



**LUTHIANE MACHADO FERRAZ**

**EFEITO DE MICRO E NANOPARTÍCULAS DE  
PRATA EM *Physalis peruviana* L.**

**LAVRAS-MG  
2017**

**LUTHIANE MACHADO FERRAZ**

**EFEITO DE MICRO E NANOPARTÍCULAS DE PRATA EM**

*Physalis peruviana L.*

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós- Graduação em Engenharia de Biomateriais, área de concentração em Compósitos e Nanocompósitos lignocelulósicos, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. José Manoel Marconcini  
Orientador

Prof. Dr. Juliano Elvis Oliveira  
Co-orientador

**LAVRAS-MG  
2017**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Ferraz, Luthiane Machado.

Efeito de micro e nanopartículas de prata em *Physalis  
peruviana L.* / Luthiane Machado Ferraz. - 2017.

66 p.

Orientador(a): José Manoel Marconcini.

Coorientador(a): Juliano Elvis de Oliveira.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de  
Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. Nanotecnologia. 2. Plantas. 3. Meio Ambiente. I.  
Marconcini, José Manoel. II. Oliveira, Juliano Elvis de. III. Título.

**LUTHIANE MACHADO FERRAZ**

**EFEITO DE MICRO E NANOPARTÍCULAS DE PRATA EM**  
*Physalis peruviana L.*

**EFFECT OF SILVER MICRO AND NANOPARTICLES ON**  
*Physalis peruviana L.*

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós- Graduação em Engenharia de Biomateriais, área de concentração em Compósitos e Nanocompósitos lignocelulósicos, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 09 de Março de 2017.

Prof. Dr. José Manoel Marconcini Embrapa Instrumentação

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Milene Alves de Figueiredo Carvalho Embrapa Café

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Michele Valquíria dos Reis UFLA

Prof. Dr. José Manoel Marconcini  
Orientador

Prof. Dr. Juliano Elvis Oliveira  
Co-orientador

**LAVRAS-MG**  
**2017**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me auxiliar nos momentos mais difíceis nos quais fiquei longe da minha família e pelo aprendizado; por me confortar e por ter colocado no meu caminho pessoas maravilhosas;

Aos meus pais, minha mãe, Verinalva Machado e meu pai Silvano Ferraz, por ter me apoiado e serem uma das razões das minhas vitórias. Com certeza não teria consigo sem vocês comigo até hoje;

Ao meu irmão, Lucas pela parceria, carinho e amizade em todos os momentos;

Ao meu amigo Thiago Cordeiro pelo apoio, parceria e amizade; pelos momentos mais difíceis em que estive ao meu lado, me auxiliando a encarar com alegria as dificuldades;

Ao Professor Juliano Elvis, por ter me sido a verdadeira ponte para o meu aprendizado e experiência de vida; pela amizade, por me acolher com tanta satisfação, pela dedicação, paciência e compreensão;

Ao Professor José Manoel Marconcini, pelo entusiasmo, seu jeito alegre de ensinar e encarar a vida, pela motivação, paciência e ajuda nas horas que precisei;

À Universidade Federal de Lavras e aos professores, funcionários e colegas do Departamento de Fisiologia Vegetal e Engenharia de Biomateriais, pelas contribuições e todos os ensinamentos concebidos;

Aos meus tutores e amigos Michele Reis e Diogo Pedrosa, por terem me ajudado muito ao longo deste trabalho, pelos ensinamentos, pela paciência, o jeito dedicado de auxiliar, pela companhia, risadas e toda amizade; à minha amiga Carol, que sempre estava disponível a me ajudar nas atividades, pela amizade;

Aos membros da banca examinadora,

A CAPES e ao CNPq, por ter custeado minhas despesas durante os dois anos de curso.

A minha amiga, Joice Raísa, por ter sido um dos motivos para eu fazer o mestrado na UFLA, e pela parceria e companhia durante esses anos aqui em Lavras;

Aos meus amigos João Lucas, Fia Guerra, Carina Alonso, Odair Eugênio e Maisa Mota, pelas descontrações, risadas, almoços, festas, conversas e por terem sido meu suporte nos momentos mais difíceis.

## RESUMO

Nos últimos anos, o interesse, a rápida produção e as amplas aplicações da nanotecnologia estimularam de forma significativa o número de nanomateriais projetados no meio ambiente. No entanto, a relação entre nanomateriais com os organismos vivos nesse meio necessita ser melhor investigada. Estudos que buscam compreender os mecanismos de ação dos nanomateriais sobre a homeostase das plantas são necessários a fim de caracterizar os efeitos que essas nanopartículas podem acarretar no meio ambiente. Nesse contexto, este trabalho objetiva investigar os efeitos das nanopartículas de prata (AgNPs) em um modelo vegetal com potencial utilização em bioensaios, a *Physalis peruviana* L. Foi feita a síntese das nanopartículas de prata e caracterização das mesmas com e sem processamento térmico adicional, a fim de avaliar a ação da temperatura nas propriedades das AgNPs. Foram realizadas análises dos efeitos de diferentes concentrações de nanopartículas de prata (0,39, 0,77, 1,54 mg L<sup>-1</sup>) com e sem processamento térmico (121°C, 1 atm) sobre a germinação, parâmetros de crescimento da raiz e parte aérea e a na bioquímica (açúcares redutores, açúcares solúveis totais, aminoácidos, catalase, ascorbato peroxidase e superóxido dismutase) de *Physalis peruviana*. Foi observado que as partículas após o processamento térmico, em comparação com as AgNPs sem processamento térmico, apresentavam 2 tipos de tamanho (nano e micrométricas). Os resultados demonstram que as concentrações de 0,77 e 1,54 mg L<sup>-1</sup> do tratamento que apresentava apenas AgNPs aumentaram a biomassa da parte aérea. No entanto, a menor concentração (0,39 mg L<sup>-1</sup>) reduziu a biomassa, o comprimento da raiz e alguns parâmetros bioquímicos (açúcares solúveis totais e aminoácidos). Além disso, foi observado que os valores para massa seca da parte aérea e da raiz, teor de água da raiz, açúcares solúveis totais, aminoácidos e açúcares redutores obtidos com o tratamento com AgNPs e AgMPs (micropartículas de prata) foi menor em relação ao tratamento com apenas AgNPs, a depender da concentração analisada. Entretanto, para esta espécie nestas condições, pode-se concluir que tanto as micropartículas quanto as nanopartículas acarretaram poucas ou nenhuma modificação na fisiologia das plantas, a depender do tratamento analisado.

**Palavras-chave:** Plantas. Nanotecnologia. Síntese. Temperatura. Meio Ambiente.

## ABSTRACT

In the last years, interest, rapid production, and extensive nanotechnology applications have significantly stimulated the nanomaterials number projected at the environment. However, the relationship between nanomaterials and living organisms in this environment needs to be better investigated. Studies that seek to understand the mechanisms of nanomaterials action on plant homeostasis are necessary in order to characterize the effects that these nanoparticles can have on the environment. In this context, this work aims to investigate the effects of silver nanoparticles (AgNPs) in plant model with potential use in bioassays, *Physalis peruviana* L. The synthesis of silver nanoparticles and their characterization were done with and without additional thermal processing, In order to evaluate the temperature action on the AgNPs properties. Analysis of the effects of different silver nanoparticles concentrations (0.39, 0.77, 1.54 mg L<sup>-1</sup>) with and without thermal processing (121 ° C, 1 atm) on germination, root and aerial part growth parameters and in biochemistry (reducing sugars, total soluble sugars, amino acids, catalase, ascorbate peroxidase and superoxide dismutase) of *Physalis peruviana*. It was observed that particles after thermal processing, in comparison with AgNPs without thermal processing, had 2 size types (nano and micrometric). The results demonstrate that the 0.77 and 1.54 mg L<sup>-1</sup> concentrations of the treatment with only AgNPs increased the biomass of the aerial part. However, the lower concentration (0.39 mg L<sup>-1</sup>) reduced biomass, root length and some biochemical parameters (total soluble sugars and amino acids). In addition, it was observed that root and shoot dry matter, root water content, total soluble sugars, amino acids and reducing sugars values obtained with AgNPs and AgMPs (silver microparticles) treatment were lower in relation to treatment with only AgNPs, depending on the concentration analyzed. However, for this species under these conditions, it can be concluded that both microparticles and nanoparticles have little or no modification in plant physiology, depending on the treatment analyzed.

**Keywords:** Plants. Nanotechnology. Synthesis. Temperature. Environment.



## SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE .....	9
1 INTRODUÇÃO.....	9
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	12
2.1 Nanotecnologia no setor do agronegócio e no mercado .....	12
2.2 Interação de nanopartículas com plantas.....	15
2.3 Cultivo <i>in vitro</i> de plantas e suas implicações em estudos de nanotecnologias.....	18
2.4 Nanopartículas de prata.....	20
2.5 Efeitos de nanopartículas de prata em plantas .....	24
2.6 <i>Physalis (Physalis peruviana L.)</i> .....	29
REFERÊNCIAS .....	31
SEGUNDA PARTE - ARTIGO.....	39
ARTIGO - EFEITO DE MICRO E NANOPARTÍCULAS DE PRATA EM <i>Physalis peruviana L</i> .....	39

## **PRIMEIRA PARTE**

### **1 INTRODUÇÃO**

As nanopartículas são definidas como materiais em dispersões ou frações sólidas em escala nanométrica, cujas dimensões variam até 1-100 nm (MOHANRAJ e CHEN, 2007). Elas podem ser sintetizadas por rotas físicas, químicas ou biosustentáveis, as quais utilizam reagentes naturais que danificam menos o meio ambiente (KHARISSOVA et al, 2013). Dependendo do método de preparação, o produto final obtido pode apresentar conformações variadas, como por exemplo, nanoesferas, nanocubos, nanohastes, entre outras (KHODASHENAS e GHORBANI, 2015).

Cada nanopartícula apresenta propriedades físicas e químicas diferentes que podem direcioná-la a uma aplicação específica nos mais variados setores, sejam alimentícios, medicinal, mecânico ou ambiental. No ramo da medicina, algumas empresas já investigam a aplicação desses nanomateriais na administração de fármacos e genes, terapias de cancros e tumores, marcações biomoleculares e até mesmo engenharia de tecidos (SALATA, 2004). Outras aplicações das nanopartículas estão voltadas a tratamento de efluentes industriais, produção de filmes comestíveis, confecção de materiais mais resistentes, entre outros (TANG e LO, 2013; KORDKHEILI; FARSI; REZAZADEH et al, 2013; LIU et al, 2015).

As nanopartículas de prata tornaram-se as mais comumente utilizadas em produtos de consumo, devido sua ação bactericida (HUND-RINKE et al. 2008). Elas, atualmente, estão inseridas em diversos itens comerciais, como por exemplo, embalagens, suplementos alimentares, cosméticos e produtos de higiene pessoal (SENJEN e ILLUMINATO, 2009). Pois os órgãos governamentais (Food and Drug Administration e Anvisa, por exemplo)

responsáveis por controlar a inserção desses produtos de consumo no mercado, classificaram essas nanopartículas como substâncias geralmente reconhecidas como seguras ou GRAs. Principalmente, devido à falta de estudos que comprovem a nocividade desses materiais em organismos vivos (GAO, 2010).

Entretanto, não se sabe quais conseqüências podem acarretar a interação dessas nanopartículas em células, órgãos e/ou metabolismo de seres vivos, sejam animais, humanos, microorganismos ou plantas. Dessa forma, têm-se buscado tanto espécies com características conhecidas para utilização em bioensaios quantas condições experimentais que promovam resultados imediatos e confiáveis (GAGNÉ; GAGNON; BLAISE et al, 2007; KWAK et al, 2016).

A literatura têm abordado a utilização de diversas espécies vegetais padrão em bioensaios relacionados à interação de AgNPs em plantas, como a *Arabidopsis thaliana*, *Allium cepa*, *Lactuca sativa*, entre outras (QIAN et al, 2013; KUMARI; MUKHERJEE; CHANDRASEKARAN et al, 2009; BARRENA et al, 2009). A *Physalis peruviana*, no entanto, é uma espécie vegetal nativa da Amazônia e dos Andes, pertencente à família Solanaceae. Esta espécie é bastante utilizada no Brasil para fins tanto alimentícios quanto medicinais (MUNIZ; MOLINA; MUNIZ et al, 2015). Além disso, a *Physalis peruviana* apresenta propriedades germinativas, ultra-estruturais e bioquímicas já elucidadas na literatura, o que faz com que esta espécie também seja uma potencial ferramenta em estudos de bioensaios (SALAZAR et al, 2008; PUENTE et al, 2011).

Ademais, algumas técnicas utilizadas em estudos de toxicidade em modelo experimental vegetal, por exemplo, necessitam de ambientes altamente estéreis, a fim de minimizar possíveis erros e/ou perdas relacionadas à contaminação (CID, 2014). Um desses principais meios de esterilização consiste no processo de autoclavagem, o qual submetem as amostras a alta temperatura e

pressão (121°C e 1 atm) (ZAFAR et al, 2016). No entanto, observa-se que as condições experimentais são uma das variáveis que devem ser analisadas em experimentos utilizando AgNPs. Uma vez que tais condições podem alterar as propriedades físico-químicas desses materiais, tais como, dimensão, morfologia, cargas na superfície, composição química, etc e conseqüentemente comprometerem os resultados (MOON et al, 2005).

A partir desse contexto, foi realizado um estudo a fim de avaliar os efeitos de nanopartículas de prata na germinação, crescimento e alguns parâmetros bioquímicos de *Physalis peruviana*.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Nanotecnologia no setor do agronegócio e no mercado**

As perspectivas de inovação no regime agrícola iniciaram sua evolução nos Estados Unidos e Europa no início de 1960 com a chamada Revolução Verde. Essa revolução estabeleceu a modernização e mecanização da agricultura, com o desenvolvimento de novas técnicas e protocolos de plantio que elevaram os níveis de produtividade e sustentabilidade. Este fato contribuiu para um melhoramento na produção e exportação agrícola através da aplicação de modernas tecnologias (HALL et al, 2011).

A partir disso, novas ferramentas acessíveis à população foram necessárias para atender a demanda do mercado global e evitar um colapso provocado pela falta de alimentos mundial (SAYER e CASSMAN, 2013). A descoberta da tecnologia do DNA recombinante nos anos 70 e o advento da biotecnologia foram considerados um marco na evolução agrícola, onde mudanças radicais foram impostas nos padrões tecnológicos e organizacionais de todos os setores, ligados de forma direta ou indireta a agricultura e toda a cadeia produtiva da agroindústria, desde o mercado de fertilizantes à indústria de insumos (SILVEIRA; BORGES; BUAINAIN et al, 2005).

