
1.6.2. Termografia.....	21
1.6.3. Biometria da raiz.....	22
1.7. Caracterização das sementes .....	22
CAPÍTULO II.....	24
2. OBJETIVOS .....	24
2.1. Objetivo geral.....	24
2.2. Objetivos específicos.....	24
CAPÍTULO III.....	25
3. METODOLOGIA.....	25
3.1. Partículas metálicas (AgNP) e óxido (CuONP) .....	25
3.2. Caracterização das nanopartículas.....	25
3.3. Sementes.....	26
3.4. Sistema de análise térmica por imagem .....	27
3.5. Fluorescência da clorofila A por imagem .....	28
3.6 Fluorescência molecular.....	29
3.7 Tamanho da raiz .....	30
CAPÍTULO IV .....	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	31
4.1. Caracterização do metal (Ag <sup>0</sup> ) e óxido metálico (CuO).....	31
4.2. Análises das sementes de <i>Sesbania virgata</i> em função da concentração de nanopartículas de óxido de Cobre (CuONPs) .....	32
4.2.1. Imagem térmica.....	32

4.2.2. Fluorescência da clorofila A .....	34
4.2.3. Fluorescência molecular .....	36
4.2.4. Tamanho da raiz.....	38
4.3. Análises das sementes de <i>Sesbania virgata</i> em função da concentração de nanopartículas de Prata metálica (AgNPs).....	41
4.3.1. Imagem térmica.....	41
4.3.2. Fluorescência da clorofila A .....	42
4.3.3. Fluorescência molecular .....	44
4.3.4 Tamanho da raiz.....	46
CAPÍTULO V.....	49
5. CONCLUSÃO.....	49
AGRADECIMENTOS .....	51
SUGESTÕES PARA OS PRÓXIMOS TRABALHOS .....	52
REFERÊNCIAS e NOTAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53

# CAPÍTULO I

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. História da nanotecnologia

O marco inicial da nanotecnologia foi quando o físico Richard Feynman (Prêmio Nobel de Física em 1965) que, apesar de não utilizar esse termo, afirmou que, em breve, os cientistas poderiam manipular a matéria ao nível atômico, ao proferir uma palestra intitulada '*Há muito espaço lá fundo*', no Encontro Anual da Sociedade Americana de Física, em 29 de dezembro de 1959. Desde então, os progressos no campo da nanociência e aplicações práticas apresentaram um ritmo intenso e crescente. Depois de quase uma década e meia, surgia a primeira definição do termo nanotecnologia, em 1974 na Universidade Científica de Tóquio, proposta pelo japonês Norio Taniguchi, que cunhou o termo para descrever os processos de semicondutores que ocorreram na ordem de um nanômetro. Taniguchi defendeu que a nanotecnologia consistia no processamento, isolamento, consolidação, e deformação dos materiais por um átomo ou uma molécula [1].

Nas décadas de 80 e 90 surgiram teorias em torno dessa definição japonesa, porém somente a partir do ano 2000 é que essa tecnologia foi desenvolvida efetivamente em laboratórios, e logo, aplicada a partir de pesquisas que alcançaram grandes avanços tecnológicos, sendo hoje o centro das atenções de pesquisadores, cientistas e governos de todo o mundo com aplicações abrangentes em todas as áreas do conhecimento. Com isso, surgiram novas tecnologias e\ou foram aprimoradas resultando no aumento da produção, aplicação e usos em controle de processos, produtos, materiais e substâncias, interferindo intensamente na economia mundial. Como resultado dessa prática, a quantidade de nanomateriais (NMs) que possuem extensa área superficial e reatividade química diferenciada está sendo descartada como resíduo no ambiente de forma contínua e progressiva, sem que se tenha conhecimento dos efeitos adversos [2].

### 1.2. Propriedades das nanopartículas

A definição mais aceita para o termo (nano)materiais (NMs) inclui partículas naturais ou produzidas pelo homem com pelo menos uma dimensão menor que 100nm, e



nanopartículas (NPs) são amplamente aceitas como materiais com pelo menos duas dimensões inferiores a 100nm [3].

Devido a sua menor dimensão, em relação aos materiais a granel, as NPs possuem propriedades químicas, físicas e biológicas diferenciadas. Essas NPs possuem elevada área superficial específica (razão entre a área superficial e a massa da partícula) e energia de superfície elevada (reatividade superficial), pois estas NPs apresentam abundantes sítios reativos na superfície como consequência de uma grande fração de átomos (> 50%) localizados no exterior\superfície em relação ao interior da partícula [4]. Com isso, muitas propriedades e comportamentos dos materiais nanoparticulados devem considerar o tamanho da partícula. Este ponto de vista é de suma importância para avaliar os efeitos que podem estas podem produzir. Estas características das NPs mudam a natureza das interações das forças entre átomos\moléculas do material, altera a reatividade e os processos nos produtos com incorporação de nanotecnologias. Após a incorporação de NPs, estes produtos ao serem descartados, podem causar impactos negativos ao meio ambiente, à saúde humana e à sociedade [5]. Estes fatos são preocupantes devido aos possíveis riscos de contaminação ambiental em razão da produção e uso intenso das NPs após seu descarte no meio ambiente [6].

Há indícios\evidências de estudos realizados pela comunidade científica que as NPs são quimicamente mais reativas, e devido a isso, possuem maior acesso aos organismos e sistemas biológicos, por permeação celular e exercendo intensa atividade biológica, principalmente, por estressar os organismos, possuir maior biodisponibilidade e (bio)atividade quando comparadas às partículas de tamanhos maiores. Sendo assim, em contato com o ambiente podem interagir e impactar de forma diferenciada o meio ambiente devido a sua (bio)persistência, que podem acumular-se em órgãos vitais como pulmões e cérebro, causando danos continuados aos organismos [7].

### **1.3. Aplicações dos nanomateriais**

Os mais recentes avanços tecnológicos têm levado ao desenvolvimento de uma grande quantidade de produtos e intenso consumo de nanomateriais (NMs). Alguns exemplos são mostrados abaixo: a) purificação, tratamento e dessalinização da água. Esta é uma aplicação muito prática dos NMs. As NPs podem ser utilizados, por exemplo,

nanotubos de carbono, sistemas nanoeletrocatalíticos e nano-sensores, que servem para desintoxicar a água, decompor poluentes orgânicos e inorgânicos e detectar agentes patogênicos [8]; b) sistemas de tratamento da poluição ambiental, possibilitando o desenvolvimento de dispositivos\ sistemas baseados em nanodispositivos que podem detectar e absorver gases tóxicos assim como armazenar dados a respeito da biodiversidade local [8]; c) produção, conversão e armazenamento de energia, fornecendo energia mais limpa, acessível, confiável e de fácil manutenção. O aproveitamento de recursos renováveis pode evitar crises energéticas, causadas pela dependência de fontes não renováveis. Alguns exemplos são os nanocompósitos e os filmes ultrafinos de polímeros semicondutores aplicados em células solares de alta eficiência; “*quantum dots*” baseados em dispositivos orgânicos emissores de luz; nanocatalisadores; nanotubos de carbono usados em pilhas e supercapacitores, além de outros nanomateriais leves utilizados em sistemas robustos de armazenamento de hidrogênio bem como em distribuição de energia elétrica mais eficiente [8]; d) usos na medicina por avanços trazidos pela nanotecnologia no diagnóstico e tratamento de doenças como em distúrbios graves como câncer, HIV, doenças neurodegenerativas, doenças autoimunes e genéticas podem ser combatidas por nanodrogas e nanodispositivos produzidos a partir de nanofios, *quantum dots*, nanoshells, nanopartículas de ouro, nanotubos de carbono, nanopartículas magnéticas e nanogéis. Nessa área, a nanotecnologia traz a promessa de uma medicina mais personalizada, com diagnóstico e tratamento mais individualizado [8-10]; e) aplicações no setor agroalimentar, a nanotecnologia tem o potencial para revolucionar o sistema global. Novos sistemas de segurança agrícolas e alimentares, métodos de entrega de tratamento de doença, ferramentas de biologia molecular e celular, sensores para detecção de patógenos, pesticidas, materiais de embalagem e proteção ambiental são exemplos do importante impacto que a nanotecnologia poderia trazer sobre a ciência e engenharia dos sistemas agrícolas e alimentares [11,12].

Assim, devido ao grande número de materiais nanoparticulados, este estudo foi realizado com prata (AgNPs) e o óxido de cobre (CuONP) em dimensões nanométricas, devido a atividade biológica e antimicrobiana [13,14]. A eficácia bactericida das NPs ocorre devido a reatividade dos íons metálicos que, por sua pequena dimensão e a alta área superficial, causam danos irreparáveis aos lipídeos, proteínas e DNA dos microrganismos por estresse oxidativo e produção de espécies radicais [15]. De outra forma, estas

propriedades proporcionam uma ampla variedade de aplicações comerciais dessas NPs, tal como na indústria cosmética e médica.

Na área têxtil, por exemplo, uma solução comercial chamada “*silverclear™*” é aplicada na confecção de sapatos, meias e roupas esportivas. O suor\umidade, substrato e aumento de temperatura produzido durante as atividades esportivas fornece o ambiente ideal para o crescimento de bactérias, como a *Staphylococcus aureus*, gerando mau cheiro e causando doenças infecciosas. Assim, as roupas esportivas com antibactericidas podem proteger os atletas contra diferentes microrganismos e\ou odores desagradáveis e aumentar a durabilidade do tecido a partir das fibras dos tecidos contra danos e decomposição [15]. Outros materiais nanoparticulados que são utilizados na nanotecnologia são o dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>) e o óxido de zinco (ZnO). Ambos têm sido usados em produtos como protetores solares, produtos farmacêuticos e em revestimentos protetores contra a radiação ultravioleta e outras aplicações [16].

#### **1.4. Questões ambientais e nanomateriais**

A nanotecnologia é um campo em contínuo crescimento, seus contínuos conhecimentos podem ser aplicados em diferentes setores e áreas, pois possui o potencial para beneficiar a saúde humana e, apesar dos riscos, também o ambiente, com isso, a quantidade de NMs que estão entrando nos fluxos de resíduos está aumentando progressivamente [18]; porém, é necessário considerarmos os riscos e impactos que a produção, uso e descarte contínuo de NPs utilizadas nas aplicações e tecnologias que possam causar ao ambiente, aos sistemas e cadeias biológicas e (micro)organismos [17]. A possível interação de NPs com ecossistemas e organismos devem-se pelo fato de produtos comerciais liberarem para o ambiente este material nanoparticulado, como exemplo, a utilização de NPs de Ag<sup>0</sup> no setor têxtil, ou TiO<sub>2</sub> em cosméticos. Dessa forma, os estudos realizados devem considerar como hipótese os potenciais riscos, principalmente, devido ao nível de exposição da humanidade e meio ambiente, visto que estes resultados não seriam observáveis, pelo menos, em médio prazo [19].

Os impactos causados pelo lançamento de cargas poluidoras com nanopartículas (NPs) e\ou nanomateriais (NMs) e os cenários de intervenção são alvos de interesse, principalmente, para as plantas que são parte importante dos ecossistemas e, podem ser

capazes de remover, imobilizar ou até indisponibilizar nanomateriais, além de sofrer os impactos no sistema biológico, podem, apesar do impacto no seu metabolismo, tornar-se inofensivas as NPs no ecossistema, assim, como contaminantes orgânicos e inorgânicos presentes no solo e/ou na água (fitoabsorção), mas também sofrer os impactos da sua atividade biológica [20].

### 1.5. Estudo de plantas como (bio)indicadores ambientais

Os bioindicadores ou indicadores ambientais são importantes para correlacionar como determinado fator antrópico (alterações provocadas pelo homem) ou um fator natural com potencial impactante, podem representar uma importante ferramenta na avaliação da integridade ecológica, como na “condição de saúde” de uma área ou organismo. Estes estudos podem ser realizados pela comparação de indivíduos, estrutura e função de uma comunidade biológica entre uma área impactada e áreas de referência [21]. Por exemplo, *Pistia stratiotes* e *Eichhornia crassipes* são espécies indicadoras de ambientes aquáticos poluídos, pois se desenvolvem em locais com altas concentrações de matéria orgânica, micro e macronutrientes. Estas espécies são utilizadas como indicadores dos níveis de poluição do meio, por possuírem uma grande taxa de crescimento, e excelente capacidade de absorver e concentrar poluentes metálicos em sistemas aquáticos, não apresentando sintomas de intoxicação em níveis elevados de concentração presentes nos mesmos [22]. Espécies, como *Utricularia breviscapa* (utricularia), *Nymphaea elegans* (lírios d’água) e *Nymphoides indica* (ninfa) são bioindicadoras de ambiente pouco poluído [23].

Em estudos agronômicos de interações plantas e metais foi observado que o excesso de Zn reduziu a translocação de Fe para as partes aéreas da soja. A presença de Zn inibe o metabolismo de Fe, assim demonstrando que em casos severos, se caracteriza por quedas de níveis de clorofila, deixando folhas totalmente cloróticas e posteriormente esbranquiçadas, acentuando o atraso no crescimento da planta [24]. Assim como a baixa concentração de Zn na planta expõe aos efeitos de altas concentrações de Cd, corroborando para que o Zn proteja as plantas contra a toxicidade do Cd, atribuindo as interações competitivas entre Zn e Cd a existência de um sistema de transporte comum nas membranas celulares [25].

