



PATRÍCIA TEIXEIRA CORRÊA

**ASPECTOS FISIOLÓGICOS DA INTERAÇÃO
ENTRE *Physalis peruviana* L. E NANOTUBOS DE
CARBONO DE PAREDES MÚLTIPLAS**

LAVRAS – MG

2017

PATRÍCIA TEIXEIRA CORRÊA

**ASPECTOS FISIOLÓGICOS DA INTERAÇÃO ENTRE *Physalis*
peruviana L. E NANOTUBOS DE CARBONO DE PAREDES
MÚLTIPLAS**

Dissertação apresentado à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós Graduação Departame em Engenharia de Biomateriais, área de concentração em Produtos de Nanoprodutos Alimentícios, para obtenção de título de Mestre.

Prof. Dr. Juliano Elvis de Oliveira

Orientador

Dra. Michele Valquíria dos Reis

Coorientadora

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).

Corrêa, Patrícia Teixeira.

Aspectos fisiológicos da interação entre *Physalis peruviana* L.
e nanotubos de carbono de paredes múltiplas / Patrícia Teixeira

Corrêa. - 2017.

58 p. : il.

Orientador(a): Juliano Elvis de Oliveira.

Coorientador(a): Michele Valquíria dos Reis.

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

Bibliografia.

1. Nanotecnologia. 2. Nanotubos de Carbono. 3. *Physalis
peruviana* L. I. de Oliveira, Juliano Elvis. II. dos Reis, Michele
Valquíria. III. Título.

PATRÍCIA TEIXEIRA CORRÊA

ASPECTOS FISIOLÓGICOS DA INTERAÇÃO ENTRE *Physalis peruviana* L. E NANOTUBOS DE CARBONO DE PAREDES MÚLTIPLAS

PHYSIOLOGICAL ASPECTS OF THE INTERACTION BETWEEN *PHYSALIS PERUVIANA* L. AND MULTIWALLED CARBON NANOTUBES

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós Graduação em Engenharia de Biomateriais, área de concentração em Produtos e Nanoprodutos Alimentícios, pra obtenção de Título de Mestre.

Aprovada em 16 de março de 2017

Dr. Juliano Elvis de Oliveira UFLA

Dra. Michele Valquíria dos Reis UFLA

Dr. Diogo Pedrosa Corrêa da Silva UFLA

Dr. Eliton Souto de Medeiros UFPB

Prof. Dr. Juliano Elvis de Oliveira

Orientador

Lavras – MG

2017

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, especialmente ao meu pai, pelo apoio, incentivo e amor não só durante essa fase, mas como sempre foi toda minha vida.

À Capes pela concessão da bolsa de estudos.

Aos orientadores Juliano Elvis de Oliveira e Michele Valquíria dos Reis pelos ensinamentos e atenção.

Aos professores do programa de pós-graduação de Engenharia de Biomateriais pelos ensinamentos.

À banca por aceitar o convite e se dispor a contribuir com o trabalho.

Ao Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas e seu responsável, Renato Paiva, por fornecer meios para a execução do presente trabalho.

Ao laboratório da Embrapa Instrumentação de São Carlos pelo apoio concedido durante a realização do trabalho.

Ao Rafael, por todo amor, carinho e atenção durante nossos anos juntos.

À Laura, amiga que sempre ofereceu apoio, atenção e carinho, desde que nos conhecemos.

Ao Geovanne, que de colega de trabalho se tornou um grande amigo e que me sinto extremamente feliz por ter conhecido.

À Lenora por guiar em todos os momentos, mesmo aqueles que pareciam não ter solução.

Ao Schumann, amigo que jamais esquecerei e que guardarei na memória, mesmo que você não esteja presente fisicamente nesse mundo.

A todas as pessoas que conheci, pelos ensinamentos que somente pela experiência poderia ter.

RESUMO

Nanotubos de carbono possuem diversas funções, propriedades e aplicações que não são encontradas em outros materiais, os tornando alvos de estudos. A planta *Physalis peruviana* L. elevada taxa de germinação e rápido desenvolvimento foi o alvo de aplicação desse nanomaterial. Neste estudo, o objetivo foi investigar efeitos de nanotubos de carbono no crescimento e desenvolvimento de *Physalis peruviana* L. Inicialmente foram obtidas micrografias pela da técnica de microscopia eletrônica de transmissão com o intuito de avaliar parâmetros morfológicos dos nanotubos de carbono. Além disso, a espectroscopia Raman foi feita para a melhor compreensão da composição química dos nanotubos de carbono. Análises do crescimento e desenvolvimento das plantas foram feitas para avaliar possíveis interações entre os nanotubos de carbono e a *Physalis peruviana* L. Este estudo foi com duas formas de análises distintas. A primeira foi conduzida com plantas desenvolvidas em condições *in vitro* e a segunda, as plantas foram desenvolvidas em condições *ex vitro*. Na análise *in vitro* foi feita avaliação do efeito do processo de autoclavagem do meio de cultivo contendo nanotubos de carbono assim como a interação entre o nanomaterial e a espécie vegetal. No segundo tratamento da análise *in vitro*, foi avaliado a efeito da embebição das sementes de *Physalis peruviana* L. em soluções contendo diferentes concentrações. No tratamento *ex vitro*, as sementes foram germinadas em substrato vegetal e a aspersão foliar foi feita com suspensões de nanotubos de carbono nas mesmas concentrações usadas na primeira fase, que foram de 2, 4, 6, 8 e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os parâmetros avaliados nessa fase também foram feito com intuito de avaliar possíveis efeitos dos nanotubos nas plantas. Os resultados para ambos os procedimentos, *in vitro* e *ex vitro*, mostraram que nanotubos de carbono tiveram, de modo geral, efeitos favoráveis no crescimento e desenvolvimento das plantas.

Palavras-chave: aspersão foliar, germinação, nanoecotoxicologia nanotecnologia, nanotoxicologia, *solanaceae*

ABSTRACT

Carbon nanotubes have many functions, properties and applications that are not found in other materials, making them target of studies. The plant *Physalis peruviana* L., with elevated germination rate and fast development, was a target for the application of this nanomaterial. In this study, the objective was to investigate the effects of carbon nanotubes over the growth and development of *Physalis peruviana* L. Initially, micrographs were obtained by means of the transmission electron microscopy with the objective of evaluating the morphological parameters of the carbon nanotubes. In addition, the Raman spectroscopy was used to better understand the chemical composition of the carbon nanotubes. Growth and development analysis were conducted on the plants to evaluate possible interactions between the carbon nanotubes and *Physalis peruviana* L. This study was conducted using two distinct forms of analysis. The first was conducted with plants developed under *in vitro* conditions and the second with plants developed under *ex vitro* conditions. For the *in vitro* analysis, the effect of the autoclaving process of the cultivation medium containing the carbon nanotubes. For the second treatment of the *in vitro* analysis, the effect of *Physalis peruviana* L. seed soaking in solutions containing different concentrations was evaluated. For the *ex vitro* treatment, the seeds were germinated in plant substrate and the foliar aspersion was done by suspending the carbon nanotubes. The parameters were evaluated in this phase also with the objective of evaluating possible effects of the nanotubes over the plants. The results for both *in vitro* and *ex vitro* procedures showed that the carbon nanotubes, in general, presented effects favorable to plant growth and development.

Keywords: foliar aspersion, germination, nanoecotechnology, nanotechnology, nanotoxicology, *solanaceae*.

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE.....	8
1	INTRODUÇÃO.....	8
2	Referencial teórico.....	9
2.1	Estrutura e propriedades dos nanotubos de carbono.....	9
2.2	Aplicações dos nanotubos de carbono.....	11
2.3	Efeitos dos nanotubos de carbono em sistemas vegetais.....	12
2.4	<i>Physalis peruviana</i> L.....	14
	SEGUNDA PARTE – ARTIGO.....	22
	ARTIGO - AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS FISIOLÓGICOS RESULTANTES DA INTERAÇÃO ENTRE <i>Physalis peruviana</i> L. E NANOTUBOS DE CARBONO DE PAREDES MÚLTIPLAS.....	22

1 INTRODUÇÃO

A nanotecnologia é a manipulação da matéria em escala atômica, molecular, supramolecular e que, constantemente se inova (WAGNER; GONDIKAS; NEUBAUER, 2014). Os produtos oriundos dessa tecnologia são os nanomateriais (NM), que apresentam no máximo 100 nanômetros em pelo menos em uma de suas dimensões (YOKEL & MACPHAIL, 2011).

A ocorrência desses materiais pode ser de origem natural ou sintética (WAGNER; GONDIKAS; NEUBAUER, 2014). Com aumento da sua aplicação, os NMs vêm sendo cada vez mais explorados (NERLICH & LEMANCYZ, 2015) e já é possível encontrar alguns produtos disponíveis para o consumo que apresentam tais materiais em sua composição (NERLICH & LEMANCYZ, 2015).

Atrelado ao aumento do emprego da nanotecnologia foi constatado que 66 toneladas de NM são liberadas em ambientes aquáticos a cada ano. Esse valor levanta questões em relação aos cuidados em relação ao manejo de descarte dos NM e aumento de estudos sobre o impacto ambiental desses novos materiais começam a ganhar maior destaque (MORENO-GARRIDO et al., 2015).

Dentre esses NM, os nanotubos de carbono (NTC) possuem grande destaque, são versáteis quanto à sua estrutura e função (MUBARAK et al. 2014). Devido a isso, estes podem ser aplicados em diversas áreas que vão desde dispositivos eletrônicos a produtos agrícolas (BAINBRIDGE & ROCO, 2006; GOGOS et al., 2012).

