



ENEPEX

ENCONTRO DE ENSINO,
PESQUISA E EXTENSÃO

8° ENEPE UFGD • 5° EPEX UEMS

ALTERAÇÃO DO STATUS FISIOLÓGICO DE PLANTAS DE SOJA INDUZIDO POR NANOPARTÍCULAS DE PRATA: AVALIAÇÃO VIA ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA.

Fernanda Costa Pinheiro ¹; Adalberto Mezacasa ²; Anderson Rodrigues Lima Caires ³.

Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal da Grande Dourados, Rodovia Dourados-Itahum, Km 12, Cidade Universitária, Dourados, MS, CEP 79.804-970

¹Aluno de Iniciação Científica PIBIC/CNPq; Aluno de Pós-Graduação Mestrado ² Orientador PIBIC/CNPq (e-mail: AndersonCaires@ufgd.edu.br)

RESUMO

O presente trabalho avaliou, via espectroscopia óptica, os efeitos e alterações que nanopartículas de prata (Ag) induzem nas atividades fotossintéticas de plantas de soja. As plantas de soja foram cultivadas em vasos sendo divididas em dois grupos: plantas cujas sementes foram tratadas com nanopartículas de prata; e plantas controle, sem adição de nanopartículas. A intensidade de fluorescência da clorofila *in vivo* e em extrato foram monitoradas para os três tipos foliares das plantas: cotilédone, unifólio e trifólio, através de um sistema portátil de fluorescência com excitação nos comprimentos de onda: 405 nm e 532 nm a fim de determinar os efeitos induzidos pela penetração das nanopartículas de prata nas sementes de soja. Medidas de absorção UV-Vis foram realizadas nos extratos correspondentes a cada tipo foliar possibilitando a quantificação da concentração de clorofila. Os resultados obtidos nas análises de fluorescência *in vivo* e em extrato mostraram uma supressão na fluorescência da clorofila cujas plantas foram tratadas com as nanopartículas de prata, estas apresentaram ainda uma maior taxa de respiração, demonstrando que as NPs influenciam direta ou indiretamente não só no estado fisiológico das plantas como também nos processos fotossintéticos.

Palavras – chave: Nanopartículas de Prata, Plantas de Soja, Espectroscopia Óptica.

ABSTRACT

The present work evaluated by optical spectroscopy, the effects and changes that silver nanoparticles (Ag) induce photosynthetic activities of soybean plants. Soybean plants were grown in pots was divided into two groups: plants whose seeds were treated with silver nanoparticles; and control plants without addition of nanoparticles. The intensity of chlorophyll fluorescence *in vivo* and extract were monitored for three follicular types of plants: cotyledon, unifoliate and trifoliate through a portable system with fluorescence excitation at wavelengths: 405 nm and 532 nm to determine the effects induced by the penetration of silver nanoparticles in soybean seeds. UV-Vis absorption measurements were performed on extracts corresponding to each follicular type enabling the quantification of chlorophyll. The results obtained in the analysis of *in vivo* fluorescence and extract showed a suppression of chlorophyll fluorescence whose plants were treated with silver nanoparticles, they still had a higher rate of respiration, demonstrating that NPs directly or indirectly influence not only in the state physiological plants as well as in photosynthetic processes.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Surgimento e Algumas Aplicações dos Nanomateriais

A primeira definição do termo nanotecnologia surgiu em 1974 na Universidade Científica de Tóquio, proposta pelo japonês Norio Taniguchi [1]. No entanto, o precursor do conceito da nanotecnologia foi o físico Richard Feynman (Prêmio Nobel de Física em 1965) que, apesar de não utilizar esse termo, discutiu acerca da idéia da manipulação da matéria ao nível atômico, ao proferir uma palestra no encontro anual da Sociedade Americana de Física, em 29 de dezembro de 1959. Desde então, os progressos no campo da nanociência e em suas aplicações práticas apresentam um ritmo intenso e incessante [2].

O conceito mais aceito para o termo nanomateriais (NMs) inclui partículas naturais ou provocadas pelo homem com pelo menos uma dimensão inferior que 100 nm, e nanopartículas (NPs) são amplamente aceitas como materiais com pelo menos duas dimensões entre 1 e 100 nm [3].

As pesquisas em materiais nanoestruturados proporcionaram, nos últimos anos, um grande avanço tecnológico em diversas áreas como medicina, farmacêutica, cosmética, têxtil, automobilística e agrícola [4]. Estudos revelaram que houve um crescimento do número de produtos comercialmente disponíveis nos últimos anos que utilizam nanomateriais em suas composições, tais como pesticidas, protetores solares, cosméticos, vestuário resistente à mancha, tintas automotivas e de revestimentos, artigos esportivos, e aparelhos digitais. Esse número passou de aproximadamente 50 produtos, em 2005, para pouco mais de 1300, em 2010 [5].

Os avanços na nanociência têm levado ao desenvolvimento de uma grande quantidade de novos produtos de consumo que contenham nanomateriais, o que proporcionou um aumento na produção de diversos tipos de nanopartículas (NPs). As nanopartículas de prata têm sido estudadas vastamente, em grande parte, devido aos seus efeitos antimicrobianos [6]. Estas propriedades proporcionam uma ampla variedade de aplicações comerciais das NPs de prata, refletindo em um aumento significativo de sua produção e da consequente eliminação ao meio ambiente [7].

As nanopartículas, embora sendo do mesmo elemento químico, comportam-se de forma distinta em relação às partículas maiores, em termos de propriedades químicas, físicas e biológicas. Portanto, o tamanho da partícula é de suma importância em relação aos efeitos que podem produzir, porque muda a natureza das interações das forças entre as moléculas do material e assim, altera os impactos que estes processos ou produtos nanotecnológicos podem causar ao meio ambiente, à saúde humana e a sociedade como um todo [8].

Apesar dos avanços tecnológicos proporcionados pelo uso e aplicações de materiais nanoestruturados, pesquisas realizadas sobre a aplicação das nanotecnologias em produtos industriais de diversos setores ainda motivam incertezas sobre os verdadeiros benefícios ou possíveis malefícios em relação à utilização dessas inovações nanotecnológicas [9].

1.2. Estudos das Implicações do Uso de Nanomateriais e Efeitos em Plantas

Estudos têm demonstrado a toxicidade de nanopartículas como o fulereno, nanotubos de carbono e óxidos metálicos para células humanas, bactérias e roedores [10]. Os fulerenos não revestidos exercem um estresse oxidativo causando uma severa peroxidação lipídica no tecido do cérebro de peixes estudados, este efeito biológico adverso nas células vivas é um possível impacto negativo dos nanomateriais na saúde dos organismos aquáticos [11].