Em outros estudos realizados “*in vivo*”, pode-se mostrar que as NPs de ouro ( $\text{Au}^0$ ) induzem extinção de fluorescência da clorofila *a* e que a extinção depende do tamanho e concentração dessas nanopartículas. Este fenômeno é principalmente atribuído ao efeito da transferência de elétrons ( $e^-$ ) através de fotoindução de moléculas de clorofila submetidas à NPs de ouro (AuNPs), resultando em um decréscimo do sinal de fluorescência da clorofila. A fluorescência que teve maior efeito de supressão foi induzida pelo AuNPs, com tamanho de 5 nm [26]. Os resultados também evidenciaram em outro estudo que as AgNPs quando associada a fluorescência da Chl contribui para a redução do tempo de vida do organismo. Além disso, a interação de Chl-AgNPs resultante é dependente do tamanho e concentração das NPs do metal [27]. Em outros estudos mais recentes sobre a interação de clorofila e NPs de metais, ficou evidenciado nos resultados que a fluorescência da Chl *a* é fortemente afetada pela AgNPs, sugerindo que a análise dessa fluorescência possui potencial de uso futuro como uma ferramenta analítica para o monitoramento da interação de plantas e NPs, e análise de seus respectivos efeitos em plantas ou partes dos organismos vegetais [28].

Outro estudo investigou o impacto das AgNPs em relação à taxa de germinação, crescimento de plântulas, peroxidase, atividade enzimática e teor de clorofila em nabo forrageiro. O resultado obtido mostrou que a concentração utilizada de AgNPs não teve nenhum efeito significativo sobre a germinação das sementes, porém quando analisados parâmetros como o comprimento e a massa da raiz, estes foram significativamente reduzidos quando expostos a essa mesma concentração [29].

Pesquisas realizada com a planta *Cicer arietinum L* (grão-de-bico) exposta a diferentes concentrações de NPs de óxido de cobre (CuONP), demonstrou que as NPs interferiram no crescimento da planta, causando um retardo no crescimento das raízes e do caule [30]. Outro estudo mostrou que o crescimento de arroz (*Oryza sativa cv. Swarna*) em três diferentes níveis de estresse causados por NPs de óxido de cobre II (0,5 mM, 1,0 mM e 1,5 mM de CuO, <50 nm de tamanho de partícula). A partir dos resultados pode-se, concluir que a porcentagem de germinação da planta foi significativamente reduzida. Além disso, ficou evidente que, nas folhas, ocorreram erupções oxidativas [31]. Em outro estudo analisou-se os efeitos de NPs de óxido de cobre (NPCuO) sobre a germinação de mudas de ervilha verde (*Pisum sativum L.*), em diferentes concentrações (0, 50, 100, 200, 400 e 500  $\text{mg dm}^{-3}$ ). Os resultados experimentais obtidos demonstraram que houve uma redução significativa no crescimento das plantas (parte aérea e comprimento das raízes),

aumentaram a geração de espécies reativas de oxigênio, EROs (em inglês, ROS) e ocorreu peroxidação lipídica, que é a degradação oxidativa dos lipídios induzidos por NPs [32].

Embora as metodologias voltadas a detecção das espécies reativas de oxigênio ou de compostos associados à reação com antioxidantes\ sistema antioxidantes sejam importantes e eficientes na avaliação dos efeitos das NPs como contaminante biológico, a aplicação de metodologias não destrutivas\ imagens são partes importantes para o entendimento de seus efeitos “*in situ*”, podendo detalhar a atividade biológica de NPs na planta ou partes da planta, além de implicar em medidas rápidas e de baixo custo.

## **1.6. Técnicas para estudo e detecção de estresse de plantas.**

### **1.6.1. Fluorescência da clorofila *a***

A fluorescência da clorofila *a* tem sido utilizada como técnica precisa e não destrutiva no estudo da eficiência fotossintética, indicando direta ou indiretamente os reflexos dos impactos de fatores ambientais e mudanças no estado fisiológico das plantas sob diferentes condições de estresse e não estresse [33]. Estudos mostraram que a eficiência fotossintética das plantas diminui quando são submetidas a condições de estresse [34,35]. Com isso, a fluorescência da clorofila tem sido usada como um método simples e eficaz para investigar o “*status*” fisiológico do complexo fotossintético em plantas, identificar classes de plantas, suas peculiaridades\ susceptibilidades para detecção de estresse causado pela deficiência de nutrientes, água, metais ou agentes poluidores, incluindo as NPs [36].

A medida da fluorescência da clorofila *a* está relacionada com a capacidade fotossintética das plantas sob diferentes condições experimentais para sua manutenção e sobrevivência. A fluorescência da clorofila *a* 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. A fluorescência é emitida, primariamente, pela clorofila *a* presente no **Fotossistema II (FSII)**, e se constitui em um modo de dissipação do excesso de energia nestes sistemas biológicos [37].

A energia luminosa absorvida pelos fotossistemas vegetais pode ser empregada de três maneiras distintas:

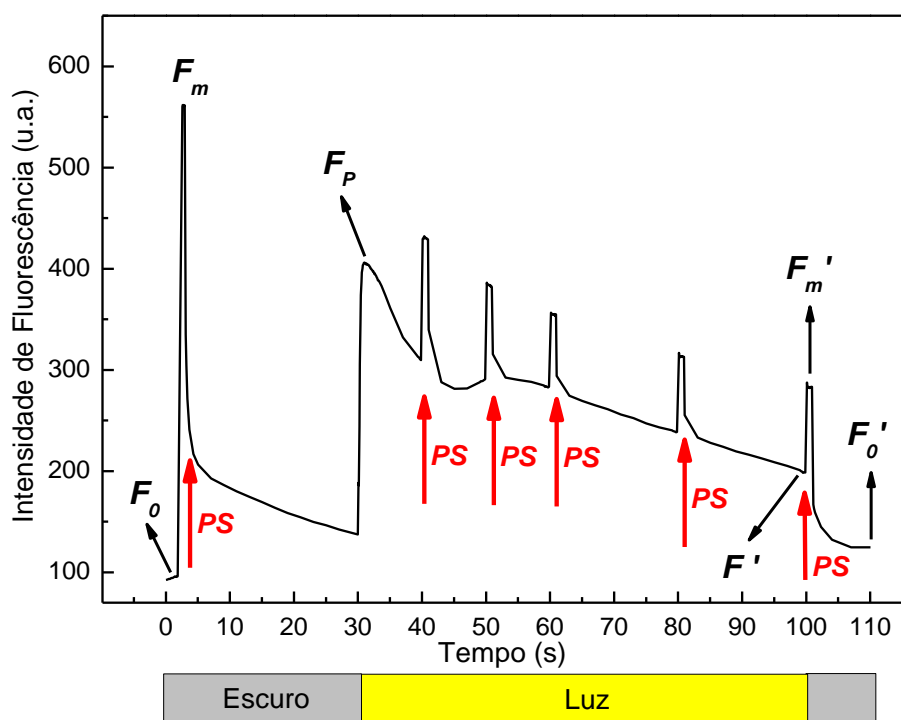
1) *via fotoquímica*: que é basicamente o uso da energia luminosa na produção bioquímica da planta durante a fotossíntese;

2) *via não fotoquímica*: que é parcela de energia dissipada de várias formas, principalmente, por calor em forma de radiação infravermelha (IV);

3) *via fluorescência*: onde a energia é convertida na emissão de luz ao ambiente.

Para eliminar a parcela de energia fotoquímica é necessário a aplicação de um pulso saturante na planta, após sua adaptação no escuro. Além disso, o pulso saturante, por conter energia em excesso, promove um máximo rendimento da emissão de fluorescência (Fm). Dessa maneira, ao trabalhar com essas três vias concorrentes de consumo de energia que a planta utiliza, é possível estudar o “*status*” do aparato fotossintético por meio da análise comparativa das intensidades de emissão do **Fotossistema II** medidas durante a cinética [33,38].

A técnica de fluorescência cinética por imagem é uma técnica eficiente para o estudo da fluorescência da clorofila *a*, pois baseia-se na coleta da emissão de luz na região de 680 nm por meio de uma câmera CCD (do inglês: Charge-Coupled Device), essa coleta de imagens é realizada em tempo real. Durante a ocorrência dessa cinética, a emissão de fluorescência é medida várias vezes, tendo início na fase em que a planta ainda está adaptada ao escuro, sendo monitorada no tempo, após a incidência de pulsos saturantes e também na fase em que planta é exposta à luz. A medida dessas intensidades de emissão de fluorescência durante a cinética torna possível a determinação de parâmetros importantes no estudo do funcionamento do aparato fotossintético das plantas. Os parâmetros podem ser medidos em cada pulso saturante, entretanto, para atingir o estado estacionário de adaptação à luz, é importante fazê-lo em tempos maiores [38] (**Figura 1**).



**Figura 1:** Cinética característica da emissão de fluorescência.  $F_o$ : fluorescência mínima da planta adaptada ao escuro.  $PS$ : pulso saturante.  $F_m$ : fluorescência máxima da planta adaptada ao escuro.  $F_p$ : pico de fluorescência no início da iluminação.  $F'$ : fluorescência da planta adaptada à luz.  $F_m'$ : fluorescência máxima da planta adaptada à luz.  $F_o'$ : fluorescência mínima no término da cinética [39]

A aplicação de um pulso de saturação sob iluminação actínica fecha de forma transitória todos os centros de reação e fornece um valor de fluorescência máxima no estado adaptado à luz, denominado **Fm**. Na fase da cinética em que a luz branca (visível) 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* (dissipação) não fotoquímica (NPQ) (equação 1). É importante notar que a intensidade da fluorescência máxima da planta na fase exposta à luz (**Fm'**) é menor que a fluorescência máxima na fase adaptada ao escuro (**Fm**) [38]. Isso porque na fase clara, parte da energia está sendo consumida pelo NPQ, o que não acontece no primeiro pulso saturante, pelo fato da planta estar totalmente adaptada ao escuro.

Assim, o NPQ é um importante parâmetro no estudo do aparato fotossintético das plantas, fornecendo informações sobre a dissipação de energia na forma não-fotoquímica [38, 42]. A equação para cálculo do NPQ é mostrada na **equação 1**:



$$NPQ' = \frac{F_m - F_m'}{F_m'}$$

(Equação 1)

Analisando a fluorescência da clorofila, usando luz ultravioleta e visível (UV-Vis) os resultados mostram que estas são absorvidas pelas folhas verdes, podendo deduzir duas regiões distintas de fluorescência: as emissões na faixa de comprimentos de onda entre 400 e 600 nm, que está associada a vários fluoróforos e entre 600 e 800 nm que, “*in vivo*”, é produzida apenas pela clorofila *a* (Chl *a*). Nesta região, entre 600 e 800 nm, a maioria da fluorescência, com máximos em 685 e 735 nm, é emitida pela Chl *a* presente no **Fotossistema II (FSII)** em temperatura ambiente. No entanto, pode ocorrer uma pequena contribuição de fluorescência do **Fotossistema I (FSI)** na faixa entre 710 e 720 nm tem sido relatada na literatura [38, 40].

### 1.6.2. Termografia

A termografia vermelha, é uma técnica ainda pouco utilizada e estudada em espécies vegetais, entretanto, é uma técnica que possibilita a visualização da temperatura da superfície foliar de plantas, por meio da detecção da radiação infravermelha emitida (radiação 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 foliar.

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 [42]. A variação da temperatura foliar pode estar relacionada à interferência de fatores ambientais e à taxa transpiratória e\ou outros fatores de estresse foliar, incluindo estresse hídrico.

As modificações do estado hídrico de uma planta podem causar mudanças na transpiração foliar, em função da ativa regulação da condutância estomática. Conforme estudo, as mudanças associadas ao modelo padrão de resfriamento da planta podem ser monitoradas de forma instantânea por meio de imagens termográficas [44]. Desse modo, a fluorescência, especialmente quando combinada com outras medidas não invasivas, tais como a espectroscopia de absorção, a análise das trocas gasosas, pode ser uma poderosa

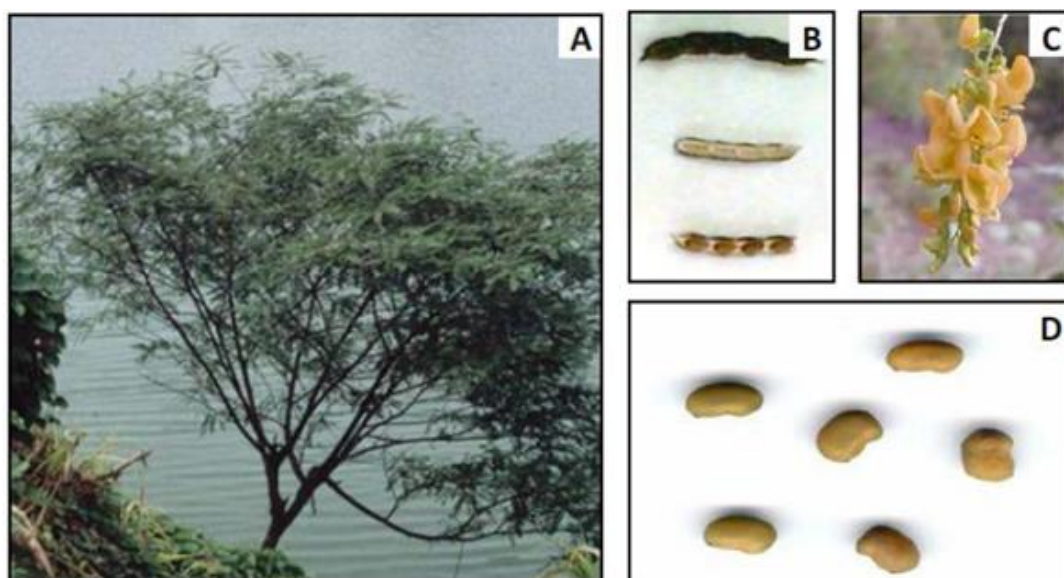
ferramenta para estudar o desempenho fotossintético das plantas e seus interferentes sob diferentes condições [45].

### 1.6.3. Biometria da raiz

A biometria é uma técnica que afere o tamanho da parte aérea e de raízes em plantas, como foi citado anteriormente [29-32]. A técnica avalia o crescimento normal e irregular e a relação dessas alterações/anomalias relacionadas com o estresse. Assim, esse conjunto de técnicas experimentais pode proporcionar o entendimento dos diferentes mecanismos, interações da luz com aparato fotossintético e agentes causadores de estresse ao organismo\parte do organismo em estudo. As análises do comportamento e estresse de plantas expostas às NPs é parte desses estudos com uso dessas técnicas não invasivas.