A compreensão de suas características morfológicas e estruturais, que já um assunto muito explorado, pode ser útil quando se pensa nos efeitos dos NTC em relação a aspectos fisiológicos de diversas espécies vegetais (PARK et al., 2016).

Diante disso, é importante ter em mente que um bioensaio seja usado para a avaliação dos possíveis efeitos da interação entre esses materiais. A espécie vegetal *Physalis peruviana* é amplamente usada na culinária e possui potencial aplicação na indústria farmacêutica devido às propriedades nutracêuticas de seus compostos fenólicos, especialmente as propriedades relacionadas aos efeitos antioxidantes (SERVIN et al, 2015).

As características fisiológicas dessa espécie vegetal já são bem estabelecidas na literatura (KUSUMANIGTYAS; LAYLI; LIMANDHA, 2015) e por este motivo, pesquisas já vêm sendo conduzidas para avaliar efeitos de substâncias nos parâmetros fisiológicos da *Physalis peruviana* (BALAGUERA – LÓPEZ, 2017).

O objetivo desse trabalho foi avaliar possíveis efeitos dos nanotubos de carbono de paredes múltiplas (NTCPMs) funcionalizados com ácido carboxílico no crescimento e desenvolvimento da espécie vegetal *Physalis peruviana* como auxílio na criação de modelos *in vitro* e *ex vitro* de estudos de seus efeitos em sistemas vegetais.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Estrutura e Propriedades dos Nanotubos de Carbono

Devido a sua dimensão reduzida, e conseqüentemente elevada área superficial, os NM apresentam propriedades diferentes daquelas reportadas para sua escala macroscópica. Esse fato propicia melhorias e criação de novos produtos em diversos campos da indústria, além de estimular diversos avanços nas mais variadas áreas da ciência (YOKEL & MACPHAIL, 2011).

Outra característica dos NM diz respeito à distribuição dos átomos em suas superfícies (30 a 40%), isso os torna instáveis e altamente reativos. Essa

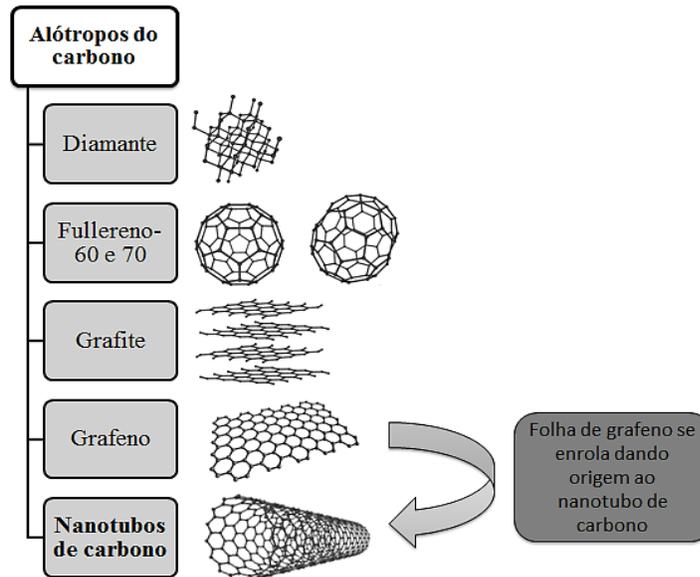
característica pode ou não ser desejável de acordo com o objetivo e aplicação desejados (MORENO-GARRIDO et al., 2015).

Dentre os MN, os NTC se destacam por possuírem excelentes propriedades elétricas, óticas, mecânicas e condutividade térmica (MUBARAK et al., 2013). Por esta razão, estes podem ser aplicados em diversos campos, podendo ser usados para melhorar características de outros materiais ou empregados de forma isolada para o desenvolvimento de novos produtos (BAUGHMAN, ZAKHIDOV, DE HEER, et al., 2016).

Os NTC também são versáteis quanto a sua estrutura. De forma geral, eles podem ser classificados em nanotubos de carbono de parede simples (NTCPS) e nanotubos de carbono de paredes múltiplas (NTCPM). No primeiro caso, a folha de grafeno se enrola uma vez e no segundo, elas se enrolam diversas vezes (HE et al., 2013).

O carbono é um elemento químico capaz de formar diversos alótropos e na figura abaixo (Figura 1), estes estão esquematizados, dando ênfase nos nanotubos de carbono, que são originados ou sintetizados a partir de uma folha de grafeno.

Figura 1 – Alótropos do carbono e formação de nanotubo de carbono



Fonte: Corrêa (2017).

Os NTC possuem excelentes propriedades óticas, elétricas e mecânicas, os tornando ideais para aplicações em produtos eletrônicos (WANG et al, 2009). Outra propriedade interessante dos NTC é que este é constado como o material de maior módulo de elasticidade, o que confere aos mesmos uma elevada rigidez. Esse comportamento mecânico permite seu emprego como agentes de reforço em compósitos de matriz polimérica ou cerâmica, componentes de cabos na indústria eletrônica, entre várias outras (COLLINS et al., 2000).

De acordo com suas características estruturais, os NTC podem se comportar como materiais condutores de eletricidade ou semicondutores (CHARLIER, 2007). São semicondutores unidimensionais graças a sua escala nanométrica e suas características estruturais, essas propriedades também contribuem para sua aplicação em produtos eletrônicos (PALACI et al., 2005).

Estes podem atuar agentes descontaminantes de ambientes aquáticos, como metais pesados. Os NTC por possuírem elevada reatividade, se adsorvem a esses agentes, os tornando estáveis e inativos (RIVERA-UTRILLA et al., 2011).

2.2 Aplicações dos nanotubos de carbono

Exemplo mais comum de aplicação dos NTC é na indústria eletrônica em componentes de dispositivos eletrônicos, como por exemplo, os transistors (WANG et al., 2009). Além da aplicação em componentes eletrônicos, os NTC, nesse caso, de paredes múltiplas, são capazes de gerar energia devido às suas propriedades cinéticas (CHINNPPAN et al., 2017).

Os NTC podem também ser usados na construção civil. Quando adicionados em mistura de resíduos de cimento Portland, estes melhoraram a resistência à compressão e a fratura, além de aumentar a resistência ao fogo dos materiais desenvolvidos. Estes podem ainda agir como pontes nas trincas, melhorando a estabilidade dos compósitos e diminui tamanho dos poros da massa de cimento (AMIN et al., 2015).

Os NTC também podem ser incorporados em fármacos, como por exemplo, para aqueles destinados a tratamentos quimioterápicos, como forma de contornar problemas como falta de seletividade nas células alvo, perfil cinético inadequado, baixa solubilidade, resistência às drogas pelos pacientes e barreiras fisiológicas (SAJID et al., 2016).

Os NTC também podem detectar presença de resíduos de pesticidas em vegetais que, em contato com seres humanos e outros organismo, podem causar danos à saúde (WANG et al., 2007) .

2.3 Efeitos dos nanotubos de carbono em sistemas vegetais

Atualmente os NM são inevitavelmente despejados na natureza e os efeitos dessa interação ainda não são totalmente claros. Sendo que, estes materiais podem entrar em contato com o ambiente por diversas rotas, estes podem estar presentes no ar atmosférico, água e solo (DENG et al., 2014).

Um exemplo de interação entre NM e organismos vivos pode ser observado em raízes das plantas. O contato pode ser estabelecido por irrigação com água contendo as mais variadas nanoestruturas (via mais recorrente) ou por absorção por vias aéreas (estômatos foliares) e ar atmosférico contendo partículas em escala manométrica dispersa (DENG et al., 2014). Apesar das concentrações no solo serem consideradas baixas, em alguns casos, os NM pode acumular no solo e as respostas são variadas e desconhecidas (GOTTSCHALK et al., 2009).

Mudanças genéticas, fisiológicas e morfológicas já foram observadas em plantas expostas aos NM. Essas alterações têm consequências na produção agrícola. Além disso, os NM podem percolar no solo chegando a alcançar o lençol freático, entrar em contato com animais e outros organismos que eventualmente possam ter contato com humanos (DENG et al., 2014).

Outra forma de contato entre NM e plantas ocorre quando estes são usados para remediar solos contaminados. Alguns grupos de pesquisa têm reportado na literatura que devido à elevada reatividade de alguns NM, é possível os empregar em processos de descontaminação de solos (ZHANG, 2016).

Um dos efeitos já observados foi que os NTC são capazes de alterar fisicamente tecidos vegetais e facilitar a entrada de outros NM que eventualmente possam ser absorvidos pelas raízes e parte aérea dos vegetais (STAMPOULIS; SINHA; WHITE, 2009).

Além da absorção, os NTC conseguem chegar até o citoplasma celular em decorrência das alterações físicas causadas na membrana plasmática como aparecimento de poros nos tecidos vegetais (cutículas foliares e estômatos). Estômatos com tecido alterado podem ficar obstruídos devido à presença de NTC, levando ao comprometimento das trocas gasosas (SERVIN et al., 2015).

Efeito da absorção de NTC foi observado em sementes de abobrinhas germinadas em hidroponia (*Cucurbita pepo*). Os NTC foram absorvidos pelas raízes das plantas e a consequência dessa absorção foi observada na diminuição em 75% das raízes das plantas (STAMPOULIS; SINHA; WHITE, 2009).

Em contrapartida, trabalhos na literatura indicam que NTCPMs melhoraram a produção de biomassa em tomates cultivados *in vitro* em meio de cultivo Murashige & Skoog (0, 10, 20 e 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Foi observado que, no terceiro dia, todas as sementes que estavam em contato com NTC germinaram e nenhuma foi observada para o controle e no 20º dia, a maior porcentagem de germinação foi para o tratamento contendo 40 $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de NTC. As plantas tiveram melhor desenvolvimento quando em contato com NTC e a espessura do tegumento não teve influencia na absorção (KHODAKOVSKAYA et al., 2009).