Efeitos adversos significativos de NPs de prata foram observados em estudos sobre o crescimento e a morfologia de algas verdes filamentosas. A exposição de talos de algas em diferentes concentrações de nanopartículas de prata resultou na diminuição progressiva no conteúdo de clorofila algal, instabilidade cromossômica e a perturbação mitótica, associada com malformações morfológicas nos filamentos de algas [12].

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. Estudos realizados com plantas hidropônicas (*Lolium perenne*) demonstraram que nanopartículas de ZnO de 20 nm, diminuiu a produção de biomassa e provocou um alongamento da raiz [13]. Pesquisas envolvendo a interação de nanopartículas e plantas revelaram que as NPs podem inibir o crescimento e a germinação de plantas [14, 15].

Os efeitos de nanopartículas de TiO₂ foram avaliados em plantas de pepino [16], estas afetam negativamente a taxa de germinação das sementes, comprimento radicular, e índice de germinação das plantas. Em contrapartida, estudos revelaram que nanopartículas de SiO₂ e TiO₂, em baixas concentrações, aumentam a atividade de nitroгенаção da soja acelerando a sua germinação e o crescimento [17].

A intensa introdução de produtos de consumo baseados em NPs traz a necessidade de uma melhor compreensão sobre os potenciais impactos negativos que as NPs podem ter sobre os sistemas biológicos. Apesar dos conhecimentos adquiridos através de alguns estudos anteriores, muitas perguntas permanecem não respondidas em relação ao destino e comportamento das NPs em sistemas vegetais.

1.3. Fluorescência da Clorofila

A fluorescência da clorofila tem sido utilizada como uma técnica precisa e não destrutiva no estudo da eficiência fotossintética, indicando direta ou indiretamente os reflexos dos impactos de fatores ambientais e mudanças no estado fisiológico das plantas [18].

A fluorescência é um fenômeno óptico que ocorre em uma molécula após a incidência de energia luminosa (fótons). Fisicamente os fótons absorvidos pela estrutura eletrônica elevam a energia dos elétrons da molécula a estados quânticos excitados e menos estáveis. As moléculas de clorofila absorvem a energia luminosa (fótons) e alteram temporariamente as suas configurações eletrônicas. Estes pigmentos passam do estado basal

(Chl *a*) para o estado excitado (nível de energia mais alto que o inicial), denominado de *singlet* 1 (Chl *a*^{*}). Este estado excitado é muito instável e de vida muito curta (aproximadamente 10⁻⁸ s) [19].

A luz ultravioleta e visível (UV-Vis) absorvida pelas folhas verdes pode induzir duas regiões distintas de fluorescência: as emissões na faixa de comprimentos de onda entre 400 e 600 nm, que está associada a vários fluoróforos, tais como ácidos hidroxicinâmicos, flavonóis, isoflavonas, flavanonas e ácidos fenólicos; e entre 600 e 800 nm que, *in vivo*, é produzida apenas pela clorofila *a* (Chl *a*) com picos máximos em 685 e 735 nm [20].

A eficiência fotossintética de muitas plantas diminui quando são submetidas a condições de estresse [21, 22]. A intensidade de emissão de fluorescência da clorofila depende da concentração de clorofila na amostra, sendo assim, pode-se dizer que a fluorescência da clorofila serve como uma ferramenta analítica de processos fotossintéticos em plantas, uma vez que esta infere o grau de estresse das plantas [23].

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Soluções de Nanopartículas de Prata

Para o preparo das soluções de nanopartículas de prata foi utilizado água destilada e o pó nanoparticulado de prata (Ag) adquirido da Sigma-Aldrich de diâmetro igual a 100 nm. Foram preparadas soluções nas concentrações de 100 mg.L⁻¹, 200 mg.L⁻¹, 400 mg.L⁻¹ e 800 mg.L⁻¹. Para melhor dispersão do pó nanoparticulado na água, as soluções foram deixadas por vinte minutos no aparelho de banho de ultrason (CRISTOFOLI) com potência de 800 W e frequência ultrasônica de 42 KHz.

2.2. Teste de Germinação

Quatro lotes de sementes contendo dez sementes de soja em cada, foram deixadas em repouso nas soluções preparadas com o pó nanoparticulado de prata (Ag) nas concentrações de 100 mg.L⁻¹, 200 mg.L⁻¹, 400 mg.L⁻¹ e 800 mg.L⁻¹ por uma hora. Posteriormente, as sementes foram colocadas em papel de germinação, identificadas e armazenadas em estufa de fotoperíodo (QUIMS) com potência de 220 V e 800 W. Após seis dias na estufa analisou-se a germinação e desenvolvimento das sementes germinadas.

2.3. Preparo do Solo

O solo depois de peneirado foi adicionado aos vasos e posteriormente tratado com 16 g de calcário para corrigir a acidez. Em cada vaso foi disposto 1,5 kg de solo. Após a aplicação do calcário, os vasos foram regados mantendo-se a quantidade de água a 20 % da massa de solo (aproximadamente 300 mL de água) por um período de dez dias.

2.4. Tratamento das Sementes

No plantio foram utilizadas sementes de soja (*Glycine max*) da variedade BRS 360 RR com percentual de germinação de 93 %. Foram separados dois grupos com 70 g de sementes cada. Para o primeiro grupo, denominado SNPs (sem NPs nas sementes), preparou-se uma solução contendo 5 mL de água, 0,2 mL e 0,21 mL de fungicida (Derosal Plus). Em um saco plástico, acrescentaram-se as 70 g de sementes de soja juntamente com a solução preparada, agitando-se lentamente até que as sementes absorvessem a solução.

O segundo grupo, denominado CNPs (com NPs nas sementes), foi tratado com uma solução preparada nas mesmas condições que para o grupo SNPs, recebendo a adição de $7,5 \cdot 10^{-3}$ g de pó nanoparticulado de prata (Ag) adquirido da Sigma-Aldrich de diâmetros igual a 100 nm com concentração de $1386,30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Em um saco plástico, acrescentaram-se 70 g de sementes de soja juntamente com a solução de NPs, agitando-se lentamente até que as sementes absorvessem a solução. A concentração de nanopartículas de prata foi superior à utilizada nos testes de germinação uma vez que o número de sementes utilizadas para o plantio foi relativamente maior que o utilizado para as testes de germinação.

2.5. Plantio

Em dez vasos foram plantadas as sementes do grupo SNPs. Em outros dez vasos foram plantadas as sementes do grupo CNPs. Em ambos os grupos foram semeadas dez sementes por vasos, junto a 0,2 g do adubo Superfosfato Triplo e 0,15 g de Cloreto de potássio (KCl). Após o plantio cada vaso foi molhado em quantidade de 30 % do seu peso em massa, mantendo-se essa condição de irrigação em dias alternados por três semanas.

