



**CAROLINE DE OLIVEIRA TIMOTEO**

**NANOPARTÍCULAS DE PRATA NO CULTIVO *in vitro* DE  
FISALIS E CASAQUEIRA**

**LAVRAS-MG  
2018**

**CAROLINE DE OLIVEIRA TIMOTEO**

**NANOPARTÍCULAS DE PRATA NO CULTIVO *in vitro* DE FISALIS E  
CASAQUEIRA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Titular, Renato Paiva, PhD.  
Orientador

Dra. Michele Valquíria dos Reis  
Co-orientadora

**LAVRAS-MG  
2018**

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

Timoteo, Caroline de Oliveira.

Nanopartículas de prata no cultivo *in vitro* de fisalis e  
casaqueira / Caroline de Oliveira Timoteo. - 2018.

67 p. : il.

Orientador(a): Renato Paiva.

Coorientador(a): Michele Valquíria dos Reis.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de  
Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. Nanotecnologia. 2. *Physalis peruviana*. 3. *Campomanesia*  
*rufa*. I. Paiva, Renato. II. Reis, Michele Valquíria dos. III. Título.

**CAROLINE DE OLIVEIRA TIMOTEO**

**NANOPARTÍCULAS DE PRATA NO CULTIVO *in vitro* DE FISALIS E  
CASAQUEIRA  
SILVER NANOPARTICLES IN THE *in vitro* CULTURE OF FISALIS AND  
CASAQUEIRA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 27 de fevereiro de 2018.

Prof. Dr. Breno Régis Santos      UNIFAL

Prof. Dr. Juliano Elvis de Oliveira      UFLA

Prof. Titular, Renato Paiva, PhD.  
Orientador

Dra. Michele Valquíria dos Reis  
Co-orientadora

**LAVRAS-MG  
2018**

À minha mãe Rosa, ao meu pai Sérgio e à minha irmã Bruna  
pelo apoio e carinho em todas as etapas...

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Rosa e Sergio e a minha irmã Bruna, por acreditarem junto comigo nos meus sonhos e pelo incentivo e apoio em todas as etapas desse percurso.

À Universidade Federal de Lavras, especialmente ao Departamento de Biologia, Setor de Fisiologia Vegetal, pela oportunidade de realização do mestrado e por oferecer as instalações necessárias para realização deste trabalho.

À CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado e ao CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

Ao meu orientador, Professor Renato Paiva, por ter aceitado me orientar e pela confiança depositada ao me proporcionar a oportunidade de realizar esse projeto.

A Michele Valquíria dos Reis que me auxiliou durante todas as etapas desse trabalho, pela confiança depositada em mim, pela paciência durante a execução dos experimentos e pelos ensinamentos oferecidos.

Ao Pedro Ivo Cunha Claro e aos Professores Juliano Elvis de Oliveira e José Manoel Marconcini, que foram imprescindíveis para execução desse trabalho.

A todos os integrantes do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, que se tornaram verdadeiros amigos, obrigada pela companhia de todos os dias, pela troca de experiências, por todos os trabalhos realizados juntos, por terem me aceitado na vida de vocês e por fazerem os meus dias mais felizes.

À Kamila Rezende Dázio de Souza do Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Molecular de Plantas, do Setor de Fisiologia Vegetal que me auxiliou durante as análises bioquímicas realizadas no presente estudo.

Aos professores do Setor de Fisiologia Vegetal pelos conhecimentos adquiridos no decorrer desses dois anos. E aos funcionários do Setor, pela disponibilidade em esclarecer dúvidas e fornecer materiais para execução dos experimentos, quando necessários.

Aos membros da banca, pela disponibilidade e pelas contribuições.

E a todos que, de alguma maneira, direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão desse trabalho, deixo meus sinceros agradecimentos.

## BIOGRAFIA

CAROLINE DE OLIVEIRA TIMOTEO, filha de Sergio Pedro Timoteo e de Rosa Silvéria de Oliveira Filha, nasceu no dia 13 de novembro de 1993, na cidade de São Gotardo, estado de Minas Gerais, Brasil. Ingressou nos cursos de Bacharelado em Ciências Biológicas na Universidade Federal de Viçosa *campus* Rio Paranaíba (UFV-CRP) em 2012, concluindo em 2016, quando apresentou o trabalho de conclusão de curso “Otimização do protocolo de germinação *in vitro*, aclimatização e embriogênese somática de *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.” com auxílio financeiro de bolsa de iniciação científica do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Em março de 2016, ingressou no programa de pós-graduação mestrado, *stricto sensu*, em Agronomia/Fisiologia Vegetal. Atualmente, é aluna de doutorado do mesmo programa na Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais.

*“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim” (Chico Xavier).*



## RESUMO

Com o uso crescente de nanomateriais, principalmente de nanopartículas de prata (AgNPs) devido as suas propriedades antimicrobianas, compreender os efeitos dessas nanopartículas em plantas comestíveis surge como uma questão de extrema importância, visto que, as nanopartículas de prata estão presentes em uma série de produtos de consumo que são inevitavelmente liberados para o ambiente sem nenhuma restrição. Compreender seus efeitos nas células vegetais além de elucidar questões referentes a fitotoxicidade também pode esclarecer dúvidas a respeito de seus benefícios no crescimento e desenvolvimento das plantas. Nesse contexto o presente estudo, teve por objetivo avaliar os efeitos das nanopartículas de prata no cultivo *in vitro* de duas espécies frutíferas: *Physalis peruviana* e *Campomanesia rufa*. Para o experimento com *P. peruviana*, sementes dessa espécie foram cultivadas em meio MS (Murashige e Skoog) suplementado com diferentes concentrações de AgNPs (0,0; 0,385; 0,77; 1,54 e 15,4 mg L<sup>-1</sup>). A solução de AgNPs foi sintetizada e caracterizada em relação ao tamanho das nanopartículas, Potencial Zeta e Polidispersividade. Foi avaliado o crescimento e desenvolvimento das plântulas, por meio de análises de crescimento, bioquímicas e anatômicas. Para o experimento com *C. rufa*, segmentos nodais das plântulas estabelecidas *in vitro* foram cultivados em meio MS, suplementado por BAP (5,62 µM), diferentes concentrações de nanopartículas de prata (0,0; 0,385; 0,77; 1,54 e 15,4 mg L<sup>-1</sup>) ou Nitrato de prata (0,18 g L<sup>-1</sup>). O meio de cultivo com as respectivas concentrações de AgNPs foi caracterizado em relação ao tamanho das nanopartículas, Potencial Zeta e Polidispersividade. Foram realizadas avaliações de crescimento, bioquímicas, de microscopia de luz e varredura das plantas. Os resultados referentes ao experimento com *P. peruviana* demonstraram que ao final de 60 dias de cultivo, a germinação *in vitro* dessa espécie não foi afetada pela presença de AgNPs e que na concentração de 0,385 mg L<sup>-1</sup> as AgNPs promovem um aumento na biomassa das plântulas. No entanto, em concentrações mais elevadas (15,4 mg L<sup>-1</sup>) provoca uma redução no tamanho das plântulas e do sistema radicular. Não foram observadas alterações no metabolismo antioxidante, no entanto alterações no sistema vascular foram observadas nos tratamentos com AgNPs em relação ao controle. No experimento com *C. rufa*, foi observado que as AgNPs nas concentrações de 0,385; 0,77 e 1,54 mg L<sup>-1</sup> não afetaram a multiplicação *in vitro*, quanto ao número, altura e peso fresco dos brotos formados, entretanto, nos tratamentos com 15,4 mg L<sup>-1</sup> de AgNPs e nitrato de prata observou-se uma redução no número de brotações. Não foram observadas alterações bioquímicas e anatômicas nos brotos formados. A caracterização do meio de cultivo com AgNPs demonstrou que o processo de esterilização do meio de cultura, promove uma aglomeração das AgNPs, o que consequentemente acarreta no aumento do seu tamanho e, portanto, em menor toxicidade. A partir do exposto conclui-se que, os efeitos das AgNPs são dependentes da concentração e que fatores como temperatura podem promover um aumento das nanopartículas, e, portanto, alterar suas propriedades intrínsecas, resultando em efeitos menos pronunciados quando comparadas com nanopartículas de prata de tamanhos menores (1 a 100 nm).

**Palavras chave:** Nanotecnologia. *Physalis peruviana*. *Campomanesia rufa*. Cultura de tecidos.

## ABSTRACT

With the increasing use of nanomaterials, mainly silver nanoparticles (AgNPs) due to their antimicrobial properties, understanding the effects of these nanoparticles on edible plants arises as a matter of extreme importance, since, silver nanoparticles are present in a series of products that are inevitably released into the environment without any restrictions. Understanding its effects on plant cells as well as elucidating questions regarding phytotoxicity may also cast doubt on its benefits in plant growth and development. In this context, the present study aimed to evaluate the effects of silver nanoparticles on *in vitro* cultivation of two fruit species: *Physalis peruviana* and *Campomanesia rufa*. For the *P. peruviana* experiment, seeds of this species were cultivated in MS medium (Murashige and Skoog) supplemented with different concentrations of AgNPs (0.0, 0.385, 0.77, 1.54 and 15.4 mg L<sup>-1</sup>). The AgNPs solution was synthesized and characterized in terms of the size of the nanoparticles, Zeta Potential and Polydispersivity. Growth and development of the seedlings were evaluated through growth, biochemical and anatomical analyzes. For the experiment with *C. rufa*, nodal segments of the seedlings established *in vitro* were cultured in MS medium, supplemented by BAP (5.62 μM), different concentrations of silver nanoparticles (0.0, 0.385, 0.77, 1.54 and 15.4 mg L<sup>-1</sup>) or silver nitrate (0.18 g L<sup>-1</sup>). The culture medium with the respective concentrations of AgNPs was characterized in relation to the size of the nanoparticles, Potential Zeta and Polydispersivity. Growth, biochemical, light microscopy and scanning microscopy of the plants were performed. The results of the experiment with *P. peruviana* demonstrated that at the end of 60 days of cultivation, the *in vitro* germination of this species was not affected by the presence of AgNPs and that at the concentration of 0,385 mg L<sup>-1</sup> the AgNPs promoted an increase in the biomass of seedlings. However, at higher concentrations (15.4 mg L<sup>-1</sup>) causes a reduction in the size of the seedlings and the root system. No alterations were observed in the antioxidant metabolism, however alterations in the vascular system were observed in the treatments with AgNPs in relation to the control. In the experiment with *C. rufa*, it was observed that AgNPs at concentrations of 0.385, 0.77 and 1.54 mg L<sup>-1</sup> did not affect the multiplication *in vitro*, in terms of number, height and fresh weight of the shoots, however, in the treatments with 15.4 mg L<sup>-1</sup> of AgNPs and silver nitrate, there is a reduction in the number of shoots. No biochemical and anatomical changes were observed in the shoots. The characterization of the culture medium with AgNPs has demonstrated that the sterilization process of the culture medium promotes agglomeration of the AgNPs, which consequently leads to an increase in its size and, therefore, to a lower toxicity. From the above, it is concluded that the effects of AgNPs are concentration dependent and that factors such as temperature can promote an increase of the nanoparticles and therefore alter their intrinsic properties, resulting in less pronounced effects when compared with silver nanoparticles of sizes (1 to 100 nm).

**Keywords:** Nanotechnology. *Physalis peruviana*. *Campomanesia rufa*. Tissue culture.

## SUMÁRIO

<b>PRIMEIRA PARTE</b> .....	<b>12</b>
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>12</b>
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>13</b>
2.1. Nanotecnologia.....	13
2.1.1. Absorção e translocação de nanomateriais pelas plantas .....	14
2.1.2. Toxicidade dos nanomateriais .....	15
2.2. Nanopartículas de prata.....	16
2.2.1. Síntese de nanopartículas de prata .....	16
2.2.2. Efeito das nanopartículas de prata em células vegetais .....	17
2.2.3. Nanopartículas de prata na cultura de tecidos .....	18
2.3. <i>Physalis peruviana</i> L.....	19
2.4. <i>Campomanesia rufa</i> (O. Berg) Nied.....	20
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>21</b>
<b>SEGUNDA PARTE – ARTIGOS</b> .....	<b>27</b>
<b>ARTIGO 1</b> .....	<b>27</b>
<b>Concentrações de nanopartículas de prata no cultivo <i>in vitro</i> de <i>Physalis peruviana</i> L. ..</b>	<b>27</b>
1. Introdução .....	28
2. Material e métodos .....	29
2.1. Síntese das nanopartículas de prata .....	29
2.2. Caracterização das nanopartículas de prata.....	30
2.3. Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Physalis peruviana</i> L. ....	30
2.4. Análises de crescimento.....	31
2.5. Microscopia de luz.....	31
2.6. Análise bioquímica do metabolismo antioxidante e peroxidação lipídica.....	31
2.7. Delineamento estatístico.....	32
3. Resultados .....	32
3.1. Caracterização das nanopartículas de prata.....	32
3.2. Análises de crescimento.....	34
3.3. Microscopia de luz.....	36
3.4. Análise bioquímica do metabolismo antioxidante e peroxidação lipídica.....	37
4. Discussão .....	38
5. Conclusões .....	41
Agradecimentos .....	42

Contribuições dos autores.....	42
Declaração de conflito de interesse .....	42
Referências .....	43
<b>ARTIGO 2.....</b>	<b>48</b>
<b>Nanopartículas de prata na micropropagação de <i>Campomanesia rufa</i> (O. Berg) Nied....</b>	<b>48</b>
<b>1. Introdução .....</b>	<b>49</b>
<b>2. Material e métodos .....</b>	<b>50</b>
<b>2.1. Síntese de nanopartículas de prata .....</b>	<b>50</b>
<b>2.2. Caracterização das nanopartículas de prata.....</b>	<b>51</b>
<b>2.3. Indução de brotações.....</b>	<b>51</b>
<b>2.3.1. Análises de crescimento .....</b>	<b>51</b>
<b>2.3.2. Análise bioquímica do metabolismo antioxidante .....</b>	<b>52</b>
<b>2.3.3. Microscopia de luz.....</b>	<b>52</b>
<b>2.3.4. Microscopia eletrônica de varredura.....</b>	<b>53</b>
<b>3. Resultados .....</b>	<b>53</b>
<b>3.1. Caracterização das nanopartículas de prata.....</b>	<b>53</b>
<b>3.2. Análises de crescimento.....</b>	<b>55</b>
<b>3.3. Análise bioquímica do metabolismo antioxidante .....</b>	<b>57</b>
<b>3.4. Microscopia de luz.....</b>	<b>57</b>
<b>3.5. Microscopia eletrônica de varredura.....</b>	<b>58</b>
<b>4. Discussão .....</b>	<b>60</b>
<b>5. Conclusão .....</b>	<b>63</b>
<b>Agradecimentos .....</b>	<b>63</b>
<b>Contribuições dos autores.....</b>	<b>63</b>
<b>Declaração de conflito de interesse .....</b>	<b>64</b>
<b>Referências .....</b>	<b>64</b>

## **PRIMEIRA PARTE**

### **1. INTRODUÇÃO GERAL**

A Nanotecnologia envolve nanomateriais que apresentem pelo menos uma de suas dimensões na escala de 1 a 100 nm e tenha propriedades que não sejam compartilhadas por seus homólogos de mesma composição química (ADAMS; BARBANTE, 2013). Estas propriedades únicas podem resultar em padrões ambientais substancialmente diferentes de destino e comportamento do que os seus homólogos em massa (SERVIN; WHITE, 2016).

Os nanomateriais interagem com o ambiente envolvente e conseqüentemente com as plantas que são um componente básico essencial de todos os ecossistemas. Estes podem ser absorvidos e acumulados na biomassa vegetal, e afetar seu destino e transporte no meio ambiente (DE LA ROSA et al., 2017).

Um número crescente de publicações emergiu recentemente sobre as interações de nanomateriais com as plantas, com a maioria desses estudos voltados para a potencial toxicidade dos nanomateriais nas espécies vegetais, e tanto efeitos positivos quanto negativos foram observados (MIRALLES; CHURCH; HARRIS, 2012). Os nanomateriais podem influenciar os principais eventos do ciclo de vida das plantas, incluindo a germinação das sementes, vigor de plântulas, emissão de raízes, crescimento e reações fotossintéticas e podem melhorar a sobrevivência das plântulas sob estresses abióticos (KHAN et al., 2017). Mas também podem provocar danos celulares à medida que aumentam a geração de espécies reativas de oxigênio (ZUVERZA-MENA et al., 2017).

Embora já se tenha entrado em consenso de que os efeitos produzidos por esses materiais são dependentes do tipo de nanomaterial, das espécies de plantas e dos meios envolventes, esses efeitos são inconsistentes entre os diferentes estudos, portanto ainda existem muitos desafios que permanecem não resolvidos, envolvendo os efeitos biológicos dos nanomateriais (ARRUDA et al., 2015).

Dentre os nanomateriais mais utilizados nas plantas, tem-se as nanopartículas de prata, titânio, zinco e ouro em comparação com outros tipos de nanomateriais, de modo que vários pesquisadores vêm trabalhando para entender melhor seus efeitos nas células vegetais (ARRUDA et al., 2015).

Como as nanopartículas de prata são de longe o nanomaterial mais prevalentemente utilizado em produtos de consumo devido à sua atividade antimicrobiana (MUSEE; THWALA; NOTA, 2011), o objetivo do presente estudo foi analisar os efeitos das

nanopartículas de prata na propagação *in vitro* das espécies frutíferas, *Physalis peruviana* e *Campomanesia rufa*. a fim de preencher essas lacunas que permanecem em aberto quando se trata dos efeitos dos nanomateriais nas células vegetais.

## **2. REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1. Nanotecnologia**

A nanotecnologia inclui nanopartículas que apresentam uma dimensão característica de 1 a 100 nm e tenha propriedades que não sejam compartilhadas por partículas maiores de mesma composição química (AUFFAN et al., 2009).

Suas propriedades físico-químicas vão depender significativamente de suas morfologias tridimensionais (tamanhos, formas e topografia de superfície) dos meios envolventes, e sua disposição no espaço (ADAMS; BARBANTE, 2013).

Dadas essas propriedades únicas, os nanomateriais são utilizados em uma variedade de produtos comerciais e de consumo, incluindo semicondutores, microeletrônicos, catalisadores, produtos de consumo diários (cosméticos e protetores solares), em embalagens de alimentos e produtos alimentícios (HANDFORD, et al., 2014; AZEREDO; ROSA; MATTOSO, 2017) e aplicações em nanomedicina e nanofarmacologia (WANG et al., 2016).

E nos últimos tempos, devido ao sucesso dos nanomateriais em diversas áreas, abriu-se espaço no campo da agricultura, para melhorias na eficiência e produtividade agrícola, melhorando a absorção pelas plantas e evitando perdas para o ambiente. Os nanomateriais podem ser aplicados no revestimento de biofertilizantes, na produção de formulações mais resistentes a dessecação e na liberação controlada de fertilizantes (DUHAN et al., 2017).

Os nanomateriais também podem ser aplicados no encapsulamento de pesticidas, permitindo uma absorção adequada do produto químico pelas plantas (DUHAN et al., 2017) e também na formulação de nanopesticidas (KHOT et al., 2012) e nanoherbicidas (PÉREZ-DE-LUQUE; RUBIALES, 2009).

Outra aplicação dos nanomateriais que vem gerando várias pesquisas nos últimos anos é referente aos efeitos na germinação e crescimento das plantas, com o intuito de promover seu uso na agricultura (KHOT et al., 2012). Alguns tipos de nanomateriais são capazes de penetrar as sementes e com isso aumentar sua taxa de germinação ao permitir uma melhor captação de água (KHODAKOVSKAYA et al., 2009).