NTCPMs também mostraram ter efeitos positivos em sementes de tomates germinadas em substrato vegetal irrigadas com solução de 50 mL em diferentes concentrações (0, 50, 100 e 200 $10 \mu\text{g mL}^{-1}$). A síntese de aquaporinas e a produção de biomassa aumentaram. Os NTC se translocaram das raízes para outras partes das plantas e são capazes de ativar expressão de proteínas e genes específicos para esses parâmetros (KHODAKOVSKAYA et al., 2013).

Em plantas de tabaco, foi observado que NTCPMs em concentrações de 5 $\mu\text{g/ mL}$ aumentam a síntese celular em 55 a 64% e em concentrações mais altas, foram tóxicos devido a inibição na atividade da enzima catalase. A

inibição altera a absorção de fatores de crescimento pelas células vegetais (KHODAKOVSKAYA et al., 2013).

Já sementes soja, milho e cevada quando germinadas em meio de cultivo meio MS, suplementado com NTCPM (50, 100 e 200 µg mL), apresentaram maior taxa de germinação em relação ao controle. Na concentração de 100 µg mL mostrou ser mais efetivo no crescimento e desenvolvimento das plantas (LAHIANI et al., 2013).

Alterações nos níveis de exposição de NTCPMs (11,20 a 40 mg.g⁻¹) em algas verdes (*Chlorella pyrenoidosa*) pode causar estresse oxidativo celular. Esse efeito pode ser observado na alteração da taxa fotossintética, que causa desequilíbrio em todo o ambiente marinho (ZHANG et al., 2015).

2.4 *Physalis peruviana* L.

A *Physalis* sp. é considerada um pequeno fruto e de ocorrência não espontânea no Brasil. Diversas espécies de *Physalis* ocorrem em países tropicais, subtropicais e de clima temperado. Nesses locais onde não foram introduzidas são consideradas nativas (RUFATO et al., 2013 & KUSUMANIGTYAS; LAYLI; LIMANDHA, 2015).

Estas são nativas de países andinos, países europeus de clima temperado, América Central, Estados Unidos e México (FISCHER & MARTINEZ, 1999). A *Physalis* sp. foi introduzida no Brasil pela Embrapa é de origem colombiana (HOFFMANN et al.; 2003)

Em relação à morfologia, o fruto da *Physalis* sp. é um bago de tonalidade amarela ou laranja, com diâmetro aproximado de 1,5cm e seus frutos são protegidos por folhas modificadas, o capulho, de coloração bege (PUENTE et al., 2011).

Em vários países, a *Physalis* sp. é usada como planta medicinal no auxílio de tratamento de doenças como malária, asma, hepatite, dermatite e reumatismo. Estudos *in vitro* apontam que suas proteínas (physalinas do tipo A, B, D e F) e compostos glicosídicos purificados apresentam propriedades antitumorais em células cancerígenas encontradas no fígado, pulmão, pele e glóbulos brancos (KUSUMANIGTYAS; LAYLI; LIMANDHA, 2015).

As *Physalis* possuem alto valor econômico e nutricional. Seus frutos são ricos em vitamina A, vitamina C, ferro e fósforo (PAGOT & HOFFMANN, 2003). As propriedades funcionais e a quantidade de seus compostos fenólicos variam de acordo com a espécie (KUSUMANIGTYAS; LAYLI; LIMANDHA, 2015).

Devido às suas propriedades nutraceuticas como atividade antioxidante e anticancerígena, o interesse científico e econômico por essa espécie vem aumentando, assim como a demanda por maior produção. No Brasil, são mais comuns produções em pequena escala destinadas a agricultura familiar (HOFFMANN et al., 2003).

Diversas espécies de *Physalis* são utilizadas na culinária. Sua coloração varia do verde como *Physalis philadelphica* ao amarelo alaranjado, observado na *Physalis peruviana* (ZHANG et al., 2016).

Em diversas partes do mundo, a *Physalis* sp. é usada na culinária em molhos, geleias e salsas (ZHANG et al., 2016) e achados arqueológicos apontam que seus frutos eram consumidos desde 200 anos D.C. Essas evidências foram encontradas no vale Tehuacán (México) onde até hoje ela é consumida como especiaria culinária (MALDONATO; GÁRCES; MARTINEZ, 2011).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMIN, M. S.; EL-GAMAL, S. M. A.; HASHEM, F. S. Fire resistance and mechanical properties of carbon nanotubes – clay bricks wastes (Homra) composites cement. **Construction and Building Materials**, Cairo, v. 98, p. 237–249, Aug. 2015.

BALAGUERA-LÓPEZ, H. Effect of ethylene and 1-methylcyclopropene on the postharvest behavior of cape gooseberry fruits (*Physalis peruviana* L.). **Food Science and Technology International**, Tunja, v. 23, n. 1, p. 86 -96, July 2017, Colombia.

BAINBRIDGE, William Sims; ROCO, Mihail C. Managing nano-bio-info-cogno innovations. Dordrech [etc.]: **Springer**, 2006.

BAUGHMAN, R. H.; ZAKHIDOV, A. A.; HEER, W. de. A carbon nanotubes--the route toward applications. **Science**, Washington, v. 297, n. 5582, p. 787-792, Aug. 2002.

CHARLIER, J. C.; ROCHE, S. Electronic and transport properties of nanotubes. **Reviews of Modern Physics**, Louvain-la-Neuve, v. 2, n. 79, p. 677–732, May 2007.

CHINNAPPAN, A.; BANDAL, H.; KIM, H.; RAMAKRISHNA, S. Mn nanoparticles decorated on the ionic liquid functionalized multiwalled carbon nanotubes as a supercapacitor electrode material. **Chemical Engineering Journal** v. 316, p. 928–935, May 2017.

COLLINS, P. G. Nanotubes for electronics. **Scientific American**, Tsukuba, n. 282, p. 67–69, Dec. 2000.

COLVIN, V. L. The potencial environmental impact of engineered nanomaterials. **Nature Biotechnology**, Houston, v. 21, n. 10, p. 1166-1171, Oct. 2003.

DENG, Y. Q.; WHITE, J. C.; XING, B. S. Interactions between engineered nanomaterials and agricultural crops: implications for food safety. **Journal of Zhejiang University**, Zhejiang, v. 15, n. 8, p. 552 -572, Aug. 2014.

FISCHER, G.; MARTÍNEZ, O. Calidad y madurez de la uchuva (*Physalis peruviana* L.) en relación con la coloración del fruto. **Agronomía Colombiana**, Bogotá, v. 16, n. 1-3, p. 35-39, Jan. 2009.

GOGOS, A. et al. Nanomaterials in plant protection and fertilization: current state, foreseen applications, and research priorities. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Zurich, v. 39, n. 60, p. 9781–9792, Sept. 2012.

GOTTSCHALK, F. et al. Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO₂, ZnO, Ag, CNT, Fullerenes) for different regions. **Environmental Science & Technology**, Zurich, v. 43, n. 24, p. 9216–9222, Nov. 2009.

HE, H. et al. Carbon nanotubes: applications in pharmacy and medicine. **BioMed Research International**, Paris, v. 2013, p. 1-12, July 2013.

HOFFMANN, A. Apresentação. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO SOBRE PEQUENAS FRUTAS, 1., 2003, Bento Gonçalves. **Anais...** Bento Gonçalves: [s.n.], 2003. p. 6.

KHODAKOVSKAYA, M.; DERVISHI, E.; MEENA MAHMOOD, M.; YANG 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**, Little Rock, v. 3, n. 10, p. 3221–3227, Sept. 2009.

KHODAKOVSKAYA M. V.; KIM, B. S.; KIM, J. N.; ALIMOHAMMADI M.; DERVISHI E.; MUSTAFA T.; CERNIGLA C. E. Carbon nanotubes as plant growth regulators: effects on tomato growth, reproductive system, and soil microbial community. **Small**, Little Rock, v. 9, n. 1, p. 115–123, Sept. 2013.

KHODAKOVSKAYA, M. V.; SILVA, K.; ALEXANDRU S. BIRIS, A. S.; ENKELEDA DERVISHI, E.; VILLAGARCIA, H. Carbon nanotubes induce growth enhancement of tobacco cells. **ACS Nano**, Little Rock, v. 6, n. 3, p. 2128–2135, Feb. 2012.

KUSUMANINGTYAS, R. W.; LAILY, N.; LIMANDHA, P. Potential of ciplukan (*Physalis angulata* L.) as source of functional ingredient. **Procedia Chemistry**, Oxford, v. 14, p. 367- 372, Mar. 2015.

LAHIANI, M. H. et al. Impact of Carbon Nanotube Exposure to Seeds of Valuable Crops. **American Chemical Society**, Little Rock, v. 5, n. 16, p. 7965-7973, Jul. 2013.

MALDONADO, E.; PÉREZ-CASTORENA, A. L.; GARCÉS, C.; MARTÍNEZ, M. Philadelphicalactones C and D and other cytotoxic compounds from *Physalis philadelphica*. **Steroids**, Coyoacán, Mexico, v. 76, n. 7, p. 724–728, Jun. 2011.

MORENO-GARRIDO, I. M.; PÉREZ, S.; BLASCO, J. Toxicity of silver and gold nanoparticles on marine microalgae. **Marine Environmental Research**, Madrid, v. 111, p. 60-73, May 2015.