A Comissão Européia estima que a nanotecnologia, atualmente, seja uma das tecnologias que mais contribuem para a competitividade e o crescimento sustentável em diversos campos de aplicação (GOUVEA, 2013). Os nanomateriais podem ocorrer de duas formas diferentes: naturalmente, em cinzas vulcânicas, argilas, nuvens e espumas oceânicas, por exemplo. Ou podem ser produzidos com propriedades específicas através de processos químicos ou físicos, de forma intencional. Esses são denominados "nanomateriais artificiais" (BUZEA; PACHECO; ROBBIE et al, 2007). A depender das propriedades

requeridas, esses nanomateriais são distribuídos para diversas áreas, como medicina, eletrônica e energia, produção agrícola e processamento de alimentos (SHAH, 2010).

No setor agroindustrial, diversas inovações tecnológicas são necessárias, principalmente, devido os crescentes desafios globais de segurança alimentar e alterações climáticas. A Tabela 1 demonstra as diversas contribuições que as nanopartículas têm oferecido ao ramo do agronegócio.

Tabela 1 — Aplicações da nanotecnologia no agronegócio

<b>Aplicações de nanopartículas no agronegócio</b>	<b>Autor (es)</b>
	WANG et al (2010); LIU et al (2012)
Desenvolvimento de sensores para detecção de pesticidas	
Confecção de embalagens	ESPITIA et al (2012)
Remediação de efluentes	NASSAR (2013)
Produção de inseticidas	OLIVEIRA et al (2014)
Liberação controlada de agrotóxicos	AOUADA e MOURA (2015)
Fertilizantes	RUI et al (2016); ABDEL-AZIZ; HASANEEN; OMER et al (2016)

Fonte: Do Autor (2017)

A síntese e a manipulação deliberada de nanomateriais iniciaram-se há milênios sem o devido entendimento dos processos básicos envolvidos. Atualmente sabe-se que a tinta nanquim, desenvolvida pelos chineses há mais de dois mil anos, apresentava nanopartículas de carvão suspensas em sua

composição. Eles estabilizavam a tinta nanquim com uma mistura de goma arábica na solução com pó de carvão e água. Da mesma forma, as cores dos vitrais das catedrais medievais são o resultado de nanopartículas de ouro de tamanhos distintos (MELO e PIMENTA, 2007).

No contexto histórico o homem já produzia as nanopartículas sem elucidar seus mecanismos de ação. A fim de registrar a inserção da nanotecnologia no mercado consumidor, o Centro Internacional Wilson Woodrow para acadêmicos e o Projeto sobre Nanotecnologias Emergentes criaram o Inventário de Produtos Nanotecnológicos de Consumo em 2005, listando 54 produtos. E em 2010, a lista de produtos com nanotecnologia aumentou para 1012 itens de 409 empresas em 24 países (VANCE et al, 2015).

Entretanto, em outubro de 2010 o Conselho Nacional de Padrões Orgânicos recomendou a proibição de nanomateriais artificiais em produtos alimentares nos Estados Unidos da América (EUA) até obter uma legislação vigente que regulamente a segurança dos nanomateriais para a saúde e o meio ambiente (KESSLER, 2011). Isso porque o FDA (Food and Drug Administration), o órgão governamental dos EUA responsável pelo controle dos alimentos (humano e animal), suplementos alimentares, medicamentos (humano e animal), cosméticos, entre outros, classificou nanomateriais artificiais como substâncias Geralmente Reconhecidas como Seguras ou GRAs, devido à falta de documentos que comprovem a nocividade das nanopartículas para o organismo de seres vivos. A utilização de GRAS é voluntária e as empresas acabam não sendo obrigadas a identificar os nanomateriais em seus produtos. Dessa forma, o FDA não tem nenhum controle sobre a inserção de nanomateriais no abastecimento alimentar dos Estados Unidos (GAO, 2010).

No Brasil ainda não há uma legislação específica sobre o uso de nanopartículas em alimentos ou em materiais em contato com alimentos.

Atualmente, a aprovação para uso de substâncias nanométricas em alimentos depende de sua inclusão nas listas de legislações ou referências utilizadas pela ANVISA para elaboração dos regulamentos nacionais, como a legislação da União Europeia, FDA e *Codex Alimentarius* (ANVISA, 2014).

Segundo as legislações vigentes no mercado, vários produtos contendo algum tipo de nanotecnologia já se encontram nas prateleiras, tanto no âmbito internacional como brasileiro. Alguns alegam a urgente necessidade de uma legislação específica para a nanotecnologia. Em paralelo, há também a concepção de que tais legislações vigentes seriam aplicáveis à regulamentação das nanotecnologias no mercado, principalmente aquelas legislações associadas à saúde humana devido o alto rigor em premissas técnicas (RICCARDI e GUASTALDI, 2013). Tais alegações consideram as conseqüências promovidas pelo amianto, bifenilospoliclorados, inseticida DDT, entre outras inovações de caráter duvidoso que acarretaram grandes problemas a saúde pública e ao meio ambiente devido à falta de vigilância (KESSLER, 2011).

## **2.2 Interação de nanopartículas com plantas**

Nos últimos anos, pesquisadores têm realizado estudos a cerca dos efeitos de nanopartículas na germinação e crescimento de plantas, na bioacumulação da cadeia alimentar de diversos ecossistemas e na contaminação de recursos naturais, com o objetivo de observar a sua interação em organismos vivos (LIN e XING, 2007; BLINOVA et al, 2010; RICO et al, 2011).

Porém, nanomateriais demonstram muitas vezes, mudanças consideráveis nas suas propriedades quando comparados com os seus homólogos em escala macro (SHARMA; YNGARD; LIN et al, 2009). Além disso, as diferentes composições químicas de cada nanopartícula seja carbono, prata, ouro, zinco,



etc, relacionam-se com o meio de formas diferenciadas. Mesmo que a região hidrofílica interaja com o solvente e a hidrofóbica com outra região, existem muitos conjuntos possíveis de moléculas que podem resultar após a agregação das mesmas, assim o mecanismo de atuação das nanopartículas vai depender do tipo de modelo utilizado no bioensaio (SCHATZ, 2007).

As plantas são importantes componentes dos ecossistemas e podem atuar como ferramentas em estudos a cerca de transporte de nanopartículas na agricultura e sobre bioacumulação na cadeia alimentar. Um importante mecanismo, possivelmente, causador de efeitos nocivos às plantas modulado pelas nanopartículas em plantas é a sua capacidade em causar um desequilíbrio na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) no organismo, processo esse conhecido como stress oxidativo que danifica componentes celulares, como proteínas, lipídios e DNA e pode levar a morte da planta (DU et al, 2011).

Embora as espécies reativas de oxigênio (EROs) sejam um subproduto do metabolismo celular normal em plantas. Quando estas são submetidas a condições de estresse, a homeostase da produção de EROs é perdida e estas espécies reativas começam a inativar enzimas rapidamente, degradar macromoléculas importantes na manutenção orgânica da planta, danificar organelas celulares vitais e desestabilizar as membranas celulares, principalmente, através da indução da degradação de pigmentos, proteínas, lipídios e ácidos nucléicos, acarretando o processo de morte celular (KARUPPANAPANDIAN et al, 2011). Tal comportamento tóxico ocorre devido a redução do tamanho das partículas, o qual promove alterações na estrutura e propriedades eletrônicas do material. Como consequência, as nanopartículas acabam pro-oxidando grupos funcionais, ativando ciclos redox e interagindo com a superfície celular (MANKE; WANG; ROJANASAKUL et al, 2013).

No entanto, nem sempre os efeitos que as nanopartículas proporcionam ao sistema vegetal são deletérios. Alguns estudos têm demonstrado o quão complexo é o mecanismo de ação das nanopartículas em diferentes espécies vegetais. Alguns pesquisadores têm analisado também os efeitos (positivos e negativos) de diferentes nanopartículas sobre a germinação de sementes de diferentes espécies. Mudanças na morfologia e tamanhos de nanopartículas de dióxido de titânio e de óxido de zinco quando expostas a sementes de trigo (*Triticum estivum* L.) demonstraram ter um efeito tóxico para a esta espécie, além de provocarum acúmulo diferenciado em regiões específicas da plântula crescida, penetrando através da parede celular (DU et al, 2011).

Observa-se que a os efeitos que as nanopartículas vão desencadear no sistema vegetal dependem da capacidade de absorção, translocação e acumulação desse material no interior do modelo experimental vegetal e de variáveis referentes às nanopartículas também (RICO et al, 2011). Lin e Xing (2008) investigaram o efeito fitotóxico de 5 tipos de nanopartículas (nanotubos de carbono de paredes múltiplas, nanopartículas de alumínio, alumina e óxido de zinco) na germinação de sementes e crescimento radicular de seis espécies de plantas superiores (rabanete, colza, azevém, alface, milho e pepino). Os resultados demonstraram que cada uma das nanopartículas apresentaram um efeito específico na planta. Apenas as nanopartículas de zinco e óxido de zinco, com dimensões entre 20-35 nm inibiram de forma significativa a germinação de sementes e o crescimento da raiz das seis espécies de plantas, após 2 horas de embebição. O crescimento da raiz foi claramente restrito com o aumento da concentração e quase terminou a 200 mgL<sup>-1</sup>.

No entanto, Khodakovskaya et al (2009) observaram que a adição de nanotubos de carbono em meio de cultura contendo sementes de tomate acelerou o processo de germinação e promoveu um aumento de 2,5 vezes na

biomassa vegetal. Os autores ressaltam que tais resultados podem estar associados à capacidade dos nanotubos de carbono melhorar a captação de água para o interior das sementes.

Alguns autores observaram que fatores inerentes às condições experimentais e os reagentes de síntese também podem alterar os efeitos resultantes dessas nanopartículas, uma vez que modifica sua funcionalização e atividade. Elsaesser e Howard (2012) relataram que as nanopartículas podem interagir com variantes ambientais (ar, a água e o solo) e conseqüentemente alterar as propriedades e cargas de sua superfície o que resulta na perda da estabilidade e agregação das mesmas. Ademais a escolha do agente redutor e do estabilizante pode interferir diretamente na distribuição de tamanhos das nanopartículas e conseqüentemente alterarem a capacidade de penetração das nanopartículas nas células (AUFFAN et al, 2009; KHODASHENAS e GHORBANI, 2015).

### **2.3 Cultivo *in vitro* de plantas e suas implicações em estudos de nanotecnologias**

Nos últimos anos a cultura de tecidos vegetais vem se destacando mundialmente como ferramenta biotecnológica, sua evolução se deve, primordialmente, pelo caráter multidisciplinar que lhe é submetido, o que tem desencadeado avanços significativos em termos de conhecimento e aplicabilidade a muitos entraves na produção de alimentos e na preservação da biodiversidade (CRIBB, 2004).

Neste processo evolutivo da micropropagação de plantas é importante reconhecer que a cultura de tecidos vegetais teve várias etapas até observar a grandeza de seus efeitos sobre a ciência (MARTINS e CARVALHO, 2012). Na

cultura de tecidos vegetais, por exemplo, as técnicas associadas ao cultivo *in vitro* de plantas têm dado suporte a diversas linhas de pesquisa envolvendo genotoxicidade, fitotoxicidade, fisiologia de plantas, germinação, nanotoxicidade, etc (CID, 2014). A técnica de cultura de tecidos vegetais varia de espécie para espécie e depende de um protocolo que combine os fatores inerentes ao meio de cultura e condições de cultivo. A micropropagação *in vitro* de *Alibertia edulis*, por exemplo, exige como condições ideais para germinação uma temperatura de 25°C, 80% de umidade relativa e um fotoperíodo de 16h (SILVA et al, 2008). Qualquer desordem nos fatores de propagação vegetal pode culminar em alterações morfofisiológicas nocivas ao desenvolvimento da planta (PALMA et al, 2011). Sendo assim, observa-se que estas técnicas estabelecem variáveis específicas de controle.

Uma dessas variáveis bastante importantes são as exigências referentes às condições assépticas dos processos. A esterilização por autoclavagem é o processo de assepsia mais utilizado na cultura *in vitro* e é feita sob condições de alta temperatura e pressão (121°C, 1 atm) (YÜCESAN et al, 2015; ZAFAR et al, 2016). No entanto, tais condições podem alterar as propriedades de determinados materiais que possam ser inseridos no meio, como por exemplo, nanopartículas de prata em análises nanotoxicológicas, e conseqüentemente alterar os efeitos resultantes desse material (LIN e XING, 2007; KHODAKOVSKAYA et al, 2009).

Estudos têm mostrado que as reduções do tamanho das partículas promovem uma diminuição drástica no seu ponto de fusão. De acordo com Qadri et al (1999) o recozimento à vácuo de nanopartículas de sulfureto de zinco, realizado a partir da temperatura ambiente e aumentado até 500°C, promoveu a fusão das partículas. Ou seja, há medida que as nanopartículas receberam energia houve uma tendência de aumento das partículas. Os autores ressaltaram que tais

resultados podem estar associados à redução na temperatura de equilíbrio de transição devido ao tamanho reduzido das partículas. As propriedades eletrônicas e óticas das nanopartículas são determinadas tanto pelo seu tamanho como pela forma (LINK e EL-SAYED, 1999).

Ademais, a sinterização também pode estar associada ao aumento no diâmetro de nanopartículas. Esse fenômeno consiste em um processo físico, termicamente ativado, responsável por reduzir a temperatura de fusão de partículas finas e produzir resistência mecânica (BRITO; MEDEIROS; LOURENÇO et al, 2008). A sinterização em nanopartículas metálicas ocorrem sob alta pressão e alta temperatura. E observa-se que tal fenômeno ocorre a uma temperatura (200 °C) muito inferior ao ponto de fusão da prata em escala macro (960 °C), isso é normalmente atribuído ao ponto de fusão reduzido das nanopartículas em comparação com o do metal macrométrico (MAGDASSI et al, 2010). A partir da cinética e dinâmica deste fenômeno, acredita-se que a elevada nanoporosidade de superfície resultam em uma proporção aumentada de átomos defeituosos interfaciais que também causam a redução da temperatura de sinterização (MOON et al, 2005).

## **2.4 Nanopartículas de prata**

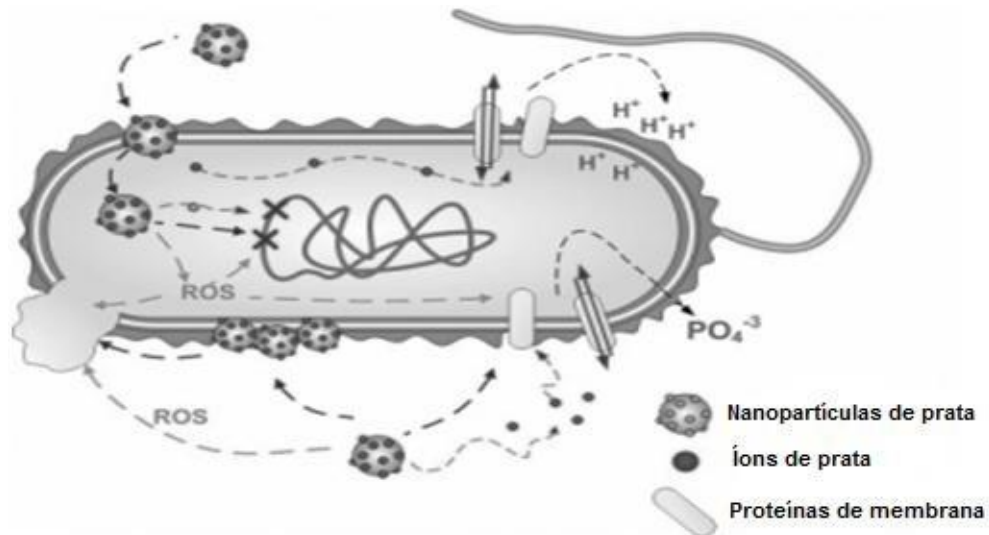
A prata é um elemento utilizado desde tempos primitivos para confecção de utensílios, jóias, materiais odontológicos, fotografia, explosivos, etc. Vários tipos de compostos de prata atuam também como agentes antimicrobianos, dentre eles, destacam-se os nitratos de prata, sulfadiazina de prata, zeólita de prata, pó de prata, óxido de prata e cloreto de prata (WIJNHOFEN et al, 2009).