2.6. Fluorescência *in vivo*

As medidas de fluorescência *in vivo* foram coletados diretamente das folhas com auxílio de uma fibra óptica, utilizado um fluorímetro portátil constituído de dois lasers, operantes em 405 e 532 nm, um monocromador (USB 2000 FL – Ocean Optics), uma fibra óptica do tipo Y e um laptop.

A Figura 1 representa a aquisição das medidas de fluorescência *in vivo*. Foram utilizados dois comprimentos de onda para excitação: em 405 nm coletando os espectros de fluorescência entre 420 e 900 nm; e em 532 nm analisando a emissão de fluorescência de 540 a 900 nm.

Figura 1. Aparato experimental utilizado para a obtenção dos espectros de fluorescência *in vivo*.

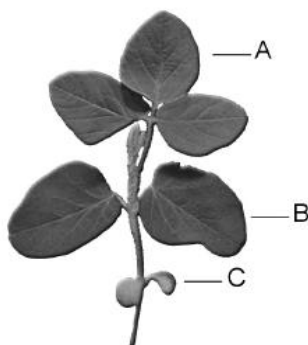


Fonte: Elaborada pela autora

As medidas de fluorescência foram coletadas dois grupos: o primeiro grupo composto de 20 plantas controle (SNPs), cujas sementes receberam tratamento normal como descrito na seção 2.3; e o segundo grupo com 20 plantas cujas nanopartículas de prata foram adicionadas no tratamento das sementes antes do plantio (CNPs).

Para ambos os grupos (SNPs) e (CNPs), a realização das medidas de fluorescência foi dividida em três etapas, uma para cada tipo folicular das plantas de soja: cotilédone, unifólio e trifólio, conforme representa a Figura 2. Na primeira etapa (COT), o sinal de fluorescência foi coletado da parte superior das folhas cotiledonares; na segunda etapa (UNI), o sinal de fluorescência foi coletado dos unifólios; e na terceira etapa (TRI), a emissão foi coletada dos folíolos centrais do primeiro trifólio. Para as três etapas e em ambos os grupos foram realizadas a média dos espectros das 20 plantas analisando o comportamento médio da emissão de fluorescência.

Figura 2. Tipos foliculares de plantas de soja: folíolo central do 1º trifólio (A), unifólio (B) e cotilédone (C).



2.7. Evapotranspiração

Para as medidas da taxa de respiração das plantas de soja foi utilizado o porômetro Leaf Porometer (DECAGON DEVICES INC). Após a calibração do porômetro e sua estabilização de equilíbrio, este foi posicionado na folha a ser analisada fornecendo as medidas na unidade de $\text{mmol/m}^2.\text{s}$.

As medidas foram realizadas nas mesmas 20 plantas de soja utilizadas nas medidas de fluorescência *in vivo*, sendo 10 plantas controle (SNPs) e 10 plantas fortificadas com nanopartículas de prata (CNPs). Para ambos os grupos (SNPs) e (CNPs), a realização das medidas foi dividida em duas etapas: na primeira etapa (UNI), as medidas foram coletadas dos unifólios e na segunda etapa (TRI), a mesma foi coletada dos folíolos centrais do primeiro trifólio. Para as duas etapas e em ambos os grupos foram realizadas a média das medidas das 10 plantas.

As medidas de evapotranspiração não puderam ser realizadas nos cotilédones devido à pequena dimensão das folhas cotiledonares, o que impossibilitava a utilização correta do porômetro sobre tal tipo folicular.

2.8. Extração da Clorofila

O processo de extração de clorofila foi realizado após a realização completa das etapas de fluorescência *in vivo*. Após coletadas as folhas das plantas de sojas, estas foram lavadas em água corrente, picotadas e adicionadas 4 g de folhas em 40 mL de Metanol PA. A extração foi mantida sob-refrigeração sem contato com a luz, para que não ocorresse degradação da clorofila, por um período de 72 horas.

Em ambos os grupos (SNPs) e (CNPs), a extração de clorofila foi realizada em três etapas. As folhas foram coletadas separadamente em três grupos: folhas do cotilédone, folhas do unifólio e folhas do folíolo central do 1º trifólio, realizando uma extração para cada grupo, obtendo assim três extratos para o grupo (SNPs) e três extratos para o grupo (CNPs), para cada fase de desenvolvimento folicular das plantas.

Através das medidas de absorção molecular calculou-se o teor da clorofila total [*Chl a + b*] das amostras de extrato de clorofila baseando-se no método de Arnon adaptado por Porra, 2002 [24], para extração metanólica, descrito pela Equação 1, de forma que [*Chl a + b*] é a concentração das clorofilas *a* e *b*, A_{652} é a absorbância em 652 nm, $A_{665,2}$ é a absorbância em 665,2 nm e as constantes 24,23 e 3,26 são os coeficientes de extinção específica da clorofila em 652 e 665,2 nm, respectivamente.

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

Definido a concentração de clorofila total para os três extratos de cada grupo, (SNPs) e (CNPs), realizou-se diluições obtendo-se o teor de clorofila em $3,9 \pm 0,3 \mu\text{mol.L}^{-1}$ para a realização das medidas ópticas: fluorescência e absorção molecular.

2.9. Fluorescência Molecular

Para as análises de fluorescência do extrato de clorofila, assim como para as medidas de fluorescência *in vivo*, foi utilizado um fluorímetro portátil constituído de dois lasers do tipo LED, operantes em 405 nm e em 532 nm, um monocromador (USB 2000 FL – OceanOptics), uma fibra óptica do tipo Y e um laptop.

As amostras foram excitadas em 405 nm obtendo espectros de 450 a 800 nm e posteriormente excitadas em 532 nm obtendo espectros de 550 a 800 nm. As medidas de fluorescência foram realizadas a temperatura ambiente utilizando-se uma cubeta de quatro faces polidas de quartzo com 10 mm de caminho óptico.

Para a obtenção dos mapas 3D de emissão do extrato de clorofila, realizaram-se medidas no espectrofotômetro Cary Eclipse (VARIAN). O espectrofluorímetro possui como fonte de excitação uma lâmpada pulsada de Xenônio (80 Hz), com a largura a meia altura do pulso de aproximadamente 2 ms e potência de pico equivalente a 75 KW. O espectrofotômetro é constituído por dois monocromadores, um para a seleção do

comprimento de onda de quatorze excitações e outro para a seleção do comprimento de onda emitido pela amostra.

Os mapas 3D de emissão foram obtidos através da medição do espectro de emissão na gama de 220 a 800 nm, com comprimentos de onda de excitação 220 a 600 nm, espaçados por intervalos de 5 nm no domínio de excitação. As medidas foram realizadas a temperatura ambiente utilizando-se uma cubeta de quatro faces polidas de quartzo com 10 mm de caminho óptico.