MUBARAK, N. M. et al. An overview on methods for the production of carbon nanotubes. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, Kuala Lumpur, v. 20, p. 1186-1197, Sept. 2014.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Compenhagen, v. 15, p. 473-497, Apr. 1962.

NERLICH, B.; LEMAŃCZYK, S. Nanotechnology: social and cultural aspects. **International Encyclopedia of the Social & Behavioral Sciences**, Kawasan, v. 16, n. 2, p. 188-193, Mar. 2015.

PAGOT, E.; HOFFMANN, A. Produção de pequenas frutas no Brasil. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO SOBRE PEQUENAS FRUTAS, 1., 2003, Bento Gonçalves. **Anais...** Bento Gonçalves: [s.n.], 2003. p. 9-14.

PALACI, I. et al. Radial elasticity of multiwalled carbon nanotubes. **Physical Review Letters**, Atlanta, v. 94, n. 17, May 2005.

PARK, C. M. P. et al. Environmental behavior of engineered nanomaterials in porous media: a review. **Journal of Hazardous Materials**, Columbia, v. 309, p. 133-150, Feb. 2016.

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 Research International**, Mendelin, v. 44, n. 7, p. 1733-1740, Aug. 2011.

RIVERA-UTRILLA, J. et al. Activated carbon modifications to enhance its water treatment applications. An overview. **Journal of Hazardous Materials**, Granada, v. 187, n. 1-3, p.1–23, Mar. 2011.

RUFATO, A. de R. et al. Pequeñas frutas. In: RUFATO, A. de R.; LIMA, C. S. M.; MUNIZ, J. **A cultura da physalis**: volume 2. Bento Gonçalves: Alice, 2013. p. 143-193.

SAJID, M. I. et al. A carbon nanotubes from synthesis to in vivo biomedical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, Lahore, v.16, n. 501, p. 278-299, Mar. 2016.

SERVIN, A. et al. A review of the use of engineered nanomaterials to suppress plant disease and enhance crop yield. **Journal of Nanoparticle Research**, Soliman, v. 17, n. 92, p. 17-92, Feb. 2015.

STAMPOULIS, D.; SINHA, S. K.; WHITE, J. C. Assay-dependent Phytotoxicity of nanoparticles to plants. **Environmental Science Technology**, New Haven, v. 43, n. 24, p. 9473–9479, Nov. 2009.

WAGNER, S.; GONDIKAS, A.; NEUBAUER, E. Spot the difference: engineered and natural nanoparticles in the environment – release, behavior and fate. **Environmental Chemistry**, Vienna, v. 53, n. 10, p. 12398-12419, Oct. 2014.

WANG, S. et al. Multi-residue determination of pesticides in water using multi-walled carbon nanotubes solid-phase extraction and gas chromatography –mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Tianjin, v. 1165, n. 1-2, p. 166-171, Sept. 2007.

WANG, X. et al. Fabrication of ultralong and electrically uniform single-walled carbon nanotubes on clean substrates. **Nano Letters**, Beijing, v. 9, n. 9, p. 3137–3141, Aug. 2009.

YOKEL, R. A.; MACPHAIL, R. C. Engineered nanomaterials: exposures, hazards, and risk prevention. **Journal of Occupation Medicine and Toxicology**, London, v. 6, n. 7, p. 1-27, 2011 Mar. 2011.

ZHANG, C. R. et al. New antiinflammatory sucrose esters in the natural sticky coating of tomatillo (*Physalis philadelphica*), an important culinary fruit. **Food Chemistry**, Peshawa, v. 196, p. 726-732, Oct. 2015.

ZHANG, W. et al. A facile strategy for fabrication of nano-ZnO/yeast composites and their adsorption mechanism towards lead (II) ions. **Applied Surface Science**, Ya'an, v. 378, p. 196–206, Aug. 2016.

**SEGUNDA PARTE – ARTIGO – AVALIAÇÃO DE
PARÂMETROS FISIOLÓGICOS RESULTANTES DA
INTERAÇÃO ENTRE *Physalis peruviana* L. E NANOTUBOS DE
CARBONO DE PAREDES MÚLTIPLAS (VERSÃO
PRELIMINAR). Artigo redigido conforme normas da revista
Química Nova.**

RESUMO

Graças às diversas funções e propriedades que somente são encontradas somente nos nanotubos de carbono, essas nanoestruturas atualmente são empregadas várias áreas da indústria e pesquisa. A *Physalis peruviana* L., está relacionada culinária e a medicina tradicional, possui elevada e rápida taxa de germinação. Os efeitos de nanotubos de carbono nas plantas foi o objetivo desse estudo. Micrografias foram obtidas microscopia eletrônica de transmissão para avaliação de parâmetros morfológicos do nanomaterial e espectroscopia Raman análise da composição química dos nanotubos de carbono. Avaliações do crescimento e desenvolvimento das plantas tinham como objetivo averiguar possíveis as interações entre as nanoestruturas e as plantas. A *P. peruviana* foi estudada *in vitro* e *ex vitro*. Os resultados mostraram que os nanotubos não possuem efeitos tóxicos para as plantas de *Physalis peruviana* L.

Palavras-chave: nanoecotoxicologia, nanoestrutura, nanotecnologia, nanotoxicologia, *solanaceae*

NANOTECNOLOGIA

A nanotecnologia é a manipulação da matéria em escala atômica, molecular e supramolecular. Atualmente é um campo da ciência que, rotineiramente, descobertas são feitas ao redor do mundo em relação aos seus produtos, os nanomateriais (NM)¹. Em relação ao seu tamanho, estes produtos apresentam no máximo 100 nanômetros em pelo menos em uma de suas dimensões².

Devido a sua dimensão reduzida e elevada área superficial, os NM apresentam propriedades diferentes daquelas reportadas para sua escala macroscópica. Esse fato propicia melhorias e criação de novos produtos em diversos campos da indústria, além de estimular diversos avanços nas mais variadas áreas da ciência³.

Características dos nanotubos de carbono

Dentre os diversos NM, os nanotubos de carbono (NTC) possuem grande destaque, pois são versáteis quanto à sua estrutura e função⁴. Devido a essas características, os NTC podem ser aplicados em diversas áreas que vão desde dispositivos eletrônicos a produtos agrícolas^{5,6}.

Os NTC variam em sua estrutura e os tipos mais comuns são nanotubos de carbono de parede simples - NTCPS e de paredes múltiplas – NTCPM. No primeiro caso, a folha de grafeno se enrola uma vez e no segundo, elas se enrolam diversas vezes⁷.

Os NTC podem ter efeitos positivos ou negativos, como já foi observado em diversos ambientes, vegetais e animais. Estudos já vêm

sido realizados com intuito de estabelecer relação entre toxidez e a presença destes no ambiente⁸.

Nanotubos de carbono e sua interação com meio ambiente

A compreensão das características morfológicas e estruturais dos NTC vem sendo explorada por grupos de pesquisa, com intuito de compreender seu comportamento e, avaliar sua interação com plantas e possíveis efeitos os efeitos em relação aos seus aspectos fisiológicos².

Devido a sua alta reatividade, NTC são usados como agentes descontaminantes de ambientes aquáticos, pois possuem capacidade de adsorverem a metais pesados e interagirem com outras moléculas⁹. A remoção é feita por outros mecanismos como interação eletrostática, reação de complexação com íons presentes na superfície dos metais e interação química entre grupos funcionais e os íons metálicos^{10,11}.

Seus efeitos na fisiologia de plantas já foi verificado em diversos trabalho e, para cada espécie, a forma de aplicação e local na planta e efeitos podem variar^{12,13,14}. Um dos efeitos já observados foi que, os NTC são capazes de alterar fisicamente tecidos vegetais e facilitar a entrada de outros NM que, eventualmente, possam ser absorvidos pelas raízes e parte aérea dos vegetais¹⁵.

Os NTC alteram fisicamente membranas plasmáticas e entram em contato com citoplasma celular. Estes são capazes de criar poros nos tecidos vegetais e estruturas como os estômatos, que podem ficar obstruídos. A consequência foi o comprometimento das trocas gasosas no vegetal¹⁶.

PHYSALIS PERUVIANA L.

A espécie vegetal *Physalis peruviana* (*P. peruviana*) é amplamente usada na culinária e possui potencial aplicação na indústria farmacêutica devido às propriedades nutracêuticas de seus compostos fenólicos, especialmente as propriedades relacionadas aos efeitos antioxidantes¹⁶.

As características fisiológicas dessa espécie vegetal já são bem estabelecidas na literatura¹⁷ e por este motivo e devido à rápida germinação de suas sementes, pesquisas já vêm conduzindo experimentos para avaliar efeitos de diversas substâncias em parâmetros fisiológicos da *P. peruviana*¹⁸.

A *P. peruviana* foi introduzida no Brasil pela Embrapa é de origem colombiana¹⁹. As *Physalis* sp. são nativas de países andinos, países europeus de clima temperado, América Central, Estados Unidos e diversas espécies também podem ser encontradas no México²⁰.

Em vários países, estas são usadas como planta medicinal de modo a auxiliar no tratamento de diversas doenças como malária, asma, hepatite, dermatite e reumatismo. Seus frutos são ricos em vitamina A, vitamina C, ferro e fósforo¹⁹. As propriedades funcionais e a quantidade de seus compostos fenólicos variam de acordo com a espécie¹⁷.

Devido às suas propriedades nutracêuticas como atividade antioxidante e anticancerígena, uso na culinária e características fisiológicas interessantes, o interesse científico e econômico por essa espécie vem aumentando, assim como a demanda por maior produção¹⁹.