Antes do início da terapia com antibióticos, a prata era utilizada devido a sua atividade antisséptica, especificamente para o tratamento de feridas e

queimaduras abertas. O efeito antibacteriano de sais de prata tem sido utilizado, atualmente para controlar o crescimento bacteriano em uma variedade de aplicações, incluindo processos odontológicos, cateteres e queimaduras/feridas (KIM et al, 2007). Observa-se que as nanopartículas de prata apresentam a mesma propriedade bactericida da escala macrométrica (RAI; YADAV; GADE et al, 2009)

Conforme ilustra a figura 1, as nanopartículas de prata na célula bacteriana podem interagir com as proteínas da membrana e afetar sua homeostase (LI et al, 2010). Quando as nanopartículas de prata entram na célula bacteriana, podem liberar íons de prata e formar uma região de baixo peso molecular no interior, à qual as bactérias se conglomeram, protegendo assim seu DNA dos íons (MORONES et al, 2005). Além disso, pode ocorrer a formação de espécies reativas de oxigênio capazes de se ligar às proteínas de membrana da célula bacteriana causando alterações estruturais na parede celular e consequentemente vazamento de substâncias intracelulares acarretando a morte celular do microrganismo (CHOI e HU, 2008). As EROs e os íons de prata também podem afetar o DNA, inibindo sua replicação (FENG et al, 2000; FABREGA et al, 2011).

Figura 1 — Interações de nanopartículas de prata em célula bacteriana



Fonte: Adaptado de CIOFFI e RAI (2012)

A prata em escala nanométrica apresenta propriedades bactericidas eficazes contra um largo espectro de bactérias, incluindo estirpes resistentes a antibióticos de ação rápida, alguns fungos comuns como *Aspergillus*, *Candidae* *Saccharomyces*. Outros estudos demonstraram a capacidade de alteração em enzimas de expressão, importantes em processos inflamatórios e de reparação, por nanopartículas de prata (ASHARANI et al, 2008). Além disso, as nanopartículas de prata são também responsáveis pela modulação de citocinas durante a cicatrização de feridas e inibição da formação de comunidades bacterianas, supressão de interleucinas pró-inflamatórias ( $\text{IL-1}\beta$ ) e interleucinas responsáveis pelas respostas citológicas ( $\text{IL-12}$ ), supressão do fator de necrose tumoral (TNF) e indução na apoptose de células inflamatórias (KANG; JUNG; LIM et al, 2012).

As AgNPs podem ser sintetizados por diferentes métodos, sejam eles

químicos (BANERJEE et al, 2014) físicos (TIEN et al, 2008) e biológicos (THAKKAR; MHATRE; PARIKH et al, 2010). As nanopartículas de prata são tipicamente sintetizadas quimicamente através da redução de um sal de prata na presença de um agente redutor, como o borohidreto de sódio, o ácido ascórbico, o citrato de sódio, entre outros (SCHMIDT, 2010). Os íons do agente redutor utilizado atuam sobre os precursores de íons metálicos formando pequenos aglomerados com variações de tamanhos em um processo chamado de nucleação. Porém, a geração das partículas finais ocorre através da agregação de partículas menores e instáveis em prol do aumento das partículas maiores, através do processo de "Maturação de Ostwald". Esse fenômeno consiste na dissolução das partículas pequenas em suspensão e deposição da sua massa em partículas maiores, minimizando a área interfacial para que se atinja um sistema de maior estabilidade termodinâmica. Em outras palavras, a solubilidade das partículas aumenta com a redução do seu raio (FILHO e SERRA, 2015).

A estabilização de nanopartículas metálicas consiste numa das principais dificuldades observadas durante sua aplicação. Isso se deve ao fato de que nanopartículas metálicas possuem uma alta energia superficial, favorecendo termodinamicamente a imediata agregação destas para a formação de ligações metal-metal (MELO JR et al, 2012). Os estabilizadores coloidais atuam promovendo uma adsorção de cargas elétricas sobre a superfície das moléculas no meio, levando a uma repulsão das nanopartículas enquanto uma distância crítica é mantida entre elas, impedindo, dessa forma, a precipitação (SCHMIDT, 2010). Dentre os estabilizadores mais comumente utilizados estão: o poli(álcool vinílico), polivinilpirrolidona (PVP), albumina de soro bovino (BSA) e alguns derivados da celulose (MODY et al, 2010).

As soluções coloidais de prata em escala nanométrica requerem o devido controle sobre sua morfologia durante a síntese, por isso parâmetros como pH ,



tempo de agitação, quantidades relativas de reagentes e temperatura devem ser respeitados (GARCÍA- BARRASA; LÓPEZ-DE-LUZURIAGA; MONGE, 2011). A coloração amarela resultante das soluções de nanopartículas de prata é proveniente do fenômeno denominado ressonância de plasmons de superfície, o qual se caracteriza por oscilações de elétrons de condução, em ressonância com a luz incidente. Quando a fração da luz é absorvida pelo objeto, ocorre excitação dos elétrons em virtude da separação entre níveis de energia eletrônicos dos compostos que constituem o objeto. E a coloração observada é proveniente de ondas resultantes da oscilação coletiva de elétrons presentes em um composto (BERNI NETO, 2010).

Estima-se que as AgNPs sejam o tipo de nanopartículas mais comercializado no mercado e também são consideradas as mais tóxicas (KESSLER, 2011; BRAYDICH-STOLLE et al, 2005). Estudos apontam que a exposição dessas AgNPs em plantas podem acarretar efeitos variados (KHODAKOVSKAYA et al, 2009). Com isso, nota-se que mais pesquisas em nanotecnologia voltadas aos efeitos de nanopartículas resultantes de diferentes vias de síntese ainda são requeridas, uma vez que cada propriedade da nanopartícula (tamanho, conformação e composição química, por exemplo) consiste numa variável a ser estudada.

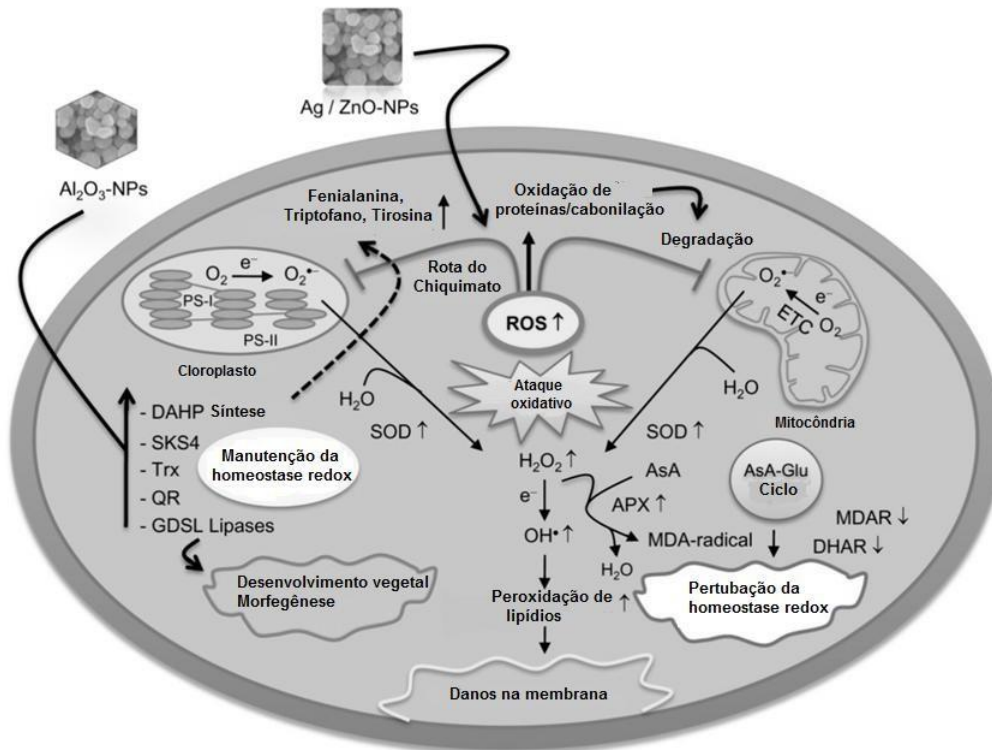
## **2.5 Efeitos de nanopartículas de prata em plantas**

As nanopartículas de prata podem ser liberadas no meio ambiente de várias formas, por exemplo, durante sua síntese, fabricação de produtos, utilização e também pelo processo de reciclagem em compostos que apresentam esses materiais em sua composição (MATHIAS; ROMANO; ROMANO et al, 2014). Como algumas nanopartículas podem apresentar diâmetros muito

pequenos (<5 nm), esses materiais se tornam capazes de atravessar paredes celulares intactas de plantas de forma eficiente, uma vez que os tamanhos de poros de paredes celulares de plantas variam em dimensões de alguns nanômetros, por exemplo, 3,5-3,8 nm em pêlos radiculares e 4,5-5,2 nm em células do parênquima paliçádico (CARPITA et al, 1979; DIETZ e HERTH, 2011). Dessa forma, as nanopartículas, inclusive AgNPs, acabam alcançando a membrana plasmática e penetrando a célula através de processos endocíticos e transportes carregados por proteínas transportadoras ou canais iônicos (NAVARRO et al., 2008).

A figura 2 representa as consequências dessa internalização descontrolada de nanopartículas de prata. Foi observado na espécie *Eruca sativa* Mill. que as nanoestruturas podem ligar-se a diferentes tipos de organelas e interferir nos processos metabólicos. Observa-se que nanopartículas de prata conduzem potencialmente a efeitos secundários tóxicos, tais como o aumento na geração de espécies reativas de oxigênio, perturbações da homeostase e danos nas membranas. Além disso, pode acarretar diminuição de biomoléculas importantes para diversas vias metabólicas, como proteínas, carboidratos, lipídios, entre outras (VANNINI et al, 2013; HOSSAIN; MUSTAFA; KOMATSU et al 2015).

Figura 2 — Resposta celular de *Eruca sativa* induzida ao stress por nanopartículas de prata



Fonte: Adaptado de HOSSAIN; MUSTAFA; KOMATSU et al (2015)

Entretanto, os mecanismos de ação das nanopartículas de prata não são bem elucidados, uma vez que nem sempre são observados efeitos negativos para a fisiologia das espécies. A tabela 2 apresenta alguns estudos sobre a interação de AgNPs em modelos experimentais vegetal.

Tabela 2 — Estudos da interação de nanopartículas de prata em plantas

Tamanho de AgNPs	Concentração	Espécie	Efeitos	Autor (es)
29± 11 nm	1.5 · 10 <sup>12</sup> nanopartículas mL <sup>-1</sup>	<i>Cucumis sativus</i> e <i>Latuca sativa</i>	Baixa ou nula toxicidade na germinação e crescimento das plantas	BARRENA et al (2009)
<100 nm	25 ppm, 50 ppm, 75 ppm e 100 ppm	<i>Allium cepa</i>	Genotoxicidade	KUMARI; MUKHERJEE; CHANDRASEKARAN et al (2009)
5-25 nm	0, 5, 10, 20 e 40 mg L <sup>-1</sup> (em meio ágar) 0, 100, 300, 500, 1000 e 2000 mg kg <sup>-1</sup> (em solo)	<i>Phaseolus radiatus</i> e <i>Sorghum bicolor</i>	Inibição de crescimento em meio ágar foi maior que em solo	LEE; KWAK; AN et al (2012)
25 nm	0, 20, 40 e 60 ppm	<i>Borago officinalis</i>	Aumento do comprimento da parte aérea e do	SEIF et al (2011)

			número de folhas	
6,0 ± 1,7 nm (AgNPs revestidas com goma arábica) e 21,0 ± 17,0 nm (AgNPs revestidas com polivinilpirrolidina)	1, 10 e 40 mg L <sup>-1</sup>	<i>L. multiflorum</i> , <i>Panicum virgatum</i> , <i>Carex lurida</i> , <i>C. scoparia</i> , <i>C. vulpinoidea</i> , <i>C. crinita</i> , <i>Eupatorium fistulosum</i> , <i>Phytolacca americana</i> , <i>Scirpus cyperinus</i> , <i>Lobelia cardinalis</i> e <i>Juncus effusus</i>	AgNPs revestidas com goma arábica reduziram a taxa de germinação de em <i>S. cyperinus</i> , <i>J. effusus</i> e <i>P. americana</i> , mas aumentou a velocidade de germinação em <i>E. fistulosum</i>	YIN et al (2012)

---

Fonte: Do Autor (2017)

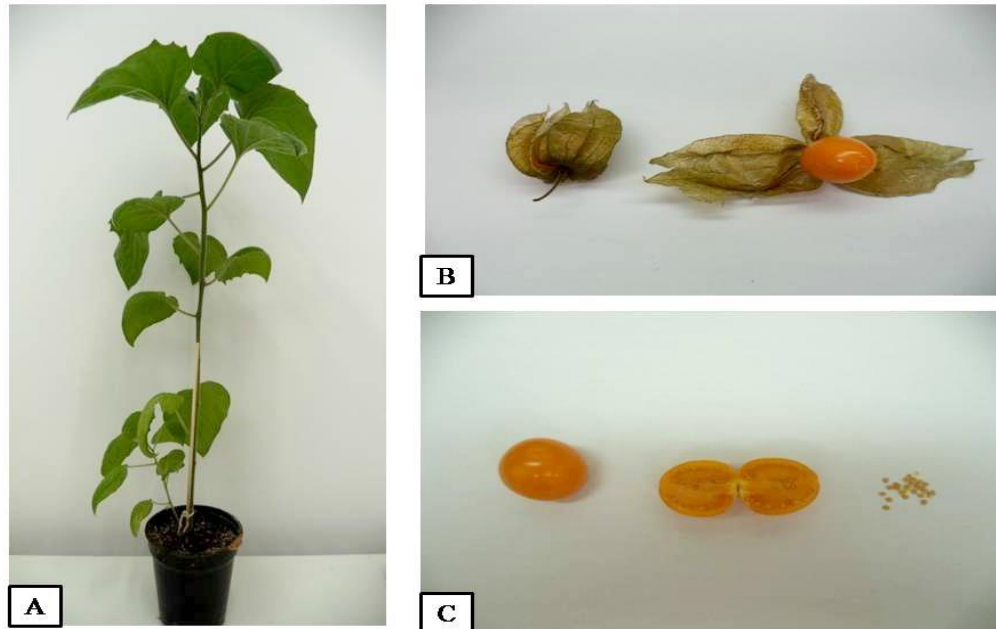
Dessa forma, observa-se que os estudos associados aos efeitos de nanopartículas de prata em plantas possuem grandes desafios. O de decifrar os eventos que regulam os efeitos finais das nanopartículas de prata em diferentes modelos experimentais. E a busca de espécies que podem ser utilizadas como bioensaio, a fim de elucidar tais mecanismos (GEISLER-LEE et al, 2014).