Também foi observado que as algumas espécies de plantas, quando tratadas com nanomateriais apresentam proteção contra vários estresses abióticos. A aplicação exógena de nanopartículas de TiO<sub>2</sub> em concentrações apropriadas, pode aumentar a tolerância à seca nas plantas com melhorias no seu processo fisiológico (AGHDAM; MOHAMMADI; GHORBANPOUR, 2016), melhorar o estado redox em plantas submetidas a baixas temperaturas, podendo aumentar a tolerância ao frio nas culturas (MOHAMMADI; MAALI-AMIRI; ABBASI, 2013) e melhorar a fotossíntese através da regulação da dissipação de energia e aumento na condutância de H<sub>2</sub>O e na taxa de transpiração das folhas em plantas submetidas ao estresses térmico (QI; LIU; LI, 2013).

A aplicação foliar de nanopartículas de ZnO aumentou a área foliar, o peso seco, a taxa de assimilação líquida de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), a concentração sub-estomática de CO<sub>2</sub>, o teor de clorofila, o conteúdo de Fv / Fm e de Zn e diminui o conteúdo de Na nas folhas, quando as plantas são submetidas a estresse de salinidade (TORABIAN; ZAHEDI, KHOSHGOFTAR, 2016).

E as nanopartículas de prata promoveram um maior desempenho no crescimento da soja durante a inundação, ao aumentar o crescimento das plântulas e afetar a abundância de proteínas associadas ao estresse, sinalização e metabolismo celular (MUSTAFA; SAKATA; KOMATSU, 2016).

### **2.1.1. Absorção e translocação de nanomateriais pelas plantas**

Os nanomateriais podem penetrar os tecidos das plantas através das raízes ou folhas e sua absorção pode ser facilitada ou dificultada, em decorrência de vários fatores, relacionados ao tipo de nanomaterial, à fisiologia da planta e pela interação dos nanomateriais com microorganismos ou compostos do ambiente de cultivo das espécies vegetais (PÉREZ-DE-LUQUE, 2017).

Para penetrar as células vegetais os nanomateriais podem se ligar a proteínas transportadoras ou através de aquaporinas, por canais iônicos, por endocitose, por ligação a substâncias orgânicas presentes no solo, pelo plasmodesma e até mesmo pela formação de novos poros que acabam favorecendo a entrada de água na célula (RICO et al., 2011).

Os nanomateriais podem seguir as vias apoplásticas e/ou simplásticas para mover-se pelo corpo da planta e movimentar de um caminho para o outro (MONTES et al., 2017). No entanto, esse movimento é dependente de barreiras químicas e fisiológicas que restringem o tamanho das partículas capazes de ultrapassá-las (WANG et al., 2016).

Compreender como os nanomateriais se movem dentro das plantas é importante para estabelecer quais partes da planta estes podem alcançar e se acumular. Nanopartículas que são transportadas através do xilema, provavelmente se moverão da raiz para as folhas, devendo, portanto, ser aplicadas nas raízes, e as nanopartículas que se movem através do floema, devem ser aplicadas via pulverização foliar (PÉREZ-DE-LUQUE, 2017).

### **2.1.2. Toxicidade dos nanomateriais**

O uso crescente dos nanomateriais iniciou uma discussão a respeito de seus potenciais efeitos adversos nos ecossistemas. Visto que, da mesma forma que os nanomateriais podem promover melhoras no crescimento e desenvolvimento das plantas, devido ao seu tamanho pequeno, que lhes confere propriedades únicas, podem também causar efeitos deletérios em células vegetais (TRIPATHI et al., 2017).

Os nanomateriais podem ser tóxicos para os tecidos das plantas, devido a efeitos químicos, mecânicos, catalíticos e efeitos superficiais (DIETZ; HERTH, 2011). Os efeitos químicos estão relacionados a dissolução de íons metálicos, que podem interagir com biomoléculas ou causar desequilíbrios no potencial redox das células. A toxicidade mecânica está relacionada à associação com estruturas celulares ou por obstrução de poros em paredes ou membranas celulares (AKEN, 2015).

Os efeitos catalíticos são causados pela catálise de reações bioquímicas, como reações de redução-oxidação, que podem induzir efeitos fitotóxicos pela geração de metabolitos modificados. Os efeitos superficiais estão relacionadas a superfícies dos nanomateriais, que, quando carregados negativamente, podem se ligar a grupos funcionais positivos e levar a inativação de proteínas (AKEN, 2015).

Os sintomas mais comumente observados da toxicidade dos nanomateriais incluem o entupimento de poros e barreiras na corrente apoplástica, reduzindo assim a absorção de nutrientes e diminuições na transferência hidráulica, redução nos processos fotossintéticos e geração de espécies reativas de oxigênio e danos nas estruturas de DNA (AKEN, 2015).

Esses efeitos tóxicos dos nanomateriais nas plantas dependem principalmente do tamanho, concentração, estrutura química do nanomaterial e do meio químico dos locais sub-celulares nos quais os nanomateriais são depositados, quando absorvidos pelas plantas (DIETZ; HERTH, 2011).

Na perspectiva toxicológica, o tamanho das partículas e a área superficial, são os pontos mais críticos da toxicidade de um nanomaterial (NEL et al., 2006). Já foi demonstrado



que a absorção e a fitotoxicidade dos nanomateriais dependem do tamanho das partículas, sendo que as partículas menores provocam níveis mais altos de toxicidade (LARUE et al., 2012). E que nanopartículas carregadas positivamente são melhores absorvidas pelas raízes das plantas, enquanto que as carregadas negativamente são mais eficientemente translocadas para a parte aérea das plantas (ZHU et al., 2012).

Apesar das inúmeras publicações sobre nanotoxicologia, os resultados obtidos ainda apresentam-se contraditórios e mostram-se insuficientes para determinar os potenciais efeitos dos nanomateriais no ambiente. Sendo necessário estudos que abordem sistemas mais realistas com exposições mais longas (SERVIN; WHITE, 2016) para investigar a toxicidade e a transferência trófica dos nanomateriais. Além disso, é importante entender como as propriedades físicas e químicas dos nanomateriais governam suas interações e respostas para quantificação dos riscos de sua utilização (ADAMS; BARBANTE, 2013), a fim de garantir seu uso adequado nos diferentes setores nos quais são empregados.

## **2.2. Nanopartículas de prata**

Dentre os nanomateriais, as nanopartículas de prata são amplamente difundidas devido às suas propriedades antimicrobianas. Os efeitos antibacterianos dos sais de prata foram notados desde a antiguidade, e atualmente são usados para controlar o crescimento bacteriano em uma série de aplicações incluindo tratamentos dentários, curativos de feridas e como revestimento de dispositivos médicos (PRABHU; POULOSE, 2012).

Com o surgimento de bactérias resistentes a antibióticos, as nanopartículas de prata surgiram como novos agentes antimicrobianos devido à sua elevada relação área / volume e às propriedades físicoquímicas distintas (MORONES et al., 2005).

Em decorrência dos efeitos bactericidas das nanopartículas de prata também começaram a ser comumente empregadas na agricultura como pesticidas. O mecanismo de toxicidade ainda não é totalmente esclarecido, mas acredita-se que as nanopartículas de prata possuem a capacidade de penetrar a parede celular bacteriana e causar alterações estruturais, gerando espécies reativas de oxigênio, que levam à morte celular (PRABHU; POULOSE, 2012).

### **2.2.1. Síntese de nanopartículas de prata**

Diferentes métodos podem ser empregados para a síntese dessas nanopartículas, tais como redução química de íons de prata em soluções aquosas, com ou sem agentes estabilizadores (LIZ-MARZÁN; LADO-TOURINHO, 1996), decomposição térmica em solventes orgânicos (ESUMI et al., 1990), fotorredução em micelas reversas (SUN; ATORNGITJAWAT; MEZIANI, 2001) e redução via radiação química (HENGLEIN, 2001). Sendo que, a redução química de íons de prata em soluções aquosas, é a técnica mais empregada, a partir da qual pode-se utilizar uma variedade de agentes redutores orgânicos e inorgânicos, como o borohidreto, o citrato, o ascorbato e o hidrogênio elementar (SONDI; GOIA; MATIJEVIĆ, 2003; GUZMÁN; DILLE; GODET, 2009).

As nanopartículas de prata ainda podem ser sintetizadas a partir de métodos biológicos utilizando microorganismos (VIGNESHWARAN et al., 2007), enzimas (WILLNER; BARON; WILLNER, 2006) ou extratos vegetais (BAR et al., 2009; SONG; KIM, 2009) que não envolvem agentes químicos e consequentemente não afetam o meio ambiente.

Dependendo do método escolhido, as nanopartículas de prata podem apresentar diferentes morfologias, tamanhos e formas. A síntese química baseada no método de Lee and Meisel (1982) que é uma variação do método de Turkevich (1951), onde o nitrato de prata é usado como fonte do metal para síntese de nanopartículas de prata, produz partículas com uma ampla distribuição de tamanhos. Já o método de Creighton (1979) onde as nanopartículas de prata são sintetizadas via redução de  $\text{AgNO}_3$  por  $\text{NaBH}_4$  produz partículas de 10 nm com reduzida distribuição de tamanho (EVANOFF; CHUMANOV, 2005).

### **2.2.2. Efeito das nanopartículas de prata em células vegetais**

Em relação aos efeitos das nanopartículas de prata nas células vegetais, ainda pouco se sabe. Estudos abordando a fitotoxicidade em diferentes espécies vegetais vem sendo realizados, todavia os resultados até o momento não são conclusivos, visto que, à ação desses nanomateriais podem depender da espécie vegetal e da concentração de nanopartículas de prata a qual são submetidas.

Existem trabalhos que retratam tanto aspectos positivos quanto negativos dessas nanopartículas no crescimento e desenvolvimento vegetal. Em *Brassica juncea* (SHARMA et al. 2012), *Boswellia ovalifoliolata* (SAVITHRAMMA; ANKANNA; BHUMI, 2012), *Eruca Sativa* (VANNINI et al., 2013), constatou-se um aumento no crescimento das plantas. Em *Trigonella foenum-graecum* (JASIM et al., 2017) além de aumentar o crescimento das plantas promoveu um aumento na síntese de diosgenina, atuando como um nanoelicitador. Já em soja

(MUSTAFA; SAKATA; KOMATSU, 2016) induziu o crescimento radicular em condições de alagamento (estresse hídrico).

No entanto as nanopartículas de prata interferiram nos processos de divisão celular em *Allium cepa* (KUMARI; MUKHERJEE; CHANDRASEKARAN, 2009) e *Vicia faba* (PATLOLLA et al., 2012) causando alterações no índice mitótico. Em *Oryza sativa* foi observado alterações fisiológicas e moleculares com redução do crescimento das raízes (NAIR; CHUNG, 2014). Em *Lolium multiflorum* as AgNPs de 6 nm inibiram mais fortemente o crescimento das plântulas do que as nanopartículas de 25 nm (YIN et al., 2011).

### 2.2.3. Nanopartículas de prata na cultura de tecidos

Na cultura de tecidos vegetais as AgNPs começaram inicialmente a serem utilizadas para o controle de contaminantes, devido as suas propriedades antimicrobianas. Estudos demonstraram que AgNPs de 35 nm, foram efetivas no controle de contaminantes para desinfestação de segmentos nodais de *Valeriana officinalis*, sem efeitos deletérios no crescimento das plantas (ABDI; SALEHI; KHOSH-KHUI, 2008).

Em *Araucaria excelsa* R. Br. a adição de AgNPs no meio de cultivo reduziu a contaminação bacteriana de 81,25% no tratamento controle para 18,75% na concentração de 400 mg L<sup>-1</sup> de AgNPs, sem efeitos adversos no crescimento e desenvolvimento da planta (SARMAST; SALEHI; KHOSH-KHUI, 2011).

Na concentração de 100 mg L<sup>-1</sup> as AgNPs adicionadas ao meio de cultivo, para a propagação *in vitro* de *Rosa hybrida* L., reduziu a contaminação bacteriana e a taxa de exsudação fenólica e na concentração de 200 mg L<sup>-1</sup> foi eficiente na esterilização superficial dos explantes (SHOKRI et al., 2015).

As AgNPs também mostraram potencial na multiplicação *in vitro* de *Tecomella undulata* (Roxb.) Seem, ao serem adicionadas ao meio de cultivo promoveram um aumento no número de brotos por explante e o tempo de vida da planta, devido a sua ação na inibição do etileno (AGHDAEI; SALEHI; SARMAST, 2012).

No entanto, já foi relatado que as AgNPs inibiram o alongamento das raízes e a expansão da folha de *Arabidopsis thaliana*, quando adicionadas ao meio de cultivo, em níveis acima de 300 mg L<sup>-1</sup>, além de diminuir a eficiência fotossintética (SOSAN et al., 2016).

Esses resultados demonstram que mais estudos são necessários, a fim de melhor compreender a influência das AgNPs nas células vegetais e seus potenciais efeitos no crescimento e desenvolvimento das plantas e com isso potencializar ou não a sua utilização,

uma vez que a ação desse nanomaterial pode variar muito em decorrência da espécie, do tamanho da nanopartícula e da concentração empregada.

### 2.3. *Physalis peruviana* L.

*Physalis peruviana* L., também conhecida como tomate-de-capucho, pertence à família Solanaceae, uma das principais famílias botânicas, que abrange espécies de interesse comercial como a batata, o tabaco e o tomate.

Seus frutos podem ser consumidos *in natura* ou na forma de sucos, geleias e sobremesas (RABIE et al., 2015). E tem sido amplamente utilizada na medicina popular para o tratamento de doenças como a diabetes, malária e pneumonia (MAOBE et al., 2012).

Essa espécie é conhecida devido a sua ação antioxidante e anti-inflamatória (OLIVARES-TENORIO et al., 2017), sendo utilizada como antiespasmódico, antidiurético, antisséptico, sedativo, analgésico, fortalecedor do nervo óptico, alívio para inflamações de garganta e eliminação de parasitas intestinais (PUENTE et al., 2011).

E já mostrou atividade citotóxica seletiva contra células tumorais, relacionadas ao câncer de próstata e carcinoma renal (XU et al., 2017). Espécies do gênero *Physalis* possuem esteroides denominados Physalins que apresentam atividade anticancerígena, inibindo a proliferação de linfócitos e a produção de citocinas pró-inflamatórias, o que ajudaria a diminuir a inflamação e a fibrose, sendo útil no tratamento de doenças imunomediadas (PUENTE et al., 2011).

Já foi comprovado também que essa espécie desempenha um papel protetor na toxicidade hepatorenal induzida por cádmio em ratos, reduzindo a peroxidação lipídica, o óxido nítrico e o aumento das atividades enzimáticas e moléculas antioxidantes não enzimáticas nos tecidos hepáticos e renais de ratos infectados por cádmio (DKHIL et al., 2014). *P. peruviana* também demonstrou um papel protetor contra a toxicidade reprodutiva induzida pelo tetracloreto de carbono em ratos, fornecendo evidências de seu papel terapêutico nas doenças mediadas por radicais livres e infertilidade (MONEIM, 2016)

Além disso alguns estudos comprovam que *P. peruviana* pode ser utilizada na fitorremediação de locais contaminados por metais pesados (LEGUIZAMO; GÓMEZ; SARMIENTO, 2017).

Recentemente *P. peruviana* foi utilizada na síntese verde de nanopartículas de prata, com formação de partículas de forma esférica com diâmetro variando de 31 a 52 nm (RASHID; SABIR, 2014).

#### 2.4. *Campomanesia rufa* (O. Berg) Nied.

*Campomanesia rufa* (O. Berg) Nied, popularmente conhecida como casaqueira, gabiroba ou guabiroba é uma espécie endêmica do Brasil que pertence à família Myrtaceae, é encontrada em Mata Atlântica e Cerrado do estado de Minas Gerais (Figura 1).

Figura 1-*Campomanesia rufa* (O. Berg) Nied, conhecida popularmente como gabiroba, no campus da Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.



Fonte: Do autor (2017).

A família Myrtaceae se encontra entre as dez famílias mais diversas de angiospermas que ocorrem no Brasil, apresentando 707 espécies endêmicas no país (FORZZA et al., 2010). Essa família apresenta um potencial econômico considerável, com espécies cultivadas para obtenção de madeira e de papel, essências aplicadas em antissépticos e produtos de limpeza (*Eucalyptus* spp.) e também como espécies ornamentais (*Melaleuca leucadendra*, *Callistemon citrinus*, *Leptospermum scoparium*, *Eucalyptus ficifolia*, *Eugenia sprengelii* e *Syzygium aromaticum*) (SOUZA; LORENZI, 2008).

Dentre as espécies frutíferas tem-se o *Psidium guajava* (goiaba) com potencial econômico bastante difundido e outras como *Myrciaria cauliflora*, *Eugenia uniflora*, *Campomanesia phae*, *Campomanesia* spp. *Psidium cattleyanum* e *Eugenia cerasiflora*, que possuem potencial semelhante, mas que ainda necessitam de domesticação para plantio em escala comercial (SOUZA; LORENZI, 2008).

Uma das características marcantes apresentadas pelas espécies pertencentes a família Myrtaceae é a presença de glândulas translúcidas distribuídas na folha que atuam como

cavidades secretoras e contêm terpenóides e compostos aromáticos de interesse farmacológico e cosmético. A presença de metabólitos secundários já foi descrita em espécies do gênero *Campomanesia*, destacando-se *C. quazumaefolia*, *C. pubescens*, *C. xanthocarpa* (SCHMEDA-HIRSCHMANN, 1995), *C. pubescens* e *C. adamantium* (CARDOSO et al., 2010).

Além do potencial farmacológico, as espécies do gênero *Campomanesia* também podem ser utilizadas como matéria prima na produção de doces, sorvetes, aguardente, licores e refrescos (VALLILO et al., 2005), apresentando, portanto, um grande potencial para cultivo em escala comercial. Quanto ao aspecto ecológico, os frutos são consumidos por pássaros e mamíferos.

Entretanto apesar de apresentar um grande potencial econômico e ecológico é pouco explorada, devido à falta de conhecimentos acerca da espécie, sendo considerada deficiente de dados segundo a lista vermelha da IUCN. À vista disso, estudos relacionados a *C. rufa* são importantes para melhor compreender as potenciais aplicações dessa espécie no âmbito ecológico e na indústria alimentícia.

Além disso, *C. rufa* apresenta um padrão de frutificação anual, de forma que a utilização de técnicas de cultivo *in vitro* surge como uma importante ferramenta de propagação, permitindo o aumento da produção.

## REFERÊNCIAS

- ABDI, G.; HASSAN S.; MORTEZA K. K. Nano silver: A novel nanomaterial for removal of bacterial contaminants in Valerian (*Valeriana Officinalis* L.) tissue culture. **Acta Physiologiae Plantarum**, Kraków, v. 30, n. 5, p. 709-714, 2008.
- ADAMS, F. C.; BARBANTE C. Nanoscience, nanotechnology and spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 86, p. 3–13, 2013.
- AGHDAEI, M.; SALEHI, H.; SARMAST, M. K. Effects of silver nanoparticles on *Tecomella undulata* (Roxb.) Seem micropropagation. **Advances in Horticultural Science**, Florence, p. 21-24, 2012.
- AGHDAM, M. T. B.; MOHAMMADI, H; GHORBANPOUR, M. Effects of nanoparticulate anatase titanium dioxide on physiological and biochemical performance of *Linum usitatissimum* (Linaceae) under well-watered and drought stress conditions. **Brazilian Journal of Botany**, São Paulo, v. 39, n. 1, p. 139–146, 2016.
- AKEN, B. V. ScienceDirect gene expression changes in plants and microorganisms exposed to nanomaterials. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 33, p. 206–19, 2015.
- AZEREDO, H. M. C.; ROSA, M. F.; MATTOSO, L. H. C. Nanocellulose in bio-based food

packaging applications. **Industrial Crops and Products**, v. 97, p. 664-671, 2017.

LIZ-MARZÁN, L. M.; LADO-TOURIÑO, I. Reduction and stabilization of silver nanoparticles in ethanol by nonionic surfactants. **Langmuir**, v. 12, n. 15, p. 3585-3589, 1996.

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

BAR, H. et al. Green Synthesis of silver nanoparticles using latex of *Jatropha curcas*. **Colloids and surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 339, n. 1-3, p. 134-139, 2009.