O objetivo desse trabalho foi avaliar possíveis efeitos dos NTCPMs funcionalizados com ácido carboxílico no crescimento e desenvolvimento da espécie vegetal *Physalis peruviana* L. como auxílio na criação de modelos de estudos nanotoxicológicos em sistemas vegetais.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiais

Os nanotubos de carbono de paredes múltiplas funcionalizados com ácido carboxílico foram adquiridos pela empresa Sigma – Aldrich® (São Paulo, SP) e os frutos de *Physalis peruviana* L. foram obtidos em mercado local (Lavras - MG), produzidos pela empresa Ocati S.A. (Bagotá, Colômbia). Os frutos foram processados a fim de individualizar e retirar a polpa aderida às sementes.

Processo de individualização consistiu na maceração da polpa feita em peneira, com auxílio de lavagem em água corrente para que as sementes ficassem retidas. Após a separação e lavagem, as sementes secaram em papel toalha por 24 horas, em temperatura ambiente.

Preparo da solução estoque de nanotubos de carbono

A solução estoque foi preparada usando 0,1 g de NTC e 0,9 g de P478 – Tween 80 (Sigma Aldrich ®) e água destilada. Todos os componentes foram acrescentados em béquer até completar o volume 300 mL, compondo uma a solução estoque contendo 0,05% de NTC. Essa solução foi levada

ao sonicador (Brenson – Digital Sonifier ®, modelos 250 & 450) com amplitude 30%, durante 15 minutos para a dispersão dos NTC.

Preparo das soluções de nanotubos de carbono nas concentrações estudadas

Da solução estoque, foram feitas soluções com diferentes concentrações de NTC -0, 2, 4, 6, 8 e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de NTC. Uma alíquota da solução estoque também foi utilizada para caracterização do NTC por espectroscopia Raman. Para microscopia eletrônica de transmissão (MET), foi usada uma amostra de 10 mg do NTC não sonificado.

Caracterizações dos nanotubos de carbono por espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman por espectrofotômetro Nicolet (Nexus 470, Madison, WI). O espectrofotômetro foi purgado com nitrogênio e 64 varreduras foram coletadas com resolução de 2 cm^{-1} . 10mg de amostra de NTC foi depositada em pastilha de silicone e os espectros foram armazenados em modo transmissão.

Os dados foram obtidos pelo espectrofotômetro Raman por transformada de Fourier (RIS 100/S, Bruker, Inc., Karlsruhe, Alemanha), excitado com laser Nd:YAG a 1064 nm e resolução espectral de 4 cm^{-1} .

Para a medição das alturas dos picos obtidos pelo espectro Raman, foi usado o software ImageJ 1.46r e, pela obtenção dessas alturas, foi possível a realização do cálculo para o índice

Caracterizações dos nanotubos de carbono por microscopia eletrônica de transmissão

As dispersões em meio aquoso dos NTC foram analisadas em microscópio eletrônico de transmissão TECNAI™ G2 F20, modo STEM (*scanning transmission electron microscope*), em campo claro (*Bright Field*) e campo escuro (*Dark Field*). As amostras foram preparadas a partir da suspensão dos NTC em hexano e posteriormente foram sonicadas em ultrasonicador Brenson 450 por 5 minutos. As suspensões foram depositadas na superfície de uma grade de cobre com filme de Formvar, 400 mesh (Ted Pella) e armazenadas em dessecador por 24 horas antes das análises no microscópio eletrônico de transmissão.

Para a medição dos diâmetros internos e diâmetros externos dos NTC, foram feitas 50 repetições para cada um deles, em ambas as micrografias usadas, pelo software ImageJ 1.46r.

Cultivo *in vitro* de sementes de *Physalis peruviana* L. expostas aos nanotubos de carbono

Para as sementes de *P. peruviana* cultivadas em meio de cultivo MS²¹ modificado, duas formas de exposição ao NTC foram testadas. Na primeira, denominada MS-NTC, os NTC foram acrescentados ao meio de cultivo para posteriormente as sementes serem inoculadas e na segunda, depois de desinfestadas, as sementes passaram por processo de embebição

em suspensões de NTC para posteriormente serem inoculadas em meio de cultivo isento de NTC.

As sementes de *P. peruviana* foram desinfestadas com álcool 70% (um minuto), seguidas por imersão em hipoclorito de sódio 2,5% (três minutos) e tríplice lavagem com água destilada autoclavada. Para cada tratamento, foram utilizados 30 repetições, sendo que cada repetição, havia uma semente por tubo de ensaio.

Na exposição MS-e, o meio de cultivo estava isento de NTC, porém, previamente a inoculação, as sementes também passaram pelo mesmo processo de desinfestação feito para as sementes usadas na exposição NTC-MS. Depois de desinfestadas, estas foram embebidas em seis *ependorfs* com 30 sementes em cada. Os diferentes *ependorfs* continham suspensões de NTC em diferentes concentrações - 0, 2, 4, 6, 8 e 10 mL⁻¹.

As sementes ficaram embebidas nos *ependorfs* ficaram acondicionadas em agitador magnético (MARCONI, modelo MA 140/CFT) a 140 rpm (rotação por minuto) durante 24 horas. Após a embebição, as sementes foram inoculadas no meio de cultivo isento de NTC.

O meio de cultivo MS foi suplementado com 0,09 M de sacarose, 0,7% de ágar (meio de cultivo MS modificado) e o pH do meio do foi ajustado para 5,82. Para o tratamento MS-NTC, antes da autoclavagem, feita em autoclave vertical FABBE 0 PRIMR, modelo 103 (20 minutos, 121°C), as suspensões de NTC nas concentrações 2, 4, 6, 8 e 10 µg mL⁻¹ preparadas a partir da solução estoque foram acrescidas ao meio de cultivo logo antes da autoclavagem, juntamente com controle (meio

isento de NTC). O tratamento MS-e, isento de NTC, também passou pelo processo de autoclavagem.

A inoculação das sementes em todos os tratamentos foi realizada em câmara de fluxo laminar unidirecional horizontal (Grupo V ECO FUH 18). Em cada tubo de ensaio, foi inoculada uma semente. Após a inoculação, o material foi mantido em sala de crescimento com temperatura de 25°C e fotoperíodo de 18 horas de luz e oito de escuro por 60 dias.

Cultivo *ex vitro* de sementes de *Physalis peruviana* L. expostas aos nanotubos de carbono

As sementes de *P. peruviana*, assim como nas cultivadas *in vitro*, passaram pelo processo de desinfestação e depois foram germinadas em vasos contendo substrato vegetal (HPTOPSTRATOS®). Sete sementes por vaso foram plantadas e, passados 14 dias, cada vaso ficou com uma planta e sete repetições foram feitas para cada concentração de suspensões aspergidas- 0, 2, 4, 6, 8, 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

A cada duas semanas, foram feitas fertirrigação com solução nutritiva de meio MS. Aos 30 dias de crescimento, estas foram tutoradas com espeto de madeira para garantir seu desenvolvimento em posição vertical e então, foi iniciada a aspersão foliar com suspensões de NTC nas mesmas concentrações usadas no tratamento *in vitro*.

Avaliação do crescimento das plantas cultivadas *in vitro* e *ex vitro*

Nas plantas desenvolvidas em condições *in vitro*, depois de completados 60 dias após a inoculação, foi feita a taxa de germinação por tratamento e em seguida, as estas foram retiradas do tubo de ensaio para as demais análises. Já para plantas do tratamento *ex vitro*, não foi feita a taxa de germinação, pois, nesse caso, cada vaso recebeu maior quantidade de sementes em relação ao tratamento *in vitro*.

Medições do teor de clorofila foi feita utilizando o equipamento atLeaf. Para a realização da medição do teor de clorofila, folhas completamente expandidas e na mesma posição nas plantas foram selecionadas, sendo evitado o posicionamento do equipamento sobre as nervuras das folhas.

Também foi determinada a taxa de germinação (%). Outros parâmetros de crescimento das plantas também foram feitos com 60 dias após a inoculação como altura da raiz (cm), altura do caule (cm), número de folhas, número de folhas senescentes, massa fresca (g) e massa seca (g).

Para medição os comprimentos das raízes e caules, foi utilizada uma régua analítica. O comprimento da raiz foi obtido pela altura desde a extremidade inferior da coifa até a extremidade superior da raiz. Comprimento do caule foi feito pela medição da base do caule até a extremidade superior do ápice.

A massa total que corresponde à parte aérea e raiz foi determinada por pesagem das plântulas em balança de precisão (CELTAC, modelo FA2104N). Para determinação da massa seca, as plantas foram armazenadas em sacos de papel *Kraft*, devidamente identificados, que

depois foram levados à estufa de circulação forçada de ar quente (FANEM, modelo 515 C), a 105°C, até o peso constante ser atingido²¹.

Após a determinação da massa fresca e seca, o teor de água foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Teor de Água (\%)} = \frac{(\text{Massa Total} - \text{Massa Seca})}{\text{Massa Total}} \times 100$$

Já para as plantas cultivadas de forma *ex vitro*, as mesmas medições e cálculos realizados para as plantas cultivadas *in vitro* foram feitos para estas, com duas diferenças no procedimento. A primeira foi em relação à medição do teor de clorofila e na forma de obtenção do teor de água.

Em relação ao teor de clorofila, duas medições foram feitas, a primeira foi feita sete dias de aplicação foliar com as suspensões de NTC e controle e a segunda medição foi feita aos 14 dias de aspersão foliar, que também foi o dia de retirada e das plantas do substrato vegetal para dar procedências nas mesmas medições feitas para o tratamento *in vitro*.