## 2.6 *Physalis* (*Physalis peruviana* L.)

O gênero *Physalis* é originário dos Andes e pertence à família Solanaceae, sua distribuição é cosmopolita tropical, sendo encontrada cerca de 3.000 espécies só na América do Sul. A espécie *Physalis peruviana* (Figura 3A), a depender da região recebe nomes variados como camapu, uchuva, uvilla ou juá-de-capote, é uma espécie nativa dos Andes, mas atualmente já existe várias cultivares na América, Europa e Ásia (GONZÁLEZ et al, 2008; YILMAZTEKIN, 2014). A espécie apresenta diferentes usos na alimentação e medicinal. Seus frutos podem ser consumidos *in natura*, bem como utilizados para produção de doces, geléias, sorvetes, bombons e molhos para saladas e carnes. Foi identificada uma substância chamada "Physalina", capaz de atuar no sistema imunológico humano, fazendo com que essa espécie seja utilizada também para fins medicinais (RUFATO et al, 2008).

Os frutos da *Physalis peruviana* (Figura 3B e 3C) apresentam coloração alaranjada durante a maturidade, contendo de 100 a 300 sementes e ficam envoltos por um cálice formado por cinco sépalas com comprimento de cinco centímetros durante seu desenvolvimento (MUNIZ et al, 2014).

Figura 3 — (A) Planta de *Physalis peruviana* L. (B) Frutos de *Physalis peruviana* L. envoltos pelo cálice (C) Frutos e sementes de *Physalis peruviana* L.



Fonte: Do autor (2017)

Além disso, os frutos desta espécie são ricos em vitaminas (A e C), flavonóides, ferro, fósforo, alcalóides e fitoesteróides (RODRIGUES et al, 2014).

Devido às diferentes aplicações, essa espécie vem ganhando cada vez mais espaço na agricultura, e com isso mais estudos sobre seu crescimento e desenvolvimento vem gerando uma melhor caracterização da mesma. A *P. peruviana* é uma planta (Figura 3A) que apresenta uma estrutura herbácea e perene, ou seja, apresenta um caule não lenhoso ou flexível e um ciclo de vida longo, com uma boa taxa de crescimento (MUNIZ et al, 2014). Além de que, a *Physalis* apresenta características germinativas e bioquímicas bem elucidadas na literatura, sendo, portanto, uma alternativa eficiente na

caracterização específica dos efeitos de nanopartículas durante seu cultivo. (PUENTE et al, 2011). Tais fatores representam uma potencial aplicação dessa espécie em bioensaios, uma vez que, tais características favorecem a obtenção de resultados em curto prazo.

## REFERÊNCIAS

ABDEL-AZIZ, H. M. M.; HASANEEN, M. N. A.; OMER, A. M. Nano chitosan-NPK fertilizer enhances the growth and productivity of wheat plants grown in sandy soil. **Spanish Journal of Agricultural Research**, Madrid, v. 14, n. 1, p. 0902, 2016.

ANVISA. Perguntas e Respostas sobre Materiais em contato com alimentos. Disponível em:<<http://portal.anvisa.gov.br/duvidas-frequentes-materiais-em-contato-com-alimentos>> Data de acesso: 22 de janeiro de 2017.

AOUADA, F. A.; MOURA, M. R. de. Nanotechnology Applied in Agriculture: Controlled Release of Agrochemicals. In: **Nanotechnologies in Food and Agriculture**. Springer International Publishing, Berlin, p. 103-118, 2015

ASHARANI, P. V. et al. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. **ACS nano**, Washington, v. 3, n. 2, p. 279-290, 2008.

AUFFAN, M. et al. Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. **Nature nanotechnology**, London, v. 4, n. 10, p. 634-641, 2009.

BANERJEE, S. et al. Structural evolution of silver nanoparticles during wet-chemical synthesis. **Chemistry of Materials**, Washington, v. 26, n. 2, p. 951-957, 2014.

BARRENA, R. et al. Evaluation of the ecotoxicity of model nanoparticles. **Chemosphere**, Amsterdam, v. 75, n. 7, p. 850-857, 2009.

BERNI NETO, E. A. **Desenvolvimento de nanobiocompósitos contendo nanopartículas de prata para aplicações bactericidas**. 2010. 112p. Tese (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

BLINOVA, I. et al. Ecotoxicity of nanoparticles of CuO and ZnO in



natural water. **Environmental Pollution**, Amsterdam, v. 158, n. 1, p. 41-47, 2010.

BRAYDICH-STOLLE, L. et al. In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. **Toxicological sciences**, Oxford, v. 88, n. 2, p. 412-419, 2005.

BRITO, F. I. G. de; MEDEIROS, K. F.; LOURENÇO, J. M. Um estudo teórico sobre a sinterização na metalurgia do pó. **Holos**, Natal, v. 3, p. 204-211, 2008.

BUZEA, C.; PACHECO, I. I.; ROBBIE, K. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. **Biointerphases**, Melville, v. 2, n. 4, p. MR17-MR71, 2007.

CARPITA, Nicholas et al. Determination of the pore size of cell walls of living plant cells. **Science**, Washington, v. 205, n. 4411, p. 1144-1147, 1979.

CHOI, O.; HU, Z. Size dependent and reactive oxygen species related nanosilver toxicity to nitrifying bacteria. **Environmental science & technology**, Washington, v. 42, n. 12, p. 4583-4588, 2008.

CID, L. P. B. Eds. Cultivo *in vitro* de plantas, 3rd, ed.; Embrapa: Brasília, 2014.

CIOFFI, N.; RAI, M. (Ed.). Nano-antimicrobials: progress and prospects. Springer Science e Business Media, 2012.

CRIBB, A. Y. Sistema agroalimentar brasileiro e biotecnologia moderna: oportunidades e perspectivas. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, Brasília, v. 21, n. 1, p. 169-195, 2004.

DIETZ, K. J.; HERTH, S. Plant nanotoxicology. **Trends in plant science**, Amsterdam, v. 16, n. 11, p. 582-589, 2011.

DU, W. et al. TiO<sub>2</sub> and ZnO nanoparticles negatively affect wheat growth and soil enzyme activities in agricultural soil. **Journal of environmental monitoring : JEM**, London, v. 13, n. 4, p. 822-828, 2011.

ELSAESSER, A.; HOWARD, C. V. Toxicology of nanoparticles. **Advanced drug delivery reviews**, Amsterdam, v. 64, n. 2, p. 129-137, 2012.

ESPITIA, P. J. P. et al. Zinc oxide nanoparticles: synthesis, antimicrobial activity and food packaging applications. **Food and Bioprocess Technology**, Berlin, v. 5, n. 5, p. 1447-1464, 2012.

FABREGA, J. et al. Silver nanoparticles : Behaviour and effects in the aquatic environment. **Environment International**, Amsterdam, v. 37, n. 2, p. 517-531, 2011.

FENG, Q. L. et al. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions

on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Journal of biomedical materials research**, Hoboken, v. 52, n. 4, p. 662-668, 2000.

FILHO, P. C. de. S.; SERRA, O. A. Metodologias de síntese em fase líquida para a obtenção de nanomateriais inorgânicos à base de terras raras. **Química Nova**, São Paulo, v. 38, n. 5, p. S1-S7, 2015.

GAGNÉ, F.; GAGNON, C.; BLAISE, C. Aquatic nanotoxicology: a review. **Current Topics in Toxicology**, Trivandrum, v. 4, p. 51-64, 2007.

GAO. Food Safety: FDA Should Strengthen Its Oversight of Food Ingredients Determined to Be Generally Recognized as Safe (GRAS). Washington, DC: Government Accountability Office (2010).

GARCÍA-BARRASA, J.; LÓPEZ-DE-LUZURIAGA, J. M.; MONGE, M. Silver nanoparticles: synthesis through chemical methods in solution and biomedical applications. **Central European Journal of Chemistry**, Berlin, v. 9, n. 1, p. 7-19, 2011.

GEISLER-LEE, J. et al. Reproductive Toxicity and Life History Study of Silver Nanoparticle Effect, Uptake and Transport in *Arabidopsis thaliana*. **Nanomaterials**, Basel, v. 4, p. 301–318, 2014.

GONZÁLEZ, O. T. et al. Caracterización morfológica de cuarenta y seis accesiones de uchuva (*Physalis peruviana* L.), em Antioquia (Colombia). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 3, p. 708-715, 2008.

GOUVEA, R. Nanotecnologia, Um Novo Paradigma de Desenvolvimento Economico: Uma Análise da Experiência Internacional & Brasileira. **Revista Estratégica**, São Paulo, v. 10, n. 1, p. 46-67, 2013.

HALL, J. et al. Managing technological and social uncertainties of innovation: The evolution of Brazilian energy and agriculture. **Technological Forecasting and Social Change**, Amsterdam, v. 78, n. 7, p. 1147–1157, 2011.

HOSSAIN, Z.; MUSTAFA, G.; KOMATSU, S. Plant responses to nanoparticle stress. **International journal of molecular sciences**, Basel, v. 16, n. 11, p. 26644-26653, 2015.

HUND-RINKE, K. et al. Beurteilung der Gesamtumweltexposition von Silberionen aus Biozid-Produkten. **UBA Text**, Dessau-Roßlau, v. 43, n. 8, p. 1-95, 2008.

KANG, K. A.; JUNG, H. Y.; LIM, J. S. Cell death by polyvinylpyrrolidone-coated silver nanoparticles is mediated by ROS-dependent signaling. **Biomolecules and Therapeutics**, Seoul, v. 20, n. 4, p. 399-405, 2012.

KARUPPANAPANDIAN, T. et al. Reactive oxygen species in plants: their

- generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. **Australian Journal of Crop Science**, Australia, v. 5, n. 6, p. 709, 2011.
- KESSLER, R. Engineered nanoparticles in consumer products: understanding a new ingredient. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle, v. 119, n. 3, p. A120-A125, 2011.
- KHARISSOVA, O. V. et al. The greener synthesis of nanoparticles. **Trends in biotechnology**, Maryland Heights, v. 31, n. 4, p. 240-248, 2013.
- KHODAKOVSKAYA, M. et al. Carbon nanotubes are able to penetrate plant seed coat and dramatically affect seed germination and plant growth. **ACS nano**, Washington, v. 3, n. 10, p. 3221-3227, 2009.
- KHODASHENAS, B.; GHORBANI, H. R. Synthesis of silver nanoparticles with different shapes. **Arabian Journal of Chemistry**, Riyadh, p. 1-13, 2015.
- KIM, J. S. et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, Amsterdam, v. 3, p. 95–101, 2007.
- KORDKHEILI, H. Y.; FARSI, M.; REZAZADEH, Z. Physical, mechanical and morphological properties of polymer composites manufactured from carbon nanotubes and wood flour. **Composites Part B: Engineering**, Amsterdam, v. 44, n. 1, p. 750-755, 2013.
- KUMARI, M.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. Genotoxicity of silver nanoparticles in *Allium cepa*. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 407, n. 19, p. 5243-5246, 2009.
- KWAK, J. I. et al. Multispecies toxicity test for silver nanoparticles to derive hazardous concentration based on species sensitivity distribution for the protection of aquatic ecosystems. **Nanotoxicology**, Abingdon, v. 10, n. 5, p. 521-530, 2016.
- LEE, W. M.; KWAK, J. I.; AN, Y. J. Effect of silver nanoparticles in crop plants *Phaseolus radiatus* and *Sorghum bicolor*: media effect on phytotoxicity. **Chemosphere**, Amsterdam, v. 86, n. 5, p. 491-499, 2012.
- LI, W. R. et al. Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli*. **Applied microbiology and biotechnology**, Berlin, v. 85, n. 4, p. 1115-1122, 2010.
- LIN, D.; XING, B. Root uptake and phytotoxicity of ZnO nanoparticles. **Environmental science & technology**, Washington, v. 42, n. 15, p. 5580-5585, 2008.
- LIN, D; XING, B. Phytotoxicity of nanoparticles: inhibition of seed germination and root growth. **Environmental Pollution**, Amsterdam, v. 150, n. 2, p. 243-

250, 2007.

LINK, S.; EL-SAYED, M. A. Size and temperature dependence of the plasmon absorption of colloidal gold nanoparticles. **The Journal of Physical Chemistry B**, Washington, v. 103, n. 21, p. 4212-4217, 1999.

LIU, C. et al. Characterization of edible corn starch nanocomposite films: The effect of self-assembled starch nanoparticles. **Starch-Stärke**, Weinheim, v. 67, p. 1-10, 2015.

LIU, D. et al. A highly sensitive, dual-readout assay based on gold nanoparticles for organophosphorus and carbamate pesticides. **Analytical chemistry**, Washington, v. 84, n. 9, p. 4185- 4191, 2012.

MAGDASSI, S. et al. Triggering the sintering of silver nanoparticles at room temperature. **ACS nano**, Washington, v. 4, n. 4, p. 1943-1948, 2010.

MANKE, A.; WANG, L.; ROJANASAKUL, Y. Mechanisms of nanoparticle-induced oxidative stress and toxicity. **BioMed research international**, Nasr, v. 2013, p. 1-15, 2013.

MARTINS, C. R.; CARVALHO, A. C. P. P. DE. Avanços da Cultura de Tecidos na Micropropagação de Plantas. In: III Ciclo de Palestras sobre Cultivo *in vitro* de Plantas, 3., 2012, Aracaju. Anais... Brasília, DF: Embrapa, 2012.

MATHIAS, F. T.; ROMANO, M. A.; ROMANO, R. M. Avaliação dos Efeitos Toxicológicos e Ambientais de Nanopartículas de Sais de Prata. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 35, n. 2, 2014.

MELO JR, M. A. et al. Preparação de nanopartículas de prata e ouro: um método simples para a introdução da nanociência em laboratório de ensino. **Química Nova**, São Paulo, v. 35, n. 9, p. 1872-1878, 2012.

MELO, C. P. de; PIMENTA, M. Nanociências e nanotecnologia. **Parcerias estratégicas**, Brasília, v. 9, n. 18, p. 9-22, 2010.

MODY, V. V. et al. Introduction to metallic nanoparticles. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, Delhi, v. 2, n. 4, p. 282, 2010.

MOHANRAJ, V. J.; CHEN, Y. Nanoparticles-a review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, Benin, v. 5, n. 1, p. 561-573, 2007.