### 1.7. Caracterização das sementes

*Sesbania virgata* (Cav.) Pers. pertence à família Leguminosae (Fabaceae), sub-família Faboideae (Papilionoideae) [46]. A espécie é popularmente conhecida pelos nomes sesbania, feijãozinho, sarazinho e mãe-josé. O gênero *Sesbania* é caracterizado por possuir espécies tolerantes a solos pobres com alto índice de metais pesados, e elevado nível de adaptabilidade quando submetidas a estresses bióticos e abióticos [47]. *S. virgata* é uma espécie pioneira de crescimento rápido, infestante, perene, reproduzida por semente, com hábito arbustivo que pode atingir de 2 a 4 m de altura (**Figura 2**).



**Figura 2:** Arbusto (A), fruto maduro com sementes (B), flores (C) e sementes (D) de *Sesbania virgata* [48].

*Sesbania virgata* é uma espécie nativa, possui um rápido crescimento e rusticidade, apresentando potencial para plantios em áreas degradadas ou em recuperação, como também áreas em processo de desertificação e recomposição de matas ciliares [49-51]. Esta espécie, além de trazer benefícios físicos para o solo com a alta ramificação do sistema radicular, previne erosão e serve de suporte ao reflorestamento e manutenção dessas áreas em recuperação [52].

A espécie produz um grande número de sementes com alta viabilidade e que são dispersas dentro de frutos indeiscentes que podem flutuar na água para dispersão da espécie [53, 54]. As sementes da espécie possuem germinação rápida e ocorre de forma homogênea, característica pouco comum entre sementes de plantas nativas. As sementes apresentam dormência tegumentar e endosperma que acumula reserva de galactomanano como polissacarídeo na parede celular. O processo germinativo dessas sementes ocorre até o segundo ou terceiro dia após a embebição [55, 56].

## CAPÍTULO II

### 2. OBJETIVOS

#### 2.1. Objetivo geral

O objetivo do estudo é caracterizar as alterações fisiológicas em sementes de *Sesbania virgata* submetidas ao tratamento com diferentes concentrações de NPs de óxido de cobre (CuONP) e prata metálica (AgNP), com o propósito de avaliar o possível impacto que essas nanopartículas podem causar no processo germinativo das sementes.

#### 2.2. Objetivos específicos

- Caracterizar as alterações no processo fotossintético, em formação, das sementes induzidos pelas NPs metálicas;
- Avaliar as mudanças na temperatura superficial das sementes induzido pelas NPs;
- Monitorar possíveis efeitos nocivos das NPs nas sementes dessa espécie nativa;
- Analisar os efeitos das NPs nas sementes, em função da concentração;
- Estudar a viabilidade da técnica de espectroscopia de fluorescência no monitoramento “*in vivo*” da interação NPs-semente\germinação\crescimento;
- Discutir o potencial da técnica de fluorescência da clorofila como uma ferramenta analítica no processo de detecção das alterações fisiológicas induzidas por NPs no crescimento e desenvolvimento de plantas.

## CAPÍTULO III

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. Nanopartículas metálicas: AgNP e óxido metálico (CuONP)

As partículas em dimensões nanométricas utilizadas na pesquisa foram:

- NPs de prata (AgNP) em pó com dimensões nominais < 100 nm, adquiridas da American Elements com distribuição de tamanho definido;
- NPs de óxido de cobre (II) (CuONP) em pó com dimensões nominais < 50 nm, adquiridas da Sigma-Aldrich com distribuição de tamanho definido;

Os experimentos foram realizados em função da concentração das NPs. Nos experimentos realizados, as sementes foram escarificadas por lixamento, para facilitar a hidratação da reserva, logo após, embebidas em solução de AgNP e CuONP nas concentrações de 0 (grupo controle), 100, 200, 300 e 400 mg L<sup>-1</sup>(ppm).

As NPs foram dispersas em soluções aquosas, utilizando-se água ultra-pura MilliQ e agitação em banho ultrassônico por 30 minutos.

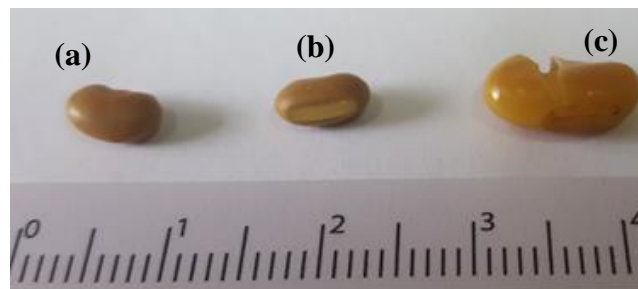
#### 3.2. Caracterização das nanopartículas

As AgNPs (< 100 nm) e CuONPs (~ 50 nm) em pó foram analisados por microscopia eletrônica de varredura (MEV) com sistema de espectroscopia de energia dispersiva de raios-x (do inglês: Energy Dispersive X-ray Spectroscopy - EDS) acoplado. O equipamento é sistema de bancada, marca Phenom-World, modelo Phenom Pro X. O sistema possui resolução nominal  $\geq 14$  nm, ampliação de 80 - 130000x, faixa de detecção elementar que varia do Carbono (C) ao Amerício (Am), fonte de elétrons de CeB6, câmera de navegação colorida com zoom de 20 a 135x e aceleração de voltagem variável de 5 - 15 kV. O equipamento possui um detector EDS do tipo SDD (do inglês: Silicon Drift Detector) contando com software integrado para a determinação da composição elementar, identificando simultaneamente os diferentes elementos da amostra. As medidas foram feitas utilizando fita de carbono para condutividade e deposição das amostras. As análises de MEV foram realizadas na UFGD (Universidade Federal da Grande Dourados).

### 3.3. Sementes

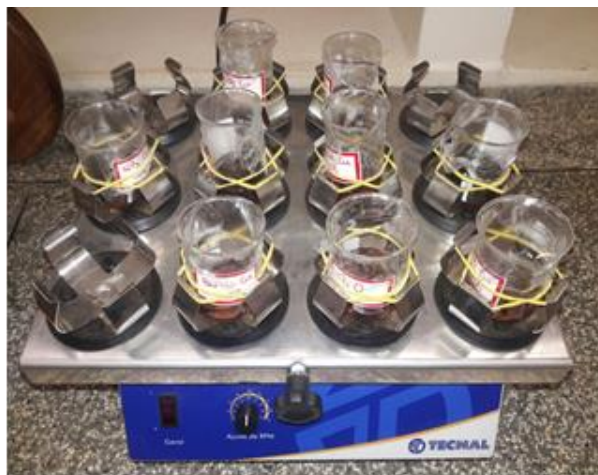
Neste estudo, foram utilizadas as sementes de *Sesbania virgata* coletadas no Pantanal Sul-matogrossense\Passo da Lontra - MS 184, Corumbá/MS em Outubro de 2015. O beneficiamento das sementes foi manual. As sementes foram obtidas a partir de plantas matrizes, em número superior a 20 indivíduos para a manutenção da diversidade genética. No lote de sementes testadas, após beneficiamento foram mantidas em caixa gerbox escura e sob refrigeração.

Antes da germinação, as sementes sofreram um processo de escarificação mecânica por lixamento, que consiste, basicamente, em submeter as sementes a desgaste por fricção, com lixa, para danificar seu tegumento, esse processo é um dos mais eficientes para obter melhor hidratação, permeação e germinação nesta espécie (**Figura 3**) [57].



**Figura 3:** Sementes de *Sesbania virgata*: (a) semente antes da escarificação, (b) semente escarificada e (c) semente após a embebição de 24h. Foto: Eliene Santos

Após essa escarificação, as sementes foram separadas em dois grupos. O primeiro grupo de sementes recebeu a adição de NPs em solução aquosa, em diferentes concentrações; no segundo grupo, houve o controle, recebendo somente água ultra-pura MilliQ. Cada grupo foi mantido submerso em 5mL da solução, dentro de um béquer por 24h em mesa agitadora orbital da marca TECNAL com ajuste de rotação de 5 rpm para facilitar a embebição das sementes e para a melhor absorção/internalização das NPs (**Figura 4**).



**Figura 4:** Procedimento de embebição de *Sesbania virgata* em agitação. Foto: Eliene Santos

Para avaliação da germinação, após a embebição as sementes foram colocadas em placas de Petri com duplo papel filtro umedecido e mantidas em câmara de germinação com controle de temperatura, umidade e fotoperíodo, fornecendo as condições ideais para a germinação e crescimento da espécie. As sementes foram mantidas em temperatura de 25°C, com fotoperíodo de 12/12h claro/escuro e umidade de 65%/70% com intensidade actínica de aproximadamente  $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Para cada concentração de NPs utilizada, foram avaliadas 12 sementes.

As análises “*in vivo*” foram realizadas por 6 dias, as primeiras 24h foram para embebição e a partir do 2º dia foram realizadas as medidas de imagem térmica, fluorescência cinética da clorofila *a* por imagem e fluorescência estacionária durante 5 dias, após esse período foram medidas o tamanho da raiz de cada semente.

Esses procedimentos foram aplicados para o estudo com cada tipo de material proposto, óxido de cobre (CuONP) e prata metálica (AgNP).

### **3.4. Sistema de análise térmica por imagem**

As imagens térmicas foram obtidas por meio de uma câmera termográfica Testo®, detector infravermelho de 2.3 Megapixels de resolução, em que as escalas de temperaturas são indicadas por gradientes de falsa cor (**Figura 5**). O equipamento possui a faixa de temperatura entre (-)20 a 350°C. Uma imagem foi coletada para cada placa de Petri contendo 12 sementes, uma placa para cada concentração testada. A partir do *software* da Testo®, a temperatura média de cada semente foi obtida a partir da análise da temperatura em 12 diferentes pontos da semente e posteriormente foi submetido à análise de variância e

as comparações entre médias foram realizadas usando-se o teste t-Student com confiabilidade de 95%, essas medidas foram realizadas após o período de adaptação ao escuro por 30 minutos, para evitar qualquer alteração de temperatura influenciada por irradiação luminosa e com temperatura controlada em 25°C.



**Figura 5:** Termográfica Testo 881. Imagem térmica de plântulas de *Sesbania virgata*. Foto: Eliene Santos

### 3.5. Fluorescência cinética da clorofila *a* por imagem

Para realizar o estudo da influência das NPs sobre o aparato fotossintético das plantas “*in vivo*” foi aplicada a técnica de fluorescência cinética por imagem, utilizando o equipamento Closed FluorCam FC 800-C da marca Photon Systems Instruments, composto basicamente por painéis de LEDs usados como fonte de excitação com intensidade de luz actínica acima de 2500  $\mu\text{mol}$  (prótons)  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  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 (**Figura 6**). O sistema é fechado, propiciando a adaptação da semente ao escuro, antes de exposta à radiação. Antes das medidas, as sementes foram adaptadas ao escuro por 30 minutos garantindo que todos os centros de reação estejam abertos, obtendo com isso, uma medida mais eficaz da fluorescência. Para a cinética, foi utilizada a luz branca como fonte de excitação, foi empregado um filtro para selecionar somente a emissão da clorofila *a*, na região de 680 nm e as medidas foram realizados em um dos lados da semente. Os parâmetros observados na análise da fluorescência da clorofila foram  $F_m'$  e  $\text{NPQ}'$ .

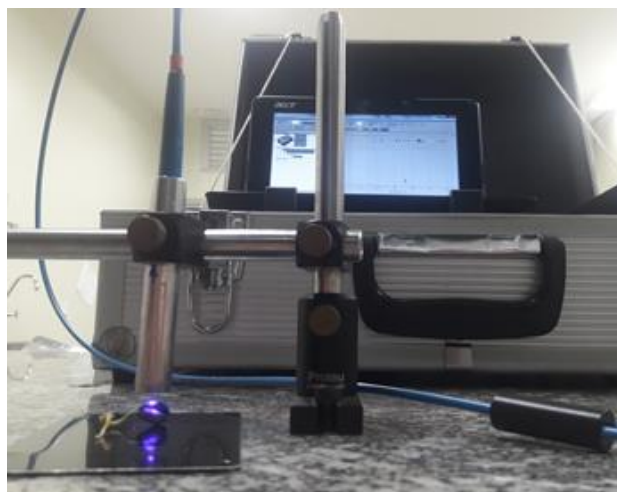




**Figura 6:** Photon Systems Instruments, FluorCam 800MF, e imagem de fluorescência de clorofila A. Foto: Eliene Santos

### 3.6. Fluorescência estacionária

Nas análises de fluorescência das sementes “*in vivo*” foi utilizado um fluorímetro portátil constituído de dois lasers, operantes em 405nm e em 532nm, um monocromador SB 2000 FL – OceanOptics), uma fibra óptica do tipo Y e um *laptop*, para obtenção os espectros. As amostras foram excitadas em 405 nm e os espectros foram obtidos de 450 nm a 800nm (**Figura 7**)



**Figura 7:** Espectro fluorímetro portátil composto por dois lasers, um monocromador, um *laptop* e uma fibra óptica do tipo Y e plântula de *Sesbania virgata* com 72h. Foto: Eliene Santos

As análises foram realizadas diretamente na parte superior de cada semente e foram realizadas durante todos os dias do processo de germinação. Ao final dos 5 dias a medida

foi realizada nas primeiras folhas. A **Figura 7** mostra a aquisição de medidas de fluorescência nas sementes “*in vivo*”.

### 3.7. Tamanho da raiz

Após o período de 06 dias de germinação, o comprimento da raiz foi determinado com o auxílio de um paquímetro da marca Digimess® com precisão de 0,05mm.