ARRUDA, S. C. C. et al. Nanoparticles applied to plant science: A review. **Talanta**, v. 131, p.693-705, 2015.

CARDOSO, C. A. L. et al. Antimicrobial activity of the extracts and fractions of hexanic fruits of *Campomanesia* species (Myrtaceae). **Journal of Medicinal Food**, v.13, n. 5, p. 1273-1276, 2010.

CREIGHTON, J. A.; BLATCHFORD, C. G.; ALBRECHT, M. G. Plasma resonance enhancement of raman scattering by pyridine adsorbed on silver or gold sol particles of size comparable to the excitation wavelength. **Journal of the chemical society, Faraday transactions: Molecular and chemical Physics**, v. 75, p. 790-798, 1979.

DE LA ROSA, G. et al. Physiological and biochemical response of plants to engineered NMs: implications on future design. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.110, p.226-235, 2017.

DIETZ, K. J.; HERTH, S. Plant nanotoxicology. **Trends in Plant Science**, v.16, n. 11, 2011.

DKHIL, M. A. et al. The potential protective role of *Physalis peruviana* L. Fruit in cadmium-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity. **Food and Chemical Toxicology**, v.74, p. 98-106. 2014.

DUHAN, J. S. et al. Nanotechnology: The new perspective in precision agriculture. **Biotechnology Reports**, v.15, p. 11-23, 2017.

ESUMI, K. et al. Preparation and characterization of bimetallic palladium-Copper colloids by thermal decomposition of their acetate compounds in organic solvents. **Chemistry of Materials** 2, v.5, p. 564-567, 1990.

EVANOFF, D. D.; CHUMANOV, G. Synthesis and optical properties of silver nanoparticles and arrays. **ChemPhysChem**, v. 6, n. 7, p. 1221-1231, 2005.

FORZZA, R. C. et al. As Angiospermas do Brasil. **Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, p. 78-89, 2010.

HANDFORD, C. E. et al. Implications of nanotechnology for the agri-food industry: opportunities, benefits and risks. **Trends in Food Science & Technology**, v. 40, n. 2, p. 226-241, 2014.

HENGLE, A. Reduction of  $\text{Ag}(\text{CN})_2^-$  on silver and platinum colloidal nanoparticles. **Langmuir**, v. 17, n. 8, p. 2329-2333, 2001.

JASIM, B. et al. Plant growth and diosgenin enhancement effect of silver nanoparticles in fenugreek (*Trigonella Foenum-Graecum L.*). **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 25, n. 3, p. 443-447, 2017.

KHAN, M. N. et al. Role of nanomaterials in plants under challenging environments. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.110, p. 194-209, 2017.

KHODAKOVSKAYA, M. et al. Carbon nanotubes are able to penetrate plant seed coat and dramatically affect seed germination and plant growth. **ACS Nano**, v. 3, n. 10, p. 3221-3227, 2009.

KHOT, L. R. et al. Applications of nanomaterials in agricultural production and crop protection: A Review. **Crop Protection**, v. 35, p. 64-70, 2012.

KUMARI, M.; MUKHERJEE, A; CHANDRASEKARAN, N. Genotoxicity of silver nanoparticles in *Allium Cepa*. **Science of the Total Environment**, v. 407, n. 19, p. 5243-5246, 2009.

LARUE, C. et al. Accumulation, translocation and impact of  $\text{TiO}_2$  nanoparticles in wheat (*Triticum aestivum* spp.): Influence of diameter and crystal phase. **Science of The Total Environment**, v. 431, p. 197-208, 2012.

LEE, P. C.; MEISEL, D. Adsorption and surface-enhanced raman of dyes on silver and gold sols. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 86, n. 17. p. 3391-3395, 1982.

LEGUIZAMO, M. A. O.; GÓMEZ, W. D. F.; SARMIENTO, M. C. G. Native herbaceous plant species with potential use in phytoremediation of heavy metals, spotlight on wetlands-A Review. **Chemosphere**, v. 168, p. 1230-1247, 2017.

MAOBE, A. et al. Profile of heavy metals in selected medicinal plants used for the treatment of diabetes, malaria and pneumonia in Kisii Region, Southwest Kenya. **Global Journal of Pharmacology**, v. 6, n. 3, p. 245-251, 2012.

MIRALLES, P.; CHURCH, T. L.; HARRIS, A. T. Toxicity , uptake , and translocation of engineered nanomaterials in vascular plants. **Environmental Science and Technology**, v. 46, n. 17, p. 9224-9239, 2012.

MOHAMMADI, R.; MAALI-AMIRI, R.; ABBASI, A. Effect of  $\text{TiO}_2$  nanoparticles on chickpea response to cold stress. **Biological Trace Element Research**, v. 152, n. 3, p. 403-410, 2013.

MONEIM, A. E. A. Prevention of carbon tetrachloride ( $\text{CCl}_4$ )-Induced toxicity in testes of rats treated with *Physalis Peruviana L.* fruit. **Toxicology and Industrial Health**, London, v. 32, n. 6, p. 1064-1073, 2016.

MONTES, A. et al. Uptake and transformations of engineered nanomaterials: Critical responses observed in terrestrial plants and the model plant *Arabidopsis Thaliana*. **Science of**



**The Total Environment**, v. 607, p. 1497-1516, 2017.

MORONES, J. R. et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 16, n. 10, p. 2346-2353, 2005.

MUSEE, N.; THWALA, M.; NOTA, N. The antibacterial effects of engineered nanomaterials: Implications for wastewater treatment plants. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 13, n. 5, p. 1164-1183, 2011.

MUSTAFA, G.; SAKATA, K.; KOMATSU, S. Proteomic analysis of soybean root exposed to varying sizes of silver nanoparticles under flooding stress. **Journal of Proteomics**, v. 148, p. 113-125, 2016.

NAIR, P. M. G.; CHUNG, I. M. Chemosphere physiological and molecular level effects of silver nanoparticles exposure in rice (*Oryza Sativa* L.) seedlings. **Chemosphere**, v. 112, p. 105-113, 2014.

NEL, A. et al. Toxic potential of materials at the nanolevel. **Science**, v. 311, n. 5761, p. 622-627, 2006.

OLIVARES-TENORIO, M. L. et al. Thermal stability of phytochemicals, HMF and antioxidant activity in cape gooseberry (*Physalis Peruviana* L.). **Journal of Functional Foods**, v. 32, p. 46-57, 2017.

PATLOLLA, A. K. et al. Genotoxicity of silver nanoparticles in *Vicia faba* : A pilot study on the environmental monitoring of nanoparticles. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 9, n. 5, p. 1649-1662, 2012.

PÉREZ-DE-LUQUE, A. Interaction of nanomaterials with plants: What do we need for real applications in agriculture? **Frontiers in Environmental Science**, v. 5, p. 12, 2017.

PÉREZ-DE-LUQUE, A.; RUBIALES, D. Nanotechnology for parasitic plant control. **Pest Management Science**, v. 65, n. 5, p. 540-545, 2009.

PRABHU, S.; POULOSE, E. K. 2012. Silver nanoparticles: Mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. **International Nano Letters**, v. 2, n.1, p. 32, 2012.

PUENTE, L. A. et al. *Physalis peruviana* Linnaeus, the multiple properties of a highly functional fruit: A review. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 1733-1740, 2011.

QI, M.; LIU, Y.; LI, T. Nano-TiO<sub>2</sub> improve the photosynthesis of tomato leaves under mild heat stress. **Biological Trace Element Research**, v.156, n.1-3, p. 323-328, 2013.

RABIE, M. A. et al. Effect of pasteurization and shelf life on the physicochemical properties of *Physalis* (*Physalis peruviana* L.) Juice. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 39, n.6, p.1051-1060, 2015.

RASHID, M.; SABIR, S. Biosynthesis of self-dispersed silver colloidal particles using the aqueous extract of *P. peruviana* for sensing *Dl*-Alanine. **ISRN Nanotechnology**, v. 2014, p.

1-7, 2014.

RICO, C. M. et al. Interaction of nanoparticles with edible plants and their possible implications in the food chain. **Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 8, p. 3485-398, 2011.

SARMAST, M.; SALEHI, H.; KHOSH-KHUI, M. Nano silver treatment is effective in reducing bacterial contaminations of *Araucaria Excelsa* R. Br. Var. *Glauca* explants. **Acta Biologica Hungarica**, v. 62, n. 4, p. 477-484, 2011.

SAVITHRAMMA, N.; ANKANNA, S.; BHUMI, G. Effect of nanoparticles on seed germination and seedling growth of *Boswellia Ovalifoliolata* an endemic and endangered medicinal tree taxon. **Nano Vision**, v. 2, n. 1, p. 61-68, 2012.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Flavonoids from *Calycorectes*, *Campomanesia*, *Eugenia* and *Hexachlamys* species. **Fitoterapia**, v. 66, n. 4, p. 373-374, 1995.

SERVIN, A. D.; WHITE, J. C. Nanotechnology in agriculture: Next steps for understanding engineered nanoparticle exposure and risk. **NanoImpact**, v. 1, p. 9-12, 2016.

SHARMA, P. et al. Silver nanoparticle-mediated enhancement in growth and antioxidant status of *Brassica juncea*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 167, n. 8, p. 2225-2233, 2012.

SHOKRI, S. et al. The effects of different concentrations of nano-silver on elimination of bacterial contaminations and phenolic exudation of rose (*Rosa hybrida* L.) *in vitro* culture. **Acta Horticulturae**, n.1083, p. 391-396, 2015.

SONDI, I.; GOIA, D. V.; MATIJEVIĆ, E. Preparation of highly concentrated stable dispersions of uniform silver nanoparticles. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 260, n. 1, p. 75-81, 2003.

SONG, J. Y.; KIM, B. S. Rapid biological synthesis of silver nanoparticles using plant leaf extracts. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 32, n. 1, p. 79-84, 2009.

SOSAN, A. et al. Engineered silver nanoparticles are sensed at the plasma membrane and dramatically modify the physiology of *Arabidopsis thaliana* plants. **The Plant Journal**, v. 85, n. 2, p. 245-257, 2016.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática-Guia ilustrado para identificação das Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II**. 2. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 640 p. 2008.

TORABIAN, S.; ZAHEDI, M.; KHOSHGOFTAR, A. H. Effects of foliar spray of two kinds of zinc oxide on the growth and ion concentration of sunflower cultivars under salt stress. **Journal of Plant Nutrition**, v. 39, n. 2, p. 172-80, 2016.

TRIPATHI, D. K. An overview on manufactured nanoparticles in plants: Uptake, translocation, accumulation and phytotoxicity. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 110, p. 2-12, 2017.

- TURKEVICH, J.; STEVENSON, P. C.; HILLIER, J. Study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. **Discussions of the Faraday Society**, v. 11, p. 55-75, 1951.
- VALLILO, M. I. et al. Physical and chemical characteristics of cambucizeiro's fruits (*Campomanesia phaea*). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Lavras, v. 27, n. 2, p. 241-244, 2005.
- VANNINI, C. et al. Morphological and proteomic responses of *Eruca sativa* exposed to silver nanoparticles or silver nitrate. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7. p. e68752, 2013.
- VIGNESHWARAN, N. et al. Biological synthesis of silver nanoparticles using the fungus *Aspergillus flavus*. **Materials Letters**, v. 61, n. 6, p. 1413-1418, 2007.
- WANG, P. et al. Nanotechnology: A new opportunity in plant sciences. **Trends in Plant Science**, n. 21, v. 8, p. 699–712, 2016.
- WILLNER, I.; BARON, R.; WILLNER, B. Growing metal nanoparticles by enzymes. **Advanced Materials**, v. 18, n. 9, p. 1109-1120, 2006.
- XU, Y. M. et al. Withanolides from aeroponically grown *Physalis peruviana* and their selective cytotoxicity to prostate cancer and renal carcinoma cells. **Journal of Natural Products**, v. 80, n. 7, p. 1981-1991, 2017.
- SUN Y. P.; ATORNGITJAWAT, A. P.; MEZIANI, M. J. Preparation of silver nanoparticles via rapid expansion of water in carbon dioxide microemulsion into reductant solution. **Langmuir**, v. 17, n. 19, p. 5707-5710, 2001.
- YIN, L. et al. More than the Ions: The effects of silver nanoparticles on *Lolium multiflorum*. **Environmental Science and Technology**, v. 45, n. 6. p. 2360–67, 2011.
- ZHU, Z. J. et al. Effect of surface charge on the uptake and distribution of gold nanoparticles in four plant species. **Environmental Science and Technology**, v. 46, n. 22, p. 12391-1298, 2012.
- ZUVERZA-MENA, N. et al. Exposure of engineered nanomaterials to plants: Insights into the physiological and biochemical responses-A Review. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 110, p. 236-264, 2017.

## SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

### ARTIGO 1

Normas do periódico *Frontiers in Plant Science*

(Versão preliminar)

## **Concentrações de nanopartículas de prata no cultivo *in vitro* de *Physalis peruviana* L.**

Caroline de Oliveira Timoteo<sup>1\*</sup>, Renato Paiva<sup>1</sup>, Michele Valquíria dos Reis<sup>1</sup>, Pedro Ivo Cunha Claro<sup>2</sup>, Luthiane Machado Ferraz<sup>3</sup>, Jose Manoel Marconcini<sup>4</sup>, Juliano Elvis de Oliveira<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biologia, Setor de Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil.

<sup>2</sup>Programa de Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais (PPG-CEM), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil.

<sup>3</sup>Departamento de Engenharia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil.

<sup>4</sup>Laboratório de Nanotecnologia para o Agronegócio (LNNA), Embrapa Instrumentação, São Carlos, SP, Brasil.

\*E-mail para correspondência: carolineoliveira011@gmail.com

### **Resumo**

Com o advento da nanotecnologia e os constantes avanços na utilização de nanomateriais em diversos setores industriais, surgiram embates sobre a toxicidade desses materiais na cadeia trófica, visto que é inevitável o seu descarte no meio ambiente. O que torna importante compreender os impactos desses nanomateriais para as células vegetais, uma vez que as plantas são a base da cadeia alimentar. Nesse contexto, o presente estudo tem por objetivo elucidar os efeitos de nanopartículas de prata (AgNPs) no cultivo *in vitro* de *Physalis peruviana*. Para tal, sementes de *P. peruviana* foram cultivadas em meio MS (Murashige e Skoog) suplementado por diferentes concentrações de AgNPs (0,0; 0,385; 0,77; 1,54 e 15,4 mg L<sup>-1</sup>). Sendo avaliado o crescimento e desenvolvimento das plântulas, por meio de análises de crescimento (germinação, tamanho das plântulas e biomassa), bioquímicas e anatômicas. Ao final de 60 dias de cultivo foi observado que a germinação *in vitro* dessa espécie não é afetada pela presença de AgNPs e que em baixas concentrações (0,385 mg L<sup>-1</sup>) pode promover um aumento na biomassa das plântulas. No entanto, em concentrações mais elevadas (15,4 mg L<sup>-1</sup>) leva a uma redução no tamanho das plântulas e do sistema radicular, mas não foram observadas alterações no metabolismo antioxidante e na anatomia das

plântulas. A partir do exposto conclui-se que as AgNPs podem inibir ou estimular o crescimento das plantas a depender da concentração empregada.

**Palavras chave:** AgNPs, Nanomateriais, Nanotecnologia, Fitotoxicidade, Cultura de tecidos.

## 1. Introdução

Com o crescente desenvolvimento da nanotecnologia a aplicação de nanomateriais em vários campos expandiu significativamente. Os nanomateriais possuem uma ou mais dimensões na escala de 1 a 100 nm (Amenta et al., 2015). O que lhes confere novas propriedades, diferentes daquelas do átomo isolado e de sua dimensão em escala macrométrica (Albrecht et al., 2006).

Devido a essas propriedades únicas dos nanomateriais, uma grande variedade de materiais na escala nano, estão sendo desenvolvidos incluindo, nanotubos de carbono, nanopartículas de ferro, alumínio, cobre, ouro, prata, sílica, zinco, óxido de zinco, dióxido de titânio, entre outras.

Dentre os nanomateriais, as nanopartículas de prata são amplamente utilizadas devido as suas propriedades antimicrobianas, sendo relatado a presença de AgNPs em mais de 400 produtos comercializados (Vance et al., 2015). Com aplicações no tratamento de água e águas residuais (Ahmed et al., 2014; Loo et al., 2015), embalagens de alimentos (de Moura et al., 2012), medicina (Ge et al., 2014; Zhang et al., 2016), cuidados pessoais (Papakostas et al., 2011) e na agricultura (Prasad et al., 2017).

Diante dessa ampla utilização é inevitável que as AgNPs sejam lançadas ao meio ambiente, o que vem gerando preocupações acerca de possíveis consequências ambientais. Nesse contexto estudos vem sendo realizados a fim de avaliar a toxicidade de AgNPs em organismos vivos (Das et al., 2018; Jung et al., 2018) e principalmente em células vegetais, visto que, as plantas são a base da cadeia alimentar (Cvjetko et al., 2017; Li et al., 2018). No entanto ainda existem lacunas a respeito de seus efeitos em células vegetais, cujos resultados apresentam-se contraditórios, com efeitos positivos e negativos a depender da espécie vegetal, da concentração empregada e do tamanho da nanopartícula (Cox et al., 2017).

Entre os aspectos positivos, foi demonstrado que as AgNPs podem melhorar o crescimento e o desenvolvimento de *Solanum tuberosum* cultivado *in vitro* (Bagherzadeh Homae and Ehsanpour, 2015); estimular o crescimento de *Brassica Juncea* (Pandey et al. 2014; Sharma et al. 2012), *Phaseolus vulgaris* e *Zea mays* (Salama 2012), estimular o

crescimento radicular em *Eruca sativa* (Vannini et al., 2013), *Panicum virgatum* e *Phytolacca americana* (Yin et al., 2012) e aumentar o tempo de vida e a multiplicação dos brotos de explantes de *Tecomella undulata* cultivados *in vitro* (Sarmast et al., 2015). E ao inibir a proliferação de bactérias as AgNPs podem aumentar o tempo de vida de flores de *Gerbera jamesonii* cv. 'Dune' (Solgi et al., 2009) e de *Rosa hybrida* L. (Nazemi Rafi and Ramezani, 2013).

Em relação aos efeitos negativos foi relatado que as AgNPs reduziram significativamente o crescimento de *Cucumis sativus* L. (Tripathi et al., 2017a) e *Spirodela polyrhiza* ao afetar o desempenho fotossintético e aumentar o estresse oxidativo (Jiang et al., 2017), reduzir o crescimento e o teor de nutrientes em *Raphanus sativus* (Zuverza-mena et al., 2016), inibir o alongamento da raiz de *Arabidopsis thaliana* e a expansão da folha, o que resulta na diminuição da eficiência fotossintética, além de promover uma acumulação de íons  $Ag^+$  nos tecidos da planta (Sosan et al., 2016). As AgNPs também inibiram o crescimento, os pigmentos e a fotossíntese de *Pisium sativum* (Kumar et al., 2017) e induziram várias aberrações cromossômicas nas células mitóticas e meióticas de *Allium cepa* (Saha and Dutta Gupta, 2017).

Á vista disso fica evidente a necessidade de estudos a fim de compreender a influência das AgNPs nas células vegetais, com o intuito de avaliar os efeitos das nanopartículas no ambiente, uma vez que, a introdução de AgNPs é cada vez mais crescente em produtos de uso comum, que são inevitavelmente e descuidadamente descartados no ambiente.

Nesse contexto objetivou-se analisar o efeito de AgNPs no desenvolvimento *in vitro* de *Physalis peruviana* L. uma espécie com grande potencial para estudos de fitotoxicidade, visto que, apresenta propriedades físico-químicas já elucidadas na literatura, e pertence à família solanaceae, que abrange espécies de interesse comercial como a batata, o tomate e o tabaco.