MOON, K. S. et al. Thermal behavior of silver nanoparticles for low-temperature interconnect applications. **Journal of Electronic Materials**, Berlin, v. 34, n. 2, p. 168-175, 2005.

MORONES, J. R. et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. **Nanotechnology**, Bristol, v. 16, n. 10, p. 2346, 2005.

- MUNIZ, J. et al. General aspects of physalis cultivation. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 6, p. 964- 970, 2014.
- MUNIZ, J.; MOLINA, A. R.; MUNIZ, J. Physalis: productive and economic overview in Brazil. **Horticultura Brasileira**, Vitória da Conquista, v. 33, n. 2, p. 00-00, 2015.
- NASSAR, N. N. The application of nanoparticles for wastewater remediation. **Applications of Nanomaterials for Water Quality**, London, p. 52-65, 2013.
- NAVARRO, E. et al. Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. **Environmental Science and Technology**, Washington, v. 42, n. 23, p. 8959–8964, 2008.
- OLIVEIRA, J. L. de et al. Application of nanotechnology for the encapsulation of botanical insecticides for sustainable agriculture: prospects and promises. **Biotechnology advances**, Amsterdam, v. 32, n. 8, p. 1550-1561, 2014.
- PALMA, D. et al. Aspectos morfofisiológicos e controle da hiperhidricidade na cultura de tecidos vegetais. **Current Agricultural Science and Technology**, Pelotas, v. 17, n. 2, p. 174–184, 2011.
- PUENTE, L. A. et al. *Physalis peruviana* Linnaeus, the multiple properties of a highly functional fruit: A review. **Food Research International**, Amsterdam, v. 44, n. 7, p. 1733-1740, 2011.
- QADRI, S. B. et al. Size-induced transition-temperature reduction in nanoparticles of ZnS. **Physical Review B**, Ridge, v. 60, n. 13, p. 9191, 1999.
- QIAN, H. et al. Comparison of the toxicity of silver nanoparticles and silver ions on the growth of terrestrial plant model *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Environmental Sciences**, Amsterdam, v. 25, n. 9, p. 1947-1956, 2013.
- RAI, M.; YADAV, A.; GADE, A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. **Biotechnology advances**, Amsterdam, v. 27, n. 1, p. 76-83, 2009.
- RICCARDI, C. dos S.; GUASTALDI, A. C. Nanoregulação: Avaliação dos cenários internacional e brasileiro. **Revista Laborativa**, Assis, v. 2, n. 2, p. 135-162, 2013.
- RICO, C. M. et al. Interaction of Nanoparticles with Edible Plants and Their Possible Implications in the Food Chain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 59, p. 3485–3498, 2011.
- RODRIGUES, F. A. et al. Chemical, physical and physical-chemical characterization of physalis cultivated in greenhouse. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 8, p. 1411-1414, 2014.

- RUFATO, L. et al. Aspectos técnicos da cultura da *Physalis*. **Lages: CAV/Udesc**, p. 457- 463, 2008.
- RUI, Mengmeng et al. Iron oxide nanoparticles as a potential iron fertilizer for peanut (*Arachis hypogaea*). **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 7, p. 1-10, 2016.
- SALATA, O. V. Applications of nanoparticles in biology and medicine. **Journal of nanobiotechnology**, Londres, v. 2, n. 1, p. 3, 2004.
- SALAZAR, M. R. et al. A model for the potential production and dry matter distribution of Cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 115, n. 2, p. 142-148, 2008.
- SAYER, J.; CASSMAN, K. G. Agricultural innovation to protect the environment. **PNAS**, Washington, v. 110, n. 21, p. 8345-8348, 2013.
- SCHATZ, G. C. Using theory and computation to model nanoscale properties. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 104, n. 17, p. 6885-6892, 2007.
- SCHMIDT, H. Nanoparticles by chemical synthesis, processing to materials and innovative applications. **Applied organometallic chemistry**, Hoboken, v. 15, n. 5, p. 331-343, 2001.
- SEIF, S. M. et al. Effect of nano silver and silver nitrate on seed yield of borage. **Journal of Medicinal Plants Research**, Ebène, v. 5, n. 5, p. 706-710, 2011.
- SENJEN, R.; ILLUMINATO, I. Nano e Biocidal Silver: Extreme Germ Killers Present a Growing Threat to Public Health. **Friends of the Earth Australia**, Melbourne, 2009.
- SHAH, V. Environmental impacts of engineered nanoparticles. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Michigan, v. 29, n. 11, p. 2389-2390, 2010.
- SHARMA, V. K.; YNGARD, R. A.; LIN, Y. Silver nanoparticles: green synthesis and their antimicrobial activities. **Advances in colloid and interface science**, Amsterdam, v. 145, n. 1, p. 83-96, 2009.
- SILVA, F. A. B. da; PEREIRA, L. A. R.; SILVEIRA, C. E. dos S. Micropropagation of *Alibertia edulis* rich. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 51, n. 6, p. 1103-1114, 2008.
- SILVEIRA, J. M. F. J. da; BORGES, I. de C.; BUAINAIN, A. M. Biotecnologia e agricultura: da ciência e tecnologia aos impactos da inovação. **São Paulo em Perspectiva**, São Paulo, v. 19, n. 2, p. 101-114, 2005.

TANG, S. C. N; LO, I. M. C. Magnetic nanoparticles: essential factors for sustainable environmental applications. **Water research**, Amsterdam, v. 47, n. 8, p. 2613-2632, 2013.

THAKKAR, K. N.; MHATRE, S. S.; PARIKH, R. Y. Biological synthesis of metallic nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, Amsterdam, v. 6, n. 2, p. 257-262, 2010.

TIEN, D. C. et al. Discovery of ionic silver in silver nanoparticle suspension fabricated by arc discharge method. **Journal of alloys and compounds**, Amsterdam, v. 463, n. 1, p. 408-411, 2008.

VANCE, M. E. et al. Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. **Beilstein Journal of Nanotechnology**, Frankfurt am Main, v. 6, p. 1769-1780, 2015.

VANNINI, C. et al. Morphological and proteomic responses of *Eruca sativa* exposed to silver nanoparticles or silver nitrate. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 7, p. 1-8, 2013.

WANG, X. T. et al. High-performance surface-enhanced Raman scattering sensors based on Ag nanoparticles-coated Si nanowire arrays for quantitative detection of pesticides. **Applied Physics Letters**, Melville, v. 96, n. 5, p.1-3, 2010.

WIJNHOFEN, S. W. P. et al. Nano-silver—a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment. **Nanotoxicology**, London, v. 3, n. 2, p. 109-138, 2009.

YILMAZTEKIN, M. Characterization of potent aroma compounds of Cape Gooseberry (*Physalis peruviana* L.) fruits grown in Antalya through the determination of odor activity values. **International Journal of Food Properties**, London, v. 17, n. 3, p. 469-480, 2014.

YIN, L. et al. Effects of silver nanoparticle exposure on germination and early growth of eleven wetland plants. **PLoS One**, San Francisco, v. 7, n. 10, p. e47674, 2012.

YÜCESAN, B. B. et al. Clonal propagation and synthetic seed production from nodal segments of Cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.), a tropical fruit plant. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, v. 39, n. 5, p. 797-806, 2015.

ZAFAR, H. et al. Effect of ZnO nanoparticles on *Brassica nigra* seedlings and stem explants: growth dynamics and antioxidative response. **Frontiers in plant science**, Lausanne, v. 7, p. 1-8, 2016.

## **SEGUNDA PARTE - ARTIGO**

Normas do periódico Environmental Science & Technology (versão preliminar)

### **Efeito de micro e nanopartículas de prata em *Physalis peruviana***

***L.***

*Luthiane M. Ferraz<sup>§</sup>, Juliano E. de Oliveira<sup>Y</sup>, Michele V. dos Reis<sup>#</sup>, Diogo P. C. da Silva<sup>#</sup>, Renato Paiva<sup>#</sup>, Caroline de O. Timoteo<sup>#</sup>, José M. Marconcin<sup>\*‡</sup>.*

*<sup>§</sup>Programa de Pós Graduação em Engenharia de Biomateriais, Departamento de Ciências Florestais, Universidade Federal de Lavras, Lavras 3037, Brasil.*

*<sup>Y</sup>Departamento de Engenharia, Universidade Federal de Lavras, Lavras 3037, Brasil.*

*<sup>‡</sup>Embrapa Instrumentação Agropecuária, São Carlos 741, Brasil.*

*<sup>#</sup>Programa de Pós Graduação em Fisiologia Vegetal, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras 3037, Brasil.*



## RESUMO

As nanopartículas de prata estão inseridas em diversos produtos de consumo e conseqüentemente acabam sendo descartadas no meio ambiente. Devido à falta de estudos que comprovem a nocividade desse material para os organismos vivos sua comercialização ocorre sem um prévio controle de segurança. No entanto, alguns estudos com plantas sugerem que em alguns casos os efeitos das nanopartículas de prata (AgNPs) podem ser tóxicos. A partir desse contexto, investigou-se os efeitos das AgNPs com e sem tratamento térmico na germinação, no crescimento e alguns parâmetros bioquímicos da *Physalis peruviana*. Foi feita a síntese das nanopartículas de prata e caracterização das mesmas com e sem processamento térmico adicional, a fim de avaliar a ação da temperatura nas propriedades das AgNPs. Foram realizadas análises dos efeitos de diferentes concentrações de nanopartículas de prata (0,39, 0,77, 1,54 mg L<sup>-1</sup>) com e sem processamento térmico (121°C, 1 atm) sobre a germinação, parâmetros de crescimento da raiz e parte aérea e a na bioquímica (açúcares redutores, açúcares solúveis totais, aminoácidos, catalase, ascorbato peroxidase e superóxido dismutase) de *Physalis peruviana*. Os resultados demonstram que as concentrações de 0,77 e 1,54 mg L<sup>-1</sup> de AgNPs aumentaram a biomassa da parte aérea. No entanto, a menor concentração (0,39 mg L<sup>-1</sup>) reduziu a biomassa, o comprimento da raiz e alguns parâmetros bioquímicos (açúcares solúveis totais e aminoácidos). Além disso, foi observado que os valores para massa seca da parte aérea e da raiz, teor de água da raiz, açúcares solúveis totais, aminoácidos e açúcares redutores obtidos com AgNPs tratadas termicamente foi menor que AgNPs não tratadas termicamente, a depender da concentração analisada. Contudo, para esta espécie nestas condições, pode-se concluir que as AgNPs apresentaram baixa ou nenhuma toxicidade, a depender da concentração e da temperatura.

## INTRODUÇÃO

A produção de novos materiais nanotecnológicos tem levado à crescente proliferação de nanopartículas aos mais variados setores industriais. Cada nanopartícula apresenta propriedades únicas, tais como a elevada área de superfície e mobilidade, capazes de acarretar conseqüências inesperadas tanto para a saúde quanto ao meio ambiente<sup>1</sup>. As nanopartículas de prata tornaram-se o tipo de nanomaterial mais comumente utilizado em produtos de consumo, devido sua ação bactericida<sup>2</sup>. Com isso, espera-se que estas nanopartículas possam ser liberadas no meio ambiente, onde seu destino e comportamento são amplamente desconhecidos.

Os efeitos provocados pelas nanopartículas de prata em espécies vegetais podem estar relacionados a danos nas membranas celulares, redução de biomoléculas importantes na reparação celular, liberação de íons  $\text{Ag}^+$  no meio ou a indução de estresse oxidativo<sup>3,4</sup>. Diversos estudos têm demonstrado que os efeitos das nanopartículas de prata em plantas podem ser potencialmente imprevisíveis quando expostas de forma descontrolada<sup>5,6</sup>. Embora os mecanismos de ação desses nanomateriais sejam ainda desconhecidos, alguns estudos revelam que seus efeitos dependem das dimensões, morfologia e composição química da nanopartícula. E também das condições experimentais, como a concentração do material no meio, o tempo de exposição e a temperatura<sup>7,8</sup>.

Na cultura de tecidos vegetais, as técnicas associadas ao cultivo *in vitro* de plantas têm dado suporte a diversas linhas de pesquisa envolvendo genotoxicidade, fitotoxicidade, fisiologia de plantas, germinação, nanotoxicidade, etc<sup>9</sup>. No entanto, esta técnica requer condições assépticas através de processos de esterilização, entre estas, destaca-se a autoclavagem, feita sob condições de alta temperatura e pressão ( $121^\circ\text{C}$ , 1 atm)<sup>10,11</sup>. Tais condições

podem alterar as propriedades de determinados materiais que possam ser inseridos no meio, como por exemplo, nanopartículas de prata em análises nanotoxicológicas, e conseqüentemente alterar os efeitos resultantes desse material<sup>12,13</sup>.

A literatura têm abordado a utilização de diversas espécies vegetais padrão em bioensaios relacionados à interação de AgNPs em plantas, como a *Arabidopsis thaliana*, *Allium cepa*, *Lactuca sativa*, entre outras<sup>14,15,5</sup>. A *Physalis peruviana* é uma espécie vegetal nativa dos Andes, pertencente à família Solanaceae. A rápida germinação e crescimento e a elucidação das características fisiológicas desta espécie, na literatura, favorece sua utilização em bioensaios, além disso, a família Solanaceae apresenta importantes aplicações agronômicas<sup>16,17</sup>.

A partir desse contexto, este estudo tem como objetivo avaliar os efeitos de nanopartículas de prata com e sem tratamento térmico para germinação, crescimento e alguns aspectos bioquímicos de *Physalis peruviana* L.

## SEÇÃO EXPERIMENTAL

**Síntese e caracterização de nanopartículas de prata.** As AgNPs (nanopartículas de prata) foram sintetizadas segundo metodologia descrita por Turkevich (1951)<sup>18</sup> e Moço (2013)<sup>19</sup> com adaptações. Foi preparada uma solução de nitrato de prata  $1,06 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> (Cennabras®) contendo 0,03g de carboximetilcelulose sódica (Sigma-Aldrich®) em aquecimento e agitação constantes. Após atingir 95°C, a solução foi reduzida com 1 mL de solução de citrato de sódio 1% (Synth®). A estabilidade das nanopartículas de prata pós-síntese foi monitorada por espectroscopia de absorção de UV-VIS (modelo UV-1800, Shimadzu) de 7 em 7 dias, por um período de 21 dias. As AgNPs eram armazenadas a 4°C em ausência de luz. A morfologia e o tamanho das

AgNPs com e sem tratamento térmico foram determinadas através de um microscópio eletrônico de transmissão (FEI Tecnai G2 F20) a 200 kv. A distribuição de tamanhos das nanopartículas com e sem tratamento térmico também foi avaliada usando o equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Inglaterra).