A segunda diferença foi feita na forma de secagem do material. Plantas desenvolvidas em vasos são mais desenvolvidas. Devido a esse fato, no momento do preparo do material para secagem em estufa, partes aéreas e caules foram individualizados e secados separadamente em estufa até peso constante por 48 horas.

Os dados coletados da avaliação da germinação e desenvolvimento *in vitro* de *P. peruviana* expostas aos NTC pelo tratamento MS-NTC e MS-e e das plantas aspergidas com as diferentes soluções de NTC em condições, foram submetidos a análise de variância pelo *software*

estatístico SISVAR²² e o teste de Scott-Knott, com 5% de probabilidade foi utilizado para comparação das médias.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman é uma técnica de caracterização utilizada para estudo de materiais carbonosos, porém, os espectros gerados para NTC e outros alótropos do carbono são semelhantes²³. Na Figura 1 está demonstrado o espectro que foi obtido para a amostra de NTC com ácido carboxílico utilizados nesse trabalho.

Na imagem gerada pelo software ImageJ 1.46r, foi possível observar três picos distintos nas regiões 1597 cm^{-1} , 1286 cm^{-1} , e 802 cm^{-1} que correspondem às bandas D, G e G'.

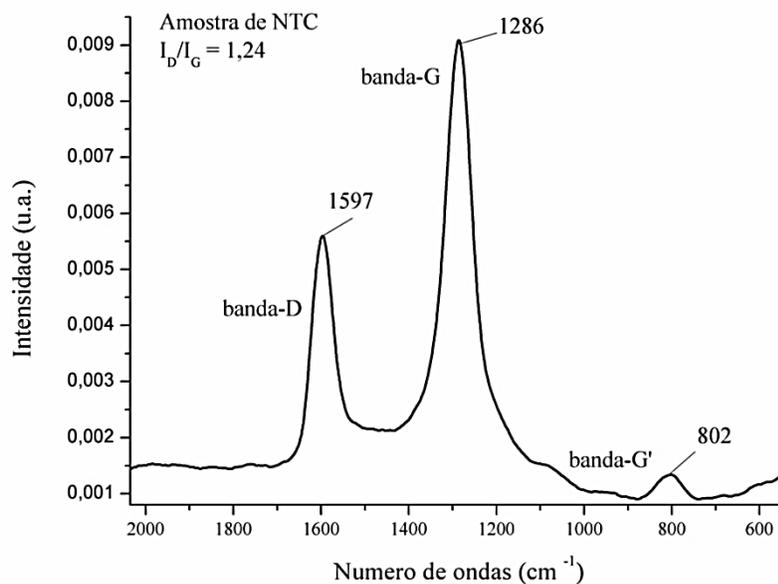


Figura 1 – Espectro Raman para amostra de nanotubos de carbono de paredes múltiplas funcionalizados com ácido carboxílico

A banda G, que corresponde ao pico de maior frequência, faz referência à banda semelhante quando se observa um espectro de grafite. O segundo pico menos intenso faz referência à banda D, que corresponde uma desordem estrutural da amostra contendo os NTC. A banda D aparece devido a uma quebra de simetria dos NTC e essa quebra é originada a partir de defeitos na amostra ou ligação entre os NTC com outra(s) molécula(s).

A banda G' corresponde aos *overtones* - picos de menores intensidades em região de alta frequência^{24,25}. Os *overtones* podem ocorrer devido a processos que envolvem dois ou mais fônons, a modos fundamentais de vibrações de pequena seção transversal ou processos de dupla ressonância, que podem estar associados a defeitos que ocorrem durante a realização da espectroscopia Raman. Os picos observados em regiões de baixa frequência, como na região de 730 cm⁻¹ podem corresponder aos modos de respiração radial: RBM - *real breathing mode*^{27,25}.

O deslocamento no comprimento de onda da banda G em conjunto com a intensidade da banda D, fornecem informações sobre as mudanças na estrutura eletrônica dos NTC. Esse fenômeno ocorre devido à interação dos NTC com outras espécies químicas²⁷.

A razão I_D/I_G foi de 1,24 essa razão é uma medida da desordem no sistema e condutância do material analisado. As bandas D e G estão bem próximas, por isso sua relação é usada como medida de desordem no

sistema²⁴. Este índice está relacionado com a condutância eletromagnética desse NM, esse se correlaciona com sua mobilidade em ambientes e organismos diversos^{5,6}. O processo de ressonância explica a origem das bandas D e G', suas frequências, e sua dependência com a desordem^{24,25}.

Com a avaliação do espectro Raman gerado pela amostra de NTC, um paralelo pode ser feito com os resultados obtidos na microscopia eletrônica de transmissão e também com o comportamento dos NTC em presença de outras moléculas e elementos químicos.

O espectro Raman fornece informações sobre a estrutura, composição química, quebra de ligações entre carbonos e esses fatores podem estar correlacionados com a presença de defeitos na amostra. Essas mudanças na amostra podem alterar o comportamento dos NTC, seja entre eles ou entre NTC, podendo acarretar na formação de glomerados ou interações com outras moléculas. NTC com defeitos podem apresentar pontos carregados quimicamente, positivos ou negativos e se absorvidos pelas plantas, podem realizar ligações com outras espécies químicas^{26,11}.

Novas interações podem ser desejáveis ou não e quando ligados a outras espécies químicas, os NTC mudam sua estrutura e, mesmo que ocorram ligações entre NTC de carbono, atrelado ao grau de aglomerados, seu comportamento pode mudar.

Novas interações dos NTC podem acarretar em comportamentos diversos de acordo com o ambiente que eles se encontram, seja no meio de cultivo ou na água destilada utilizada para processo de embebição e aspersão foliar e eventualmente, sua possível absorção e translocação na planta pode tomar diferentes rotas.

Microscopia Eletrônica de Transmissão

Para avaliação dos aspectos morfológicos dos NTC, foi feita microscopia eletrônica de transmissão na amostra. Na figura 2 estão representadas duas micrografias, A e B, típicas de NTC. Além da morfologia do NM, as micrografias mostram o arranjo dos NTC na amostra e por meio destas, foi possível a realização das medições dos diâmetros internos e diâmetros externos.

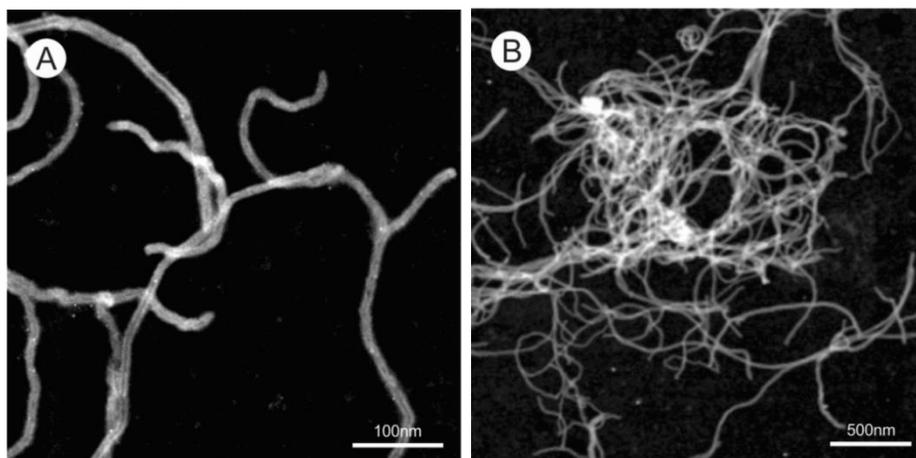


Figura 2 – Micrografias por microscopia eletrônica de transmissão (campo escuro) mostrando a morfologia e arranjo dos NTC de uma mesma amostra. Micrografia A dá ênfase na morfologia dos NTC e a B na distribuição e presença de aglomerados de NTC.

A microscopia eletrônica de transmissão fornece imagens de alta resolução sendo possível identificar a morfologia do material estudado que, para esse trabalho, é essencial, pois, a morfologia e organização do material têm efeitos no seu modo de absorção e comportamento antes e depois de entrar em contato com a planta. Os NTC podem ter efeitos diferentes de acordo com sua morfologia e organização²⁸. Pelas micrografias, é possível detectar que o material possui estrutura conhecida como *core-shell*, que é típica em NTC, tanto de parede simples quanto de paredes múltiplas²⁸ que significa que, o material apresentado nas micrografias, possui estrutura oca e tubular.

Pela estruturação típica de NTC, é possível obter valores para diâmetro interno e externo. Para micrografia 2A, da média do diâmetro interno foi de 0,74nm ($\sigma = 0,11$), diâmetro externo foi de 1,84 nm ($\sigma = 0,30$). Já para as médias dos NTC da micrografia 2B, as médias dos diâmetros internos e externos foram de, respectivamente, 0,68 nm ($\sigma = 0,12$) e 1,34 nm ($\sigma = 0,38$). Essa variação ocorre devido a dificuldade em manter o mesmo diâmetro durante a síntese dos NTC, já que estes podem ter comprimento superiores a escala nanométrica² e também pelas modificações em sua estrutura ao longo do seu uso e até mesmo no momento de realizar a espectroscopia.

Na figura 2A e 2B, por diferença de tonalidade na escala do cinza, foi possível obter informações a respeito da morfologia do material analisado. Os pontos com coloração de cinza claro demonstram as paredes dos NTC e cinza escuro indica o interior dos NTC e na micrografia 2B, nos pontos cinza esbranquiçados, é possível a visualização de aglomerados de NTC (*bundles*) e o ponto mais claro,

tendendo ao branco e com formato circular na micrografia 2B, indica presença de impurezas ou menos, defeito na amostra.