## **2. Material e métodos**

### **2.1. Síntese das nanopartículas de prata**

As nanopartículas de prata (AgNPs) foram sintetizadas conforme metodologia descrita por (Turkevich et al., 1951) com adaptações. Foi preparada uma solução com Nitrato de prata ( $0,18 \text{ g L}^{-1}$ ) e carboximetilcelulose sódica ( $0,6 \text{ g L}^{-1}$ ), que permaneceu sob aquecimento e

agitação constantes. Ao atingir 95°C, foi adicionado a esta, uma solução aquosa de citrato de sódio (1%). A concentração da solução de AgNPs foi quantificada por espectroscopia de absorção de UV-VIS (modelo UV-1800, Shimadzu).

## 2.2. Caracterização das nanopartículas de prata

A solução estoque de nanopartícula de prata foi caracterizada por meio de Espalhamento dinâmico de luz (DLS) e potencial Zeta. E as análises morfológicas das AgNPs foram obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (MET).

O DLS e o potencial Zeta foram analisados em um equipamento Malvern 3000 Zetasizer durante 2 meses a fim de verificar a estabilidade das nanopartículas e o tamanho médio das AgNPs no decorrer do tempo de armazenamento. Para essas análises, 0,5 mL da solução estoque de AgNPs foi diluída em 100 ml de água deionizada e dispersada por sonificação em uma ponteira de ultrassom (Brason) por 1 minuto a potência de 450W.

A morfologia das AgNPs foi analisada após 15 dias de síntese, em um microscópio eletrônico de transmissão (Magellan 400L). As amostras foram diluídas na mesma metodologia para as análises de DLS e potencial Zeta. As suspensões foram depositadas em um grid de cobre 400 mesh.

## 2.3. Cultivo *in vitro* de *Physalis peruviana* L.

Sementes de *P. peruviana* foram retiradas manualmente de frutos maduros adquiridos em mercados locais. A mucilagem das sementes foi removida em água corrente e estas foram armazenadas em geladeira até o momento de utilização.

Em fluxo laminar as sementes foram desinfestadas primeiramente em álcool 70° GL por 30 segundos e posteriormente imersas em solução de 1% (v/v) de hipoclorito de sódio comercial e 2 gotas de tween 20 por 10 minutos. Após passarem por 3 enxágues em água deionizada autoclavada as sementes foram inoculadas em meio de cultura MS (Murashige and Skoog, 1962) acrescido de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e por diferentes concentrações de AgNPs (0,0; 0,385; 0,77; 1,54 e 15,4 mg L<sup>-1</sup>), e solidificado por 7 g L<sup>-1</sup> de ágar. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,7 ± 0,1 e submetido à esterilização em autoclave a temperatura de 121°C e 1 atm de pressão por 20 minutos.

Após a inoculação, o material foi transferido para sala de crescimento onde permaneceu durante 60 dias a uma temperatura de 25° C, em fotoperíodo de 16 horas

(lâmpadas fluorescentes de  $36 \mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) para germinação e desenvolvimento das plântulas até posterior avaliações.

#### **2.4. Análises de crescimento**

Após 45 dias de cultivo foram analisados a taxa de germinação das sementes, número de plantas normais, massa fresca e seca das plântulas, tamanho da parte aérea e raiz principal e teor de clorofila das plântulas obtidas. As plântulas foram consideradas normais quando apresentavam folhas completamente expandidas e raízes formadas.

A massa fresca (mg) foi obtida imediatamente após a retirada das plântulas dos tubos de ensaio e a massa seca (mg) após 24 horas de desidratação das plantas em estufa ( $100^{\circ}\text{C}$ ). O tamanho da parte aérea e da raiz principal foi obtido de forma automatizada pelo equipamento GroundEye®. E o teor de clorofila foi medido por um clorofilômetro portátil atLEAF.

#### **2.5. Microscopia de luz**

Para os estudos anatômicos, amostras foliares, caulinares e radiculares, com 60 dias de cultivo, foram coletadas e armazenadas em álcool 70% (v/v) até a realização dos cortes anatômicos. Para confecção das lâminas permanentes, amostras das folhas, caules e raízes foram seccionadas em cerca de  $0,5 \text{ cm}^2$  e estas foram desidratadas em série etílica crescente e incluídas em metacrilato (Historesina, Leica Instruments, Heidelberg, Alemanha).

Os cortes transversais das folhas, caule e raízes foram realizados em micrótomo manual com espessura de  $8 \mu\text{m}$ , corados com azul de toluidina (O'Brien et al., 1964) e as lâminas seladas utilizando verniz vitral incolor (Acrilex).

As lâminas confeccionadas foram observadas e fotografadas em microscópio Zeiss Scope AX10® acoplado à câmera digital e fotomicrografadas em software Axio Vision R.L. 4.8®. Foram analisadas a presença ou ausência de danos celulares.

#### **2.6. Análise bioquímica do metabolismo antioxidante e peroxidação lipídica**

Aos 60 dias de cultivo, amostras da parte aérea das plântulas foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a  $-80^{\circ} \text{C}$  para análises bioquímicas posteriores.

O extrato enzimático para análise bioquímica foi obtido pela maceração em nitrogênio líquido de 200 mg de material fresco da parte aérea das plântulas germinadas *in vitro*, ao qual



foi adicionado 1,5 mL do tampão de extração, composto por: tampão fosfato de potássio (400 mM) em pH 7,8; 15 µL de EDTA (10 mM); 75 µL de ácido ascórbico (200 mM) e 1035 µL de água (Biemelt, Keetman, and Albrecht 1998). O extrato foi centrifugado a 13.000 g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante coletado para análise da peroxidase do ascorbato (APX), conforme metodologia de Nakano and Asada (1981), catalase (CAT), segundo Havir and McHale (1987) e dismutase do superóxido (SOD) avaliada de acordo com Giannopolitis and Ries (1977).

A peroxidação lipídica foi determinada, conforme metodologia de Buege and Aust (1978), onde o material fresco da parte aérea (200 mg) das plântulas foi macerado em nitrogênio líquido, acrescido de PVPP e homogeneizado em 1,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (m/v). A peroxidação lipídica foi expressa em Nmol de MDA.g<sup>-1</sup>MF.

## **2.7. Delineamento estatístico**

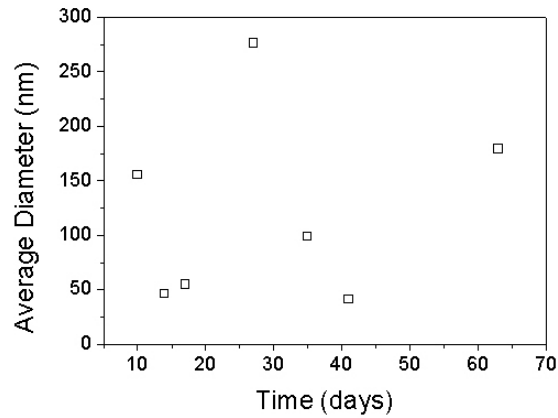
O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado (DIC). Com 30 repetições por tratamento, sendo considerada uma planta por repetição. Os dados foram analisados pelo programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2014).

## **3. Resultados**

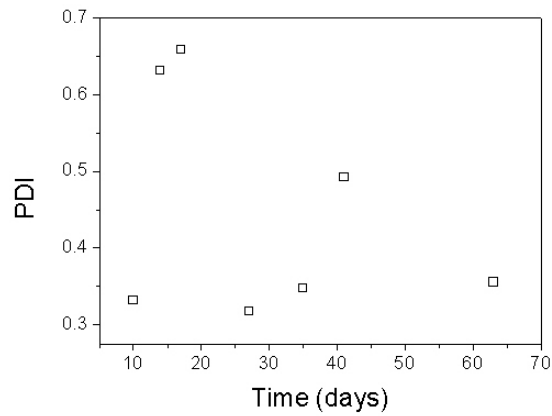
### **3.1. Caracterização das nanopartículas de prata**

A caracterização e a análise da estabilidade das AgNPs são importantes para avaliar o seu modo de ação em espécies vegetais. Visto que as respostas referentes ao efeito das nanopartículas em tecidos vegetais podem variar conforme o tamanho destas.

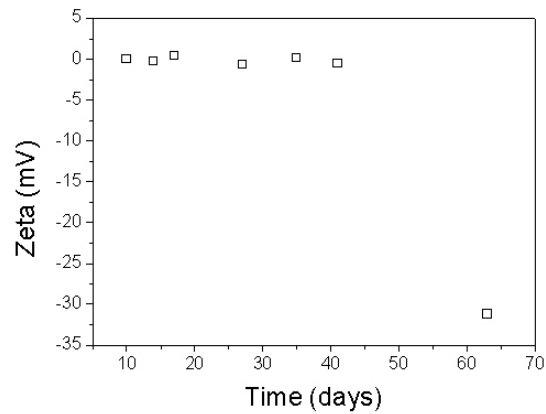
A distribuição do tamanho das AgNPs variou durante o período de armazenamento da solução sintetizada (Figura 1), apresentando um tamanho médio de 121,6 nm. O Índice de Polidispersividade também demonstrou uma variação na polidispersão das nanopartículas (Figura 2), com um valor médio de 0,45. E potencial Zeta, próximo de zero (Figura 3), indica uma solução que permanece instável durante o período de armazenamento. Essas características indicam que as nanopartículas de prata sintetizadas tendem a se agregar, o que acarreta no aumento do tamanho das nanopartículas.



**Figura 1.** Distribuição de tamanhos de Nanopartículas de prata (AgNPs) após períodos de armazenamento da solução sintetizada.

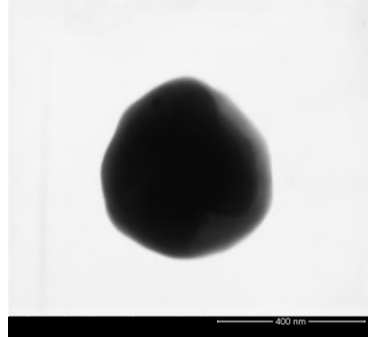


**Figura 2.** Índice de polidispersividade (PDI) de Nanopartículas de prata (AgNPs) após períodos de armazenamento da solução sintetizada.



**Figura 3.** Potencial Zeta de Nanopartículas de prata (AgNPs) após períodos de armazenamento da solução sintetizada.

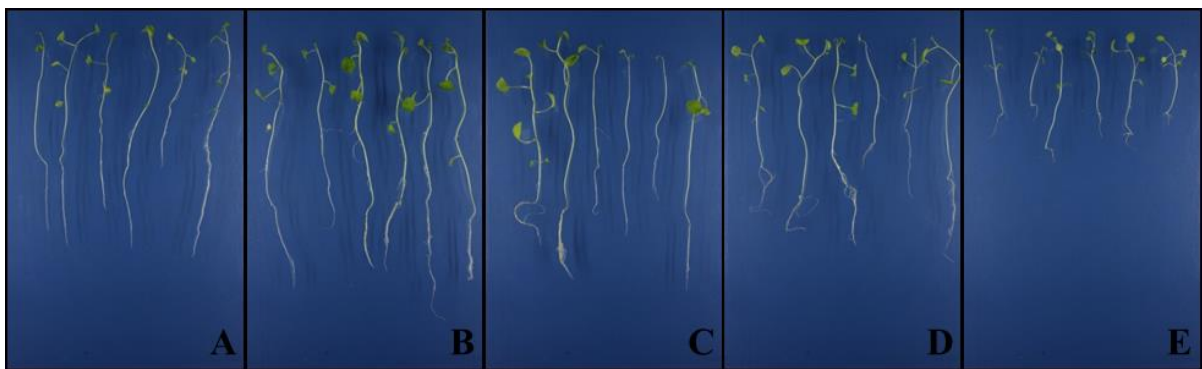
Por meio das imagens obtidas por meio da microscopia eletrônica de transmissão, realizada após 15 dias de armazenamento da solução estoque, foi observado que as AgNPs formadas pela síntese química, apresentaram uma morfologia esférica (Figura 4).



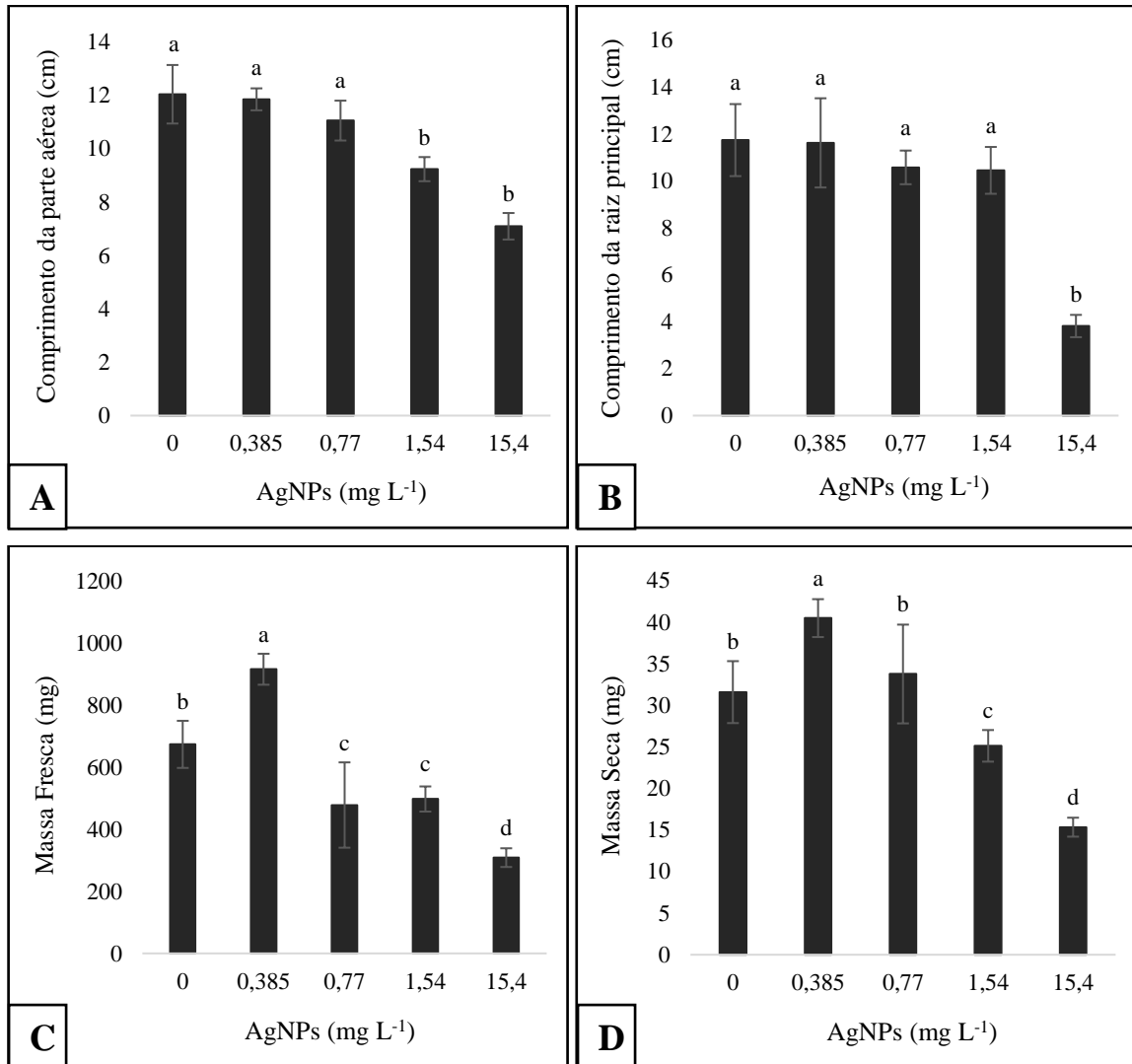
**Figura 4.** Morfologia das nanopartículas de prata (AgNPs), 15 dias após a síntese da solução estoque.

### 3.2. Análises de crescimento

A presença de AgNPs no meio de cultura não afetou a germinação *in vitro* de sementes de *P. peruviana*, visto que observou-se 100% de germinação e de plantas normais em todos os tratamentos (Figura 5). Entretanto, a exposição contínua às nanopartículas afetou o comprimento da parte aérea das plântulas obtidas nas maiores concentrações AgNPs (Figuras 5; 6A). Uma redução de 67% no comprimento das raízes foi observado na concentração de 15,4 mg L<sup>-1</sup> quando comparadas a plântulas cultivada na ausência de AgNPs (Figuras 5; 6B).



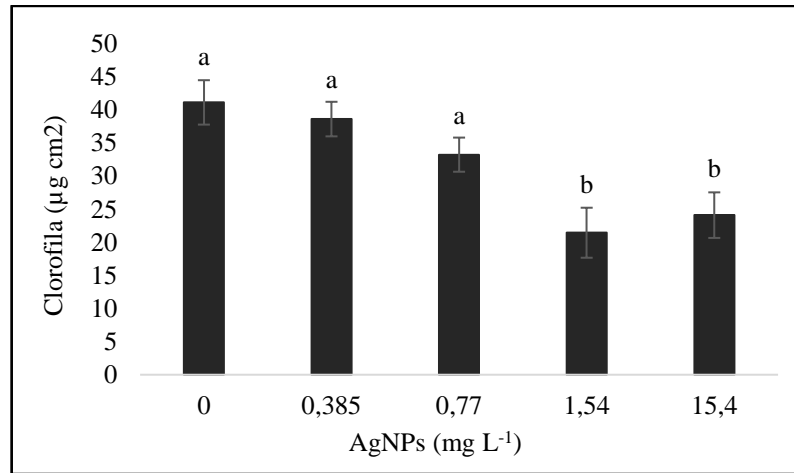
**Figura 5.** Plântulas de *Physalis peruviana* aos 45 dias de cultivo, submetidas a diferentes concentrações de AgNPs **A:** 0,0; **B:** 0,385; **C:** 0,77; **D:** 1,54 e **E:** 15,4 mg L<sup>-1</sup> de Nanopartículas de prata.



**Figura 6.** Comprimento da parte aérea (A), e da raiz (B), massa fresca (C) e massa seca (D) de plântulas de *Physalis peruviana* cultivadas *in vitro* na presença diferentes concentrações de nanopartículas de prata. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Plântulas expostas ao tratamento com 0,385 mg L<sup>-1</sup> de AgNPs apresentaram um aumento de cerca de 36% e 28 % em sua massa fresca e seca respectivamente, quando comparadas ao tratamento com ausência de nanopartículas (Figuras 6C; 6D). E correspondentemente, a massa fresca e seca das plântulas submetidas à 15,4 mg L<sup>-1</sup> de AgNPs foi reduzida em quase 50% quando comparadas ao tratamento com ausência de nanopartículas (Figuras 6C; 6D).

Uma redução significativa no teor de clorofila foi observada nas maiores concentrações (1,54 e 15,4 mg L<sup>-1</sup>) de nanopartículas de prata utilizadas (Figura 7).