**Condições experimentais e tratamentos.** Sementes de *Physalis peruviana* L. (Empresa Ocati®) foram previamente desinfestadas com álcool 70% durante 30 segundos e uma solução de hipoclorito de sódio 2% e álcool 70% (1:1) por 2 minutos. Após sucessivas lavagens em água destilada, elas foram cultivadas em caixas Gerbox (11 x 11 cm e 3,5cm de altura) contendo duas folhas de papel Germitest. O teste de germinação foi realizado de acordo com a Regra de Análise de Sementes – RAS (BRASIL, 2009)<sup>20</sup>. O papel foi umedecido com volumes (mL) equivalente a 2,5 vezes o peso do papel seco, com solução de nanopartículas de prata em diferentes concentrações (0,39 mg L<sup>-1</sup>; 0,77 mg L<sup>-1</sup> e 1,54 mg L<sup>-1</sup>). A fim de avaliar a ação do tratamento térmico nas nanopartículas de prata e seus efeitos no cultivo da *Physalis*, os nanomateriais foram submetidos ao processo de autoclavagem (121°C, 1 atm) por 20 min, para posterior etapa. De acordo com a tabela 1, foram avaliados os efeitos relacionados à concentração de nanopartículas (0,39 mg L<sup>-1</sup>, 0,77 mg L<sup>-1</sup> e 1,54 mg L<sup>-1</sup>) e a presença e ausência de tratamento térmico nas soluções de nanopartículas. O controle negativo foi utilizado água destilada. As caixas gerbox contendo as sementes nos diferentes tratamentos foram armazenadas em BOD com temperatura de 25°C e fotoperíodo de 16 horas.

**Tabela 1. Condições experimentais de cada tratamento**

Tratamentos	Concentração (mg L <sup>-1</sup> )	Tratamento térmico
T0	0	-
T1	0,39	121°C, 1 atm por 20 min
T2	0,39	-
T3	0,77	121°C, 1 atm por 20 min
T4	0,77	-
T5	1,54	121°C, 1 atm por 20 min
T6	1,54	-

**Parâmetros avaliados.** Foram analisados os efeitos das AgNPs na germinação das sementes de *Physalis peruviana* L. Calculado de acordo com a fórmula de Maguire (1962)<sup>21</sup>.

$$IVG = \left(\frac{G1}{N1}\right) + \left(\frac{G2}{N2}\right) + \left(\frac{G3}{N3}\right) + \dots + \left(\frac{Gn}{Nn}\right), \text{ em que:}$$

IVG= Índice de velocidade germinativa;

G1, G2, G3...Gn= número de plântulas computadas na primeira, segunda, terceira e última contagem;

N1, N2, N3...Nn= número de dias da semeadura à primeira, segunda, terceira e última contagem.

O ensaio foi realizado até todas as sementes germinarem ou obter-se um número constante de germinações para os respectivos tratamentos. Após esse período, as plântulas foram transferidas para tubetes de polipropileno (11 x 5 x

5cm) contendo substrato a base de casca de pinus, turfa e vermiculita expandida, enriquecido com macro e micronutrientes (Tropstrato HT Hortaliças®) e depois colocadas em uma sala a  $25 \pm 5$  °C e fotoperíodo de 16 h . Os tubetes com as plântulas foram irrigados com 4,5 ml com a solução de AgNPs dos seus respectivos tratamento a cada 7 dias.

Após 60 dias da transferência para substrato, foram realizadas avaliações de crescimento: comprimento da raiz (cm), comprimento da parte aérea (cm), massa seca (g) e massa fresca da raiz (g), massa seca(g) e massa fresca da parte aérea (g), número de folhas, teor de água da raiz (%) e teor de água da parte aérea (%). A análise de massa seca foi realizada segundo Figueiredo et al (2006)<sup>22</sup>. E o teor de água (TA) foi calculado de acordo com Amaral et al (2000)<sup>23</sup> com base na massa fresca e seca das plântulas, a partir da relação:

$$\text{Teor de água (\%)} = \frac{\text{massa fresca} - \text{massa seca}}{\text{massa fresca}} \times 100 \quad (23)$$

Foram realizadas análises bioquímicas das plantas inteiras, para quantificação de açúcares solúveis totais através do método da Antrona<sup>24</sup>. Para os açúcares redutores foi utilizado o método de DNS<sup>25</sup>. Os aminoácidos foram quantificados pelo método da Ninidrina<sup>26</sup> e as proteínas pelo método de Bradford (1976)<sup>27</sup>. Foram feitas análises bioquímicas, para analisar a atividade da Superóxido Dismutase (SOD) de acordo com Giannopolitis e Ries (1977)<sup>28</sup>, da Catalase (CAT) segundo Havir e McHale (1987)<sup>29</sup> e da Ascorbato peroxidase (APX) de acordo com Nakano e Asada (1981)<sup>30</sup>.

**Análise estatística dos dados.** Todos os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado (DIC). Foi realizada análise de variância

(ANOVA) e comparação de médias pelo Teste de Scott Knott com um nível de significância 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ) utilizando o programa estatístico SISVAR<sup>31</sup>.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

**Síntese e Caracterização de AgNPs.** A figura 1 representa a análise da estabilidade das nanopartículas de prata sintetizadas ao longo de 21 dias de armazenamento. É possível observar um aumento na concentração das nanopartículas no meio, sem fase estável, ou seja, a reação não foi finalizada após a síntese e continuou ao longo dos 21 dias.

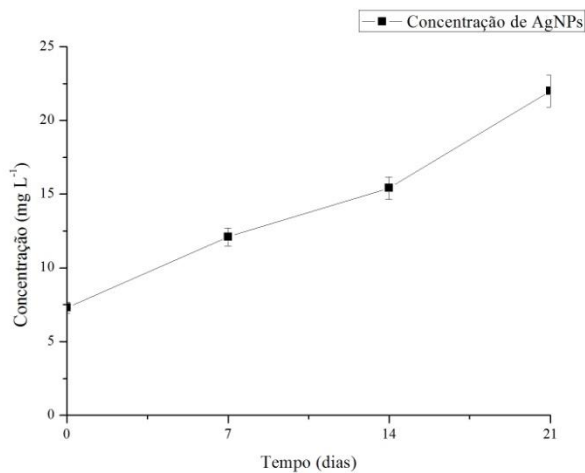


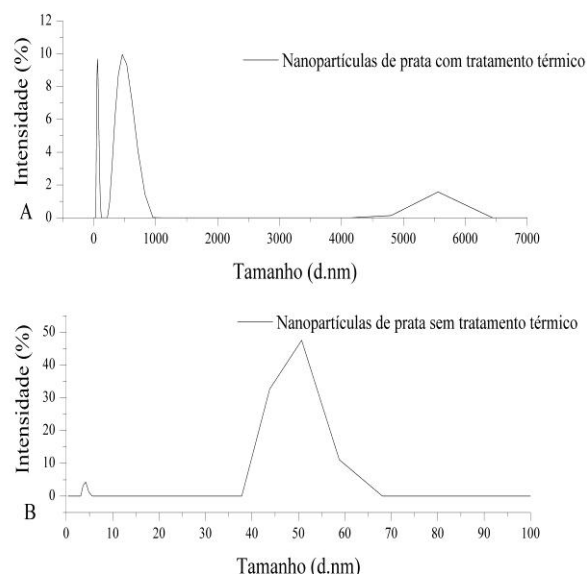
Figura 1. Estabilidade de nanopartículas de prata (AgNPs) após 0, 7, 14 e 21 dias.

A carboximetilcelulose utilizada para estabilizar as nanopartículas pode

atuar também como agente redutor da reação, desta forma, nenhum outro reagente é necessário<sup>32</sup>. Os resultados deste trabalho diferem com os obtidos por Chen et al (2008)<sup>33</sup>, o qual obteve AgNPs, estabilizadas com carboximetilcelulose, estáveis por 2 meses à temperatura ambiente, sem qualquer alteração visível, no entanto, os autores utilizaram o microondas como método para indução do crescimento das nanopartículas. Segundo He e Zhao (2007)<sup>34</sup>, nanopartículas de ferro sintetizadas à base de água são menos estáveis quando comparados a nanopartículas sintetizadas com outros meios e exigem a adição de agentes estabilizantes. A estabilidade dessas nanopartículas durou 9 dias à temperatura ambiente.

O diâmetro médio das nanopartículas de prata com e sem o tratamento térmico adicional foi analisado através do espalhamento dinâmico de luz e da microscopia eletrônica de transmissão. De acordo com a figura 2, AgNPs sem tratamento térmico apresentaram uma distribuição bimodal de tamanhos em que, a média dessas nanopartículas no primeiro pico foi de 4 nm e no segundo pico de 50 nm. As AgNPs obtidas após tratamento térmico apresentaram uma distribuição trimodal de tamanhos, cujo primeiro pico apresentou uma média de 58nm, o segundo pico média de 459 nm e o terceiro pico uma média de 5560 nm. O agente redutor utilizado na síntese das nanopartículas, o citrato de sódio, é considerado um redutor fraco que produz AgNPs com uma larga distribuição de tamanhos<sup>35</sup>.

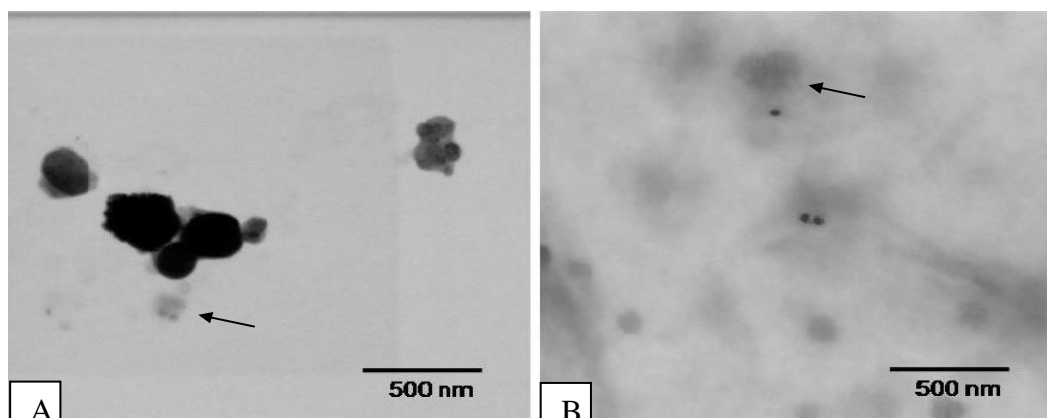




**Figura 2. Distribuição de tamanhos de AgNPs (A) sem tratamento térmico (B) com tratamento térmico.**

Esses resultados demonstram que o processo térmico altera o diâmetro inicial de partículas em escala nanométrica no meio. Embora ainda haja nanopartículas, outras escalas são observadas, como por exemplo, partículas em escala micrométricas. As nanopartículas são materiais ou frações sólidas que atinge dimensões de 1-100 nm, após esse intervalo, as partículas são consideradas micrométricas<sup>36</sup>.

A figura 3 demonstra que, em geral, as amostras tanto com tratamento térmico quanto as sem tratamento térmico dicional são dimensionalmente poli-dispersas. A maioria das partículas individuais detectadas mostra uma forma quasi-esférica.



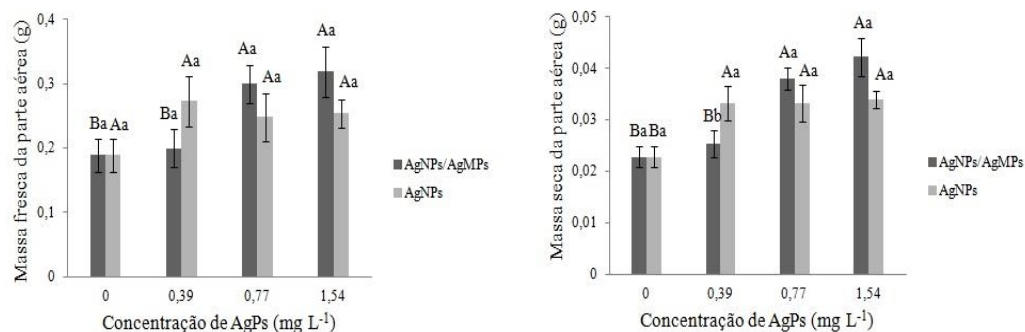
**Figura 3. Microscopia eletrônica de transmissão mostrando resíduos orgânicos (setas pretas), A) Micropartículas de prata (AgMPs) e B) Nanopartículas de prata (AgNPs).**

Observou-se também a presença de resíduos orgânicos do processo de produção nas imagens (indicados pelas setas pretas nas figuras 3A e 3B), inseridos como na forma de alguns sombreamentos acinzentados próximos a pontos menores e mais escuros, que representam AgNPs agregadas. Os fatores determinantes da morfologia das nanopartículas estão inerentes à reações ocorridas no meio, como, nucleação, crescimento das partículas, concentração de reagentes e tipo do reagente<sup>37</sup>.

**Efeito de AgMPs e AgNPs no índice de velocidade germinativa e crescimento de *Physalis peruviana* L.** O índice de velocidade germinativa apresentou uma média geral de  $16 \pm 2$  e não foi observado diferença significativa entre eles. Segundo Lin e Xing (2007)<sup>38</sup> o tegumento das sementes podem apresentar permeabilidade seletiva. Sendo assim, poluentes nocivos ao crescimento da raiz, não afetam a germinação. Isto pode explicar porque a germinação das sementes neste estudo não apresentou diferença significativa

quando expostas as diferentes soluções de nanopartículas de prata.

Observa-se na figura 4 que todas as concentrações do tratamento com apenas AgNPs afetaram significativamente, em relação ao controle, a biomassa (massa seca e massa fresca) da parte aérea, promovendo um aumento de  $0.01 \pm 1$  g da massa seca. Embora os resultados não apresentaram diferença significativa em relação ao controle para a massa fresca da parte aérea é possível observar uma certa propensão a este aumento de massa em função da utilização de AgNPs.



**Figura 4. Efeito de micropartículas de prata (AgMPs) e nanopartículas de prata (AgNPs) na biomassa da parte aérea de *Physalis peruviana* expostas a diferentes concentrações (0, 0,39, 0,77 e 1,54 mg L<sup>-1</sup>).**

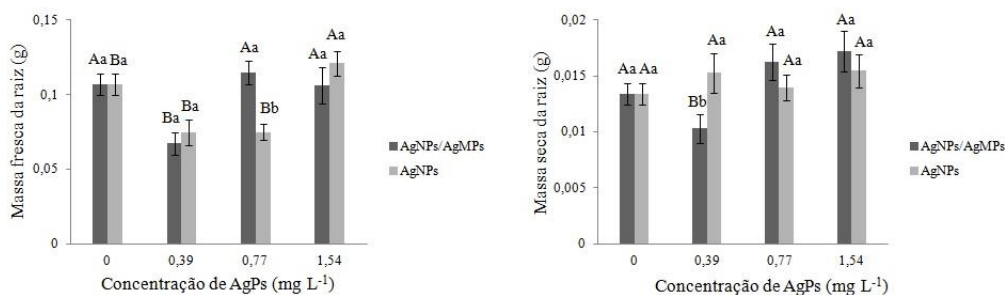
\*Médias seguidas de letras maiúsculas nas colunas e letras minúsculas nas linhas não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott Knott.