**Figura 8:** Paquímetro com medida da raiz das plântulas de *Sesbania virgata*. Foto: Eliene Santos

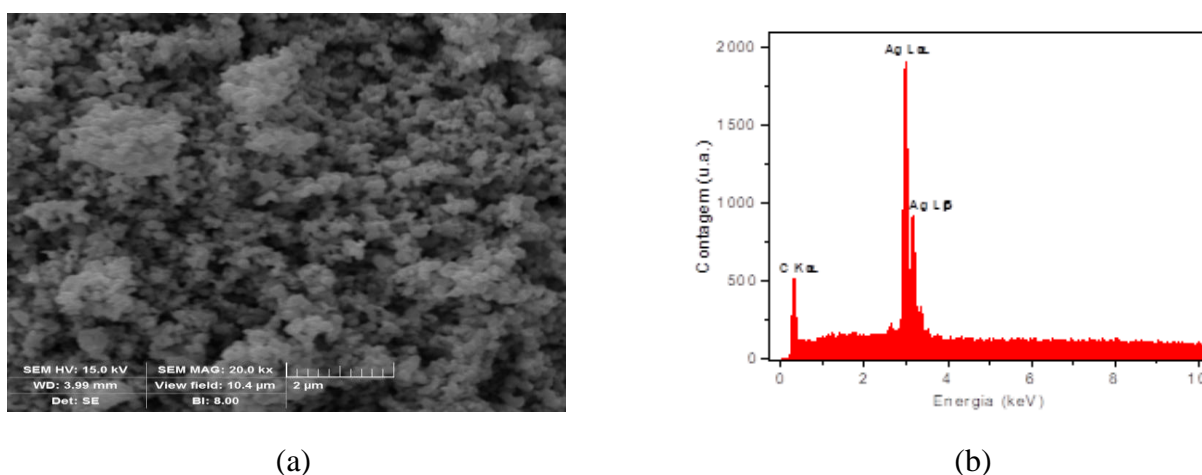
## CAPÍTULO IV

### 4. RESULTADOS E DISCUSÃO

#### 4.1. Caracterização das nanopartículas do metal: (AgNPs) e óxido metálico (CuONPs)

As análises foram realizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), seguidas das análises por espectroscopia de energia dispersiva de raios-x (EDS), nas amostras de CuONPs (~50nm) e AgNPs (<100 nm) utilizadas nos experimentos em função da concentração das partículas. As **Figuras 9 e 10** mostram: **(a)** os resultados das imagens de MEV e **(b)** as análises de EDS, que fornecem os picos de raios-x característicos de cada elemento químico presente nas amostras.

A análise de EDS das AgNPs de 100 nm (**Figura 9 (b)**) apresenta as duas linhas de maior intensidade relativa características da prata, sendo uma delas em 2,984 keV, referente à transição  $L\alpha_1$ , e a segunda em 3,150 keV, referente à transição  $L\beta_1$  da prata. Outros pequenos picos referentes a transições de menor intensidade relativa da prata também são observados na região entre 2 e 4 keV. Na imagem é possível notar um pico característico do carbono, em 0,277 keV, referente à transição  $K\alpha_{1,2}$ , muito provavelmente proveniente da fita de carbono utilizada no porta-amostra.



**Figura 9:** **(a)** Imagem de MEV das nanopartículas de prata (AgNP), na escala de 8 μm. **(b)** Análise de EDS

Os resultados de EDS das amostras de CuONPs (**Figura 10 (b)**) mostram os picos característicos do cobre de maior intensidade relativa: em 0,929 keV referente à transição  $L\alpha_{1,2}$ ; em 0,949 keV referente à transição  $L\beta_1$ ; em 8,047 keV referente à transição  $K\alpha_1$  e em 8,905 keV referente à transição  $K\beta_{1,3}$ . Na amostra também é possível verificar a existência de um pico característico do oxigênio em 0,525 keV das transições  $K\alpha_{1,2}$ , mostrando que as amostras são de óxido de cobre (II).

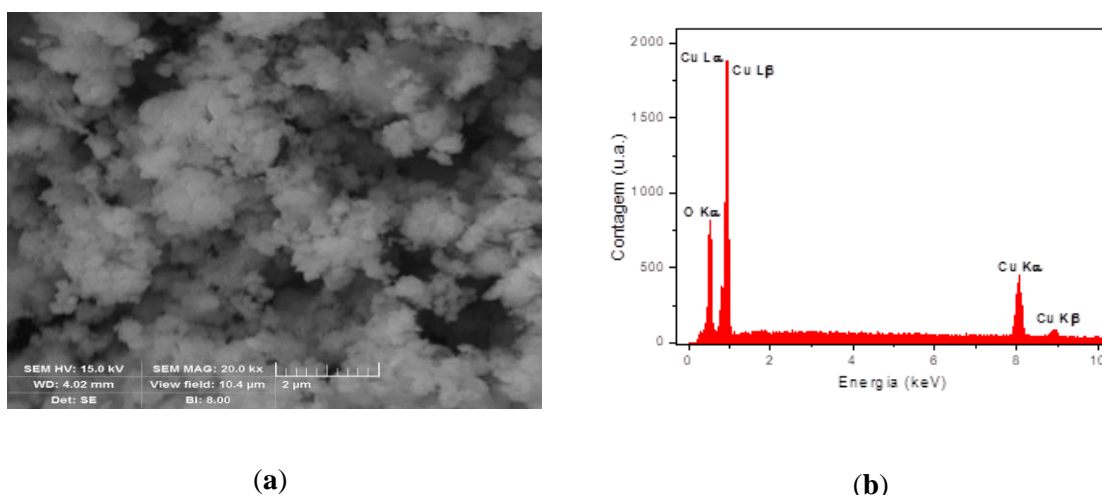


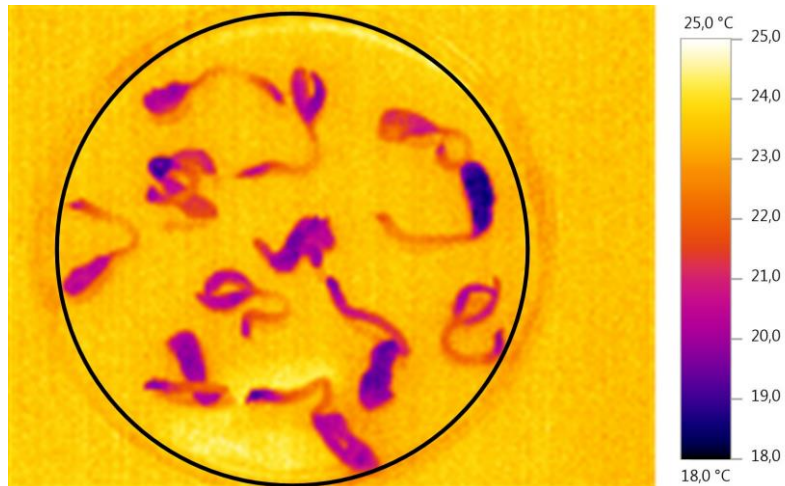
Figura 10: (a) Imagem de MEV das nanopartículas de óxido de cobre (CuONP), na escala de 8  $\mu\text{m}$ . (b) Análise de EDS

## 4.2. Análises das sementes de *Sesbania virgata* em função da concentração de nanopartículas de óxido de Cobre (CuONPs)

### 4.2.1. Imagem térmica

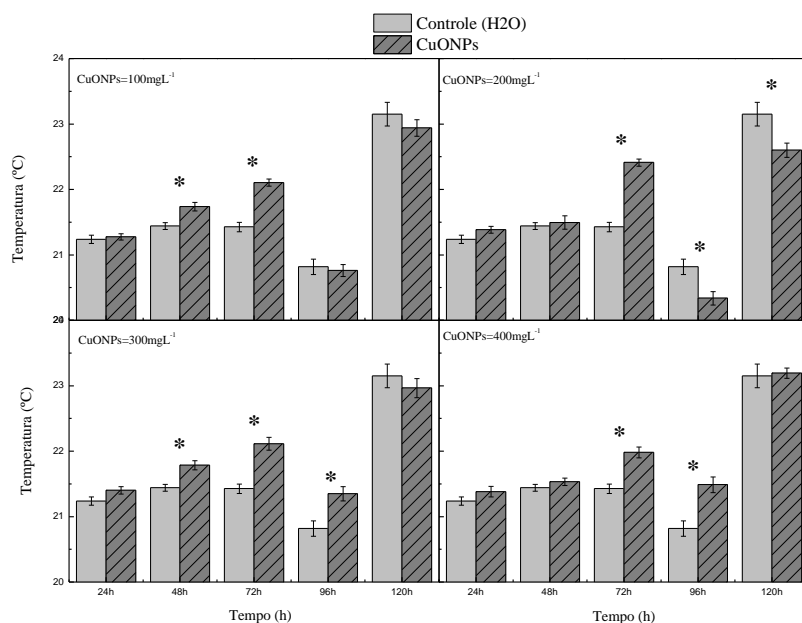
As análises térmicas por imagem realizadas mostraram um aumento significativo na temperatura, principalmente, nas sementes submetidas com CuONPs nos primeiros dias de germinação, porém, pode-se verificar que as sementes recuperaram-se, como é comum nos organismo vivos, possivelmente, devido a homeostase, quando comparadas com a controle ( $0 \text{ mg L}^{-1}$ )

A **Figura 11**, apresenta a imagem térmica de um lote de plântulas de *Sesbania virgata* submetidas a  $200 \text{ mg L}^{-1}$  de NPs de óxido de cobre (CuONP).



**Figura 11:** Imagem térmica de um lote de plântulas submetida a de 200 mg L<sup>-1</sup> de CuONPs

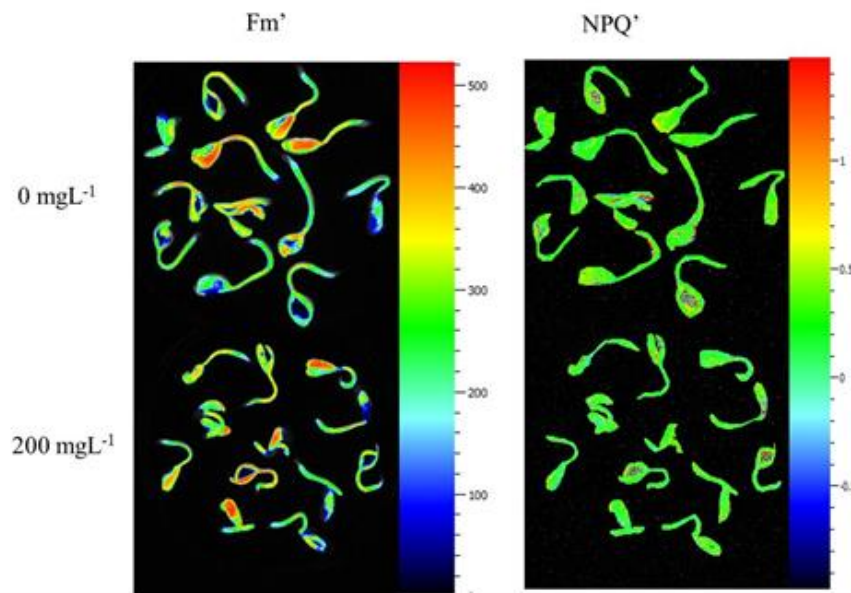
Ao considerar a temperatura média de doze pontos de cada semente e a média das 12 sementes analisadas, de cada concentração. Os valores mostraram que o comportamento médio das temperaturas das sementes que receberam CuONPs são significativamente diferentes (ao grau de confiança de 95% do teste t-Student) em relação à temperatura média das sementes controle (0 mg L<sup>-1</sup>), principalmente entre as 48h e 96h, tendendo ao equilíbrio no final da germinação, exceto na concentração de 200 mg L<sup>-1</sup>, conforme mostra a **Figura 12**.



**Figura 12:** Temperatura média de 12 sementes de *Sesbania virgata* em função do tempo em todas as concentrações de CuONPs (< 50nm) comparadas com a controle (0 mg L<sup>-1</sup>). \* Diferença significativa (teste T, p < 0,05, n =12).

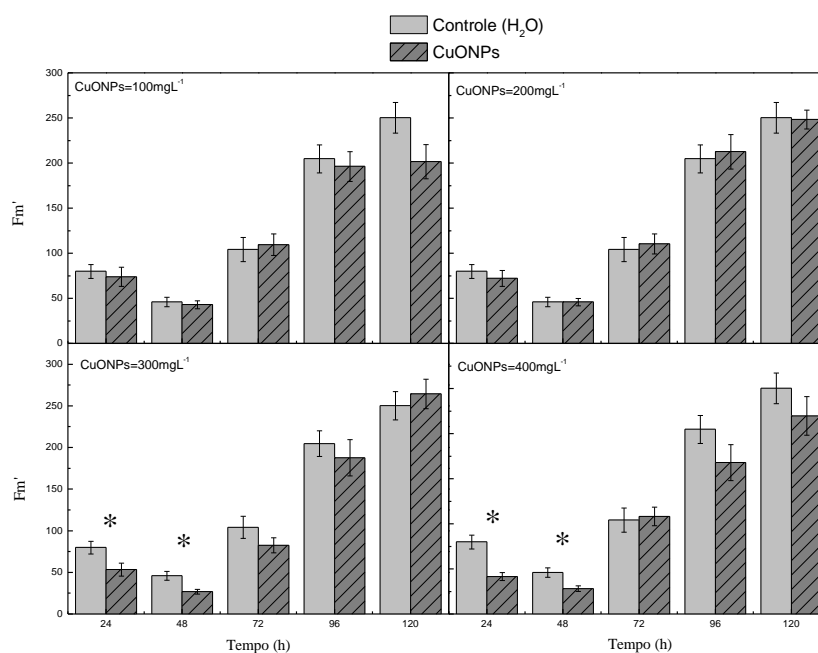
#### 4.2.2. Fluorescência cinética da clorofila *a*

A **Figura 13**, apresenta os resultados obtidos pelas análises de imagem de fluorescência cinética da parte superior das sementes de *Sesbania virgata*, após 120h da embebição, para as concentrações de 0 e 200 mg L<sup>-1</sup>. Os parâmetros apresentados serão o Fm' e o NPQ', medidas realizadas no pulso saturante, quando as sementes já estão adaptadas a fase clara.