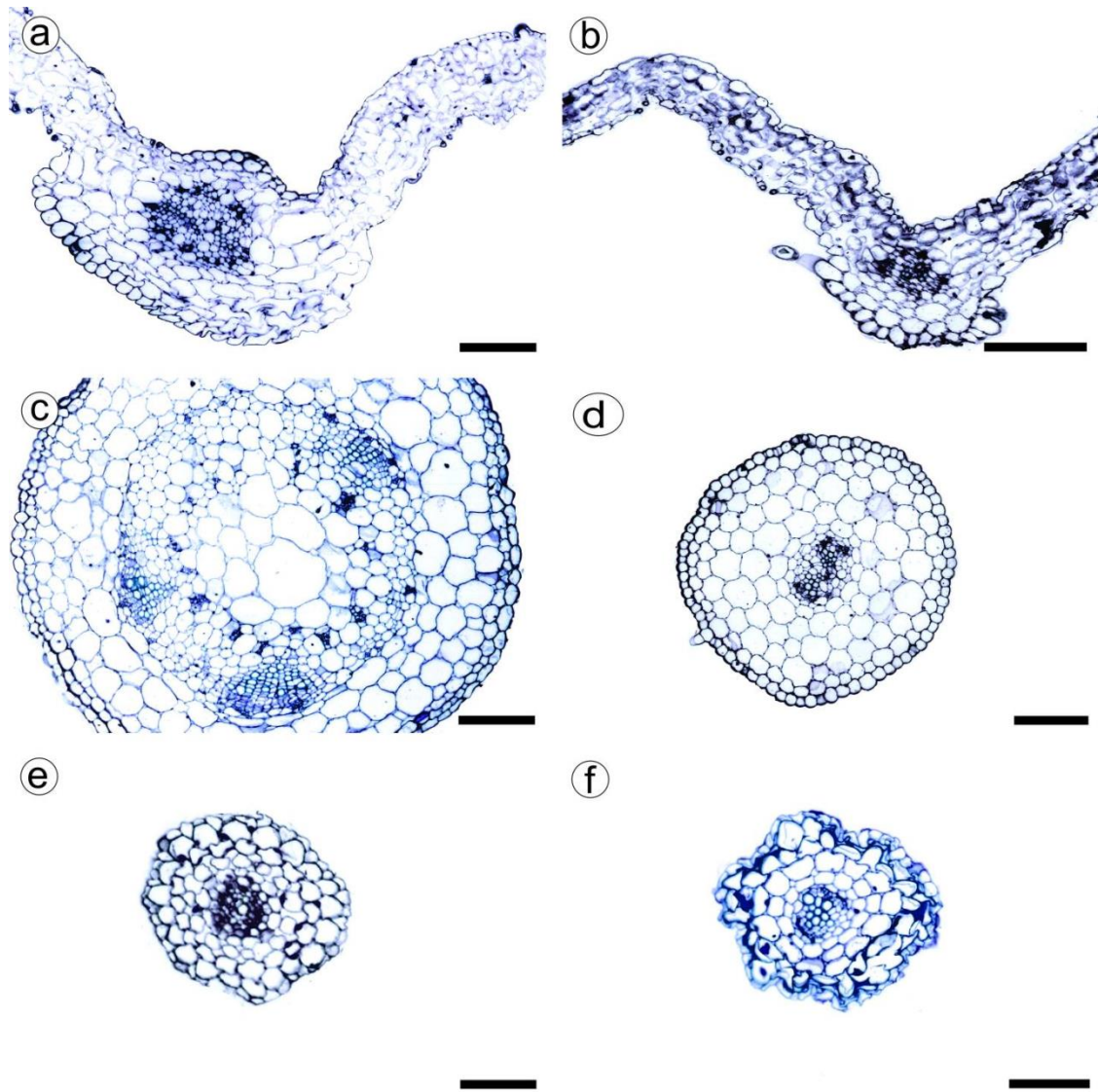


**Figura 7.** Teor de clorofila de folhas de *Physalis peruviana* cultivadas *in vitro* na presença de Nanopartículas de prata. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

### 3.3. Microscopia de luz

Observa-se que as folhas de *P. peruviana* cultivadas *in vitro* na presença de diferentes concentrações de AgNPs apresentam estômatos na face adaxial e abaxial, sendo classificadas como folhas anfiestomáticas, com os estômatos ocorrendo em maior quantidade na face abaxial. O parênquima apresentou células de formato irregular, com grandes espaços intercelulares, sendo difícil a classificação entre parênquima paliçádico e lacunoso devido ao ambiente de cultivo *in vitro* (Figuras 8A; 8D). Plantas cultivadas *in vitro* geralmente apresentam pouca diferenciação foliar e o mesofilo com alta proporção de espaços intercelulares (Wetzstein and Sommer, 1982).

Os caules e raízes apresentaram crescimento primário, e nos tratamentos com AgNPs foi observado a presença de estômatos nos caules. No tratamento com ausência de AgNPs observa-se um melhor desenvolvimento dos feixes vasculares nos caules, com formação evidente dos feixes ao redor da medula (Figuras 8B; 8E). Ademais não foram observados danos celulares nos cortes foliares, caulinares e radiculares de plantas cultivadas na presença de AgNPs, independentemente da concentração utilizada, em relação as plântulas cultivadas na ausência de AgNPs (Figura 8).



**Figura 8.** Cortes transversais de folha, caule e raiz de plântulas de *Physalis peruviana* cultivadas *in vitro* na presença de nanopartículas de prata (AgNPs). **A, C e E:** Cortes de folha, caule e raiz, respectivamente de plântulas cultivadas na ausência de AgNPs. **B, D e F:** Cortes de folhas, caule e raiz respectivamente de plântulas cultivadas em  $15,4 \text{ mg L}^{-1}$  de AgNPs. Barras:  $10 \mu\text{M}$ .

### 3.4. Análise bioquímica do metabolismo antioxidante e peroxidação lipídica

A exposição de plantas a AgNPs pode levar a geração de espécies reativas de oxigênio, assim a análise do metabolismo antioxidante é uma importante ferramenta para determinar os efeitos das nanopartículas nos tecidos vegetais.

Quanto à resposta das enzimas antioxidantes, a atividade da dismutase do superóxido (SOD) e da peroxidase do ascorbato (APX) não diferiu significativamente entre os

tratamentos. Entretanto, a atividade da catalase (CAT) apresentou-se menor nos tratamentos com 0,385 e 15,4 mg L<sup>-1</sup> de AgNPs (Tabela 1).

**Tabela 1.** Atividade das enzimas antioxidantes dismutase do superóxido (SOD), Atividade da catalase (CAT) e Atividade da peroxidase do ascorbato (APX).

Concentração de AgNPs (mg L <sup>-1</sup> )	SOD (mg <sup>-1</sup> MF)	CAT (μmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> MF)	APX (μmol AsA min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> MF)
0	0,88 a	1,91 a	10,68 a
0,385	0,82 a	1,25 b	9,54 a
0,77	0,84 a	2,26 a	12,15 a
1,54	0,86 a	2,01 a	8,38 a
15,4	0,80 a	0,83 b	10,51 a

\*As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Avaliações das taxas de peroxidação lipídica não mostraram alterações significativas nos níveis de MDA na parte aérea de *P. peruviana*, apresentando uma média de 229,3 ηmol MDA mg<sup>-1</sup> MF.

#### 4. Discussão

Foi observado que a exposição à AgNPs não afeta a germinação *in vitro* de *P. peruviana*, e que em baixas concentrações pode melhorar o desenvolvimento das plântulas *in vitro*, visto que a concentração de 0,385 mg L<sup>-1</sup> aumentou consideravelmente a biomassa das plântulas obtidas. Esse efeito dependente da dose também foi observado em *Arabidopsis thaliana* onde a exposição à AgNPs promoveu um aumento significativo de biomassa em concentrações de 1,0 e 2,5 mg L<sup>-1</sup>, e uma redução em exposições de 5,0 a 20 mg L<sup>-1</sup> (Kaveh et al., 2013). De forma semelhante em *Brassica juncea*, concentrações de 25 e 50 mg L<sup>-1</sup> aumentaram substancialmente o crescimento de plantas cultivadas *in vitro* na presença de AgNPs e mostraram-se tóxicas em maiores concentrações (Sharma et al., 2012).

Em estudo realizado por Syu et al. (2014) com *A. thaliana* observou-se que as AgNPs podem atuar como fitoestimuladoras, ao aumentar a acumulação de proteínas relacionadas ao ciclo celular, à biogênese do cloroplasto e ao metabolismo de carboidratos. Estas podem

afetar positivamente diferentes vias celulares de importantes processos nas células vegetais, promovendo portanto, um melhor desenvolvimento da planta em baixas concentrações.

No entanto, na concentração de 15,4 mg L<sup>-1</sup> as AgNPs mostraram-se prejudiciais ao desenvolvimento *in vitro* de raízes em plântulas de *P. peruviana*, posto que, observa-se uma redução de 67% no tamanho das raízes em plantas expostas a essa concentração. Reduções no sistema radicular também foram observadas em *Vicia faba* e *Zea mays*, onde raízes expostas à AgNPs apresentaram danos no seu desenvolvimento (Patlolla et al., 2012; Pokhrel and Dubey, 2013).

As raízes são os tecidos primários através dos quais as AgNPs entram nas plantas, sendo assim o órgão mais responsivo aos seus efeitos. Em *A. thaliana* foi relatado que as AgNPs acumulam-se nas células iniciais da columela da raiz, o que impede a divisão celular e consequentemente o crescimento das raízes (Geisler-Lee et al., 2012). Em relação ao transporte de AgNPs pelas raízes foi relatado a presença destas em plasmodesmos e na parede celular das raízes, o que resultaria em um bloqueio físico no transporte simplástico e interrupção da comunicação intercelular e consequentemente no transporte de nutrientes nesses locais (Geisler-Lee et al., 2014).

A vista desses resultados, a redução no tamanho das raízes observadas em *P. peruviana* quando exposta a 15,4 mg L<sup>-1</sup> de AgNPs, pode estar relacionado a esse acúmulo de AgNPs na columela. O que potencialmente impediria o crescimento das raízes e/ou a presença de AgNPs nos plasmodesmos impedindo o transporte de nutrientes nesses locais, visto que, também se observa uma redução de aproximadamente 50% de massa fresca nas plantas expostas a essa mesma concentração.

Foi observado que as AgNPs alteraram a absorção de íons metálicos, importantes para o desenvolvimento vegetativo (Qian et al., 2013). Em *Raphanus sativus* foi observado uma redução na absorção de Ca, Mg, B, Cu, Mn e Zn (Zuverza-mena et al., 2016). E em *Lycopersicon esculentum*, o teor de K, Na, NO<sub>3</sub> e Cl<sup>-</sup> foi reduzido quando as plantas foram expostas a AgNPs (Karami Mehrian and Karimi, 2017). O que também levaria a uma redução no desenvolvimento da planta, como foi observado em *P. peruviana*, a parte aérea das plantas foi reduzida quando expostas a 1,54 e 15,4 mg L<sup>-1</sup> de AgNPs.

O conteúdo de pigmentos fotossintéticos também pode ser afetado por AgNPs. Conforme observado em *P. peruviana* o teor de clorofila foi reduzido nos tratamentos com 1,54 e 15,4 mg L<sup>-1</sup> de AgNPs. Resultados semelhantes foram verificados em plantas de *Spirodela polyrhiza*, onde o conteúdo de pigmentos fotossintéticos diminuiu significativamente na presença de AgNPs (Jiang et al., 2012). E em plântulas de *A. thaliana* cujo teor de



clorofila também foi reduzido quando estas foram submetidas a AgNPs, foi observado alterações estruturais nos cloroplastos, e assim levar a alterações no metabolismo fotossintético e conseqüentemente afetar o desenvolvimento das plântulas (Nair and Chung 2014; Qian et al. 2013).

Em alguns casos, a fitotoxicidade de AgNPs pode estar associada a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e peroxidação lipídica (Hossain et al., 2015; Jiang et al., 2014). A superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e a ascorbato peroxidase (APX) são antioxidantes enzimáticos que catalisam a decomposição de EROs para evitar danos celulares. A SOD catalisa a remoção de  $O_2^-$  por decomposição em  $O_2$  e  $H_2O_2$  e as enzimas CAT e APX catalisam a dismutação de  $H_2O_2$  em  $H_2O$  e  $O_2$  (Das and Roychoudhury, 2014).

Em *Solanum tuberosum*, também pertencente à família Solanaceae foi relatado um aumento significativo das atividades da SOD, CAT, APX e glutathione redutase (GR) em decorrência do aumento do estresse oxidativo, causado pelo aumento das EROs, em plantas cultivadas *in vitro* na presença de AgNPs (Homaei and Ehsanpour, 2016).

Entretanto no presente estudo, não foram observadas diferenças significativas entre o tratamento controle e as demais concentrações de AgNPs em relação as enzimas SOD e APX.

Em mudas de *Brassica* sp. observou-se a inibição da APX e da CAT quando cultivadas na presença de AgNPs (Vishwakarma et al., 2017). E em *A. thaliana* a expressão de genes de enzimas antioxidantes também foram reprimidos a uma exposição contínua ou em altas concentrações de AgNPs (Qian et al., 2013). Na mesma espécie também não foram observadas a formação de EROs ( $H_2O_2$ ) em folhas e raízes de plantas expostas a 100  $\mu$ M de AgNP (Wen et al., 2016).

Todavia, no caso do presente estudo as culturas foram expostas a luz (60 dias), logo esse longo período de exposição sob irradiação luminosa poder ter alterado o tamanho das AgNPs e conseqüentemente diminuir sua toxicidade. Em *Tetrahymena pyriformis* foi analisado a influência da luz sobre a toxicidade de AgNPs, cujos resultados demonstraram que a irradiação da luz poderia induzir o crescimento de AgNPs e provocar uma aglomeração em massa, isso diminuiria a área de superfície e o número de íons  $Ag^+$  liberados de AgNPs, o que levaria portanto a uma menor toxicidade de AgNPs (Shi et al., 2012).

Diante disto, com uma menor taxa de toxicidade, o estresse oxidativo não seria observado aos 60 dias de cultivo em *P. peruviana*, o que poderia explicar, portanto, a atividade semelhante das enzimas do metabolismo antioxidante (SOD, CAT e APX) entre as plantas cultivadas na ausência e presença de AgNPs. Como já foi demonstrado a toxicidade

das AgNPs está intimamente relacionada ao tamanho e a concentração do nanomaterial no meio de cultivo (Wang et al., 2013).

Os resultados anatômicos demonstraram que as AgNPs não provocaram danos celulares em folhas, caules e raízes de plântulas de *P. peruviana*. Estes resultados corroboram com as análises de peroxidação lipídica, onde não foram observadas diferenças significativas entre as plântulas cultivadas na presença e ausência de AgNPs.

A partir dos resultados obtidos, observa-se que as AgNPs não se mostraram potencialmente tóxicas a *P. peruviana*, em baixas concentrações, fator este que pode estar relacionado à aglomeração das nanopartículas de prata provocadas pela exposição das culturas a radiação luminosa, ao tamanho das nanopartículas obtidas pela síntese química empregada, pelo tipo de revestimento de superfície das AgNPs utilizado no presente estudo (citrato de sódio) e também pela carga superficial das nanopartículas obtidas pelo potencial zeta. O Potencial zeta médio de -4,58 mV indica uma solução instável, como consequência tem-se uma maior agregação das nanopartículas, promovendo o aumento do seu tamanho e diminuindo a toxicidade de AgNPs.

Nanopartículas revestidas com citrato de sódio mostraram-se menos tóxicas do que AgNPs revestidas por brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) ou polivinilpirrolidona (PVP) em *Allium cepa*, ao promover a formação de nanopartículas de prata de tamanhos maiores durante a síntese (Cvjetko et al., 2017). Como já foi verificado AgNPs de tamanhos menores são mais tóxicas do que AgNPs de tamanhos maiores (Wang et al., 2013). E no presente estudo, as AgNPs apresentaram um tamanho médio de 121,6 nm.

Portanto devido ao seu maior tamanho, alto potencial de agregação que foi aumentado pela exposição à luz, as AgNPs sintetizadas nesse trabalho não apresentaram toxicidade as plântulas de *P. peruviana*, exceto em concentrações elevadas cujo efeito está relacionado a quantidade de íons de  $\text{Ag}^+$  liberados.

## 5. Conclusões

Baixas concentrações de AgNPs não afetam a germinação *in vitro* de *Physalis peruviana*, não causam danos celulares e podem promover um aumento da biomassa. No entanto em concentrações elevadas, o excesso de íons  $\text{Ag}^+$  afeta o crescimento e desenvolvimento das plântulas *in vitro*.

Os resultados deste estudo demonstram que a concentração de AgNPs influencia significativamente no efeito do nanomaterial no crescimento e desenvolvimento das plântulas cultivadas *in vitro*.

### **Agradecimentos**

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos, durante a qual foi executado o presente estudo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

Ao Laboratório Nacional de Nanotecnologia para o Agronegócio - Embrapa Instrumentação - São Carlos-SP, onde foi realizada a caracterização das Nanopartículas de prata.

### **Contribuições dos autores**

CT, MR planejaram o estudo, realizaram os experimentos, analisaram os resultados e redigiram o manuscrito.

RP Supervisor de pesquisa e responsável pela coordenação do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, contribuiu com conselhos científicos, corrigiu e revisou a versão final do manuscrito.

JO, JM auxiliaram no planejamento e supervisão do estudo, realizaram os experimentos, analisaram os resultados e corrigiram o manuscrito.

CT, PC, LF realizaram os experimentos e analisaram os resultados.

O MR foi responsável pela análise estatística e contribuiu com conselhos científicos.

Todos os autores leram e aprovaram o manuscrito final.

### **Declaração de conflito de interesse**

Os autores declaram que o presente estudo foi realizado na ausência de relações comerciais ou financeiras que possam resultar em um potencial conflito de interesse.

## Referências

- Ahmed, T., Imdad, S., Yaldram, K., Butt, N. M., and Pervez, A. (2014). Emerging nanotechnology-based methods for water purification: A review. *Desalin. Water Treat.* 52, 4089–4101. doi:10.1080/19443994.2013.801789.
- Albrecht, M. A., Evans, C. W., and Raston, C. L. (2006). Green chemistry and the health implications of nanoparticles. *Green Chem.* 8, 417. doi:10.1039/b517131h.
- Amenta, V., Aschberger, K., Arena, M., Bouwmeester, H., Botelho Moniz, F., Brandhoff, P., et al. (2015). Regulatory aspects of nanotechnology in the agri/feed/food sector in EU and non-EU countries. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 73, 463–476. doi:10.1016/J.YRTPH.2015.06.016.
- Bagherzadeh Homae, M., and Ehsanpour, A. A. (2015). Physiological and biochemical responses of potato (*Solanum tuberosum*) to silver nanoparticles and silver nitrate treatments under *in vitro* conditions. *Indian J. Plant Physiol.* 20, 353–359. doi:10.1007/s40502-015-0188-x.
- Biemelt, S., Keetman, U., and Albrecht, G. (1998). Re-aeration following hypoxia or anoxia leads to activation of the antioxidative defense system in roots of wheat seedlings. *Plant Physiol.* 116, 651–658. doi:10.1104/pp.116.2.651.
- Buege, J. A., and Aust, S. D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 52, 302–310. doi:10.1016/S0076-6879(78)52032-6.
- Cox, A., Venkatachalam, P., Sahi, S., and Sharma, N. (2017). Silver and titanium dioxide nanoparticle toxicity in plants : A review of current research. *Plant Physiol. Biochem.* 110, 33–49. doi:10.1016/j.plaphy.2016.08.007.
- Cvjetko, P., Milošić, A., Domijan, A.-M., Vinković Vrček, I., Tolić, S., Peharec Štefanić, P., et al. (2017). Toxicity of silver ions and differently coated silver nanoparticles in *Allium cepa* roots. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 137, 18–28. doi:10.1016/J.ECOENV.2016.11.009.
- Das, K., and Roychoudhury, A. (2014). Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Front. Environ. Sci.* 2, 53. doi:10.3389/fenvs.2014.00053.
- Das, P., Barua, S., Sarkar, S., Chatterjee, S. K., Mukherjee, S., Goswami, L., et al. (2018). Mechanism of toxicity and transformation of silver nanoparticles: Inclusive assessment in earthworm-microbe-soil-plant system. *Geoderma* 314, 73–84. doi:10.1016/J.GEODERMA.2017.11.008.
- de Moura, M. R., Mattoso, L. H. C., and Zucolotto, V. (2012). Development of cellulose-based bactericidal nanocomposites containing silver nanoparticles and their use as active food packaging. *J. Food Eng.* 109, 520–524. doi:10.1016/J.JFOODENG.2011.10.030.
- Ferreira, D. F. (2014). Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. *Ciência e Agrotecnologia* 38, 109–112. doi:10.1590/S1413-70542014000200001.

Ge, L., Li, Q., Wang, M., Ouyang, J., Li, X., and Xing, M. M. Q. (2014). Nanosilver particles in medical applications: Synthesis, performance, and toxicity. *Int. J. Nanomedicine* 9, 2399–407. doi:10.2147/IJN.S55015.

Geisler-Lee, J., Brooks, M., Gerfen, J., Wang, Q., Fotis, C., Sparer, A., et al. (2014). Reproductive toxicity and life history study of silver nanoparticle effect, uptake and transport in *Arabidopsis thaliana*. *Nanomaterials* 4, 301–318. doi:10.3390/nano4020301.