2.10. Espectroscopia de Absorção UV-Vis

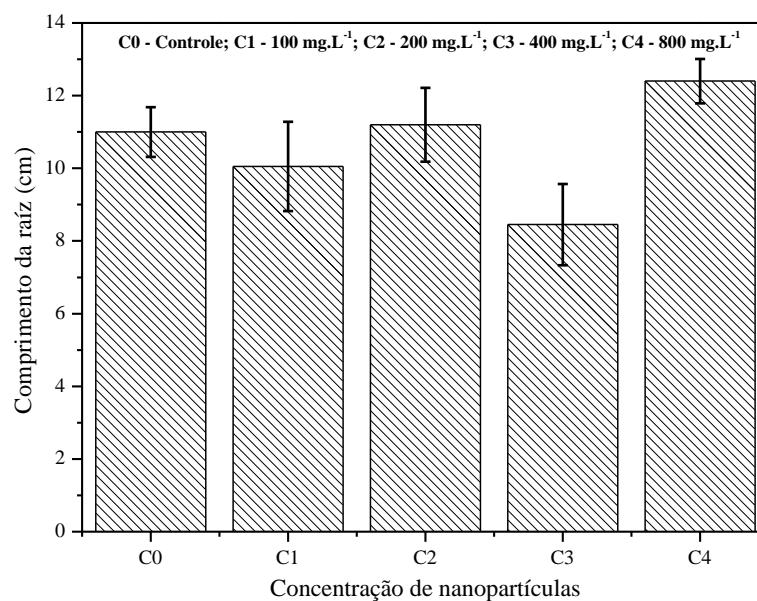
Para o estudo da absorção do extrato de clorofila foi utilizado o espectrofotômetro d absorção molecular Cary 50 UV-VIS (VARIAN). O espectrofotômetro tem como fonte d excitação uma lâmpada pulsada de Deutério, um monocromador Czerny-Turner 0,25 m e um detector de diodo de Si. As medidas de absorção foram realizadas de 200 a 800 nm, usando cubeta de quatro faces polidas de 10 mm de caminho óptico.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Testes de Germinação

Os testes de germinação visaram identificar a possibilidade de inibição de germinação das sementes de soja mediante o tratamento destas com as concentrações de NPs de prata propostas. Os quatro lotes de sementes deixados em repouso nas soluções com diferentes concentrações de nanopartícula de prata apresentaram 100 % de germinação e diferentes tamanhos para o crescimento da raiz. O valor médio do comprimento da raiz para as dez sementes germinadas em função das concentrações de nanopartículas de prata são apresentados na Figura 3.

Figura 3. Média do crescimento da raiz das sementes de soja submetidas ao teste de germinação.



Quanto ao desenvolvimento e média de crescimento das sementes, os resultados do teste de germinação não apresentaram uma diferença estatística entre as quatro concentrações de NPs de prata analisadas, mas sanou a incerteza de germinação das sementes submetidas ao tratamento com as nanopartículas.

3.2. Determinação do Teor de Clorofila

Os resultados obtidos no estudo da absorção dos extratos de clorofila para cada grupo de plantas: (SNPs) e (CNP), indicam duas regiões distintas de absorção, de 400 a 500 nm: região as quais clorofilas *a* e *b* e outros pigmentos como os carotenóides absorvem a radiação luminosa, ocorrendo uma sobreposição de bandas e absorção de 600 a 700 nm: região cujas clorofilas *a* e *b* também absorvem a luz [25]. A concentração de clorofila *a* e *b* para cada extrato, apresentadas na Tabela 1, foi calculada através do método de Arnon adaptado por Porra descrito na seção 2.7 pela Equação 1.

Tabela 1. Concentração de clorofila dos extratos correspondente a cada tipo folicular.

Tipo Folicular	Concentração de Chl ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	
	SNPs	CNPs
Cotilédone	3,946	3,906

Unifólio	28,401	22,292
Trifólio	22,265	21,851

3.3. Fluorescência do Extrato de Clorofila

Os resultados demonstraram a ocorrência da supressão na intensidade de fluorescência da clorofila, para ambos os comprimentos de onda de excitação, no grupo (CNP), cujas sementes foram tratadas com o pó nanoparticulado de prata de 100 nm. As Figuras 4 e 5 representam os espectros de fluorescência com excitação em 405 e 532 nm respectivamente, para os extratos correspondentes aos três tipos foliulares das plantas (SNPs) e (CNP).

Figura 4. Espectros de fluorescência dos extratos de clorofila com excitação em 405 nm para cada tipo foliular: cotilédone, unifólio e trifólio dos grupos de plantas (SNPs) e (CNP).

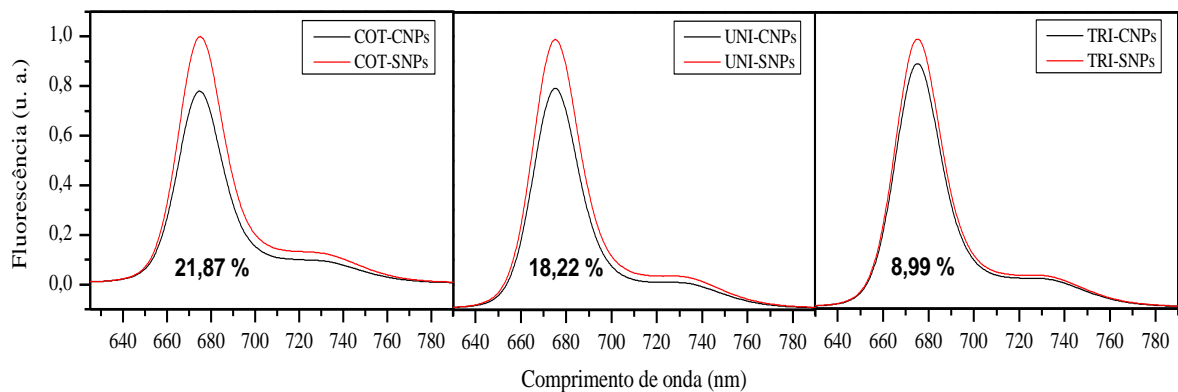
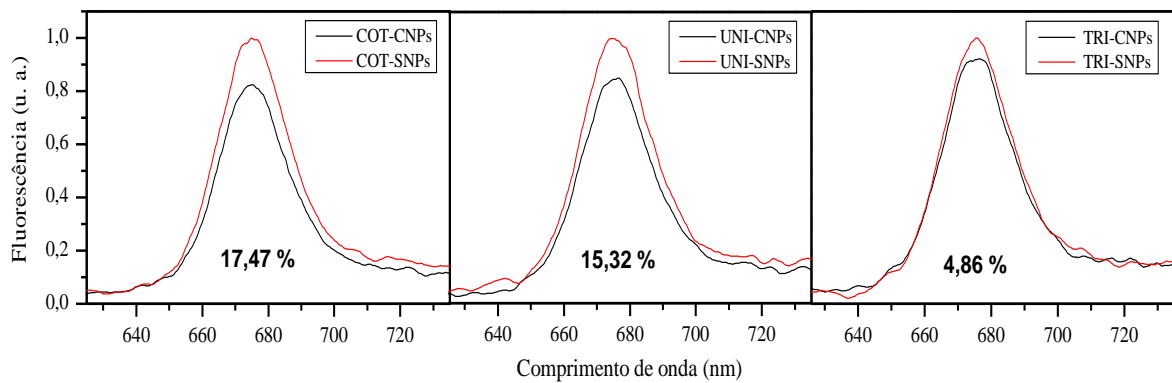


Figura 5. Espectros de fluorescência dos extratos de clorofila com excitação em 532 nm para cada tipo foliular: cotilédone, unifólio e trifólio dos grupos de plantas (SNPs) e (CNP).