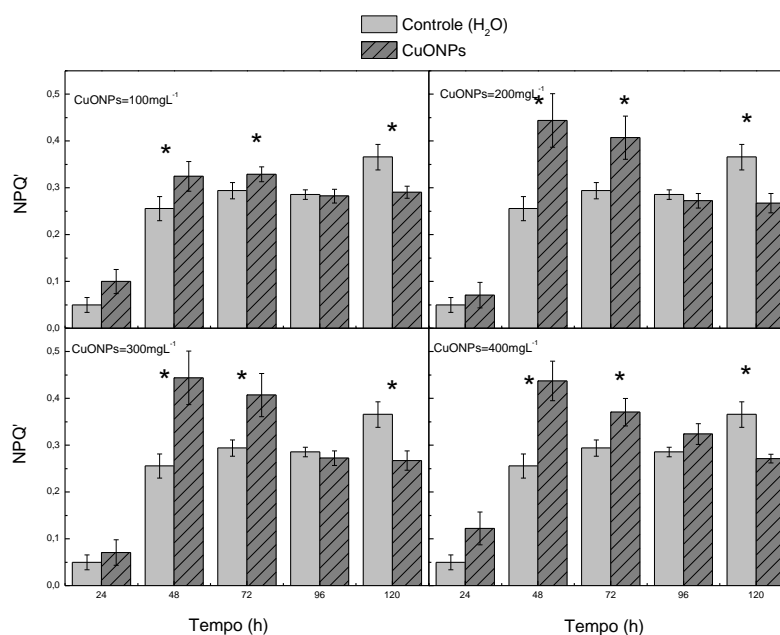
**Figura 13:** Imagens de Fm' e NPQ', 120 h após a imersão em 0 e 200 mg L<sup>-1</sup> de CuONPs, obtidas por meio de imagem de fluorescência da clorofila *a*.

As **Figuras 14** e **15**, ilustram através de gráficos, um comparativo, em relação ao tempo, das sementes submetidas a presença de CuONPs, e das sementes em controle, para os parâmetros Fm' (fluorescência máxima no estado adaptado de luz) e NPQ' (indicativo do excesso de dissipação de energia radiante na forma de calor no FSII).



**Figura 14:** Fm' média de 12 sementes de *Sesbania virgata*, em função do tempo, após embebição de 24h de solução aquosa de 0, 100, 200, 300 e 400 mg L<sup>-1</sup> de CuONPs (< 50nm). \* Diferença significativa (teste T, p < 0,05, n = 12).

As análises da supressão não fotoquímica (NPQ'), no último pulso saturante de luz, quando as sementes já estão adaptadas a fase clara, mostram que as CuONPs induziram mudanças nesse parâmetro em todas as concentrações avaliadas em relação ao controle, provocando um aumento significativo para tempos de 48h e 72h. Porém, após 72h começa a ocorrer uma inversão no comportamento do NPQ', no qual observa-se uma diminuição significativamente diferente após 120h.



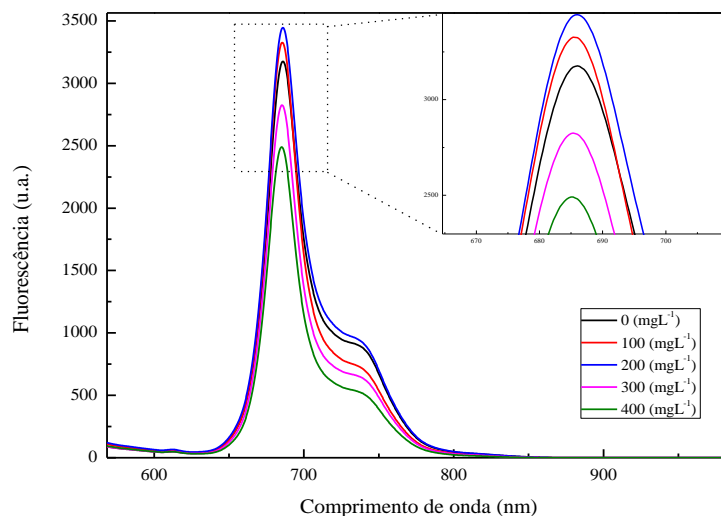
**Figura 15:** NPQ' da média de 12 sementes de *Sesbania virgata* em função do tempo após serem submetidas a 0, 100, 200, 300 e 400 mg L<sup>-1</sup> de óxido de cobre (CuONPs) (< 50nm). \* Diferença significativa (teste T, p < 0,05, n = 12).

#### 4.2.3. Fluorescência estacionaria

A **Figura 16** mostra os espectros típicos da fluorescência de moléculas de clorofila quando excitado em 405 nm. As medidas foram realizadas nas folhas cotiledonares, primeiras folhas que se formam do embrião. Duas bandas de emissão podem ser observadas entre 625 e 800 nm: as bandas no vermelho e no vermelho-distante com máximo em 685 e 735 nm, respectivamente. As bandas de fluorescência vermelho e vermelho-distante são devidas aos complexos Chl do **Fotossistema II** e **Fotossistema I**, respectivamente, encontrados no interior das membranas tilacóides dos cloroplastos [58].

Baseado no espectro pode-se notar um aumento na intensidade de fluorescência da Chl para os tratamentos de 100 e 200 mg L<sup>-1</sup> de nanopartículas de óxido de Cobre (CuONPs) e uma supressão nas concentrações de 300 e 400 mg L<sup>-1</sup>, quando comparados com o controle (H<sub>2</sub>O Milli-Q).

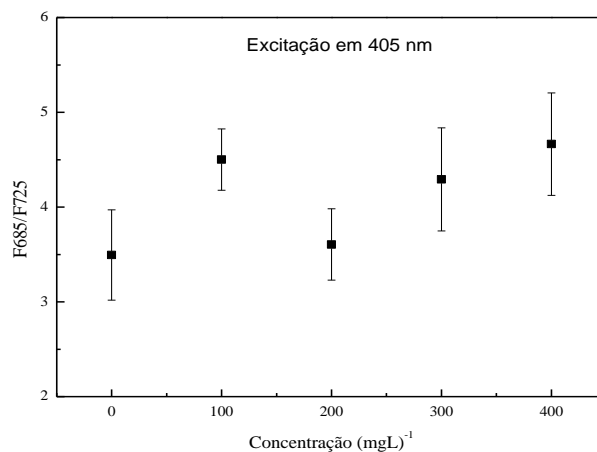




**Figura 16:** Intensidade de fluorescência das plântulas de *Sesbania virgata* com diferentes concentrações de NPs de óxido de Cobre (CuONPs), com excitação em 405 nm, as 120h de germinação.

A razão de fluorescência  $F_{685}/F_{735}$ , fornece informações sobre o estado fisiológico e o conteúdo de clorofila das plantas [59]. Essa relação é usada para quantificar a eficiência máxima da PS II. Na análise do conteúdo de clorofila, a razão de fluorescência é um indicador do estresse oxidativo [60].

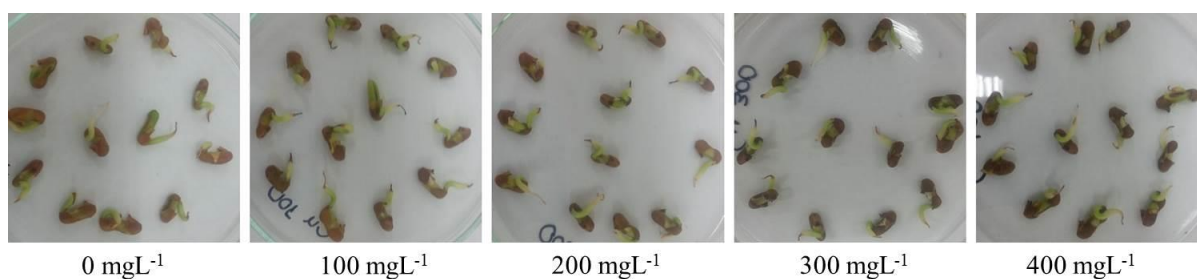
A análise dessa razão  $F_{685}/F_{735}$ , intensidade de fluorescência dos picos característicos da clorofila *a*, na **Figura 17**, nota-se que houve alterações no teor de clorofila das sementes com nanopartículas de óxido de Cobre (CuONPs), porém, nada muito expressivo.



**Figura 17:** Razão  $F_{685}/F_{735}$  em função da concentração de NPs de óxido de Cobre (CuONPs), com excitação em 405 nm, em 120h de germinação (5 dias).

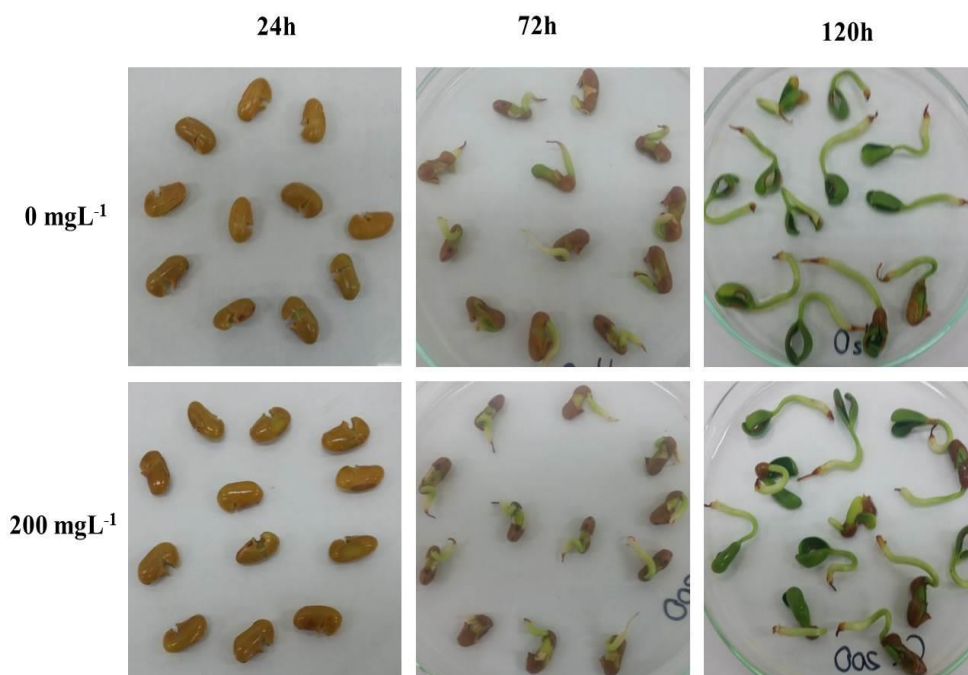
#### 4.2.4. Tamanho da raiz

A **Figura 18** apresenta o desenvolvimento radicular das sementes de *Sesbania virgata* em função da concentração de CuONPs, 4 dias (96h) após o início da germinação.



**Figura 18:** Plântulas de *Sesbania virgata* em todas as concentrações de CuONPs em 72h (3 dias) após embebição. Foto: Eliene Santos

A **Figura 19** ilustra a evolução na germinação de sementes durante os diferentes períodos de germinação quando comparadas entre as sementes embebidas em 0 e 200 mg L<sup>-1</sup> CuONPs.



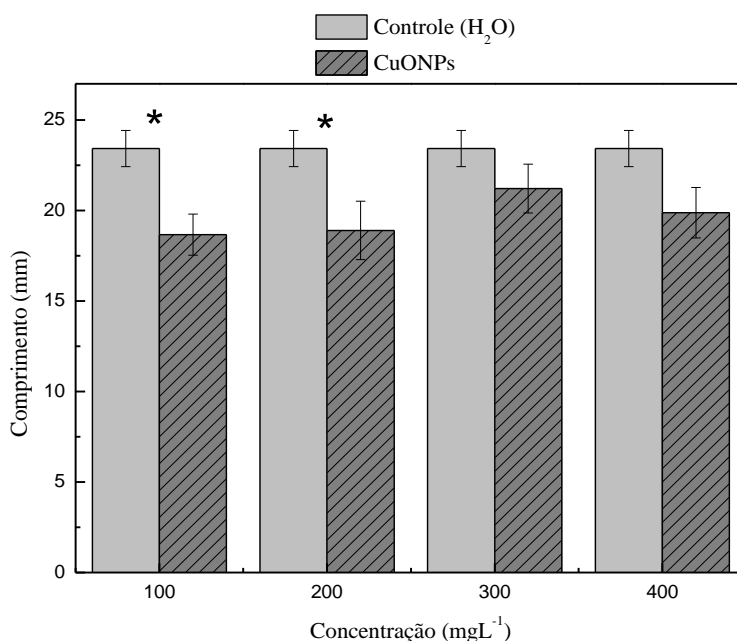
**Figura 19:** Sementes de *Sesbania virgata* em processo de emergência com 0 e 200 mg L<sup>-1</sup> CuONPs. Foto Eliene Santos

A **Figura 20** apresenta as plântulas de *Sesbania virgata* em função da concentração de CuONPs após 6 dias (144h) do início da germinação.



**Figura 20:** Raiz de plântulas de *Sesbania virgata* com diferentes concentrações de CuONPs. Foto: Eliene Santos

As análises das médias do comprimento da raiz das 12 sementes de *Sesbania virgata* germinadas com CuONPs nas concentrações de 100, 200, 300 e 400 mg L<sup>-1</sup> quando comparadas com a média do tamanho da raiz das sementes controle (0 mg L<sup>-1</sup>) demonstrou que nas primeiras concentrações houve uma redução no tamanho, porém nas concentrações mais alta essa redução no comprimento das raízes não teve diferença significativa. Mostrando que quando submetidas ao estresse induzido por nanopartículas, as plantas tendem a diminuir ou parte aérea ou o tamanho da raiz [35].