A biomassa (massa seca e massa fresca) da parte aérea também foi afetada significativamente, em relação ao controle, quando expostas a solução contendo AgNPs e AgMPs, mas apenas nas concentrações de 0,77 e 1,54 mg L<sup>-1</sup>. A exposição das plantas a essas concentrações promoveram um aumento na massa seca de 0.015 e 0.018 g, respectivamente e na massa fresca de 0.111

e 0.130 g, respectivamente.

Estudos apontam espécies do gênero *Physalis* como potenciais ferramentas de fitorremediação em áreas acumuladoras de metais pesados<sup>39,40</sup>. Sabe-se que os efeitos de AgNPs e AgMPs pode estar associado com a liberação de Ag<sup>+</sup> no meio que estão inseridas. Dessa forma, AgNPs e AgMPs são uma fonte de Ag<sup>+</sup> o que, conseqüentemente, pode levar ao rápido acúmulo desse elemento no interior das plantas<sup>41,42</sup>. Colman et al (2013)<sup>43</sup> observaram que cinco espécies de plantas que ocorrem comumente (*Carex lurida*, *Juncus effusus*, *Lobelia cardinalis*, *Microstegium vimineum* e *Panicum virgatum*) acumulam significativamente mais Ag<sup>+</sup> nos tecidos acima do solo, ou seja, na parte aérea. Tais fatores podem explicar o aumento da biomassa na parte aérea pelos tratamentos.

A figura 5 ilustra que a menor concentração (0,39 mg L<sup>-1</sup>) do tratamento contendo AgNPs e AgMPs afetou significativamente a biomassa da raiz, em relação ao controle, promovendo uma redução de 0.004 e 0.038 g na massa seca e massa fresca, respectivamente.



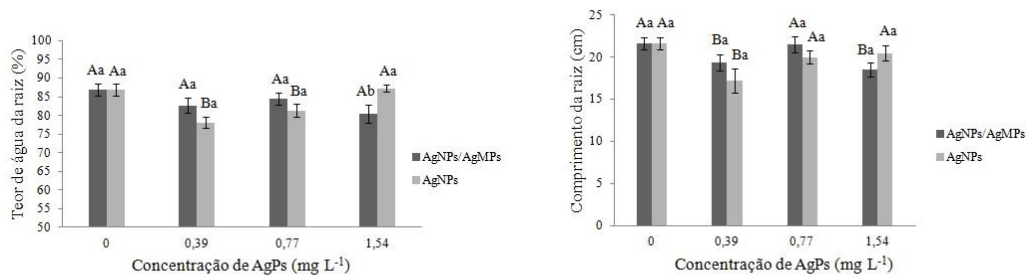
**Figura 5.** Efeito de micropartículas de prata (AgMPs) e nanopartículas de prata (AgNPs) na biomassa da raiz de *Physalis peruviana* expostas a diferentes concentrações (0, 0,39, 0,77 e 1,54 mg L<sup>-1</sup>).

\*Médias seguidas de letras maiúsculas nas colunas e letras minúsculas nas linhas não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott Knott.

A absorção não conduz necessariamente à inibição do crescimento da parte aérea, pois diferentes espécies de plantas têm diferentes sensibilidades a toxicidade induzida por AgNPs. De acordo com Colman et al (2013)<sup>43</sup> a espécie *Microstegium vimineum* mostrou maior sensibilidade aos efeitos de AgNPs que as outras espécies (*Carex lurida*, *Juncus effusus*, *Lobelia cardinalis* e *Panicum virgatum*), a qual reduziu a biomassa da parte aérea em 32%, em relação ao controle, mas sua biomassa radicular não foi afetada de forma significativa.

O tratamento contendo apenas AgNPs não afetou significativamente a massa seca da raiz, mas a massa fresca da raiz aumentou 0.014 g, em relação ao controle, apenas quando exposta a concentração de 1,54 mg L<sup>-1</sup>. As diferenças aparentes sobre os efeitos de AgNPs nas plantas podem surgir de propriedades relacionadas à concentração de nanopartículas no meio, a espécie da planta e o tempo de exposição e as concentrações<sup>44</sup>. Segundo Hojjat e Hojjat (2015)<sup>45</sup>, a ação de AgNPs em feno-grego (*Trigonellafoenum-graecum*) apresentou uma variação dose-dependente quanto aos seus efeitos no crescimento da espécie. O comprimento e o teor de água da parte aérea e o número de folhas não foram afetados de forma significativa, independente dos tratamentos. Porém, teor de água da raiz (Figura 6) foi reduzido em 9 e 6% em relação ao controle, nas concentrações de 0,39 e 0,77 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente, nos tratamentos contendo apenas AgNPs.

O tratamento com AgNPs e AgMPs nas concentrações de 0,39 mg L<sup>-1</sup> e 1,54 mg L<sup>-1</sup> promoveram uma redução no comprimento da raiz de 2,22 e 3,09 cm, respectivamente (Figura 6). Tal redução também foi observado na concentração de 0,39 mg L<sup>-1</sup> (3,67 cm) do tratamento com apenas AgNPs.



**Figura 6. Efeito de micropartículas de prata (AgMPs) e nanopartículas de prata (AgNPs) no teor de água e comprimento da raiz de *Physalis peruviana* expostas a diferentes concentrações (0, 0,39, 0,77 e 1,54 mg L<sup>-1</sup>).**

**\*Médias seguidas de letras maiúsculas nas colunas e letras minúsculas nas linhas não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott Knott.**

As paredes celulares nas superfícies radiculares apresentam uma permeabilidade seletiva que permitem a passagem de moléculas de água e solutos pequenos através dos poros, mas impedem a passagem de materiais coloidais com diâmetros de partícula maiores que 8 nm. Em alguns casos a acumulação de partículas coloidais nas paredes celulares da raiz pode reduzir o diâmetro médio dos poros na matriz da parede celular. Tal mecanismo pode promover a acumulação de partículas na interface de parede e conseqüentemente reduz o transporte de água para o interior da raiz formando camadas de agregados na superfície e diminuindo a entrada de água nas paredes celulares epidérmicas radiculares. Estas respostas sintomáticas parecem envolver interações físicas e não tóxicas entre nanopartículas e raízes<sup>1</sup>.

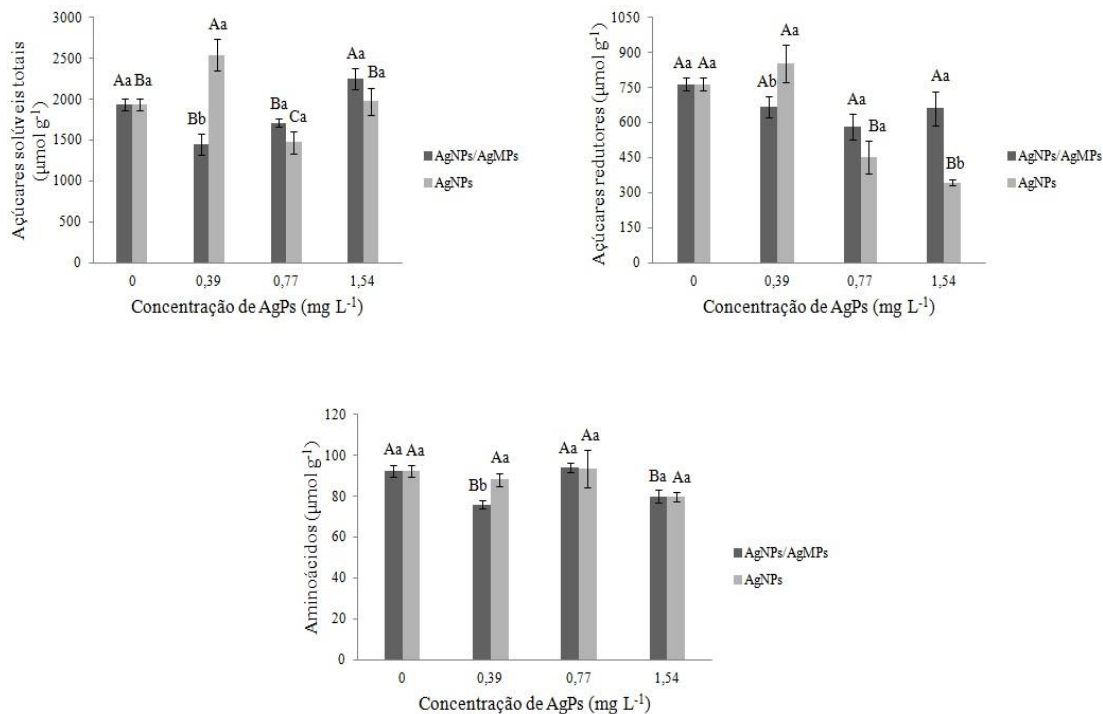
Além disso, várias transformações podem ocorrer com as partículas de prata no ambiente, tais como a agregação e dissolução, afetando suas propriedades, comportamento e efeitos<sup>46</sup>. A determinação dos efeitos finais de partículas coloidais metálicas e seus óxidos em organismos vivos é complexa,

devido à dissolução potencial dos íons metálicos dessas partículas e a captação destes pela célula<sup>47</sup>.

**Efeito de AgMPs e AgNPs em alguns parâmetros bioquímicos de *Physalis peruviana* L.** Na figura 7 observa-se que as concentrações de 0,39 e 0,77 mg L<sup>-1</sup> promoveram uma redução no teor de açúcares solúveis totais (AST) de 485,25 e 225,25 μmol g<sup>-1</sup>, em relação ao controle, quando expostas ao tratamento com AgNPs e AgMPs. No entanto, no tratamento com AgNPs apenas, quando comparado com o controle, a menor concentração (0,39 mg L<sup>-1</sup>) promoveu um aumento de 607,73 μmol g<sup>-1</sup> no teor de AST, enquanto a concentração de 0,77 mg L<sup>-1</sup> continuou a reduzi-lo (463,09 μmol g<sup>-1</sup>).

O teor de açúcares redutores (AR) foi significativamente reduzido, em relação ao controle, nas concentrações 0,77 mg L<sup>-1</sup> (450.9 μmol g<sup>-1</sup>) e 1,54 mg L<sup>-1</sup> (343.51 μmol g<sup>-1</sup>) de nanopartículas de prata, apenas. Esses resultados corroboram com os obtidos por Arora et al (2012)<sup>48</sup>, que observaram um aumento significativo dose-dependente de AST e AR em *Brassica juncea* quando expostas a 25 ppm de nanopartículas de ouro. Após atingir um limiar de concentração dessas nanopartículas, o teor de açúcares solúveis totais e açúcares redutores foi reduzido.

Estudos sugerem que plantas (especialmente aquelas com capacidade bioacumuladora) geralmente depositam os metais na forma de nanopartículas no seu interior e os açúcares presentes nos extratos de plantas podem também induzir a formação de nanopartículas metálicas. Foi observado que açúcares redutores, tais como a glicose e a frutose atuam como um agente redutor com potencial atividade antioxidante também<sup>49,50</sup>.



**Figura 7. Análises bioquímicas do efeito de AgMPs e AgNPs em açúcares solúveis totais, açúcares redutores e aminoácidos de plântulas de *Physalis peruviana* expostas a diferentes concentrações (0, 0,39, 0,77 e 1,54 mg L<sup>-1</sup>).**

**\*Médias seguidas de letras maiúsculas nas colunas e letras minúsculas nas linhas não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott Knott.**

O teor de aminoácidos (Figura 7) foi significativamente reduzido nas concentrações 0,39 e 1,54 mg L<sup>-1</sup> apenas no tratamento com AgNPs e AgMPs, alcançando valores de 75.85 e 79.95 µmol g<sup>-1</sup>. De acordo com Olkhovych et al (2016)<sup>51</sup>, os aminoácidos de plantas de *Pistia stratiotes* L. expostas a nanopartículas metálicas (cobre, zinco, e a sua composição binária) foram reduzidos em proporções diferentes, a depender do tipo da nanopartícula. A quantidade de metionina, por exemplo, foi reduzida significativamente, apenas na presença de nanopartículas de zinco a uma concentração de 89 mg L<sup>-1</sup>.



Os resultados do teor de proteínas e das atividades enzimáticas não apresentaram diferenças significativas com o controle para nenhum dos tratamentos e concentrações utilizadas. A primeira hipótese para atividade das enzimas antioxidantes não apresentar diferenças significativas com o controle, é a de que apenas a fração de tamanhos entre 1-10 nm foi capaz de penetrar nas células das plantas, considerando que essa é uma fração pequena, neste estudo, muitas nanopartículas podem ter ficado agregadas às células da periderme formando aglomerados e não foi suficiente para provocar um estresse oxidativo e conseqüentemente aumentar a concentração dessas enzimas antioxidantes<sup>52</sup>. A segunda hipótese é a de que a *Physalis peruviana* possa ter reduzido os efeitos de EROs causadas por AgNPs com um aumento na concentração de outras substâncias antioxidantes no seu interior, como por exemplo, terpenóides e carotenóides<sup>53,54</sup>.

Além disso, a carboximetilcelulose foi o agente estabilizante utilizado neste trabalho. A carboximetilcelulose é um polímero natural bastante utilizado em sínteses sustentáveis de nanomateriais, as quais reduzem o uso de solventes perigosos ou outros ingredientes tóxicos. Os processos incluem a produção de nanomateriais sem prejudicar o meio ambiente ou a saúde humana. A principal aplicação da carboximetilcelulose nessas rotas de síntese é devido sua baixa toxicidade e elevada sensibilidade<sup>55</sup>.

Ademais, utilizou-se o citrato de sódio como agente redutor. Quando comparado com outros agentes redutores (borohidreto de sódio, por exemplo), as nanopartículas obtidas pelo método com citrato são maiores e conseqüentemente menor sua capacidade de penetração<sup>56</sup>.

Com isso, conclui-se que tanto as micropartículas quanto as nanopartículas acarretaram poucas ou nenhuma modificação na fisiologia das plantas, a depender da concentração e temperatura analisada. Além disso, foi

observado neste estudo, que a temperatura influenciou os efeitos das AgNPs, de forma significativa. Estes resultados sugerem que a utilização de metodologias aplicadas a análises nanotoxicológicas utilizando variações na temperatura pode comprometer as propriedades físico-químicas das nanopartículas e conseqüentemente a validação dos efeitos das mesmas no modelo experimental. Contudo, mais estudos são necessários a fim de consolidar a ação de AgNPs em *Physalis*.

#### INFORMAÇÕES DO AUTOR

Autor Correspondente

\*Telefone: 55(16) 2107-2800; email: jose.marconcini@embrapa.br

#### CONTRIBUIÇÕES DE AUTORES

O manuscrito foi escrito através das contribuições de todos os autores.

#### AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Capes, CNPq, FAPEMIG e Embrapa Instrumentação pelo apoio.

#### ABREVIACÕES

AgNPs, nanopartículas de prata; AgMPs, micropartículas de prata; AgPs, partículas de prata; MP, micropartículas; NP, nanopartículas; SOD, superóxido dismutase; CAT, catalase, APX, ascorbato peroxidase; AST, açúcares solúveis totais; AR, açúcares redutores; DLS, espalhamento dinâmico de luz; EROs, espécies reativas de oxigênio.