A supressão da fluorescência do extrato de clorofila, induzida por nanopartículas de ouro de 8 nm, foi relatado por Barazzouk, S. et. al 2005 [26]. Os estudos realizados atribuíram o efeito de supressão ao processo de transferência fotoinduzida de elétrons da clorofila no estado excitado para as NPs.

Segundo Barazzouk e colaboradores, existem vários processos moleculares importantes pelo qual um supressor pode desativar um fluoróforo no estado excitado, sendo os mais importantes os de transferência de elétrons e a transferência de energia. No entanto, como os metais em dimensões de nanopartículas são mais eletronegativos que o material a granel, é mais provável que estes participem no processo de transferência de elétrons.

Através de estudos eletroquímicos, Barazzouk e seus colaboradores mostraram que nanopartículas metálicas podem aceitar e armazenar elétrons. Essa transferência de elétrons pode ser explicada uma vez que os elétrons das moléculas de clorofila no estado excitado, em vez de retornar ao estado fundamental emitindo radiação luminosa são transferidos para as NPs, resultando em uma diminuição do sinal de fluorescência.

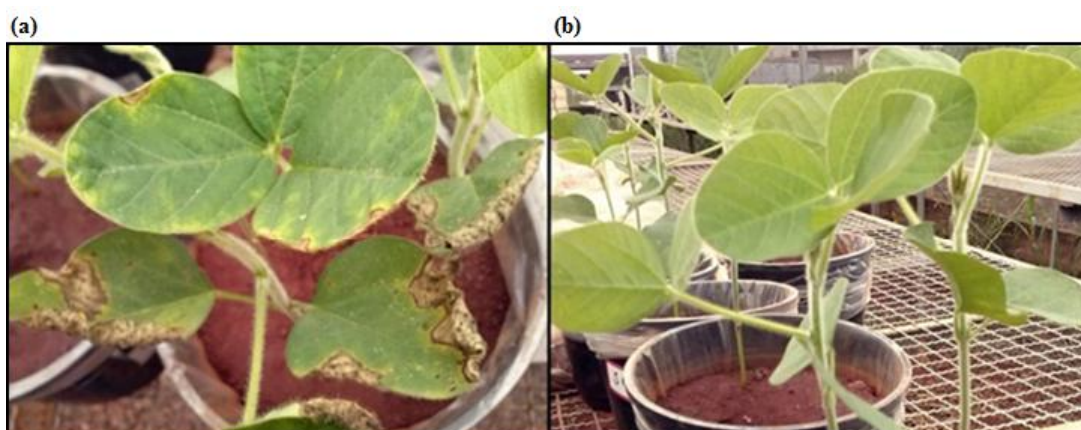
Falco e co-autores, 2011 [27] em estudos relacionados à interação nanopartícula-planta, sugeriram que o efeito da transferência de elétrons fotoinduzida da clorofila no estado excitado para NPs de ouro seja o processo dominante na supressão da fluorescência da clorofila.

Assim sendo, a supressão da fluorescência da clorofila no grupo de plantas (CNPs) para os três tipos foliares (cotilédone, unifólio e trifólio) pode estar relacionadas à adsorção de moléculas de clorofila na superfície das nanopartículas de prata, induzindo a transferência de elétrons da clorofila no estado excitado para as NPs.

3.4. Fluorescência *in vivo*

As análises de fluorescência *in vivo* foram realizadas em 40 plantas de soja nas folhas cotiledonares, unifolioladas e trifolioladas. Não foram observadas alterações induzida pelas nanopartículas de prata no processo de germinação das plantas, no entanto, após o nascimento do segundo trifólio, as folhas de algumas plantas do grupo (CNPs) começaram a apresentar manchas foliculares conforme ilustra a Figura 6, o que não ocorreu nas plantas do grupo (SNPs).

Figura 6. Plantas de soja após o nascimento do segundo trifólio: (a) grupo de plantas CNPs; (b) grupo de plantas SNPs.



Fonte: Elaborada pela autora

Os resultados de fluorescência *in vivo* revelaram uma supressão na intensidade de fluorescência da clorofila nas plantas submetidas ao tratamento com nanopartícula de prata. Tal supressão na fluorescência foi observada para ambos os comprimentos de onda de excitação, 405 e 532 nm, representado nas Figuras 7 e 8, respectivamente. Os espectros são as médias das medidas realizadas em 20 plantas de soja de cada grupo.

Figura 7. Espectros de fluorescência *in vivo* normalizada com excitação em 405 nm para cada tipo folicular: cotilédone, unifólio e trifólio dos grupos de plantas (SNPs) e (CNPs).