Na figura 2B é possível observar o arranjo dos NTC no espaço. Os pontos da micrografia que se observa coloração que vai do cinza claro ao branco indica formação de aglomerados de NTC, pontos mais claros indicam sobreposição dos NTC na amostra. Os aglomerados de NTC podem alterar sua resposta e desempenho em meio com diferentes composições químicas³¹.

Dependendo do grau de aglomeração dos NTC, estes podem sair da escala nanométrica e podem apresentar novas características e comportamento³². Os efeitos da aglomeração de NTC em espécies vegetais ainda não foram estabelecidos e esse é um ponto interessante a ser levantado.

Pelas micrografias é possível observar que a aglomeração já está presente antes mesmo do NM ser aplicado nas sementes de *P. peruviana*, seja pelo tratamento MS-NTC ou pelo MS-e e a aglomeração pode ter começado no processo de sonicação dos NTC.

A variação em relação à organização dos NTC também pode ser um fator determinante para seu comportamento quando presentes no meio em que as sementes se desenvolveram e até mesmo depois de absorvidos.

Efeito de nanotubos de carbono no desenvolvimento *in vitro* e *ex vitro* de *Physalis peruviana* L.

Para taxa de germinação no tratamento *in vitro*, não houve diferenças significativas entre as formas de exposição (MS-NTC e MS-e) e as

concentrações usadas, as dispersões de NTC não afetaram na taxa de germinação e não mostraram efeitos fitotóxicos. A média geral para taxa de germinação foi de 83,6% e no tratamento *ex vitro*, esse parâmetro não foi avaliado.

A taxa de clorofila para o tratamento *in vitro* não apresentou diferenças estatísticas entre as formas de exposição e concentrações avaliadas. A média geral para o tratamento *in vitro* MS-NTC foi de 26,25 e para MS-e foi de 21,09. No tratamento *ex vitro*, as médias para o primeiro dia de avaliação da taxa de clorofila foram estatisticamente significativas. Na Tabela 1, podem ser observadas as médias para o teor de clorofila no 7° de 14° dia de medição.

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Teor de clorofila no 7° dia (%)	Teor de clorofila no 14° dia (%)
0	46,70 aA	50,20 bA
2	49,60 aB	52,70 bA
4	49,70 aB	53,28 bA
6	51,36 aB	54,61 bA
8	50,63 aB	55,07 bA
10	50,13aB	53,40bA

Tabela 1 - Teor de clorofila em plantas de *P. peruviana* após aspersão foliar de nanotubos de carbono (0, 2, 4, 6, 8 e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) por 7 e 14 dias.

* Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Segundo a Tabela 1, as plantas aspergidas com NTC apresentaram valores de médias significativamente maiores em comparação ao controle. Para a medição feita aos 14 dias de aspersão, não foram constatadas diferenças significativas entre as médias. Quando comparados os dois dias de medição, houve aumento no teor de clorofila no 14º de medição para as plantas aspergidas com suspensões de NTC.

Estes resultados apostam que os NTC promoveram um aumento na síntese de clorofila. A aplicação foi realizada diretamente sobre as folhas e isso pode explicar o aumento na síntese de clorofila nas folhas, o que não foi observado no tratamento *in vitro*.

No 14º dia de medição, não houve aumento no teor de clorofila. A resposta pode estar relacionada com o fato de que os NTC podem acumular em tecidos animais e vegetais^{31,30} e o seus efeitos na síntese de clorofila pode ter alcançado seu máximo entre o 7º dia e o 14º de aspersão.

As médias dos numero de folhas totais (6,24 folhas/planta) e numero de folhas senescentes (1.18 folhas/planta) para o tratamento *ex vitro* não diferiram estatisticamente entre si. No tratamento *in vitro*, o mesmo ocorreu para o numero de folhas senescentes (1,2 folhas/planta), porém,

para numero de folhas totais, as médias variaram estatisticamente entre si, demonstrado na Tabela 2.

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Tratamento MS-NTC	Tratamento MS-e
0	4,80 Aa	3,93 Ba
2	5,80 Bb	2,47 Aa
4	5,73 Bb	2,53 Aa
6	5,33 Ba	4,53 Ba
8	5,20 Ba	4,53 Ba
10	6,13 Ba	5,33 Ba

Tabela 2 – Numero de folhas totais das plantas de *Physalis peruviana* submetidas aos tratamentos MS-NTC e MS-e nas concentrações 0, 2, 4, 6, 8,10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (cm).

*Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

No tratamento MS-NTC, as plantas expostas aos NTC apresentaram maior número de folhas em relação ao controle, os NTC promoveram

aumento da síntese de folhas e a concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de NTC mostrou ser a mais eficiente.

Em relação ao tratamento MS-e, os NTC não apresentaram efeitos na produção de folhas já que não houve diferenças significativas entre o controle e as concentrações 6, 8 e $10 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Os resultados para as médias não se apresentaram de forma linear, ou seja, quanto maior a concentração, maior a produção. Isso pode ser justificado pelo fato de que, para cada concentração de suspensão de NTC.

O efeito no número de folha pode ter comportamento diferentes já que a concentração não é um fator exclusivo e decisivo para analisar efeitos de NTC em sistemas vegetais³² e esse comportamento não linear foi observado em todos os resultados apresentados neste trabalho.

Os NTC podem se encontrar aglomerados em maior ou menor grau. Fatores como pH e presença de metais pode alterar o processo de aglomeração de NTC^{10,11,33}, porém, em meio MS, ainda não há informações na literatura sobre efeito da embebição em suspensões de NTC em *P. peruviana* ou em outras espécies da família *solanaceae*.

A aglomeração dos NTC ocorreu para todos os tratamentos e em todas as concentrações. O processo de embebição, que durou 24 horas, pode ter afetado as sementes de *P. peruviana* e então, os aglomerados de NTC possam ter agido como uma barreira para entrada de água.

A capacidade de translocação dos NTC na planta¹² pode explicar porque foram observados efeitos desses NM no número de folhas sendo que as raízes ficaram em contato com estas.

Em relação ao tratamento MS-e, no processo de embebição, pode ter ocorrido a aderência dos NTC no tegumento das sementes, podendo então dificultar na absorção de água e nutrientes quando inoculadas no meio de cultivo.

No tratamento *in vitro*, Os resultados dos comprimentos das raízes e caules das plantas submetidas aos tratamentos MS-NTC e MS-e nas diferentes concentrações de NTC estão apresentados nas Tabelas 3 e 4. As médias para o comprimento da parte aérea das plantas aspergidas com suspensões NTC não difeririam entre si, com média geral de 18,02 cm. Em relação ao comprimento das raízes, os NTC mostram resultados favoráveis (Tabela 5).

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Tratamento MS-NTC (cm)	Tratamento MS-e (cm)
0	4,67 Aa	4,16 Aa
2	6,94 Bb	2,25 Aa
4	7,12 Ba	5,87 Ba
6	6,62 Ba	6,75 Ba
8	6,41 Ba	3,66 Aa
10	7,44 Ba	3,93 Aa

Tabela 3 – Comprimento das raízes submetidas NTC por via de exposição: tratamentos MS-NTC e MS-e nas concentrações 0, 2, 4, 6, 8,10 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Os resultados apresentados na Tabela 3 mostram que, para o tratamento MS-NTC, todas as plantas expostas aos NTC tiveram maior comprimento de raiz em relação ao controle. Em relação ao tratamento MS-e, somente nas concentrações de 4 e 6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ os NTC foram eficazes no aumento do comprimento das raízes.

No processo de autoclavagem do meio de cultivo, devido ao aumento da temperatura e desordem no sistema, os NTC tendem a se aglomerar e saírem da escala manométrica. Isso indica que, na suspensão, há menor quantidade de NTC em escalas menores, ou seja, mais fácil de serem absorvidos. Os NTC (escala manométrica) presentes no meio de cultivo autoclavado estavam presentes em menor quantidade em relação ao tratamento MS-e, que não sofreu processamento térmico e conseqüentemente, as suspensões tinham menos aglomerados de NTC e mais destes disponíveis para serem absorvidos.

Resultados semelhantes foram observados em trabalhos feitos em tomates cultivados em meio MS suplementado com NTC, em todas as concentrações testadas (0, 0, 20 e 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$), o comprimento da raiz foi maior para as sementes em contato com os NTC¹².

Nas tabelas 4 e 5 estão apresentadas as médias para os comprimentos da parte aérea e raízes das sementes submetidas aos tratamentos MS-NTC e MS-e.

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Comprimento para tratamento	Comprimento para tratamento
	MS-NTC (cm)	MS-e (cm)
0	6,02 Aa	6,3 Aa
2	9,03 Bb	2,64 Aa
4	11,65 Bb	6,50 Aa
6	9,40 Ba	8,13 Ba
8	8,06 Ba	5,03 Aa
10	9,94 Ba	6,30 Aa

Tabela 4 – Comprimento da parte aérea (cm) das plantas submetidas NTC por via de exposição: tratamentos MS-NTC e MS-e nas concentrações 0, 2, 4, 6, 8,10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

* Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

As médias apresentadas na Tabela 3, no tratamento MS-NTC, tiveram valores estatisticamente superiores em relação ao controle, os NTC tiveram efeito favorável para crescimento das partes aéreas.

Já no tratamento MS-e, somente as sementes embebidas em concentração de $6 \mu\text{g mL}^{-1}$ de NTC obtiveram média significativamente maior, ou seja, somente nessa concentração, os NTC promoveram aumento no comprimento das raízes.