## REFERÊNCIAS

- (1) Navarro, E.; Piccapietra, F.; Wagner, B.; Marconi, F.; Kaegi, R.; Odzak, N.; Behra, R. Toxicity of Silver Nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environ. Sci. Technol.* **2008**, 42(23), 8959–8964; DOI <https://doi.org/10.1021/es801785m>.
- (2) Pachapur, V. L.; Larios, A. D.; Cledon, M.; Brar, S. K.; Verma, M.; Surampalli, R. Y. Behavior and characterization of titanium dioxide and silver nanoparticles in soils. *Science of The Total Environment*. **2016**, 563-564, 933-943; DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.11.090>.
- (3) Vannini, C.; Domingo, G.; Onelli, E.; Prinsi, B.; Marsoni, M.; Espen, L.; Bracale, M. (2013). Morphological and proteomic responses of *Eruca sativa* exposed to silver nanoparticles or silver nitrate. *PLoS One*. **2013**, 8 (7), e68752; DOI <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0068752>.
- (4) Bai, C.; Liu, M. From chemistry to nanoscience: not just a matter of size. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52 (10), 2678-2683; DOI <http://dx.doi.org/10.1002/anie.201210058>.
- (5) Barrena, R.; Casals, E.; Colón, J.; Font, X.; Sánchez, A.; Puentes, V. Evaluation of the ecotoxicity of model nanoparticles. *Chemosphere*. **2009**, 75 (7), 850-857; DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.01.078>
- (6) Yin, L.; Colman, B. P.; McGill, B. M.; Wright, J. P.; Bernhardt, E. S. Effects of silver nanoparticle exposure on germination and early growth of eleven wetland plants. *PLoS One*. **2012**, 7 (10), e47674; DOI <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0047674>

- (7) Magdassi, S.; Grouchko, M.; Berezin, O.; Kamyshny, A. Triggering the Sintering of Silver Nanoparticles at Room Temperature. *ACS Nano*. **2010**, *4*(4), 1943–1948; DOI 10.1021/nn901868t.
- (8) Arora, S.; Rajwade, J. M.; Paknikar, K. M. Nanotoxicology and in vitro studies: the need of the hour. *Toxicol. and Appl. Pharmacol.* **2012**, *258* (2), 151-165; DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2011.11.010>.
- (9) Cid, L. P. B. Eds. *Cultivo in vitro de plantas*, 3rd, ed.; Embrapa: Brasília, 2014.
- (10) Yücesan, B. B.; Mohammed, A.; Arslan, M.; Gürel, E. Clonal propagation and synthetic seed production from nodal segments of Cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.), a tropical fruit plant. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*. **2015**, *39* (5), 797-806; DOI <http://dx.doi.org/10.3906/tar-1412-86>
- (11) Zafar, H.; Ali, A.; Ali, J. S.; Haq, I. U.; Zia, M. Effect of ZnO Nanoparticles on Brassica nigra Seedlings and Stem Explants: Growth Dynamics and Antioxidative Response. *Frontiers in Plant Science*. **2016**, *7*, 1–8; DOI <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00535>
- (12) Lin, D.; Xing, B. Root Uptake and Phytotoxicity of ZnO Nanoparticles. *Environ. Sci. Technol.* **2007**, *42*(15), 5580–5585; DOI <https://doi.org/10.1021/es800422x>
- (13) Khodakovskaya, M.; Dervishi, E.; Mahmood, M.; Xu, Y.; Li, Z.; Watanabe, F.; Biris, A. S. Carbon nanotubes are able to penetrate plant seed coat and dramatically affect seed germination and plant growth. *ACS nano*. **2009**, *3*(10), 3221-3227; DOI <https://doi.org/10.1021/nn900887m>.
- (14) Qian, H.; Peng, X.; Han, X.; Ren, J.; Sun, L.; Fu, Z. Comparison of the toxicity of silver nanoparticles and silver ions on the growth of terrestrial plant model *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Environmental Sciences*. **2013**, *25*(9), 1947-1956; DOI [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(12\)60301-5](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(12)60301-5)

- (15) Kumari, M.; Mukherjee, A.; Chandrasekaran, N. Genotoxicity of silver nanoparticles in *Allium cepa*. *Science of the Total Environment*. **2009**. 407(19), 5243-5246; DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.06.024>
- (16) Puente, L. A.; Pinto-Muñoz, C. A.; Castro, E. S.; Cortés, M. *Physalis peruviana* Linnaeus, the multiple properties of a highly functional fruit: A review. *Food Res. Int.* **2010**, 44 (7), 1733-1740; DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2010.09.034>.
- (17) Muniz, J.; Kretzschmar, A. A.; Rufato, L. ; Pelizza, T. R.; Rufato, A. De R.; Macedo, T. A. de. General aspects of *physalis* cultivation. *Ciênc.Rural*.**2014**, 44 (6), 964-970; ISSN 0103-8478.
- (18) Turkevich, J.; Stevenson, P. C.; Hillier, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discuss. Faraday Soc.***1951**, 11, 55-75; DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/DF9511100055>.
- (19) Moço, S. S. da S. Impregnação de fibras de celulose com nanopartículas de prata, óxido de zinco e óxido de cobre para aplicações anti-bacterianas. Tese de Mestrado, .Faculdade de Ciência e Tecnologia/Universidade Nova de Lisboa, Nov. 2013.
- (20) Brasil. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Regras para análise de sementes. Brasília: SNAD/DNDV/CLAV, 2009. 365p.
- (21) Maguire, J. D. Speed of germination—aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop science*. 1962. 2(2), 176-177; DOI <http://dx.doi.org/10.2135/cropsci1962.0011183X000200020033x>
- (22) Figueiredo, M. D. L. C.; Martins-Dias, A. M. P.; Cruz, I. Relação entre a lagarta-do-cartucho e seus agentes de controle biológico natural na produção de milho. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. **2006**. 41(12), 1693-1698.

- (23) Amaral, L. I. V. do; Pereira, M. D. E. F. D. A.; Cortelazzo, E. Â. L. Germinação de sementes em desenvolvimento de *Bixa orellana*. *Revista Brasileira de Fisiologia*. **2000**, 12(3), 273–285.
- (24) Yemm, E.W.; Willis, A. J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *Biochem.J.* **1954**, 57 (3), 508-514; DOI <http://dx.doi.org/10.1042/bj0570508>.
- (25) Miller, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal.Chem.* **1959**, 31 (3), 426–428; DOI <http://dx.doi.org/10.1021/ac60147a030>.
- (26) Yemm, E. W.; Cocking, E. C.; Ricketts, R. E. The determination of amino-acids with ninhydrin. *Analyst*. **1955**, 80 (948), 209-214; DOI <http://dx.doi.org/10.1039/AN9558000209>.
- (27) Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, 72 (1-2), 248-254; DOI [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- (28) Giannopolitis, C. N.; Ries, S. K. Superoxide dismutases I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiol.* **1977**, 59 (2), 309-314; DOI <http://dx.doi.org/10.1104/pp.59.2.309>.
- (29) Havir, E. A.; Mchale, N. A. Regulation of catalase activity in leaves of *Nicotiana glauca* by high CO<sub>2</sub>. *Plant Physiol.* **1989**, 89 (3), 952-957; DOI <http://dx.doi.org/10.1104/pp.89.3.952>
- (30) Nakano, Y.; Asada, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* **1981**, 22 (5), 867-880; ISSN 1471-9053

- (31) Ferreira, D. F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. *Ciênc.Agrotec.***2014**, 35 (6), 109-112; DOI <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542011000600001>.
- (32) Hebeish, A. A.; El-Rafie, M. H.; Abdel-Mohdy, F. A.; Abdel-Halim, E. S.; Emam, H. E. Carboxymethyl cellulose for green synthesis and stabilization of silver nanoparticles. *Carbohydrate Polymers.***2010**, 82 (3), 933-941; DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.06.020>
- (33) Chen, J.; Wang, J.; Zhang, X.; Jin, Y. Microwave-assisted green synthesis of silver nanoparticles by carboxymethyl cellulose sodium and silver nitrate. *Materials chemistry and physics.***2008**, 108 (2), 421-424; DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.matchemphys.2007.10.019>
- (34) He, F.; Zhao, D.; Liu, J.; Roberts, C. B. Stabilization of Fe–Pd nanoparticles with sodium carboxymethyl cellulose for enhanced transport and dechlorination of trichloroethylene in soil and groundwater. *Industrial e Engineering Chemistry Research.***2007**, 46 (1), 29-34; DOI <http://dx.doi.org/10.1021/ie0610896>
- (35) Khodashenas, B.; Ghorbani, H. R. Synthesis of silver nanoparticles with different shapes. *Arabian Journal of Chemistry.***2015**, 1-16; DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.12.014>.
- (36) Guglielmotti, M. B.; Domingo, M. G.; Steimetz, T.; Ramos, E.; Paparella, M. L.; Olmedo, D. G. Migration of titanium dioxide microparticles and nanoparticles through the body and deposition in the gingiva : an experimental study in rats. *European Journal of Oral Science.***2015**, 123(4), 242–248; DOI <https://doi.org/10.1111/eos.12190>
- (37) Sau, T. K., & Rogach, A. L. (Eds.). (2012). *Complex-shaped metal nanoparticles: bottom-up syntheses and applications*. John Wiley & Sons.

- (38) Lin, D.; Xing, B. Phytotoxicity of nanoparticles: inhibition of seed germination and root growth. *Environmental Pollution*. **2007**, 150(2), 243-250.
- (39) Cui, S.; Zhou, Q.; Chao, L. Potential hyperaccumulation of Pb , Zn , Cu and Cd in enduring plants distributed in an old smeltery , northeast China. *Environ. Geol.* **2007**, 51, 1043–1048; DOI <https://doi.org/10.1007/s00254-006-0373-3>
- (40) Subhashini, V.; Swamy, A. V. V. S. Phytoremediation of cadmium and chromium from contaminated soils using *Physalis minima*Linn.*American International Journal of Research in Formal, Applied e Natural Sciences*.**2013**,3(1), 119–122; ISSN 2328-3785.
- (41) Choi, O.; Deng, K. K.; Kim, N. J.; Ross, L.; Surampalli, R. Y.; Hu, Z. The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth. *Water research*. **2008**, 42(12), 3066-3074; DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2008.02.021>
- (42) Hadrup, N.; Lam, H. R. Oral toxicity of silver ions, silver nanoparticles and colloidal silver—a review. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. **2014**, 68(1), 1-7; DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.yrtph.2013.11.002>
- (43) Colman, B. P.; Arnaout, C. L.; Anciaux, S.; Gunsch, C. K.; Hochella, M. F.; Kim, B.; Bernhardt, E. S. Low Concentrations of Silver Nanoparticles in Biosolids Cause Adverse Ecosystem Responses under Realistic Field Scenario. *PLoS ONE*.**2013**, 8(2), 1-10; DOI <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057189>
- (44) Dietz, K. J.; Herth, S. Plant nanotoxicology. *Trends in plant science*. 2011, 16(11), 582-589.
- (45) Hojjat, S. S; Hojjat, H. Effect of Nano Silver on Seed Germination and Seedling Growth in Fenugreek Seed.*International Journal of Food Engineering*.**2015**, 1(2), 106–110; DOI <https://doi.org/10.18178/ijfe.1.2.106-110>
- (46) García-alonso, J.; Rodríguez-sánchez, N.; Misra, S. K.; Valsami-jones, E.; Croteau, M.; Luoma, S. N.; Rainbow, P. S. Toxicity and accumulation of silver



nanoparticles during development of the marine polychaete *Platynereis dumerilii*. *Science of the Total Environment*. **2014**, 476–477, 688–695; DOI <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.01.039>

(47) 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*. **2010**, 408(16), 3053–3061; DOI <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.03.031>

(48) Arora, S.; Sharma, P.; Kumar, S.; Nayan, R.; Khanna, P. K.; Zaidi, M. G. H. Gold-nanoparticle induced enhancement in growth and seed yield of *Brassica juncea*. *Plant Growth Regul.* **2012**, 66 (3), 303–310; DOI <https://doi.org/10.1007/s10725-011-9649-z>

(49) Panigrahi, S., Kundu, S., Ghosh, S. K., Nath, S., e Pal, T. General method of synthesis for metal nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research*. **2004**, 6(4), 411–414; DOI <https://doi.org/10.1007/s11051-004-6575-2>

(50) Makarov, V. V; Love, A. J.; Sinitsyna, O. V; Makarova, S. S.; Yaminsky, I. V; Taliansky, M. E.; Kalinina, N. O. “ Green ” Nanotechnologies : Synthesis of Metal Nanoparticles Using Plants. *ACTA Naturae*. **2014**, 6 (20), 35–44.

(51) Olkhovych, O.; Volkogon, M.; Taran, N.; Batsmanova, L.; Kravchenko, I. The Effect of Copper And Zinc Nanoparticles on the Growth Parameters , Contents of Ascorbic Acid , and Qualitative Composition of Amino Acids and Acylcarnitines in *Pistia stratiotes* L. (Araceae). *Nanoscale Research Letters*. **2016**, 11(1), 1–9; DOI <https://doi.org/10.1186/s11671-016-1422-9>

(52) Du, W.; Sun, Y.; Ji, R.; Zhu, J.; Wub, J.; Guo, H. TiO<sub>2</sub> and ZnO nanoparticles negatively affect wheat growth and soil enzyme activities in agricultural soil activities in agricultural soil. *Journal of Environmental Monitoring*. **2011**, 13 (4), 822–828; DOI <https://doi.org/10.1039/c0em00611d>

- (53) Mirzajani, F.; Askari, H.; Hamzelou, S.; Farzaneh, M.; Ghassempour, A. Ecotoxicology and Environmental Safety Effect of silver nanoparticles on *Oryzasativa*L .and its rhizosphere bacteria. *Ecotoxicology and Environmental Safety*.**2013**, 88, 48–54; DOI <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.10.018>
- (54) Horn, R. C.; Soares, J. C.; Mori, N. C.; Gelatti, G. T.; Manfio, C. E.; Golle, D. P.; Oliveira, C. (2015). Antioxidant Effect of *Physalis Peruviana* Fruit Aqueous Extract – The Antioxidant Effect of Physalis. *Journal of Agricultural Science*.**2015**, 7 (12), 137–143; DOI <https://doi.org/10.5539/jas.v7n12p137>
- (55) Virkutyte, J.; Varma, R. S. Green synthesis of metal nanoparticles : Biodegradable polymers and enzymes in stabilization and surface functionalization. *Chemical Science*.**2011**, 2(5), 837–846; DOI <https://doi.org/10.1039/c0sc00338g>
- (56) Auffan, M., Rose, J.; Bottero, J.; Lowry, G. V.; Jolivet, J.; Wiesner, M. R. Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. *Nature Nanotechnology*.**2009**, 4(10), 634–641; DOI <https://doi.org/10.1038/nnano.2009.24>