**Figura 21:** Valores médios de comprimento das raízes de plântulas de *Sesbania virgata* para quatro concentrações de CuONPs, comparadas com as médias do comprimento do controle (H<sub>2</sub>O). \* Diferença significativa (teste T, p < 0,05, n = 12).

Os resultados obtidos nos experimentos com as NPs de óxido de Cobre (CuONPs) nas sementes de *Sesbania virgata*, mostraram que os valores da fluorescência máxima (Fm') e o *quenching* (dissipação não fotoquímica (NPQ')) estão aumentando durante o tempo de germinação, como esperado, já que o aparato fotossintético está ainda em formação, porém, quando avaliando e comparado com sementes controle, apenas a dissipação não fotoquímica (NPQ') aumentou. O fato da dissipação não fotoquímica estar aumentando é evidenciado quando analisamos o gráfico da temperatura em função do tempo, pois verifica-se um aumento na temperatura das sementes com CuONPs, principalmente, no período de 72h (3 dias). Este fato pode indicar que as sementes estão dissipando energia na forma de calor, principalmente, devido ao processo de estresse oxidativo que produz radicais livres, que são espécies oxidantes e induzem reações oxidativas e dissipação de calor. Quanto a quantidade de teor de clorofila *a*, nas folhas cotilédones de *Sesbania virgata*, após 120h (5 dias) de germinação, verificou-se um aumento da intensidade da fluorescência da clorofila no **Fotossistema II** nas concentrações menores de nanopartículas e uma supressão da atividade da clorofila nas maiores concentrações de nanopartículas, porém quando analisado a razão F685/F735, apesar dessa razão ser maior para as sementes com tratamento de CuONPs, não houve uma diferença significativa em relação aos outros comportamentos.

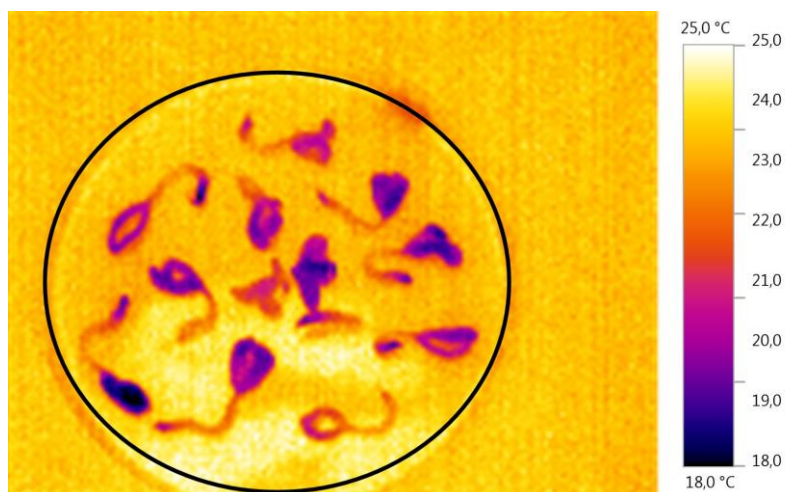
Esta atividade mais intensa, possivelmente, pode estar relacionada a menor concentração de nanopartículas em solução estar ligada a atividade superficial das nanopartículas e/ou a disponibilidade de área superficial dessas para indução do estresse oxidativo "*in situ*"; a medida que a concentração das nanopartículas aumenta há uma tendência a aglomerações que podem ocorrer com perda de área superficial e redução da reatividade da nanopartículas metálicas devido a diminuição de área superficial e reatividade, além dos aglomerados terem a dificuldade de permeação no organismo vegetal, bloquear os canais e/ou reduzir a intensidade das reações de estresse oxidativo com consequentemente redução na produção de espécies radicais, que são oxidantes fortes. Com relação ao desenvolvimento radicular, nota-se uma diminuição no comprimento em todas as concentrações de NPs quando comparadas com o controle, com diferença significativa nos tratamentos com 100 e 200 mg L<sup>-1</sup>.

### 4.3. Análises das sementes de *Sesbania virgata* em função da concentração de nanopartículas de Prata metálica (AgNPs)

#### 4.3.1. Imagem térmica

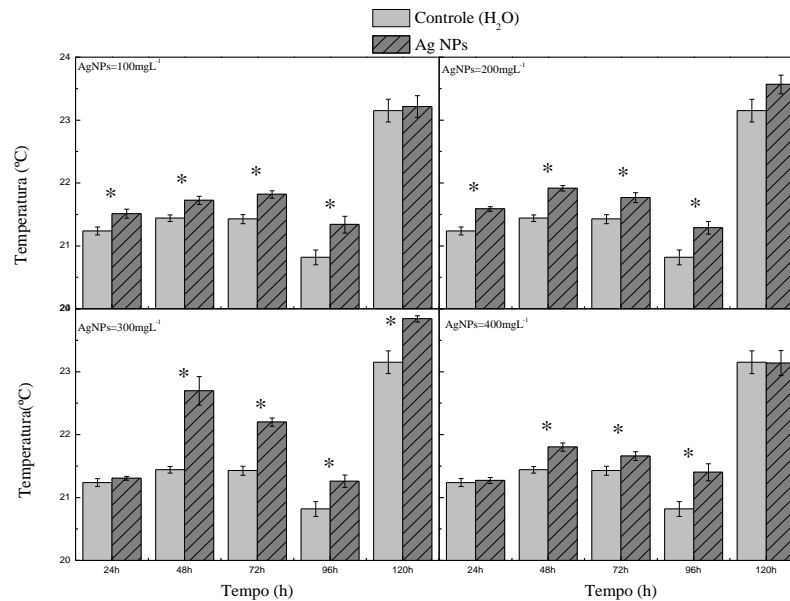
As análises térmicas por imagem mostraram um aumento significativo na temperatura, principalmente, nas sementes submetidos com AgNPs nos primeiros dias de germinação, porém verifica-se que as sementes buscam ajustar essa temperatura, quando comparadas com sementes do controle.

A **Figura 22**, a imagem térmica de um lote de plântulas germinadas de *Sesbania virgata* submetidas a  $300 \text{ mg L}^{-1}$  de NPs de prata em 120h.



**Figura 22:** Imagem térmica das 12 plântulas de *Sesbania virgata* que foram submetidas a  $300 \text{ mg L}^{-1}$  de AgNPs.

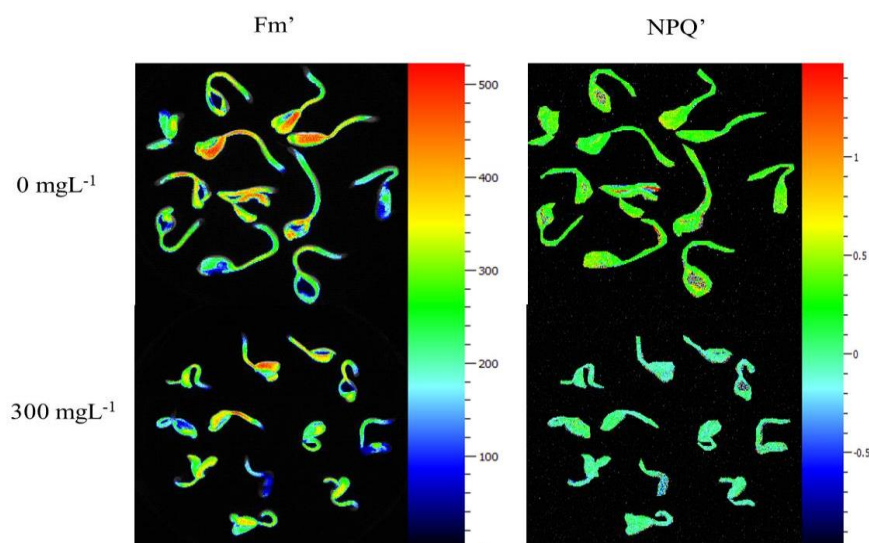
Ao considerar a temperatura média das 12 sementes germinadas analisadas, de cada concentração, quando comparadas com a temperatura média das sementes controle esse valor médio mostra que o comportamento da temperatura das sementes que receberam as AgNPs e, apresentam-se valores significativamente diferentes (ao grau de confiança de 95% do teste T), principalmente entre as 48h (2 dias), 72h (3 dias) e 96h (4 dias), tendendo a normalizar no final da germinação, exceto na concentração de  $300 \text{ mg L}^{-1}$ , conforme **Figura 23**.



**Figura 23:** Temperatura média de 12 sementes de *Sesbania virgata* em função do tempo após serem submetidas a 0, 100, 200 e 300 e 400 mg L<sup>-1</sup> de AgNPs (< 100nm). \* Diferença significativa (teste T, p < 0.05, n =12).

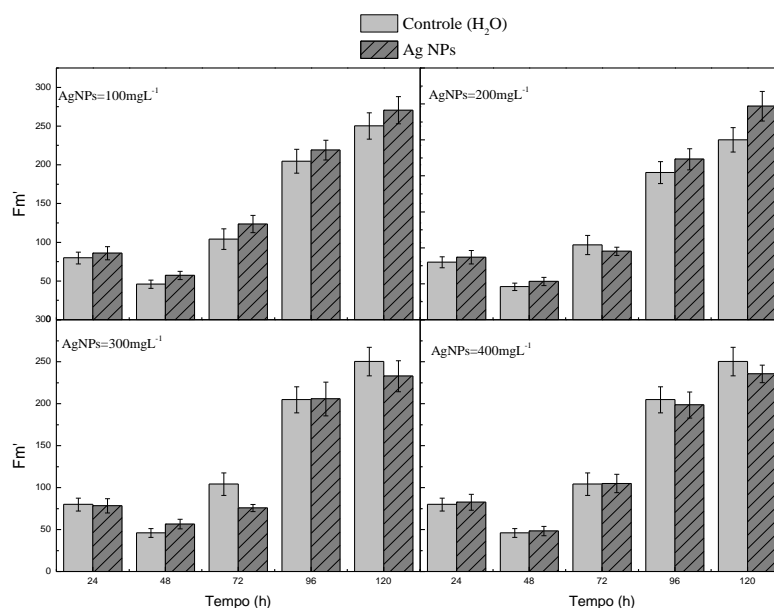
#### 4.3.2. Fluorescência cinética da clorofila A

A **Figura 24**, apresenta os resultados obtidos da medida de imagem de fluorescência cinética da parte superior das sementes germinadas de *Sesbania virgata*, após 120h (5 dias), em duas concentrações: 300 mg L<sup>-1</sup> de AgNPs e água ultrapura Milli-Q. Os parâmetros apresentados são o Fm' e o NPQ', as medidas foram realizadas no pulso saturante, quando as sementes estão adaptadas a fase clara.



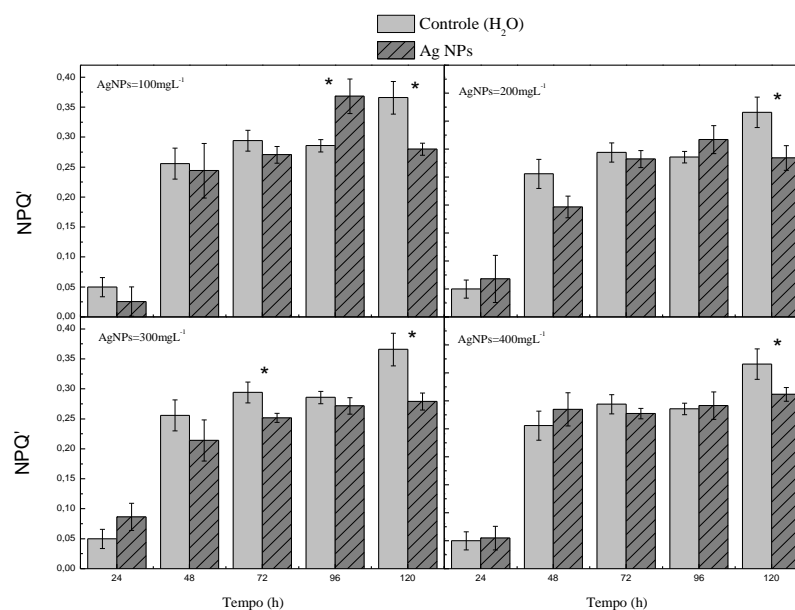
**Figura 24:** Imagens de Fm' e NPQ', das plântulas de *Sesbania virgata* 120 h após a embebição em concentrações de 0 e 300 mg L<sup>-1</sup> de AgNPs, obtidas por meio de imagem de fluorescência cinética da clorofila

As **Figuras 25 e 26**, ilustram por meio de gráficos, um comparativo, em relação ao tempo, das sementes submetidas a presença de AgNPs, e das sementes em H<sub>2</sub>O Milli-Q (controle), para os parâmetros Fm' (fluorescência máxima no estado adaptado de luz) e NPQ' (indicativo do excesso de dissipação de energia radiante na forma de calor no **FSII**). Considerando que o **FSII** ainda esteja em construção, pode-se inferir que este está sofrendo alteração nas sementes com tratamento de AgNPs.



**Figura 25:** Fm', média de 12 sementes de *Sesbania virgata*, em função do tempo, após embebição de 0, 100, 200, 300 e 400 mg L<sup>-1</sup> de AgNPs (< 100nm). \* Diferença significativa (teste T, p < 0,05, n = 12).

As análises da dissipação não fotoquímica (NPQ'), no último pulso saturante de luz, quando as sementes já estão adaptadas a fase clara, mostram que as NPs de prata (AgNPs) não induzem mudanças significativas nesse parâmetro com relação a controle durante as primeiras 72h (3 dias), porém em 120h (5 dias) as sementes controle evidenciaram na NPQ' com relação as sementes com tratamento de AgNPs (**Figura 26**).