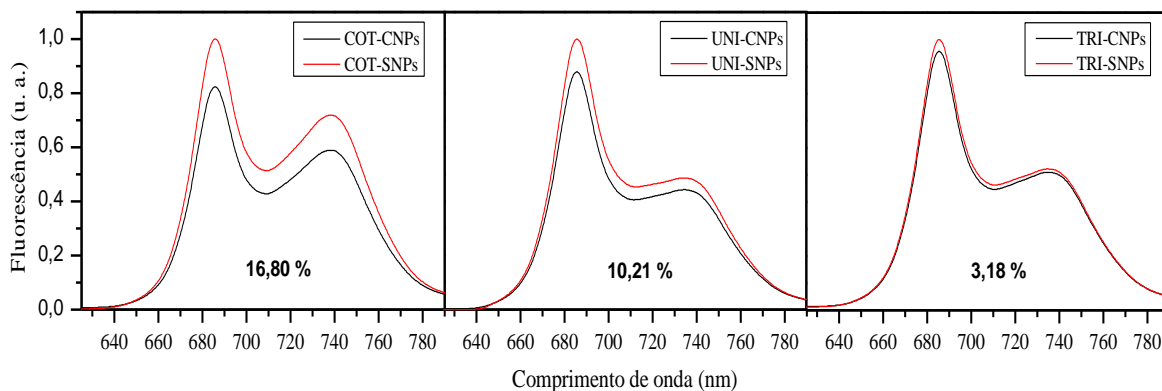
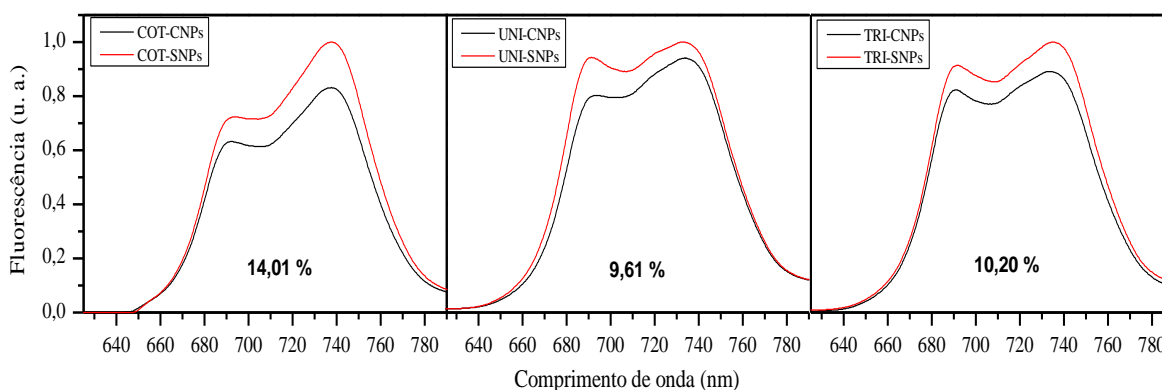


Figura 8. Espectros de fluorescência *in vivo* normalizada com excitação em 532 nm para cada tipo folicular: cotilédone, unifólio e trifólio dos grupos de plantas (SNPs) e (CNPs).



Através do cálculo da área abaixo da curva do espectro de emissão determinou-se a porcentagem de supressão na fluorescência das plantas (CNPs) para cada tipo folicular. Para o comprimento de onda de excitação em 405 nm, as folhas cotiledonares apresentaram a maior supressão na intensidade de fluorescência, 16,90 %, o que era esperado, visto que as folhas cotiledonares se originam das sementes, as quais as nanopartículas foram diretamente depositadas. As folhas unifolioladas apresentaram uma supressão de fluorescência de 10,21 % e as folhas trifolioladas, que são as mais altas e as últimas folhas a se expandir, apresentaram uma redução de 3,18 %.

Para a excitação em 532, as folhas cotiledonares apresentaram uma supressão na intensidade de fluorescência de 14,01 %, as folhas unifolioladas de 9,61 % e as folhas trifolioladas de 10,20 %.

A razão (F685/F735) das intensidades de fluorescência nos comprimentos de onda em 685 e 735 nm, picos característicos da clorofila *a*, pode ser usada medida de forma não-destrutiva para avaliar a concentração de clorofila presente na planta [28]. A partir do estudo dessa razão verificou-se que apesar da supressão de fluorescência nas plantas contaminadas

com NPs, em ambos os comprimentos de excitação (405 e 532 nm) e em cada tipo folicular, não houve alterações no teor de clorofila das plantas submetidas ao tratamento com nanopartículas de prata. Ou seja, a intensidade de supressão foi à mesma para os dois picos de fluorescência e esta aconteceu de forma proporcional quando comparado às folhas das plantas (SNPs).

Os valores da razão (F685/F735), apresentados na Tabela 2, para os três tipos foliculares (cotilédone, unifólio e trifólio) das plantas controle foi significativamente muito próximos aos das plantas submetidas ao tratamento com NPs.

Tabela 2. Valores da razão (F685/F735), nos comprimentos de excitação em 405 e 532 nm para cada tipo folicular, realizada a partir dos espectros apresentados nas Figuras 7 e 8.

Comprimentos de excitação em 405		
	Valores da Razão F685/F735	
Tipo Folicular	SNPs	CNPs
Cotilédone	1,39±0,19	1,39±0,26
Unifólio	2,05±0,15	1,98±0,25
Trifólio	1,91±0,33	1,87±0,18
Comprimentos de excitação em 532		
	Valores da Razão F685/F735	
Tipo Folicular	SNPs	CNPs
Cotilédone	0,63±0,07	0,67±0,10
Unifólio	0,96±0,13	0,87±0,13
Trifólio	0,84±0,26	0,82±0,11

A supressão na intensidade de fluorescência observada para todos os tipos foliculares (cotilédone, unifólio e trifólio) das plantas submetidas ao tratamento com nanopartículas de prata sugere que as NPs foram capazes de penetrar as sementes e de se translocar até as folhas das plantas de soja (*Glycine max*). No estudo com plantas de abóbora (*Cucurbita maxima*) cultivadas em um meio aquoso contendo nanopartículas de óxido de ferro, H. Zhu, et. al, 2008 [29] provaram que as plantas foram capazes de absorver, translocar e acumular as nanopartículas nos tecidos vegetais. Cerca de 0,6 % das nanopartículas fornecidas foram acumuladas nas folhas e 45,4 % destas foram detectadas nas raízes.

Quando eventos fotossintéticos relacionados com os processos bioquímicos ou fisiológicos das plantas são inibidos, o rendimento de fluorescência da clorofila dissipada é

alterado [30]. Portanto, a supressão de fluorescência da clorofila pode estar diretamente ligada ao estresse causado nas plantas submetidas ao tratamento com NPs [31].

Detectado o estresse nas plantas a partir da análise de fluorescência *in vivo* da clorofila realizada, pode-se afirmar que as NPs de prata interferiram diretamente nos processos fotossintéticos das plantas de soja. Esta interferência pode estar relacionada à toxicidade das NPs ou a interações físicas entre as nanopartículas e as vias de transporte da célula vegetal isto é, através da inibição tráfico apoplástica pelo bloqueio dos espaços intercelulares na parede celular da planta.

Asli, S. et. al, 2009 [32] em seu estudo realizado com plantas de milho (*Zeamays L.*) mostrou que a inibição do crescimento das folhas e transpiração das plantas por nanopartículas de TiO₂ ocorre devido a redução da condutividade hidráulica. O diâmetro dos poros da parede celular das raízes de milho foi reduzido de 6,6 nm para 3,0 nm após tratamento com as nanopartículas.

Por sua vez, definir a toxicidade de NPs em plantas é extremamente complexo. [33]. Estudos anteriores realizados por Ma, X. et. al, 2010 demonstraram claramente que diferentes espécies de plantas demonstram diferente resistividade as nanopartículas, mas como e por que isso ocorre ainda é instável [34].