Geisler-Lee, J., Wang, Q., Yao, Y., Zhang, W., Geisler, M., Li, K., et al. (2012). Phytotoxicity, accumulation and transport of silver nanoparticles by *Arabidopsis thaliana*. *Nanotoxicology* 7, 323–337. doi:10.3109/17435390.2012.658094.

Giannopolitis, C. N., and Ries, S. K. (1977). Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiol.* 59, 309–14. doi:10.1104/PP.59.2.309.

Havir, E. A., and McHale, N. A. (1987). Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiol.* 84, 450–5. doi:10.1104/PP.84.2.450.

Homaee, M. B., and Ehsanpour, A. A. (2016). Silver nanoparticles and silver ions: Oxidative stress responses and toxicity in potato (*Solanum tuberosum* L.) Grown *in vitro*. *Hortic. Environ. Biotechnol* 57, 544–553. doi:10.1007/s13580-016-0083-z.

Hossain, Z., Mustafa, G., and Komatsu, S. (2015). Plant responses to nanoparticle stress. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 26644–26653. doi:10.3390/ijms161125980.

Jiang, H.-S., Li, M., Chang, F.-Y., Li, W., and Yin, L.-Y. (2012). Physiological analysis of silver nanoparticles and AgNO<sub>3</sub> toxicity to *Spirodela polyrhiza*. *Environ. Toxicol. Chem.* 31, 1880–1886. doi:10.1002/etc.1899.

Jiang, H.-S., Qiu, X.-N., Li, G.-B., Li, W., and Yin, L.-Y. (2014). Silver nanoparticles induced accumulation of reactive oxygen species and alteration of antioxidant systems in the aquatic plant *Spirodela polyrhiza*. *Environ. Toxicol. Chem.* 33, 1398–1405. doi:10.1002/etc.2577.

Jiang, H. S., Yin, L. Y., Ren, N. N., Zhao, S. T., Li, Z., Zhi, Y., et al. (2017). Silver nanoparticles induced reactive oxygen species via photosynthetic energy transport imbalance in an aquatic plant. *Nanotoxicology* 11, 157–167. doi:10.1080/17435390.2017.1278802.

Jung, Y., Metreveli, G., Park, C.-B., Baik, S., and Schaumann, G. E. (2018). Implications of pony lake fulvic acid for the aggregation and dissolution of oppositely charged surface-coated silver nanoparticles and their ecotoxicological effects on *Daphnia magna*. *Environ. Sci. Technol.* 52, 436–445. doi:10.1021/acs.est.7b04635.

Karami Mehrian, S., and Karimi, N. (2017). Biological testing of the chemically synthesized silver nano-particles for nitrate, chloride, potassium and sodium contents, and some physiological and biochemical characteristics of tomato plants. *Indian J. Plant Physiol.* 22, 48–55. doi:10.1007/s40502-016-0250-3.

Kaveh, R., Li, Y., Ranjbar, S., Tehrani, R., Brueck, C. L., and Aken, B. Van (2013). Changes

in *Arabidopsis thaliana* gene expression in response to silver nanoparticles and silver ions. *Environ. Sci. Technol.* 47, 10637-10644. doi:10.1021/es402209w.

Kumar, D., Singh, S., Singh, S., Kumar, P., Pratap, V., Singh, S., et al. (2017). Nitric oxide alleviates silver nanoparticles (AgNps)-induced phytotoxicity in *Pisum sativum* seedlings. *Plant Physiol. Biochem.* 110, 167–177. doi:10.1016/j.plaphy.2016.06.015.

Li, X., Ke, M., Zhang, M., Peijnenburg, W. J. G. M., Fan, X., Xu, J., et al. (2018). The interactive effects of diclofop-methyl and silver nanoparticles on *Arabidopsis thaliana*: Growth, photosynthesis and antioxidant system. *Environ. Pollution* 232, 212-219. doi:10.1016/j.envpol.2017.09.034.

Loo, S.-L., Krantz, W. B., Fane, A. G., Gao, Y., Lim, T.-T., and Hu, X. (2015). Bactericidal mechanisms revealed for rapid water disinfection by superabsorbent cryogels decorated with silver nanoparticles. *Environ. Sci. Technol.* 49, 2310–2318. doi:10.1021/es5048667.

Murashige, T., and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473–497. doi:10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.

Nair, P. M. G., and Chung, I. M. (2014). Physiological and molecular level effects of silver nanoparticles exposure in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Chem.* 112, 105–113. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.03.056.

Nakano, Y., and Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 22, 867–880. doi:10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232.

Nazemi Rafi, Z., and Ramezani, A. (2013). Vase life of cut rose cultivars “Avalanche” and “Fiesta” as affected by Nano-Silver and S-carvone treatments. *South African J. Bot.* 86, 68–72. doi:10.1016/J.SAJB.2013.02.167.

O’Brien, T. P., Feder, N., and McCully, M. E. (1964). Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* 59, 368–373. doi:10.1007/BF01248568.

Pandey, C., Khan, E., Mishra, A., Sardar, M., and Gupta, M. (2014). Silver nanoparticles and its effect on seed germination and physiology in *Brassica juncea* L. (Indian Mustard) plant. *Adv. Sci. Lett.* 20, 1673–1676. doi:10.1166/asl.2014.5518.

Papakostas, D., Rancan, F., Sterry, W., Blume-Peytavi, U., and Vogt, A. (2011). Nanoparticles in dermatology. *Arch. Dermatol. Res.* 303, 533–550. doi:10.1007/s00403-011-1163-7.

Patlolla, A. K., Berry, A., May, L., and Tchounwou, P. B. (2012). Genotoxicity of silver nanoparticles in *Vicia faba*: A pilot study on the environmental monitoring of nanoparticles. *International J. Environ. research and public health.* 9, 1649–1662. doi:10.3390/ijerph9051649.

Pokhrel, L. R., and Dubey, B. (2013). Science of the total environment evaluation of developmental responses of two crop plants exposed to silver and zinc oxide nanoparticles.

*Sci. Total Environ.* 452, 321–332. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.02.059.

Prasad, R., Bhattacharyya, A., and Nguyen, Q. D. (2017). Nanotechnology in sustainable agriculture: Recent developments, challenges, and perspectives. *Front. Microbiol.* 8, 1014. doi:10.3389/fmicb.2017.01014.

Qian, H., Peng, X., Han, X., Ren, J., Sun, L., and Fu, Z. (2013). Comparison of the toxicity of silver nanoparticles and silver ions on the growth of terrestrial plant model *Arabidopsis thaliana*. *J. Environ. Sci.* 25, 1947–1956. doi:10.1016/S1001-0742(12)60301-5.

Saha, N., and Dutta Gupta, S. (2017). Low-dose toxicity of biogenic silver nanoparticles fabricated by *Swertia chirata* on root tips and flower buds of *Allium cepa*. *J. Hazard. Mater.* 330, 18–28. doi:10.1016/J.JHAZMAT.2017.01.021.

Salama, H. M. H. (2012). Effects of silver nanoparticles in some crop plants, common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and corn (*Zea mays* L.). *Int Res J Biotechnol.* 3, 190-197.

Sarmast, M. K., Niazi, A., Salehi, H., and Abolimoghadam, A. (2015). Silver nanoparticles affect ACS expression in *Tecomella undulata* *in vitro* culture. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 121, 227–236. doi:10.1007/s11240-014-0697-8.

Sharma, P., Bhatt, D., Zaidi, M. G. H., Saradhi, P. P., Khanna, P. K., and Arora, S. (2012). Silver nanoparticle-mediated enhancement in growth and antioxidant status of *Brassica juncea*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 167, 2225–2233. doi:10.1007/s12010-012-9759-8.

Shi, J.-P., Ma, C.-Y., Xu, B., Zhang, H.-W., and Yu, C.-P. (2012). Effect of light on toxicity of nanosilver to *Tetrahymena pyriformis*. *Environ. Toxicol. Chem.* 31, 1630–1638. doi:10.1002/etc.1864.

Solgi, M., Kafi, M., Taghavi, T. S., and Naderi, R. (2009). Essential oils and silver nanoparticles (SNP) as novel agents to extend vase-life of gerbera (*Gerbera jamesonii* cv. “Dune”) flowers. *Postharvest Biol. Technol.* 53, 155–158. doi:10.1016/J.POSTHARVBIO.2009.04.003.

Sosan, A., Svistunenko, D., Straltsova, D., Tsiurkina, K., Smolich, I., Lawson, T., et al. (2016). Engineered silver nanoparticles are sensed at the plasma membrane and dramatically modify the physiology of *Arabidopsis thaliana* plants. *Plant J.* 85, 245–257. doi:10.1111/tpj.13105.

Syu, Y., Hung, J.-H., Chen, J.-C., and Chuang, H. (2014). Impacts of size and shape of silver nanoparticles on *Arabidopsis* plant growth and gene expression. *Plant Physiol. Biochem.* 83, 57–64. doi:10.1016/J.PLAPHY.2014.07.010.

Tripathi, A., Liu, S., Singh, P. K., Kumar, N., Pandey, A. C., Tripathi, D. K., et al. (2017a). Differential phytotoxic responses of silver nitrate (AgNO<sub>3</sub>) and silver nanoparticle (AgNps) in *Cucumis sativus* L. *Plant Gene* 11, 255–264. doi:10.1016/J.PLGENE.2017.07.005.

Tripathi, D. K., Shweta, Singh, S., Singh, S., Pandey, R., Singh, V. P., et al. (2017b). An overview on manufactured nanoparticles in plants: Uptake, translocation, accumulation and

phytotoxicity. *Plant Physiol. Biochem.* 110, 2–12. doi:10.1016/J.PLAPHY.2016.07.030.

Turkevich, J., Stevenson, P. C., and Hillier, J. (1951). A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discuss. Faraday Soc.* 11, 55. doi:10.1039/df9511100055.

Vance, M. E., Kuiken, T., Vejerano, E. P., McGinnis, S. P., Hochella, M. F., Rejeski, D., et al. (2015). Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein J. Nanotechnol.* 6, 1769–1780. doi:10.3762/bjnano.6.181.

Vannini, C., Domingo, G., Onelli, E., Prinsi, B., Marsoni, M., Espen, L., et al. (2013). Morphological and proteomic responses of *Eruca sativa* exposed to silver nanoparticles or silver nitrate. *PLoS One* 8, e68752. doi:10.1371/journal.pone.0068752.

Vishwakarma, K., Shweta, Upadhyay, N., Singh, J., Liu, S., Singh, V. P., et al. (2017). Differential phytotoxic impact of plant mediated silver nanoparticles (AgNPs) and silver nitrate (AgNO<sub>3</sub>) on *Brassica* sp. *Front. Plant Sci.* 8, 1501. doi:10.3389/fpls.2017.01501.

Wang, J., Koo, Y., Alexander, A., Yang, Y., Westerhof, S., Zhang, Q., et al. (2013). Phytostimulation of poplars and *Arabidopsis* exposed to silver nanoparticles and Ag<sup>+</sup> at sublethal concentrations. *Environ. Sci. Technol.* 47, 5442–5449. doi:10.1021/es4004334.

Wen, Y., Zhang, L., Chen, Z., Sheng, X., Qiu, J., and Xu, D. (2016). Co-exposure of silver nanoparticles and chiral herbicide imazethapyr to *Arabidopsis thaliana*: Enantioselective effects. *Chem.* 145, 207–214. doi:10.1016/j.chemosphere.2015.11.035.

Wetzstein, H. Y., and Sommer, H. E. (1982). Leaf anatomy of tissue-cultured *Liquidambar styraciflua* (Hamamelidaceae) during acclimatization. *Am. J. Bot.* 69, 1579. doi:10.2307/2442913.

Yin, L., Colman, B. P., McGill, B. M., Wright, J. P., and Bernhardt, E. S. (2012). Effects of silver nanoparticle exposure on germination and early growth of eleven wetland plants. *PLoS One* 7, e47674. doi:10.1371/journal.pone.0047674.

Zhang, X.-F., Liu, Z.-G., Shen, W., and Gurunathan, S. (2016). Silver nanoparticles: Synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 1534. doi:10.3390/ijms17091534.

Zuverza-mena, N., Armendariz, R., and Peralta-vidua, J. R. (2016). Effects of silver nanoparticles on *Radish sprouts*: Root growth reduction and modifications in the nutritional value. 7, 1–11. doi:10.3389/fpls.2016.00090.



**ARTIGO 2**

Normas do periódico Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)

(Versão preliminar)

**Nanopartículas de prata na micropropagação de *Campomanesia rufa* (O. Berg) Nied.**Caroline de Oliveira Timoteo<sup>1\*</sup>, Renato Paiva<sup>1</sup>, Michele Valquíria dos Reis<sup>1</sup>, Pedro Ivo Cunha Claro<sup>2</sup>, Diogo Pedrosa Corrêa da Silva<sup>3</sup>, Jose Manoel Marconcini<sup>4</sup>, Juliano Elvis de Oliveira<sup>5</sup><sup>1</sup>Departamento de Biologia, Setor de Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil.<sup>2</sup>Programa de Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais (PPG-CEM), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil.<sup>3</sup>Departamento de Agricultura, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil.<sup>4</sup>Laboratório de Nanotecnologia para o Agronegócio (LNNA), Embrapa Instrumentação, São Carlos, SP, Brasil.<sup>5</sup>Departamento de Engenharia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil.

\*E-mail para correspondência: carolineoliveira011@gmail.com

**Resumo**

Com o avanço da nanotecnologia, os nanomateriais começaram a ser empregados em diferentes ramos da ciência, incluindo a cultura de tecidos. Dentre os nanomateriais as nanopartículas de prata (AgNPs) são amplamente utilizadas devido aos seus efeitos antibactericidas. No entanto ainda pouco se sabe sobre seus efeitos no cultivo *in vitro* de espécies vegetais. Nesse contexto o presente estudo tem por objetivo analisar os efeitos de AgNPs na propagação *in vitro* de *Campomanesia rufa* (O. Berg) Nied, uma espécie frutífera do Cerrado. Segmentos nodais de plântulas de *C. rufa* estabelecidas *in vitro*, foram seccionados e cultivados em meio de multiplicação MS para indução de brotações. O meio MS foi suplementado por BAP (5,62  $\mu\text{M}$ ), diferentes concentrações de nanopartículas de prata (0,0; 0,385; 0,77; 1,54 e 15,4  $\text{mg L}^{-1}$ ) ou nitrato de prata (0,18  $\text{g L}^{-1}$ ). As AgNPs foram sintetizadas e caracterizadas em função do tempo para se compreender seu comportamento durante os ensaios de micropropagação no meio de cultura. Os brotos formados foram analisados quanto ao número, altura e peso fresco. E também foram realizadas avaliações bioquímicas e microscopia de luz e eletrônica de varredura. As AgNPs nas menores concentrações não afetaram a multiplicação *in vitro* de *C. rufa*, visto que não foram

observadas diferenças significativas entre os tratamentos com 0,385; 0,77 e 1,54 mg L<sup>-1</sup> de AgNPs em relação ao controle, quanto ao número, altura e peso fresco dos brotos formados, entretanto nos tratamentos com 15,4 mg L<sup>-1</sup> de AgNPs e nitrato de prata observou-se uma redução no número de brotos. Não foram observadas alterações bioquímicas, morfológicas e anatômicas nos brotos formados, independentemente da concentração de AgNP ou nitrato de prata. Os dados da caracterização de AgNPs demonstram que o processo de aquecimento para esterilização do meio de cultivo, promove uma aglomeração das AgNPs, aumentando, portanto, seu tamanho. Dessa forma conclui-se que as AgNPs não afetaram a multiplicação *in vitro* de *C. rufa*, em baixas concentrações, mas podem causar mais danos ao desenvolvimento vegetal do que o AgNO<sub>3</sub> a depender da concentração empregada.

**PALAVRAS CHAVE:** AgNP, Nanotecnologia, Gabiroba, Cultura de tecidos.

## 1. Introdução

Os nanomateriais possuem propriedades físico-químicas únicas que os diferem distintamente de suas contrapartes macroscópicas ou mesmo iônicas. Essas propriedades geralmente resultam do tamanho pequeno, forma, composição química, elevada área superficial e reatividade (Ma et al. 2010). Dadas essas propriedades únicas, os nanomateriais têm sido amplamente utilizados para melhorar a germinação das sementes, (Lahiani et al. 2013; Siddiqui and Al-Whaibi 2014), aumentar o crescimento e o rendimento das plantas (Kole et al. 2013), possibilitar modificações genética em células vegetais (Torney et al. 2007) e melhorar a eficiência fotossintética (Sharma et al. 2012).

Na cultura de tecidos de plantas, há indicativos positivos da utilização da nanotecnologia. Nanopartículas de ferro, por exemplo, melhoraram o desenvolvimento *in vitro* de plântulas de morango submetidas à estresse hídrico (Mozafari et al. 2018). E nanopartículas de CuO estimularam a produção *in vitro* de compostos bioativos em *Stevia rebaudiana* (Javed et al. 2017) e *Brassica rapa* spp. *pekinensis* (Chung et al. 2018).

E tendo em vista que o sucesso *in vitro* de uma cultura vegetal depende de uma gama de fatores, incluindo o tipo de meio de cultura e reguladores de crescimento vegetais para efetivamente conseguir micropropagar espécies de interesse (Satish et al. 2015; Venkatachalam et al. 2015; Scalzo et al. 2016; Yu et al. 2017). A aplicação de nanomateriais seria uma alternativa para otimizar protocolos de embriogênese somática, organogênese, indução de brotos e raízes, desinfecção superficial de explantes para o cultivo *in vitro*,

produção de metabolitos secundários e até mesmo melhorar a variação somaclonal dos explantes *in vitro* (Kim et al. 2017).

Dentre os nanomateriais as nanopartículas de prata (AgNPs), devido as suas propriedades fisiológicas atraentes e sua reconhecida ação antimicrobiana tem despertado interesse em processos de desinfecção superficial de explantes para o cultivo *in vitro* (Sarmast and Salehi 2016). Mostrando-se eficientes na redução da contaminação bacteriana em *Vanilla planifolia* Jacks. Ex Andrews (Spinoso-Castillo et al. 2017) e no controle de contaminantes para o cultivo *in vitro* de *Valeriana officinalis* (Abdi et al. 2008) e *Olea europaea* (Rostami and Shamsavar 2009).

As AgNPs também foram eficientes na multiplicação *in vitro* de *Alternanthera sessilis* L. (Venkatachalam et al. 2017), na indução de embriogênese somática e regeneração de plantas de *Gloriosa superba* L. (Mahendran et al. 2017) e através da melhora no estado antioxidante de *Brassica juncea* promoveu seu crescimento *in vitro* (Sharma et al. 2012).

E além de atuarem diretamente na propagação *in vitro*, as nanopartículas de prata também podem atuar como inibidoras do hormônio etileno (Syu et al. 2014; Sarmast et al. 2015). Este fitohormônio é acumulado nos recipientes de cultivo e pode afetar o crescimento e desenvolvimento *in vitro* de algumas espécies (Biddington 1992).

No entanto, as respostas da exposição de nanopartículas de prata em organismos vegetais têm sido estudadas principalmente em relação à toxicidade (Cvjetko et al. 2017), e pouca atenção tem sido dada à possibilidade das nanopartículas de prata ajudarem no crescimento *in vitro* de espécies vegetais.

Nesse contexto, o presente estudo tem por objetivo analisar o efeito de nanopartículas de prata na micropropagação de *Campomanesia rufa* (O. Berg) Nied, uma espécie frutífera do Cerrado, com potencial para comercialização alimentícia, mas que apresenta dificuldades de propagação em ambiente natural.