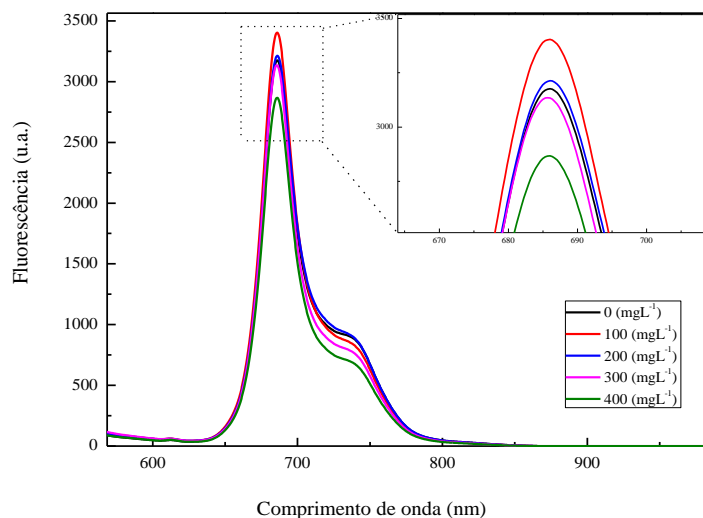


**Figura 26:** NPQ' da média de 12 sementes de *Sesbania virgata* em função do tempo após serem submetidas a 0, 100, 200, 300 e 400 mg L<sup>-1</sup> de AgNPs (< 100nm). \* Diferença significativa (teste T, p < 0,05, n = 12).

### 4.3.3. Fluorescência estacionária

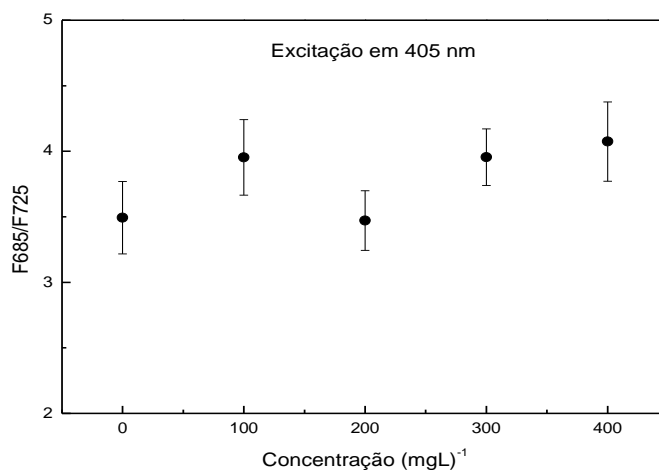
A **Figura 27** mostra os espectros típicos da fluorescência de moléculas de clorofila quando excitado em 405 nm para as sementes com tratamento com AgNPs. Duas bandas de emissão podem ser observadas entre 625 e 800 nm: as bandas no vermelho e no vermelho-distante com máximo em 685 e 735 nm, respectivamente.





**Figura 27:** Intensidade de fluorescência das plântulas de *Sesbania virgata* com diferentes concentrações de NPs de prata metálica (AgNPs), com excitação em 405 nm, após 120h (5 dias) de emergência.

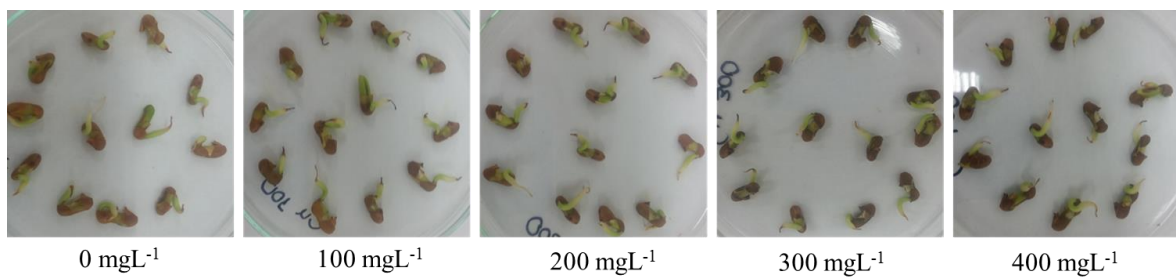
Verificou-se que nas menores concentrações de AgNPs houve um aumento na emissão da clorofila *a* e nas concentrações mais altas, houve uma supressão da emissão. Com relação a razão F685/F735, nota-se um aumento no valor dessa razão, porém, sem valor expressivo para indicar um aumento no conteúdo de clorofila *a* das sementes e\ou produção de radicais livres que são espécies que podem fluorescer.



**Figura 28:** Razão F685/F725 em função da concentração de NPs de prata (AgNPs), com excitação em 405 nm, após 120h de emergência.

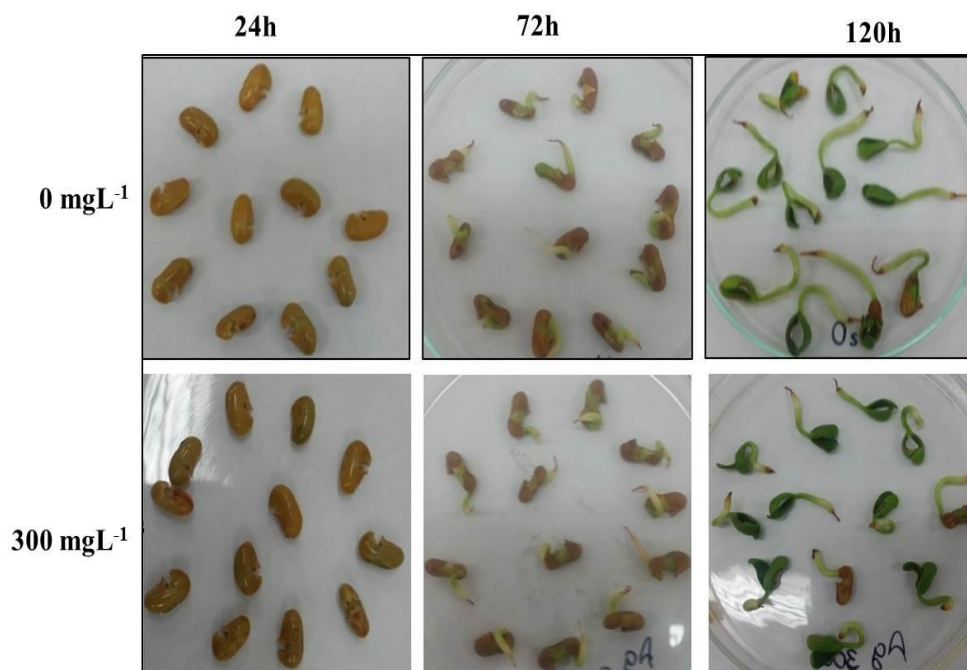
#### 4.3.4 Tamanho da raiz

A **Figura 29** ilustra sementes germinadas de *Sesbania virgata*, em todas as concentrações em que o experimento foi realizado, no tempo de 72 horas (3 dias) após a embebição de água e dispersões com NPs de prata (AgNPs).



**Figura 29:** Plântulas de *Sesbania virgata* em todas as concentrações em 72h (3 dias) após embebição. Foto: Eliene Santos

Na imagem da **Figura 30**, que representa a evolução na germinação de sementes durante os dias iniciais de germinação e comparadas entre as embebecidas em 0 e 300 mg L<sup>-1</sup> AgNPs.



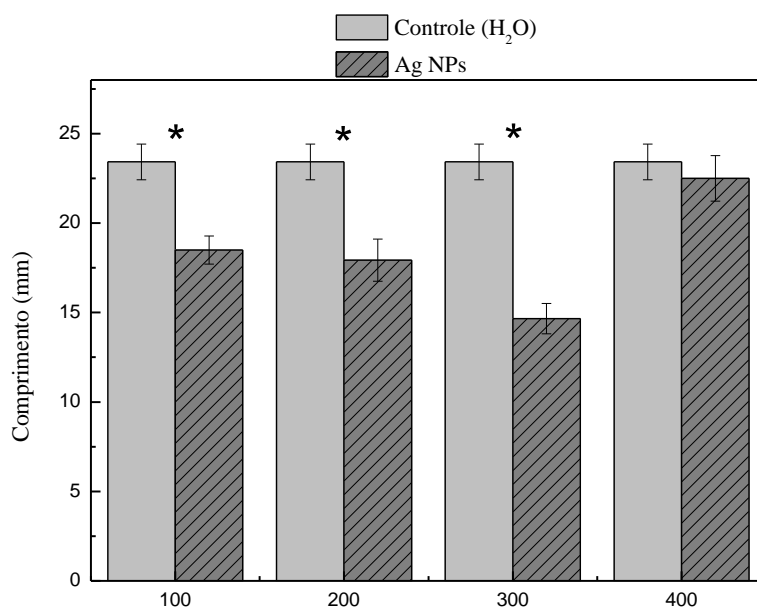
**Figura 30:** Plântulas de *Sesbania virgata* em processo de germinação com água e 300 mg L<sup>-1</sup> AgNPs, durante a germinação. Foto: Eliene Santos

A **Figura 31** ilustra o aspecto e comprimento das raízes das sementes de *Sesbania virgata* após 120h (5 dias) de germinação.



**Figura 31:** Raiz das plântulas de *Sesbania virgata* com diferentes concentrações de AgNPs. Foto: Eliene Santos.

As análises das médias do comprimento da raiz das 12 plântulas de *Sesbania virgata* germinadas com AgNPs nas concentrações de 100, 200, 300 e 400 mg L<sup>-1</sup> quando comparadas com a média do tamanho da raiz das plântulas controle (0 mg L<sup>-1</sup>) demonstrou que nas primeiras concentrações houve uma redução no tamanho, porém com 400 mg L<sup>-1</sup> houve um aumento no tamanho da raiz, equiparando-se com as sementes germinadas controle nessa concentração.



**Figura 32:** Valores médios de comprimento para quatro concentrações de AgNPs, comparadas com as médias do controle (H<sub>2</sub>O). \* Diferença significativa (teste *t*, *p* < 0,05, *n* = 12).

As NPs de Prata (AgNPs) induziram a um pequeno aumento na fluorescência máxima nas concentrações de 100 e 200 mg L<sup>-1</sup>, nas demais concentrações o Fm' é maior para as sementes do controle, porém sem diferença significativa. Quanto ao parâmetro NPQ', em 120h (5 dias), foi o que obteve maior diferença significativa entre os tratamentos, sendo este, maior no controle. A temperatura das sementes com NPs de prata (AgNPs) teve um aumento significativo quando comparados com as sementes com água ultrapura (Milli-Q), com exceção das 120h (5 dias), pois todas as sementes tiveram semelhança nesse parâmetro em todas concentrações. Quanto a fluorescência molecular ocorre um aumento na fluorescência nas menores concentrações e uma supressão nas concentrações maiores, quando comparado com o valor nas plântulas controle, quanto a razão F685/F735 houve um aumento em quase todas as concentrações, o que indica um menor teor de Chl *a*. Pode-se ainda analisar os efeitos das AgNPS sobre as sementes germinadas que tiveram uma redução considerável no tamanho da raiz nas primeiras concentrações testadas, entretanto, e na maior concentração as raízes aumentaram de tamanho, com tamanho equivalente ao tamanho das raízes do controle. Pode-se observar que os danos induzidos pela presença de nanopartículas (NPs) são diferenciados, mas visíveis em todo período de germinação.

## CAPÍTULO V

### 5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos mostraram que as NPs metálicas (AgNPs e CuONPs) alteraram a emissão da fluorescência máxima da clorofila *a* em função da concentração de nanopartículas com aumento da quantidade de energia dissipada por vias não-fotoquímicas. Os resultados mostraram que houve alteração da temperatura das sementes e redução no tamanho das raízes das sementes germinadas, indicando danos metabólicos e alterações na dissipação de energias e crescimento da planta. Pode-se observar que todos estes efeitos induzidos por nanopartículas (NPs) foram dependentes da concentração, apesar da ocorrência de diferenças a partir da concentração utilizada. Em resumo, pode-se concluir que as sementes quando submetidas às nanopartículas de Cobre (II) (CuONPs) e Prata (AgNPs) modificaram\alteraram a formação e o funcionamento do aparato fotossintético da plântula, que impactou no desenvolvimento e crescimento dessas plantas, principalmente, das raízes. Estes efeitos biológicos\alterações\danos metabólicos são devidos, principalmente, aos radicais livres produzidos no processo de estresse oxidativo na presença de nanopartículas metálicas. Pode-se também observar uma tentativa de restabelecimento da homeostase pelo vegetal a partir do aumento na expressão de clorofila *a* para redução dos danos induzidos por radicais livres; pode-se também sugerir uma possibilidade complementar a partir da atividade biológica das NPs, uma vez que estas NPs podem estar alterando a microbiota presente na semente durante o experimento, uma vez que estas NPs possuem atividades bactericidas e fungicida.

Apesar de estarmos trabalhando com organismo vivos e estes se comportarem de forma diferente, e, mesmo sendo indivíduos do mesmo grupo e nas mesmas condições experimentais, pode-se sugerir que as mostrar que as NPs comprometem a formação dos parâmetros\sistemas fotossintéticos das sementes e, podem trazer consequências\danos metabólicos diferenciados a partir das concentrações, embora não tenha ocorrido dano maior (morte da plântula), percebe-se uma drástica redução do funcionamento do aparato fotossintético, afetando a espécie por redução da parte aérea e raiz .

Considerando, ainda, os resultados experimentais obtidos e as discussões pode-se mostrar que o conjunto de técnicas experimentais adotadas (não invasivas) se mostrou eficiente como ferramenta analítica no processo de detecção das alterações fisiológicas das

sementes e plantas induzidas por nanopartículas de AgNPs e CuONPs. Essas técnicas utilizadas podem ser aplicadas com vantagens nos estudos para avaliação dos impactos e análise da toxicidade de NPs em vegetais a partir da germinação.