No estudo das alterações na atividade fotossintética de algas verdes (*Chlamydomonas reinhardtii*) induzidas por NPs, C. Saison, et. al, 2010 [35] mostraram que nanopartículas de óxido de cobre cobertas com poliestireno induziram processos de agregação celular, provocando uma inibição do transporte fotossintético de elétrons, provocando uma forte dissipação de energia por processos não-fotoquímicos.

A redução da fluorescência da clorofila em plantas também foi associada à necessidade de reorganização do mecanismo de fotossíntese por Busch, et. al, 2008. O estudo relatou que agentes supressores provocaram mudanças no conteúdo de clorofila e proteína de plantas [36].

Diante os resultados apresentados na análise *in vivo*, a supressão da fluorescência da clorofila nas plantas de soja (CNPs), pode estar relacionada à inibição, induzida pelas NPs, de processos bioquímicos das plantas, provocando mudanças em suas atividades fotossintéticas e, conseqüentemente, diminuindo o rendimento de fluorescência da clorofila dissipada.

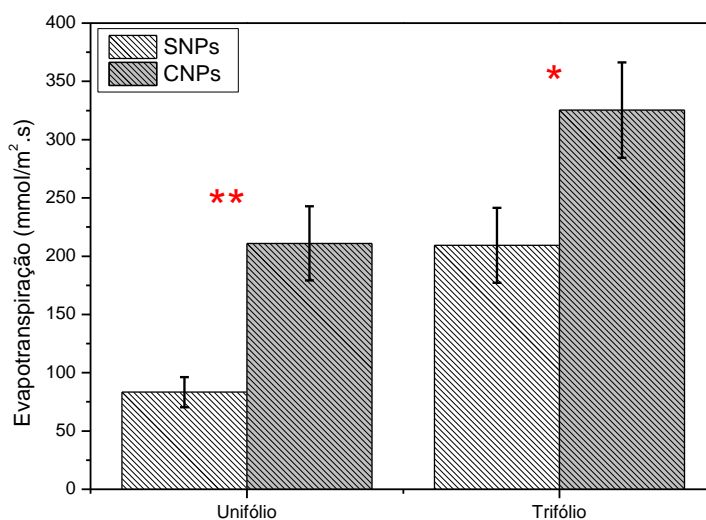
3.5. Evapotranspiração

Através das medidas de evapotranspiração, que forneceu a taxa de respiração das plantas de soja em mmol/m².s, observou-se que as plantas submetidas ao tratamento com

nanopartículas de prata, grupo (CNPs), apresentaram uma maior taxa de respiração conforme apresentado na Figura 9.

A média para taxa de respiração das plantas apresentou-se maior para os trifólios, em ambos os grupos, uma vez que estes são folhas maiores e mais desenvolvidas que os unifólios e a evapotranspiração é altamente correlacionada com a expansão de área foliar [37].

Figura 9. Gráfico com os valores médios das medidas de evapotranspiração. *Ao nível de confiança 0,95 os valores são significativamente diferentes. ** Ao nível de confiança 0,99 os valores são significativamente diferentes.



Os estômatos são estruturas vegetais responsáveis pela troca gasosa da planta com o ambiente, quando ocorre à abertura destes para a entrada de CO₂ há perda de água. As células-guarda, presentes nos estômatos, funcionam como uma válvula de abertura/fechamento, quando aberto os estômatos possuem de 5 a 15 µm de largura e 20 µm de comprimento representando cerca de 2% da área total da folha [38].

Efeitos como o estresse hídrico e salino provocam a redução na evapotranspiração das plantas [39]. No entanto, as plantas submetidas às NPs de prata apresentaram um aumento significativo, revelando uma situação de estresse na qual as nanopartículas induziram nas plantas alterando seu processo de transpiração foliar.

4. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos revelaram que as nanopartículas de prata não alteraram a germinação e o crescimento das plantas. Todavia, as NPs induziram uma supressão na

fluorescência da clorofila, e esse efeito de diminuição da emissão da clorofila foi observado tanto nas análises diretamente nas plantas, *in vivo*, quanto nas análises no extrato da clorofila. As supressões determinadas sugerem que as NPs foram capazes de penetrarem nas sementes de soja e se translocarem até as folhas, se acumulando nos cotilédones, unifólios e trifólios em diferentes concentrações, onde a maior concentração foi determinada nas folhas cotiledonares por se originarem das sementes, e a menor concentração para as folhas trifolioladas, por serem as últimas a se desenvolverem. Além das alterações na fluorescência da clorofila, os resultados também demonstraram que as NPs de prata alteraram o processo de transpiração foliar, revelando uma situação de estresse na qual as nanopartículas induziram nas plantas. Em resumo, no presente estudo foi demonstrado que as NPs podem influenciar direta ou indiretamente o estado fisiológico das plantas como também os processos fotossintéticos. Ademais, também foi mostrado que a espectroscopia de fluorescência induzida a laser pode ser utilizada como uma técnica analítica eficiente e não destrutiva na investigação de alterações na resposta fisiológica de plantas induzidas por nanopartículas metálicas.

5. REFERÊNCIAS

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

[2] BRANDÃO, H. M. Nanotecnologia: a próxima revolução na agropecuária. **Revista CRMV**, v.17, n. 53, p 61-67, 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] MORETTIN, P. A.; BUSSAB, W. O. **Estatística Básica**. 6 ed. São Paulo: Atual, 2010.

[5] AITKEN, R.J.; HANKIN, S.M.; TRAN, C.L.; DONALDSON, K.; STONE, V.; CUMPSON, P.; JOHNSTONE, J.; CHAUDHRY, Q.; CASH, S. REFNANO: Reference materials for engineered nanoparticle toxicology and metrology. Final report on Project CB01099, Defra, London, 2007.

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

[7] GOTTSCHALK, F.; SONDERER, T.; SCHOLZ, R. W.; NOWACK, B. Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO₂, ZnO, Ag, CNT, Fullerenes) for Different Regions. **Environmental Science & Technology**, v. 43, n. 24, p. 9216-9222, 2009.

[8] QUINA, F. Nanotecnologia e o meio ambiente: perspectivas e riscos. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 1028-1029, 2004.

[9] MA, X.; GEISER-LEE, J.; DENG, Y.; KOLMAKOV, A. Interactions between engineered nanoparticles (ENPs) and plants: Phytotoxicity, uptake and accumulation. **Science of the Total Environment**, v. 408, n. 16, p. 3053-3061, 2010.

[10] SOTO, K. F.; CARRASCO, A.; POWELL, T. G.; MURR, L. E.; GARZA, K. M. Biological effects of nanoparticulate materials. **Materials Science & Engineering C-Biomimetic and Supramolecular Systems**, v. 26, n. 8, p. 1421-1427, 2006.

[11] OBERDORSTER, E. Manufactured nanomaterials (Fullerenes, C-60) induce oxidative stress in the brain of juvenile largemouth bass. **Environmental Health Perspectives**, v. 112, n. 10, p. 1058-1062, 2004.