## **2. Material e métodos**

### **2.1. Síntese de nanopartículas de prata**

As nanopartículas de prata (AgNPs) foram sintetizadas conforme metodologia descrita por Turkevich (1951) com adaptações. Foi preparada uma solução com Nitrato de prata (0,18 g L<sup>-1</sup>) e carboximetilcelulose sódica (0,6 g L<sup>-1</sup>), que permanecerá sob aquecimento e agitação constantes. Ao atingir 95°C, foi adicionado a esta, uma solução aquosa de citrato de sódio

(1%). A concentração da solução de Nanopartículas de prata foi quantificada por espectroscopia de absorção de UV-VIS (modelo UV-1800, Shimadzu).

## 2.2. Caracterização das nanopartículas de prata

O meio de cultura contendo a solução de Nanopartícula de prata nas concentrações correspondentes, após autoclavagem, foram caracterizados por meio de Espalhamento Dinâmico de Luz e Potencial Zeta, realizados no equipamento Malvern 3000 Zetasizer.

Para análises das soluções, 0,5 ml das suspensões das amostras foram adicionadas em 100 ml de água deionizada, sonificadas em ponteira de ultrassom (Brason) por 1 minuto a potência de 450W.

## 2.3. Indução de brotações

Brotações (4 cm) induzidas a partir de plântulas estabelecidas *in vitro* de *Campomanesia rufa*, foram transferidos para meio de multiplicação: meio de cultura MS (Murashige and Skoog 1962) acrescido de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 5,62 µM de BAP (6-Benzylaminopurine), suplementado por diferentes concentrações de nanopartículas de prata (0,0 mg L<sup>-1</sup>, 0,385 mg L<sup>-1</sup>, 0,77 mg L<sup>-1</sup>, 1,54 mg L<sup>-1</sup> e 15,4 mg L<sup>-1</sup>) ou Nitrato de prata na concentração de 0,18 g L<sup>-1</sup>, que corresponde a mesma concentração empregada para síntese da solução estoque de AgNPs. Essa concentração equivale a 0,114 g L<sup>-1</sup> de íons Ag<sup>+</sup>.

O Meio de cultura foi solidificado por 7,0 g L<sup>-1</sup> de ágar, o pH ajustado para 5,7 ± 0,1 antes da autoclavagem e submetido à esterilização em autoclave a temperatura de 121°C e 1 atm de pressão por 20 minutos.

A cultura foi mantida em sala de crescimento, durante 90 dias, a uma temperatura de 25° C, em fotoperíodo de 16 horas (lâmpadas fluorescentes de 36 µmol de fótons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) para multiplicação dos brotos e posteriores avaliações de crescimento, bioquímica e microscopia de luz e varredura.

### 2.3.1. Análises de crescimento

Ao final de 90 dias foi analisado o número e tamanho dos brotos formados e a massa fresca total das brotações. O tamanho dos brotos foi aferido com auxílio de uma régua.

### 2.3.2. Análise bioquímica do metabolismo antioxidante

Aos 90 dias de cultivo amostras dos brotos formados foram retiradas para análises bioquímicas e armazenados em freezer a - 80° C até a realização das análises.

O extrato enzimático para análise bioquímica foi obtido pela maceração em nitrogênio líquido de 200 mg de material fresco da parte aérea dos brotos formados, ao qual foi adicionado 1,5 mL do tampão de extração, composto por: tampão fosfato de potássio (400 mM) em pH 7,8; 15 µL de EDTA (10 mM); 75 µL de ácido ascórbico (200 mM) e 1035 µL de água (Biemelt, Keetman, and Albrecht 1998). O extrato foi centrifugado a 13.000 g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante coletado para análise da dismutase do superóxido (SOD) avaliada de acordo com Giannopolitis and Ries (1977).

A atividade da SOD foi avaliada pela capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio, NBT, (Giannopolitis and Ries 1977). Alíquotas de 5 mL do sobrenadante referente aos tratamentos com diferentes concentrações de AgNPs e Nitrato de prata, foram adicionadas ao meio de incubação contendo tampão fosfato de potássio 100 mM e pH 7,8, metionina 70 mM, EDTA 10 µM, NBT 1 mM, Riboflavina 0,2 mM e água. As amostras e o controle, composto pelo mesmo meio de reação sem a amostra, foram iluminados com lâmpada fluorescente de 20 W por 7 minutos. A leitura foi realizada a 560 nm, onde uma unidade da SOD corresponde à quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a fotorredução do NBT nas condições do ensaio.

### 2.3.3. Microscopia de luz

Para os estudos anatômicos, amostras foliares e caulinares com 90 dias de cultivo, foram coletadas e armazenadas em álcool 70% (v/v) até a realização dos cortes anatômicos. Para confecção das lâminas, amostras das folhas e caules foram seccionadas em cerca de 0,5 cm<sup>2</sup> e estas foram desidratadas em série etílica crescente e incluídas em metacrilato (Historesina, Leica Instruments, Heidelberg, Alemanha).

Os cortes transversais das folhas e caules foram realizados em micrótomo manual com espessura de 8µm, corados com azul de toluidina (O'Brien et al. 1964) e para confecção de lâminas permanentes, estas foram seladas utilizando verniz vitral incolor (Acrilix).

As lâminas confeccionadas foram observadas e fotografadas em microscópio Zeiss Scope AX10® acoplado à câmera digital e fotomicrografadas em software Axio Vision R.L. 4.8®. Foram analisadas a presença ou ausência de danos celulares.

#### 2.3.4. Microscopia eletrônica de varredura

Segmentos foliares e caulinares dos brotos obtidos foram fixados em solução aquosa de Karnovsk por 24 horas, posteriormente o material permaneceu em glicerol por 30 minutos. Após esse período, os segmentos caulinares e foliares foram segmentados em nitrogênio líquido. Em seguida realizou-se a desidratação em série crescente de acetona (25, 50, 75 e 100%), por um período de 10 minutos.

Na etapa seguinte o material foi levado ao equipamento de ponto crítico para secagem com CO<sub>2</sub>, e os cortes foram aderidos aos *stubs* e recobertos por uma camada de ouro metálico.

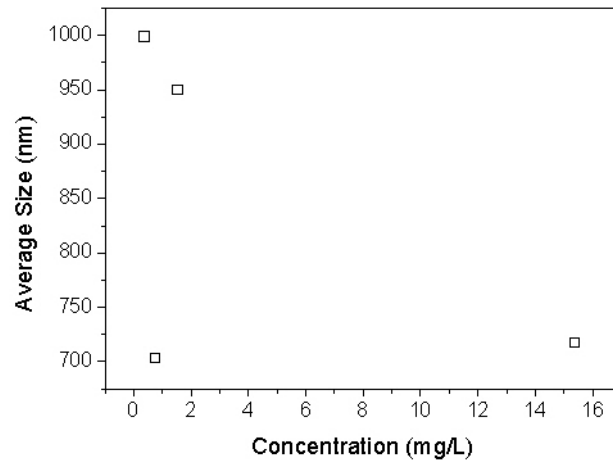
Os segmentos foram observados em microscópio eletrônico de varredura JEOL T200.

### 3. Resultados

#### 3.1. Caracterização das nanopartículas de prata

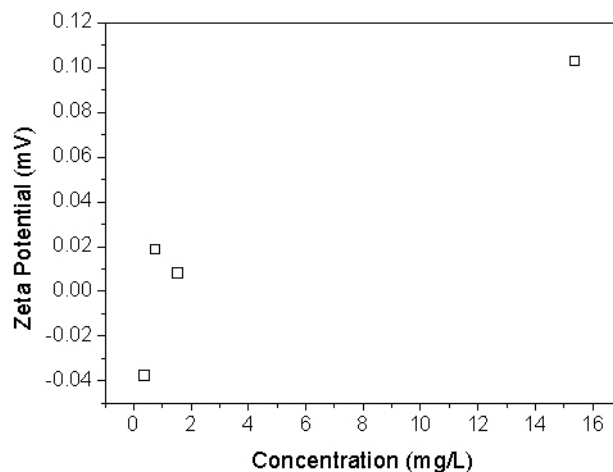
Com a análise de EDS verificou-se a presença de nanopartículas de prata no meio de cultivo tanto na menor (0,385 mg L<sup>-1</sup>) quanto na maior (15,4 mg L<sup>-1</sup>) concentração, o que indica a presença de íons prata no meio de cultivo utilizado para indução de brotações em *C. rufa*.

As AgNPs presentes no meio de cultura apresentaram tamanhos superiores em comparação as AgNPs da solução estoque (155,2 nm). Esse aumento de tamanho está relacionado a autoclavagem do meio de cultura. O aquecimento elevado (121 ° C) para esterilização promoveu a aglomeração dessas nanopartículas, o que resultou no aumento de tamanho das AgNPs em detrimento da solução estoque de AgNPs não autoclavada (Figura 1).

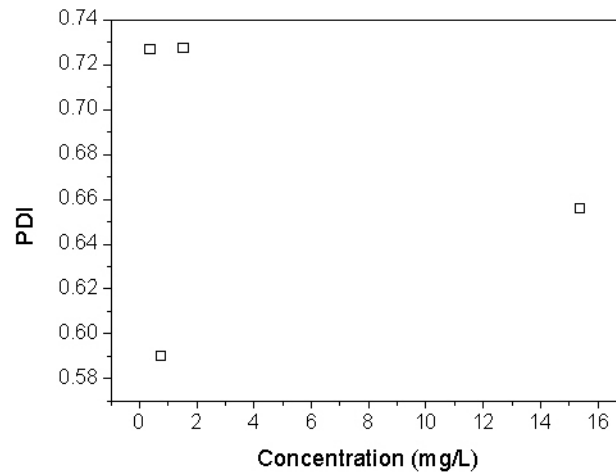


**Figura 1.** Diâmetro médio das AgNPs nas concentrações  $0,385 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $0,77 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $1,54 \text{ mg L}^{-1}$  e  $15,4 \text{ mg L}^{-1}$  no meio de cultura após autoclavagem, 10 dias após a síntese.

O Potencial Zeta, próximo de zero, e o índice de polidispersividade (PDI) revelam que a solução sintetizada apresenta-se instável e tende a agregar-se. A instabilidade da solução, associada à alta temperatura a qual as AgNPs foram submetidas para esterilização do meio de cultura, são fatores que contribuiriam para o aumento das AgNPs (Figuras 2 e 3).



**Figura 2.** Potencial Zeta das AgNPs, nas concentrações de  $0,385 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $0,77 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $1,54 \text{ mg L}^{-1}$  e  $15,4 \text{ mg L}^{-1}$  no meio de cultura, após autoclavagem, 10 dias após a síntese.



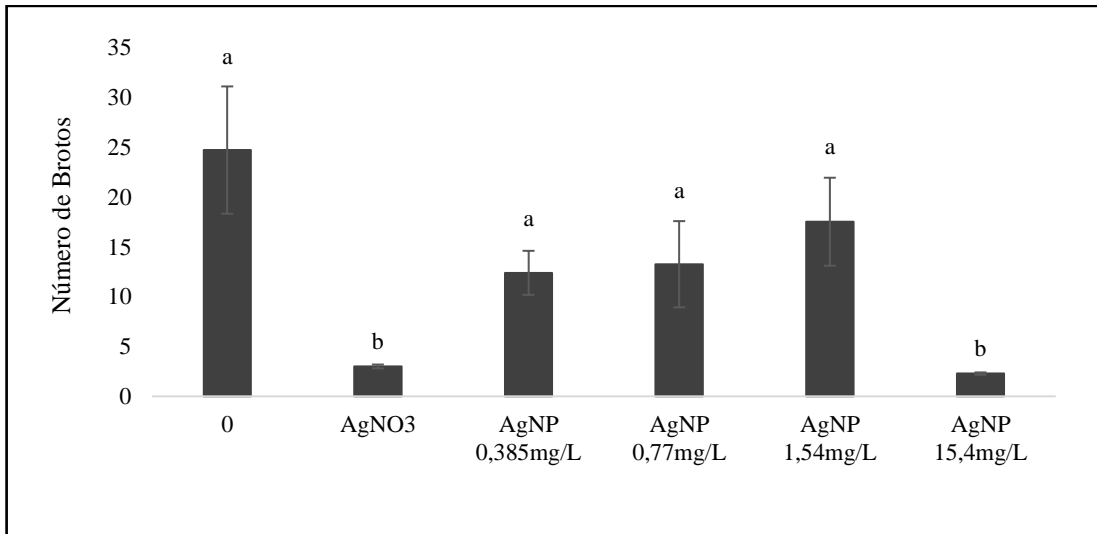
**Figura 3.** Índice de polidispersividade das AgNPs, nas concentrações de 0,385 mg L<sup>-1</sup>, 0,77 mg L<sup>-1</sup>, 1,54 mg L<sup>-1</sup> e 15,4 mg L<sup>-1</sup> no meio de cultura, após autoclavagem, 10 dias após a síntese.

### 3.2. Análises de crescimento

A exposição de segmentos nodais de *C. rufa* à diferentes concentrações de AgNPs não alterou a indução de brotações nas concentrações de 0,385, 0,77 e 1,54 mg L<sup>-1</sup>, quando comparadas ao tratamento com ausência de AgNPs. No entanto, na concentração de 15,4 mg L<sup>-1</sup> e no tratamento com nitrato de prata ocorreu uma redução de aproximadamente 90% no número de brotos obtidos (Figuras 4, 5).

Consequentemente com a redução no número de brotos, a massa fresca total também foi reduzida em cerca de 80% nos tratamentos com nitrato de prata e com 15,4 mg L<sup>-1</sup> de AgNPs, quando comparados ao tratamento com ausência da prata (Figura 6). Entretanto, o comprimento dos brotos obtidos não foi alterado pela exposição às nanopartículas de prata, apresentando um tamanho médio de 1,1 cm.

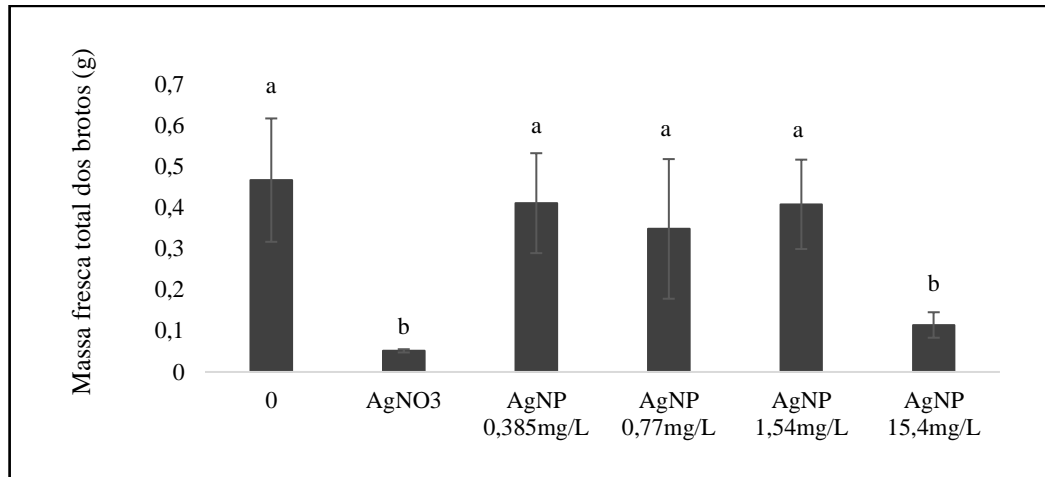




**Figura 4.** Números de brotos obtidos de *Campomanesia rufa* aos 90 dias de cultivo, induzidos a partir de BAP (5,6  $\mu\text{M}$ ) e submetidos a Nitrato de prata (180  $\text{mg L}^{-1}$ ) ou diferentes concentrações de Nanopartículas de prata (0,385, 0,77, 1,54 e 15,4  $\text{mg L}^{-1}$ ). As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.



**Figura 5.** Aparência dos brotos de *Campomanesia rufa* aos 90 dias de cultivo induzidos a partir de BAP (5,6  $\mu\text{M}$ ) e submetidos a diferentes concentrações de Nanopartículas de prata. Da esquerda para direita, 0,0; 180  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{AgNO}_3$ ; 0,385; 0,77; 1,54 e 15,4  $\text{mg L}^{-1}$  de Nanopartículas de prata, respectivamente.



**Figura 6.** Massa fresca total dos brotos obtidos de *Campomanesia rufa* aos 90 dias de cultivo, induzidos a partir de BAP (5,6  $\mu\text{M}$ ) e submetidos a Nitrato de prata (0,18  $\text{g L}^{-1}$ ) ou diferentes concentrações de Nanopartículas de prata (0,385, 0,77, 1,54 e 15,4  $\text{mg L}^{-1}$ ). As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

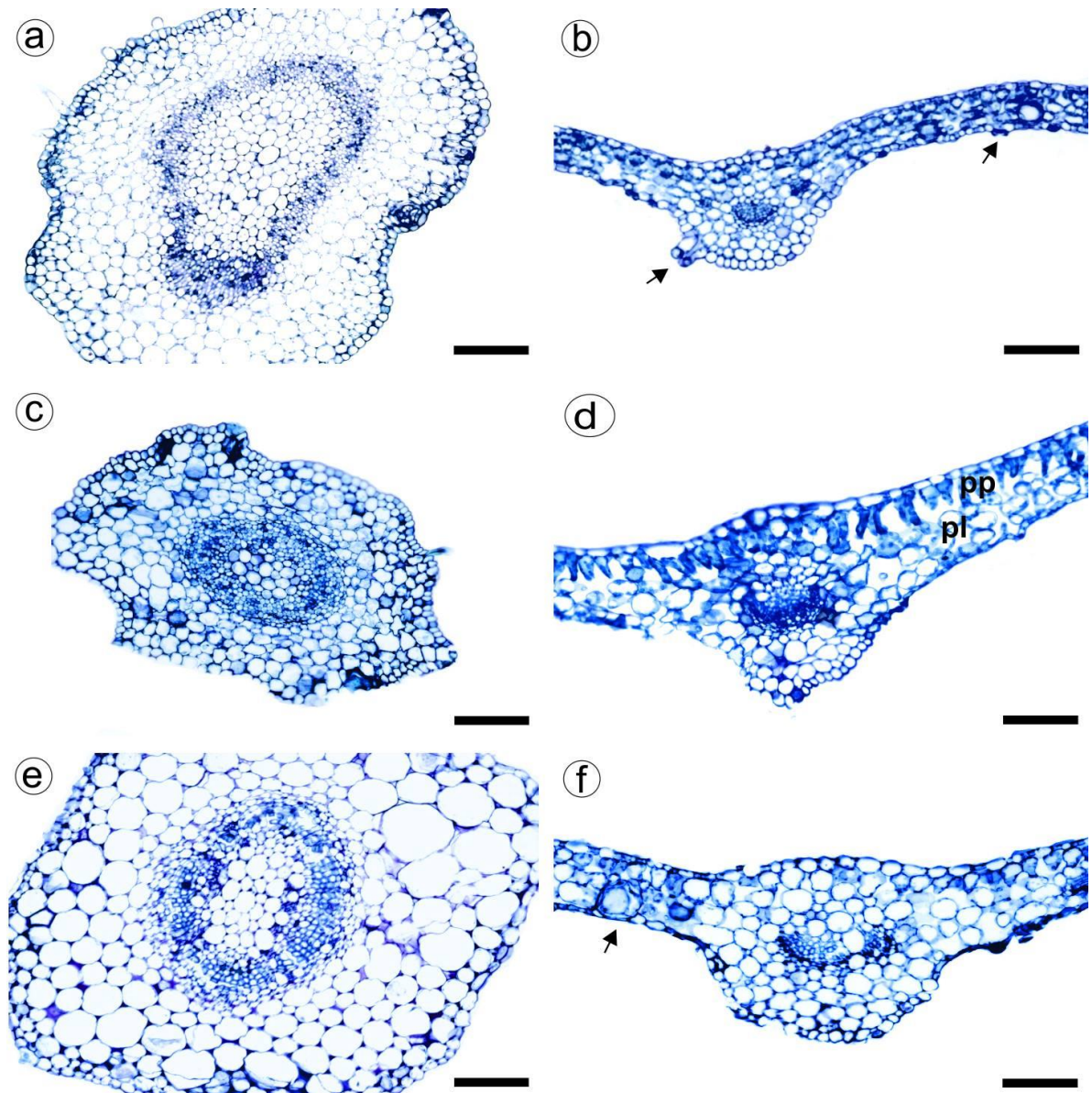
### 3.3. Análise bioquímica do metabolismo antioxidante

Não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos, referente a atividade da dismutase do superóxido (SOD) pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade, sendo que esta apresentou uma atividade média de 0,51 U SOD  $\text{mg}^{-1}$  MF.