Como foi discutida para número de folhas, a translocação de NM ao longo das plantas é possível³⁰ e esse fator pode explicar as diferenças significativas encontradas no tratamento MS-NTC e no tratamento MS-e.

Na Tabela 5 estão apresentados os valores das médias para comprimento das raízes nas diferentes concentrações de NTC aplicados por aspersão foliar.

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Comprimento da raiz (cm)
0	24,49 a
2	24,24 a
4	21,56 a
6	37,25 b
8	38,75 b
10	35,75 b

Tabela 5 – Comprimento (cm) das raízes submetidas à aspersão nas concentrações 0, 2, 4, 6, 8, 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

*Médias seguidas com mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Foi observado que, nas concentrações 6, 8 e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, as médias para o comprimento das raízes foram maiores. Em maiores concentrações, os NTC apresentaram efeito acentuado no aumento do comprimento das raízes.

Esses resultados foram diferentes em relação aos observados nas sementes expostas em meio de cultivo suplementado com NTC e as sementes embebidas nas concentrações estudadas, que foram as mesmas usadas para o tratamento *ex vitro*. Esses resultados apontam que, novamente, o modo de exposição está ligado aos efeitos dos NTC nas plantas.

As variações nas médias observadas na Tabela 5 podem ser atribuídas a translocação dos NTC pelo floema até outras partes das plantas. O grau de aglomeração dos NTC também pode nesse tipo de exposição, ter interferido no seu comportamento na planta.

Se os NTC foram capazes de translocarem das folhas até as raízes, mostrando ter efeitos diferentes nas concentrações avaliadas, pode-se afirmar que para $I_D/I_G = 1,24$, na concentração de 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$, os NTC favorecem o crescimento das raízes de *P. peruviana*.

Em relação aos demais valores como foram discutidos anteriormente, o comportamento dos NTC é multifatorial¹⁻³. Neste trabalho, tal fator foi o contato entre NTC e as sementes de *P. peruviana*.

Plantas desenvolvidas em condições *in vitro* possuem atividade fotossintética menor e única fonte de carbono é a sacarose. Os NTC podem ter agido como fonte alternativa de carbono, auxiliando na fotossíntese e, conseqüentemente, pode ter auxiliado no desenvolvimento do caule e raiz nas plantas aspergidas com suspensões de NTC.

Efeito para todas as formas de exposição dos NTC (MS-NTC, MS-e e aspersão foliar) não mostrou efeito no peso fresco, peso seco e teor de água nas plantas. Resultados contrastantes, em relação ao tratamento MS-NTC, foi encontrado em trabalho realizado com tomates desenvolvidos em meio MS acrescidos com NTCPM. A absorção de água aumentou devido a maior síntese de aquoporinas¹².

Em relação a massa seca, massa fresca e teor de água para os tratamentos *in vitro*, MS-NTC e MS-e, e *ex vitro*, as médias não diferiram estatisticamente entre si e as médias geral foram, respectivamente 0,089 g, 0,053g, 1,890g, 0,1734g, 23,4g, 92,1% de água e 96,44% de água.

CONCLUSÃO

Os resultados mostram que, os nanotubos de carbono não apresentaram efeitos adversos em nenhum dos tratamentos usados neste trabalho. Dependendo da forma e local de aplicação e exposição, diferentes resultados são gerados. Sementes desenvolvidas em meio de cultivo suplementadas com nanotubos de carbono apresentaram maior numero de efeitos positivos em relação às sementes embebidas em suspensões desse nanomaterial. O tratamento por aspersão foliar mostrou resultados interessantes em relação ao aumento da taxa de clorofila.

Diante disso desses resultados, fica evidente os efeitos positivos dos nanotubos de carbono quando aplicados em plantas na tentativa de otimizar parâmetros fisiológicos da espécie a ser avaliada. Em contrapartida, é de extrema importância que a concentração e forma de aplicação desse nanomaterial deve ser cuidadosamente levada em conta.

REFERÊNCIAS

1. Wagner, S.; Gondikas, A.; Neubauer, E. *Envir. Chem*, **2014**, *53*, 12398.
2. Park, C. M. P.; Chu, K. H.; Heo, J.; Her, N.; Jang, M.; Son, A.; Yoon, Y. *J of Hazard Mater*, **2016**, *309*, 133.
3. Yokel, R. A.; Macphail, R. C. *J Occup Med Toxicol*. **2011**, *6*, 27.
4. Mubarak, N .M.; Abdullh, E. C.; Jayakumar, N. S.; Sahu, J. N. *J Indust & Eng Chem*, **2014**, *20*, 1186.
5. Bainbridge, William Sims; ROCO, Mihail C. *Managing nano-bio-info-cogno innovations*. Dordrech [etc.]: 2006, Springer.
6. Gogos, A.; Knauer, K.; Thomas D. Bucheli, T. D. *J AGR FOOD CHEM*, **2012**, *39*, 9781.
7. He, H., Pham-Huy, L.A., Dramou, P., Xiao, D., Zuo, P., Pham-Huy, C. *BioMed Res. Int*, **2013**, 2013, p. 1.
8. Boncel, S.; Kyzioł-Komosińska, J.; Krzyżewska, I. Czupioł, J.. *Chemosphere*, 2015, *136*, 211.

9. Rivera-Utrilla, J., M. Sánchez-Polo, M.; Gómez-Serrano, V.; Álvarez, P. M.; Alvim-Ferraz, M. C. M.; Dias, J. M. *J Hazard Mater*, **2011**, 187, 1.
10. Ihsanullah, A. A.; Al-Amer, A. M.; Laoui, T.; Al-Marri, M. J.; Nasser, M. S.; Khraisheh, M.; Atieh, M. A. *Sep Purif Technol*, **2016**, v. 157, 141-161
11. Marques, P.A.S.S.; Rosa, M.F.; Pinheiro, H.M. *Bioprocess Eng.*, **2000**, 23, 135.
12. Khodakovskaya, M.; Dervishi, E.; Mahmood, M.; Xu, Y.; Li, Z.; Watanabe, F.; Biris, A. S. *ACS Nano*, **2009**, 3, 3221.
13. Khodakovskaya M. V.; Kim, B. S.; Kim, J. N.; Alimohammadi M.; Dervishi, E.; Mustafa, T.; Cernigla, C. E. *Small*, **2013**, 9, 115–123.
14. Lahiani, M. H.; Dervishi, E.; Chen, J.; Nima, Z.; Gaume, L.; Biris, A. S.; Khodakovskaya, M. V. *J. Am. Chem. Soc.* , **2013**, 5, 7965.
15. Rico, C. M.; Majumdar, S.; Duarte-Gardea, M.; Peralta-Videa, J. R. ; Gardea-Torresdey, J. L. *J Agric Food Chem.* **2011**, 59, n. 8, p. 3485–3498. 2011 Mar.
16. Servin, A; Elmer, W.; Mukherjee, A.; de La Torre-Roche, R.; Hamdi. H.; White, J. C.; Bindraban, P.; Dimkpa, C. J. *Nanopart. Res.*, **2015**, 17, 17.

17. Kusumaningtyas, R. W.; Laily, N.; Limandha, P. *Procedia Chem.*, **2015** v. 14, 367. 2015.
18. Balaguera-López, H.; Espinal-Ruiz, M.; Zacarías, L., Herrera, A. O. *Food Sci Technol Int*, **2017**, 23, p. 86.
19. PAGGOT, Eduardo; HOFFMANN, Alexandre. Produção de pequenas frutas no Brasil. 1º Seminário Brasileiro sobre Pequenas Frutas. **Embrapa Uva e Vinho. Vacaria**, 2003. p. 9-14.
20. Fischer, G.; Martínez, O. *Agron. Colomb.*, **2009**, 16, 35.
21. Murashige, T.; Skoog, F. *Physiol. Plant.*, **1962** Copenhagen, 15, 473-497.
22. Ferreira, D. F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. *Ciênc. agrotec.* [online]. **2014**, 38, 1.
23. Li, W; Zhang, H; Wang, C; Zhang, Y; XU, L; Zhu, K.; Xie, S. *Appl. Phys. Lett*, **1997**, 70, 2685.
24. Dresselhaus, M. S.; Dresselhaus, G.; Saito, R.; Jorio, A. *Phys. Rep.* **2005**, 409, 47.

25. Murphy, H., Papakonstantinou, P.; Okpalugo, T. I. T. *JVSB*, **2006**, N.2, v. 24, p. 715
26. Ferrari, A. C.; Robertson, J. *Phys Ver B*, **2000**, v. 61, 2, 95.
27. Filho, A. G. S.; Fagan, S. B. *Quim. Nova*, **2007**, 30, 1695.
28. Somani, P. R.; Umeno, M. Importance of transmission electron microscopy for carbon nanomaterials research. *Modern Research and Educational Topics in Microscopy*, **2007**, 3, 634.
29. Solá, F.; Xia, Z. H.; Colón – Lebrón, M.; Meador, M. A. *PSSrri*, **2012**, v.6, n.8, p. 341-351.
30. Moreno-Garrido, I. M.; Pérez, S.; Blasco, J. *Mar Environ Res*, **2015**, 111, 60.
31. Lahiani, M. H.; Dervishi, E.; Chen, J.; Nima, Z.; Gaume, L.; Biris, A. S.; Khodakovskaya, M. V. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2013**, 5, 7965.
32. He, F.; Zhao, D.; J Liu, Roberts C. B. *Ind. Eng. Chem.* **2007**, 46, 29.
33. Zhang, W.; Meng, L.; MU, G.; Zhao, M.; Zou, P.; Zhang, Y. *Appl. Surf. Sci.*, **2016**, 378, 196.