[12] DASH, A.; SINGH, A. P.; CHAUDHARY, B. R.; SINGH, S. K.; DASH, D. Effect of silver nanoparticles on growth of eukaryotic green algae. **Nano-Micro Letters**, v. 4, n.3, p. 158-165, 2012.

[13] LIN, D.; XING, B. Root uptake and phytotoxicity of ZnO nanoparticles. **Environmental Science & Technology**, v. 42, p. 5580–5585, 2008.

[14] YANG, L.; WATTS, D. J. Particle surface characteristics may play an important role in phytotoxicity of alumina nanoparticles. **Toxicology Letters**, v. 158, n. 2, p. 122-132, 2005.

[15] LEE, W. M.; AN, Y. J.; YOON, H.; KWEON, H. S. Toxicity and bioavailability of copper nanoparticles to the terrestrial plants mung bean (*Phaseolus radiatus*) and wheat (*Triticum aestivum*): Plant agar test for water-insoluble nanoparticles. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 27, n. 9, p. 1915-1921, 2008.

[16] MUSHTAQ, Y. K. Effect of nanoscale Fe₃O₄, TiO₂ and carbon particles on cucumber seed germination. **Journal of Environmental Science and Health A**, v. 46, n.14, p.1732-1735, 2011.

- [17] LU, C. M.; ZHANG, C.Y.; WEN, J. Q.; WU, G.R.; TAO, M.X. Research of the effect of nanometer materials on germination and growth enhancement of Glycine max and its mechanisms. **Environmental Science e Technology**, v. 21, p.168-172, 2002.
- [18] BAKER, N. R. Chlorophyll fluorescence: A probe of photosynthesis in vivo. In: (Ed.). **Annual Review of Plant Biology**, v.59, p. 89-113, 2008.
- [19] LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids, the pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in enzymology**, v. 148, p. 350-382, 1987.
- [20] CEROVIC, Z. G.; SAMSON, G.; IRIBAS, F. M. Ultraviolet-induced fluorescence for plant monitoring: present state and prospects. **Agronomie**, v. 19, n. 7, p. 543-578, 1999.
- [21] ZHAO, C. M.; WANG, G. X.; WEI, X. P.; DENG, J. M.; CHENG, D. L. Effects of groundwater depth variation on photosynthesis and photoprotection of *Elaeagnus angustifolia* L. **Trees-Structure and Function**, v. 21, n. 1, p. 55-63, 2007.
- [22] KAO, W. Y.; TSAI, T. T. Tropic leaf movements, photosynthetic gas exchange, leaf delta C-13 and chlorophyll a fluorescence of three soybean species in response to water availability. **Journal of Plant Cell Environment**, v. 21, n. 10, p. 1055-1062, 1998.
- [23] MAXWELL, K.; JOHNSON, G. N. Chlorophyll fluorescence - a practical guide. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, n. 345, p. 659-668, 2000.
- [24] PORRA, R. J. The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b. **Photosynthesis Research**, v. 73, n. 1-3, p. 149-156, 2002.
- [25] CEROVIC, Z. G.; SAMSON, F.; MORALES, N.; TREMBLAY, I. M. Ultraviolet-induced fluorescence for plant monitoring: present state and prospects. **Agronomie**, v. 19, n. 7, p. 543-578, 1999.
- [26] BARAZZOUK, S.; KAMAT, P. V.; HOTCHANDANI, S. Photoinduced electrontransfer between chlorophyll a and gold nanoparticles. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 109, n. 2, p. 716-723, 2005.
- [27] FALCO, W. F.; BOTERO, E. R.; FALCÃO, E. A.; SANTIAGO, E. F.; BAGNATO, V. S.; CAIRES, A. R. L. In vivo observation of chlorophyll fluorescence quenching induced by gold nanoparticles. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 225, p. 65 - 71, 2011.
- [28] NDAO, A. S. et al. Analysis of chlorophyll fluorescence spectra in some tropical plants. **Journal of Fluorescence**, v. 15, n. 2, p. 123-129, 2005.

- [29] ZHU, H.; HAN, J.; XIAO, J. Q.; JIN, Y. Uptake, translocation, and accumulation of manufactured iron oxide nanoparticles by pumpkin plants. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 10, n. 6, p. 713-717, 2008.
- [30] BAKER, N. R. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, p. 89 – 113, 2008.
- [31] BUSCHMANN, C. Variability and application of the chlorophyll fluorescence emission ratio red/far-red of leaf. **Photosynthesis Research**, v. 92, p. 261 – 271, 2007.
- [32] ASLI, S.; NEUMANN, P. M. Colloidal suspensions of clay or titanium dioxide nanoparticles can inhibit leaf growth and transpiration via physical effects on root water transport. **Journal of Plant Cell Environment**, v. 32, p. 577-584, 2009.
- [33] BATTKE, F.; LEOPOLD, K.; MAIER, M.; SCHMIDHALTER, U.; SCHUSTER, M. Palladium exposure of barley: uptake and effects. **Journal of Plant Biology**, v. 10, p. 272-276, 2009.
- [34] MA, X.; GEISER-LEE, J.; DENG, Y.; KOLMAKOV, A. Interactions between engineered nanoparticles (ENPs) and plants: Phytotoxicity, uptake and accumulation. **Science of the Total Environment**, v. 409, p. 3053-3061, 2010.
- [35] SAISON, C.; PERREAULT, F.; DAIGLE, J. C.; FORTIN, C.; CLAVERIE, J.; MORIN, M.; POPOVIC, R. Effect of core-shell copper oxide nanoparticles on cell culture morphology and photosynthesis (photosystem II energy distribution) in the green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*. **Aquatic Toxicology**, v. 96, n. 2, p. 109-114, 2010.
- [36] BUSCH, F.; HUENER, N. P. A.; ENSMINGER, I. Increased air temperature during simulated autumn conditions impairs photosynthetic electron transport between photosystem II and photosystem I. **Plant Physiology**, v. 147, n. 1, p. 402-414, 2008.
- [37] GRAHAM, E. A.; YUEN, E. M.; ROBERTSON, G. F.; KAISER, W. J.; HAMILTON, M. P.; RUNDEL, P. W. Budburst and leaf area expansion measured with a novel mobile camera system and simple color thresholding. **Environmental and Experimental Botany**, v. 65, p. 238-244, 2009.
- [38] TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4.ed. Artmed, Porto Alegre, Brasil. 819p., 2009.
- [39] MORITANI, S.; YAMAMOTO, T.; ANDRY, H.; INOUE, M.; KATO, K.; SAITO, H. Effect of combined water and salinity stress factors on evapotranspiration of *Sedum kamtschaticum* Fischer in relation to green roof irrigation. **Urban Forestry & Urban Greening**, v. 12, p. 338-343, 2013.