## AGRADECIMENTOS



## SUGESTÕES PARA OS PRÓXIMOS TRABALHOS

Sugestões podem ser realizadas sobre esta temática e, muito pode ser explorado. Pode-se sugerir algumas possibilidades para a complementação do trabalho ou o desenvolvimento de uma linha de pesquisa que se preocupe com a dispersão de NPs no ambiente sobre sementes e espécies vegetais, citamos algumas sugestões para trabalhos futuros:

- ✓ Monitorar o desenvolvimento das plantas de *Sesbania virgata* para analisar se houve ou não modificações no crescimento devido as concentrações de NPs;
- ✓ Monitorar o conteúdo de Chl *a* e outras clorofilas durante os experimentos;
- ✓ Verificar se houve translocação das NPs das sementes para as folhas das plantas e sua dispersão, considerando efeitos de bloqueio dos canais de seiva por aglomerações de NPs;
- ✓ Avaliar se as sementes de *Sesbania virgata*, submetidas a outros materiais nanoparticulados metálicos ou não terão os mesmos comportamentos;
- ✓ Comparar os resultados da *Sesbania virgata* com outras sementes nativas ou exóticas que estão sendo analisadas no grupo de pesquisa.



## REFERÊNCIAS e NOTAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] HULLA, J. E.; SAHU, S. C.; HAYES, A. W. Nanotechnology: history and future. **Human & Experimental Toxicology**, v. 34, n. 12, p. 1318-1321, 2015.
- [2] JUDY, J. D.; UNRINE, J. M.; BERTSCH, P. M. Evidence for biomagnification of gold nanoparticles within a terrestrial food chain. **Environmental Science & Technology**, v. 45, n. 2, p. 776-781, 2011.
- [3] KLAINE, S. J.; ALVAREZ, P. J. J.; BATLEY, G. E.; FERNANDES, T.F.; HANDY, R. D.; LYON, D. Y.; MAHENDRA, S.; McLAUGHLIN, M. J.; LEAD, J. R. Nanomaterials in the environment: Behavior, fate, bioavailability, and effects. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 27, p. 1825 - 1851, 2008.
- [4] MAYNARD, A. D.; AITKEN, R.J.; BUTZ, T.; COLVIN, V.; DONALDSON, K.; OBERDORSTER, G.; PHILBERT, M.A.; RYAN, J.; SEATON, A.; STONE, V.; TINKLE, S. S.; TRAN, L.; WALKER, N. J.; WARHEIT, D. B. Safe handling of nanotechnology. **Nature**, v. 444, n. 16, p. 267 - 269, 2006.
- [5] NEL, A.; XIA, T.; MADLER, L.; LI, N. Toxic potential of materials at the nanolevel. **Science**, v. 311, n. 5761, p. 622 - 627, 2006.
- [6] TAYLOR, R.; WALTON, D.R.M. The chemistry of fullerenes. **Nature**, v. 363, p. 685 - 693, 1993.
- [7] FADEEL, B; PIETROIUSTI, A; SHVEDOVA, A. Adverse effects of engineered nanomaterials: exposure, toxicology, and impact on human health. **Elsevier Academic Press**, 2012.
- [8] SALAMANCA-BUENTELLO, F.; DAAR, A. S. Dust of wonder, dust of doom: a landscape of nanotechnology, nanoethics, and sustainable development. In: **Global Bioethics: the impact of the UNESCO International Bioethics Committee**. Springer International Publishing, p. 101 - 123, 2016.
- [9] JAIN, K; KUMAR MEHRA, N; K JAIN, N. Nanotechnology in drug delivery: safety and toxicity issues. **Current Pharmaceutical Design**, v. 21, n. 29, p. 4252 - 4261, 2015.
- [10] SUN, BO et al. Advances in the application of nanotechnology in the diagnosis and treatment of gastrointestinal tumors (review). **Molecular and Clinical Oncology**, v. 3, n. 2, p. 274 - 280, 2015.
- [11] BOUWMEESTER, H. et al. Review of health safety aspects of nanotechnologies in food production. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 53, n. 1, p. 52 - 62, 2009.

- [12] GARCIA, M.; FORBE, T.; GONZALEZ, E. Potential applications of nanotechnology in the agro-food sector. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 3, p. 573 - 581, 2010.
- [13] GUERRA, R.; LIMA, E.; GUZMAN, A. Antimicrobial supported nanoparticles: Gold versus silver for the cases of *Escherichia coli* and *Salmonella typhi*. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 170, p. 62 - 66, 2013.
- [14] RAMYADEVI, J. et al. Synthesis and antimicrobial activity of copper nanoparticles. **Materials Letters**, v. 71, p. 114 - 116, 2012.
- [15] HARIFI, T; MONTAZER, Majid. Application of nanotechnology in sports clothing and flooring for enhanced sport activities, performance, efficiency and comfort: a review. **Journal of Industrial Textiles**, v. 45(5), p. 1147–1169, 2015.
- [16] BANDYOPADHYAY, Susmita et al. Comparative phytotoxicity of ZnO NPs, bulk ZnO, and ionic zinc onto the alfafa plants symbiotically associated with *Sinorhizobium meliloti* in soil. **Science of the Total Environment**, v. 515, p. 60 - 69, 2015.
- [17] CARNIEL, B. F. Avaliação de impactos ambientais e sociais do uso de nanotecnologias na agricultura: uma proposta metodológica. 2013. 189 f. Tese (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos, São Paulo, 2013
- [18] SONG, Lan et al. A comparative analysis on the in vivo toxicity of copper nanoparticles in three species of freshwater fish. **Chemosphere**, v. 139, p. 181 - 189, 2015.
- [19] BRAYNER, R; FIÉVET, F; CORADIN, T. Nanomaterials: a danger or a promise? A chemical and biological perspective. **Springer**, London. DOI 10.1007/978-1-4471-42133. 2013.
- [20] ANDRADE, J.; TAVARES, S.; MALHER, C. Fitorremediação: o uso na melhoria de qualidade ambiental. São Paulo: **Oficina de Textos**, p. 176, 2007.
- [21] ANDRADE, H.P. Análise cienciométrica global em bioindicadores: um panorama das tendências entre os anos 1998 a 2007. Dissertação de Mestrado, Universidade Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Setor de Ciências Biológicas, Goiás, 2010.
- [22] BETTINELLI, M.; BEONE, G.M.; SPEZIAS, S. & BAFFI, C. Determination of heavy metals in soil and sediments by microwave-assisted digestion and inductively coupled plasma optical emission spectrometry analysis. **Anal. Chim. Acta**, v. 424, p. 289-296, 2000.
- [23] POMPÊO, M.L. M. Monitoramento e manejo de macrófitas aquáticas. **Oecologia Brasiliensis**, Rio de Janeiro, v.12, n.3, p. 406 - 424, 2008.
- [24] TREVIZM, A.R. SILVA, M.L.S. Interações iônicas e seus efeitos na nutrição das plantas. **Jornal de Informações Agronômicas**. Brasil, nº 149, p. 10 - 16, 2015.

- [25] KÖLELI et al. Effect of zinc fertilization on cadmium toxicity in durum and bread wheat grown in zinc-deficient soil. **Environ. Pollut.** v. 131 p. 453 - 459, 2004.
- [26] FALCO, W. F. et al. In vivo observation of chlorophyll fluorescence quenching induced by gold nanoparticles. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 225, p. 65 - 71, 2011.
- [27] QUEIROZ, A. M. et al. Quenching of chlorophyll fluorescence induced by silver nanoparticles. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 168, p. 73 - 77, 2016.
- [28] FALCO, W. F. et al. Interaction between chlorophyll and silver nanoparticles: a close analysis of chlorophyll fluorescence quenching. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 299, p. 203 - 209, 2015.
- [29] WANG, Lifen et al. Effects of silver nanoparticles on seed germination and seedling growth of radish (*Raphanus Sativus* L.). In: **2<sup>nd</sup> International Conference on Civil, Materials and Environmental Sciences**. Atlantis Press, 2015.
- [30] 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, 2015.
- [31] 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.
- [32] NAIR, P. M. G.; CHUNG, I. M. The responses of germinating seedlings of green peas to copper oxide nanoparticles. **Biologia Plantarum**, Volume 59, p. 591–595, 2015.
- [33] BAKER, N. R. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. In: (Ed.). **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, p. 89 - 113, 2008.
- [34] KOBORI, H.; TSUCHIKAWA, S. Time-resolved principal component imaging analysis of chlorophyll fluorescence induction for monitoring leaf water stress. **Applied Spectroscopy**, v. 67, n. 6, p. 594 - 599, 2013.
- [35] ROUSSEAU, C. et al. High throughput quantitative phenotyping of plant resistance using chlorophyll fluorescence image analysis. **Plant Methods**, v. 9:17, 2013.
- [36] LI, Q. et al. Dynamic changes in photosynthesis and chlorophyll fluorescence in *Nicotiana tabacum* infested by *Bemisia tabaci* (Middle East-Asia Minor 1) nymphs. **Arthropod-Plant Interactions**, v. 7, n. 4, p. 431 - 443, 2013.
- [37] MOHAMMED, G.H., TEJADA, P.Z., Miller, J.R. Applications of chlorophyll fluorescence in forestry and ecophysiology. In: DeEll, J. R., Toivinen, P. M. A. ractical

applications of chlorophyll fluorescence in plant biology. Ed. By DeEll, J. R., Toivinen, P. M. A. p. 79-124. 2003.

[38] 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.

[39] FALCO, W. F. Avaliação das Alterações Fisiológicas em Plantas de *Vicia faba* induzidas por nanopartículas de prata. Tese (Doutorado em Biotecnologia e Biodiversidade) – Faculdade de Ciência e Tecnologia, Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), Dourados, 2017.

[40] KALAJI, Hazem M. et al. Identification of nutrient deficiency in maize and tomato plants by in vivo chlorophyll a fluorescence measurements. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 81, p. 16 - 25, 2014.

[41] LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. 3. Ed. Springer, 2006.

[42] 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**, v. 3 p. 76 - 80, 2015.

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

[44] NILSSON, H.E. Remote sensing and image analysis in plant pathology. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 17, p. 154 - 166. 1995.

[45] BAKER, N.R., ROSENQVIST, E. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: in examination of future possibilities. **Journal Experiment Botany**, v. 55, n. 403, p. 1607 - 1621. 2004.

[46] SHUGUANG, J; WEIJUN, S; YANG ZHONGYI. Enhanced adaptability of *Sesbania rostrata* to Pb/Zn tailing via stem nodulation. **Journal of Environmental Sciences**, Pequim, v. 21, p. 1135 - 1141, 2009.

[47] YANG, B. et al. Growth and metal accumulation in vetiver and two *Sesbania* species on lead/zinc mine tailings. **Chemosphere**, Wallingford, v. 52, n. 15, p. 93 - 106, 2003.

[48] ZERLIN, J.K. Mecanismos de proteção de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. contra espécies reativas de nitrogênio e oxigênio. Tese (Doutorado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente. n. 120, São Paulo, 2015.

[49] DELARMELENA, W. M. et al. Diferentes Substratos para a Produção de Mudanças de *Sesbania virgata*. **Floresta e Ambiente**, Seropédica, v. 21, n. 2, p. 224 - 233, 2014.

[50] CHAVE, L. L. B. et al. Efeitos da inoculação com rizóbio e da adubação nitrogenada na produção de mudas de *Sesbania* em substrato constituído de resíduos agroindustriais. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 27, n. 4, p. 443 - 449, 2003.

- [51] ARAÚJO, E. C.; MENDONÇA, A. V.; BARROSO, D. G.; LAMÔNICA, K. R.; SILVA, R. F. Caracterização morfológica de frutos, sementes e plântulas de *Sesbania virgata* Pers. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 26, n. 1, p. 105 - 110, 2004
- [52] ZANANDREA, I. et al. Tolerance of *Sesbania virgata* plants to flooding. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, n. 57, p. 661 - 669, 2009.
- [53] POTT, A. & Pott, V.J. Plantas do Pantanal. EMPRAPA/CPAP/SPI, Corumbá, 320p, 1994.
- [54] SIMOES, K. et al. Phytotoxic catechin leached by seeds of the tropical weed *Sesbania virgata*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 34, p. 681 - 687, 2008.
- [55] BUCKERIDGE, M.S. & Dietrich, S.M.C. Mobilisation of the raffinose family oligosaccharides and galactomannan in germinating seeds of *Sesbania marginata* Benth. (Leguminosae-Faboideae). **Plant Science**, v. 117, p. 33 - 43, 1996.
- [56] TONINI, P.P., Lisboa, C.G.S., Silva, C.O., Mazzoni-Viveiros, S.C. & Buckeridge, M.S. Testa is involved in the control of storage mobilisation in seeds of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers., a tropical legume tree from of the Atlantic Forest. **Trees**, v. 21, p. 13 - 21, 2007.
- [57] CAMARGOS, Valquíria Nogueira; CARVALHO, Maria Laene Moreira de; ARAUJO, Dejânia Vieira de e MAGALHAES, Flávio Henrique Linhares. Superação da dormência e avaliação da qualidade fisiológica de sementes de *Sesbania virgata*. **Ciênc. Agrotec. [online]**, v. 32, n. 6, p. 1858 – 1865, 2008.
- [58] K. B. Mishra & R. Gopal. Detection of nickel-induced stress using laser induced fluorescence signatures from leaves of wheat seedlings, **International Journal of Remote Sensing**, v. 29, n. 1, p. 157 - 173, 2010.
- [59] BUSCHMANN, C. Variability and application of the chlorophyll fluorescence emission ratio red/far-red of leave. **Photosynthesis Research**, v. 92, p. 261 - 271, 2007
- [60] LU, C. M, CHAU, C. W., ZHANG, J. H. Acute toxicity of excess mercury on the photosynthetic performance of cyanobacterium, *S. platensis* – assessment by chlorophyll fluorescence analysis. **Chemosphere**, v. 41, p. 191 - 196, 2000.