### 3.4. Microscopia de luz

Observa-se nas fotomicrografias da lâmina foliar de *C. rufa*, epiderme unisseriada, com estômatos presentes somente na face abaxial, mesofilo heterogêneo dorsiventral, composto de uma camada de parênquima paliçádico e duas de lacunoso (Figura 7).

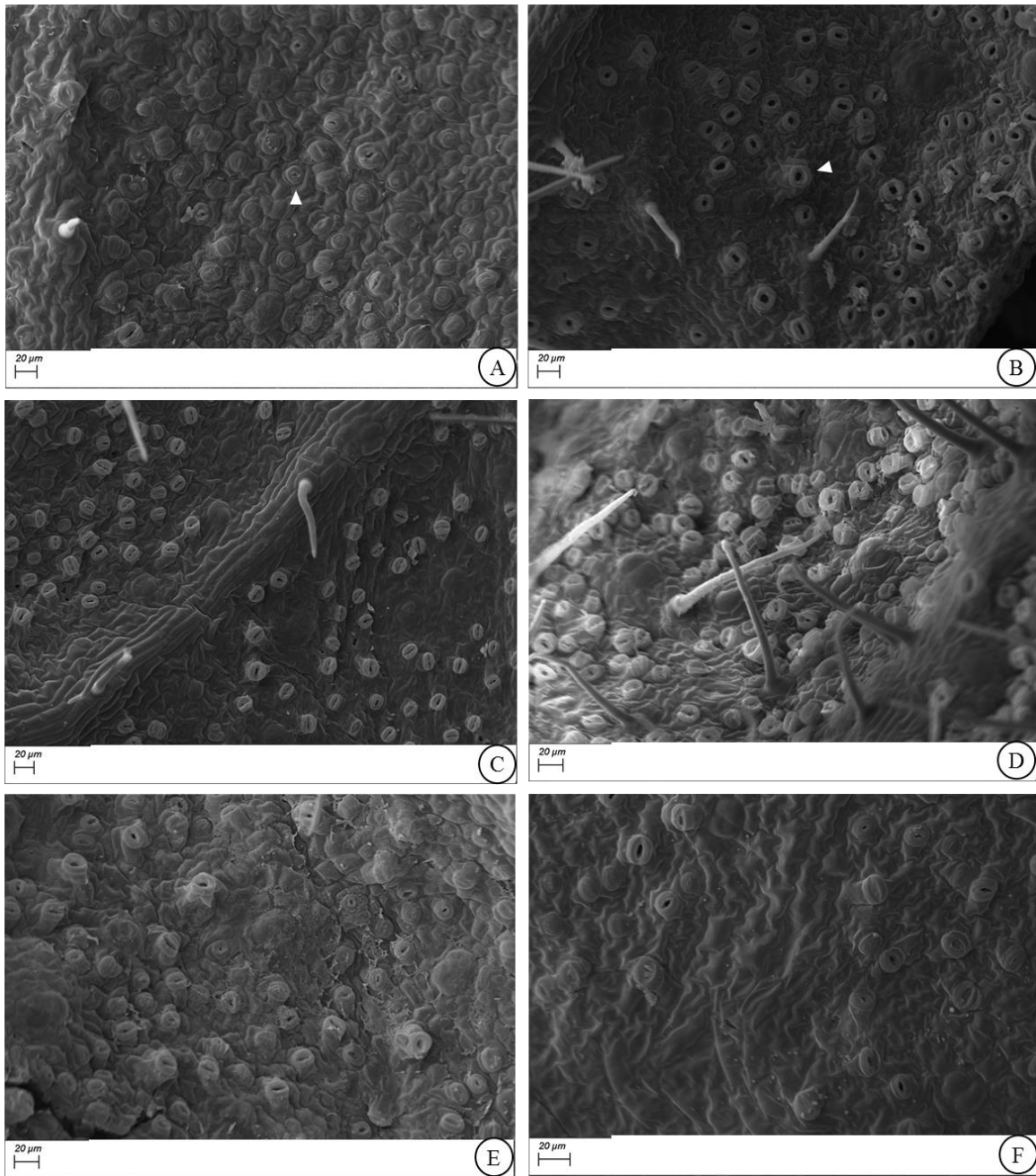
*C. rufa* possui glândulas secretoras abundantes nas folhas e caule. Em *Campomanesia xanthocarpa* foi relatado que estas glândulas apresentam conteúdo lipídico (Gogosz et al. 2010). Não foram observados danos celulares nas folhas e caules, independentemente da concentração de AgNPs ou do nitrato de prata em comparação ao tratamento controle.



**Figura 7.** Cortes transversais de segmentos foliares e caulinares de *Campomanesia rufa* aos 90 dias de cultivo, resultantes da indução de brotos a partir de BAP ( $5,6 \mu\text{M}$ ), submetidos a Nitrato de prata ( $0,18 \text{ g L}^{-1}$ ) ou Nanopartículas de prata (AgNP). **A e B:** Controle, **C e D:** Nitrato de Prata, **E e F:**  $0,77 \text{ mg L}^{-1}$  AgNP. **PP** (Parênquima paliçádico), **PL** (Parênquima lacunoso). Em **B** destaque para os estômatos e em **F** destaque para Glândula secretora. Barra:  $10 \mu\text{M}$ .

### 3.5. Microscopia eletrônica de varredura

Observa-se nas fotomicrografias a presença de muitos tricomas simples, não ramificados e unisseriados, tanto na face adaxial, quanto na face abaxial das lâminas foliares de *C. rufa*, cultivadas *in vitro*, independentemente dos tratamentos. Localizando-se tanto nas nervuras como nas entrenervuras (FIGURA 8).



**Figura 8.** Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura da superfície abaxial de segmentos foliares de *Campomanesia rufa* aos 90 dias de cultivo, resultantes da indução de brotos a partir de BAP ( $5,6 \mu\text{M}$ ), submetidos a Nitrato de prata ( $0,18 \text{ g L}^{-1}$ ) ou diferentes concentrações de Nanopartículas de prata (AgNP). **A:** Controle, **B:** Nitrato de Prata, **C:**  $0,385 \text{ mg L}^{-1}$  AgNP, **D:**  $0,77 \text{ mg L}^{-1}$  AgNP, **E:**  $1,54 \text{ mg L}^{-1}$  AgNP e **F:**  $15,4 \text{ mg L}^{-1}$  AgNP. Ponta de setas: em **B:** estômato e em **C:** tricoma.

Os estômatos foram observados somente na face abaxial das folhas, sendo classificados como paracíticos, apresentando-se mais salientes do que as células epidérmicas fundamentais, com células-guarda reniformes (FIGURA 8).

Os estômatos das folhas tratadas com nitrato de prata apresentaram uma maior abertura estomática em relação ao tratamento controle e os demais tratamentos com AgNPs. Não foram

observados danos na superfície das folhas, independentemente da concentração de AgNPs ou da presença do nitrato de prata, em comparação ao tratamento controle.

#### 4. Discussão

Não foram observadas alterações significativas entre o tratamento sem adição de AgNPs e os tratamentos com baixas concentrações de AgNPs (0,385; 0,77 e 1,54 mg L<sup>-1</sup>), quanto ao número, altura e peso fresco dos brotos formados.

Essa baixa toxicidade das AgNPs pode estar relacionada ao tamanho das AgNPs, como observado pela caracterização do meio de cultivo, ao autoclavar o meio de cultura suplementado por AgNPs, a alta temperatura promove uma aglomeração das nanopartículas, obtendo-se, portanto, partículas que não se encontram somente na escala nano (1 a 100 nm). E conforme já foi demonstrado, o tamanho das nanopartículas interferem nos efeitos de AgNPs em células vegetais.

Em um estudo realizado com *Arabidopsis* verificou-se que AgNPs de 45±5 nm promoveram uma maior taxa de crescimento com menor indução de estresse oxidativo, quando comparadas a AgNPs de 8±2 nm que causaram a maior taxa de inibição do crescimento e os níveis mais altos de estresse oxidativo (Syu et al. 2014). E com *Spirodela polyrhiza* foi demonstrado que micropartículas de prata não causavam estresse oxidativo em detrimento das nanopartículas de prata, e conseqüentemente não foram observadas alterações no metabolismo antioxidante em comparação ao controle (Jiang et al. 2014).

Esses resultados podem estar relacionados ao tamanho dos poros das paredes das células vegetais que geralmente compreendem uma faixa de alguns nanômetros (Carpita et al. 1979; Adani et al. 2011), que é muito menor que o tamanho das partículas de prata. Desse modo é possível supor que devido ao tamanho das partículas de prata, estas não poderiam penetrar facilmente a parede celular das plantas e conseqüentemente por esse motivo, causariam menos danos do que as AgNPs que devido ao seu tamanho pequeno não encontraram essa barreira ao serem expostas as células vegetais.

Nos tratamentos com 15,4 mg L<sup>-1</sup> de AgNPs e nitrato de prata (180 mg L<sup>-1</sup>) observou-se resultados significativamente semelhantes. Em ambos os tratamentos foi observado uma redução no número e na massa fresca dos brotos formados. No entanto, a concentração de AgNO<sub>3</sub> é superior a concentração de AgNPs, o que demonstra que as AgNPs podem ser mais tóxicas do que o AgNO<sub>3</sub> para as espécies vegetais.

Resultados semelhantes foram relatados para *Lolium multiflorum*, onde observou-se que, em concentrações similares, as AgNPs eram mais tóxicas para as plantas do que o AgNO<sub>3</sub> em *Lolium multiflorum* e que a toxicidade da AgNP provocou reduções significativas na taxa de crescimento das raízes e alterações na morfologia do sistema radicular (Yin et al. 2011). Da mesma forma, o AgNO<sub>3</sub> mostrou-se mais eficaz na melhoria dos índices de crescimento (comprimento da raiz e parte aérea e área foliar) do que as AgNPs para o cultivo *in vitro* de *Solanum tuberosum* (Bagherzadeh Homaei and Ehsanpour 2015).

Em *Allium cepa*, o AgNO<sub>3</sub> apresentou-se mais tóxico do que as AgNPs revestidas por citrato, polivinilpirrolidona (PVP) ou brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) (Cvjetko et al. 2017). O AgNO<sub>3</sub> também mostrou-se mais tóxico do que AgNPs em *Brassica sp.*, devido à menor acumulação de AgNPs e melhor atividades de APX e CAT, que resultaram em menor estresse oxidativo (Vishwakarma et al. 2017). Em *Brassica Juncea L.*, foi observada uma inibição no comprimento da raiz e no teor de clorofila em plantas expostas a AgNO<sub>3</sub> nas mesmas concentrações de AgNPs (Pandey et al. 2014).

Para *Cucumis sativus L.* a degeneração das células corticais e a desintegração da endoderme nos tratamentos com AgNO<sub>3</sub> mostraram-se mais proeminentes do que em tratamentos com AgNPs, apesar de ambos apresentarem-se tóxicos para o crescimento e desenvolvimento dessa espécie (Tripathi et al. 2017).

Em *Capsicum annuum L.* tanto as AgNPs quanto os íons Ag<sup>+</sup> afetaram de forma similar o desenvolvimento da planta, diminuindo sua altura e biomassa em decorrência do aumento do conteúdo total de Ag<sup>+</sup> nos tecidos da planta (Vinković et al. 2017).

Com esses dados fica claro que o efeito das AgNPs e do nitrato de prata, ainda é controverso, com resultados que variam muito de espécie para espécie. Esses resultados deixam evidente a necessidade de mais estudos para compreender os efeitos das AgNPs nas células vegetais e afim de explorar melhor as propriedades intrínsecas das nanopartículas.

Em relação ao metabolismo antioxidante não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos, independentemente da concentração de AgNPs ou do nitrato de prata.

No entanto já foi relatado que a exposição das plantas a nanomateriais pode aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio, como oxigênio singlete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>), superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e radical hidroxila (OH<sup>•</sup>) (Hossain et al. 2015).

As EROs influenciam o crescimento e o desenvolvimento de uma planta, de modo que precisam ser rapidamente metabolizadas pelo sistema antioxidante, para evitar condições de estresse oxidativo. O metabolismo enzimático para a desintoxicação de EROS em plantas é

essencial para a proteção de células vegetais e suas organelas contra os efeitos tóxicos das EROs (Mittler 2017). Assim quando uma planta é submetida a algum tipo de estresse abiótico é notável o aumento da atividade das enzimas antioxidantes (Gill et al. 2015). Mediante esse contexto é importante avaliar as condições fisiológicas das células vegetais, visto que essas condições refletem no seu crescimento e desenvolvimento.

A SOD constitui a primeira linha de defesa do sistema antioxidante, catalisando a decomposição de  $O_2^{\bullet-}$  em  $O_2$  e  $H_2O_2$ , e as enzimas CAT e APX catalisam a dismutação de  $H_2O_2$  em  $H_2O$  e  $O_2$  (Das and Roychoudhury 2014).

É relatado que os íons  $Ag^+$  liberados de AgNPs induz o estresse oxidativo através da geração de EROs. Na multiplicação *in vitro* de cana de açúcar por imersão temporária, foi relatado um aumento de EROs e de peroxidação lipídica, em que diferentes concentrações de AgNPs foram adicionadas ao meio de cultivo MS (Bello-Bello et al. 2017). Em *Solanum tuberosum* também foi observado um aumento de  $H_2O_2$  e peroxidação lipídica em explantes cultivados *in vitro* na presença de AgNPs ou nitrato de prata (Bagherzadeh Homaei and Ehsanpour 2015).

Entretanto, no presente estudo é possível aferir que provavelmente as AgNPs não estavam provocando a produção de EROs em plântulas de *C. rufa* cultivadas *in vitro*, visto que, a atividade da SOD não foi significativamente alterada pela adição de AgNPs ou nitrato de prata. E por meio da análises das imagens obtidas pela microscopias de luz e de varredura não foram observados danos celulares nas células vegetais, que seriam provocadas pela produção de  $H_2O_2$ , que potencialmente causa morte celular nas células das plantas, quando produzido em altas concentrações.

A maior abertura dos estômatos no tratamento com nitrato de prata está relacionada ao efeito positivo do  $AgNO_3$  na redução da hiperhidricidade, já foi relatado que a presença do  $AgNO_3$  no meio de cultura reduz a hiperhidricidade dos explantes cultivados *in vitro*, ao promover uma maior abertura estomática, a maior abertura dos estômatos resulta em uma maior saída de água das plântulas e reduz o acúmulo de água nos tecidos (Gao et al. 2017).

Em *Bacopa monnieri* (Linn.) Wettst. também não foram observadas alterações morfológicas ou efeitos tóxicos em plantas tratadas com AgNPs ou nitrato de prata pela microscopia eletrônica de varredura, no entanto na microscopia de luz foram observadas pequenas alterações nos elementos do xilema em caules e raízes de plantas tratadas com AgNPs e  $AgNO_3$  (Krishnaraj et al. 2012). Já em *Oryza sativa* a presença de AgNPs de 150 nm a 10 e 100  $mg L^{-1}$  provocaram alterações na anatomia da folha da plântula formada (Thuesombat et al. 2014).

Esses resultados demonstram que tanto o tamanho quanto a concentração de AgNPs podem afetar o desenvolvimento de espécies vegetais. Evidenciando a necessidade de mais estudos para compreender exatamente os efeitos das AgNPs, visto que na literatura os resultados ainda se mantêm controversos e inconclusivos.

## 5. Conclusão

As AgNPs não afetaram a multiplicação *in vitro* de *C. rufa*, em baixas concentrações, e os resultados referentes ao nitrato de prata (180 mg L<sup>-1</sup>) foram significativamente semelhantes aos resultados da concentração de 15,4 mg L<sup>-1</sup> de AgNPs. Esses resultados indicam que as AgNPs podem causar mais danos ao desenvolvimento vegetal do que o AgNO<sub>3</sub> a depender da concentração empregada.

Com a caracterização do meio de cultivo com AgNPs, observa-se que o tratamento térmico altera drasticamente o tamanho das AgNPs e que isso pode alterar significativamente as propriedades únicas presentes somente em nanopartículas. Esses resultados são importantes porque ajudam a entender o comportamento das AgNPs sob altas temperaturas e abre um leque para futuras pesquisas a respeito das propriedades das AgNPs após o tratamento térmico em células vegetais.

## Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos, durante a qual foi executado o presente estudo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

Ao Laboratório Nacional de Nanotecnologia para o Agronegócio - Embrapa Instrumentação - São Carlos-SP, onde foi realizada a caracterização das Nanopartículas de prata.

## Contribuições dos autores

CT, MR planejaram o estudo, realizaram os experimentos, analisaram os resultados e redigiram o manuscrito.



RP Supervisor de pesquisa e responsável pela coordenação do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, contribuiu com conselhos científicos, corrigiu e revisou a versão final do manuscrito.

JO, JM auxiliaram no planejamento e supervisão do estudo, realizaram os experimentos, analisaram os resultados e corrigiram o manuscrito.

CT, PC, DS realizaram os experimentos e analisaram os resultados.

O MR foi responsável pela análise estatística e contribuiu com conselhos científicos.

Todos os autores leram e aprovaram o manuscrito final.

### **Declaração de conflito de interesse**

Os autores declaram que o presente estudo foi realizado na ausência de relações comerciais ou financeiras que possam resultar em um potencial conflito de interesse.

### **Referências**

- Abdi G, Salehi H, Khosh-Khui M (2008) Nano silver: A novel nanomaterial for removal of bacterial contaminants in valerian (*Valeriana officinalis* L.) tissue culture. *Acta Physiol Plant* 30:709–714. doi: 10.1007/s11738-008-0169-z
- Adani F, Papa G, Schievano A, et al (2011) Nanoscale structure of the cell wall protecting cellulose from enzyme attack. *Environ Sci Technol* 45:1107–1113. doi: 10.1021/es1020263
- Bagherzadeh Homae M, Ehsanpour AA (2015) Physiological and biochemical responses of potato (*Solanum tuberosum*) to silver nanoparticles and silver nitrate treatments under *in vitro* conditions. *Indian J Plant Physiol* 20:353–359. doi: 10.1007/s40502-015-0188-x
- Bello-Bello JJ, Chavez-Santoscoy RA, Lecona-Guzmán CA, et al (2017) Hormetic response by silver nanoparticles on *in vitro* multiplication of sugarcane (*Saccharum* spp. Cv. Mex 69-290) using a temporary immersion system. *Dose Response* 15:1559325817744945. doi: 10.1177/1559325817744945
- Biddington NL (1992) The influence of ethylene in plant tissue culture. *Plant Growth Regul* 11:173–187. doi: 10.1007/BF00024072
- Biemelt S, Keetman U, Albrecht G (1998) Re-aeration following hypoxia or anoxia leads to activation of the antioxidative defense system in roots of wheat seedlings. *Plant Physiol* 116, 651-658. doi:10.1104/pp.116.2.651
- Carpita N, Sabulase D, Montezinos D, Delmer DP (1979) Determination of the pore size of cell walls of living plant cells. *Science* 205:1144–7. doi: 10.1126/science.205.4411.1144
- Chung I-M, Rekha K, Rajakumar G, Thiruvengadam M (2018) Production of bioactive compounds

and gene expression alterations in hairy root cultures of chinese cabbage elicited by copper oxide nanoparticles. *Plant Cell, Tissue Organ Cult* 1–12. doi: 10.1007/s11240-018-1402-0

Cvjetko P, Milošić A, Domijan A-M, et al (2017) Toxicity of silver ions and differently coated silver nanoparticles in *Allium cepa* roots. *Ecotoxicol Environ Saf* 137:18–28. doi: 10.1016/J.ECOENV.2016.11.009

Das K, Roychoudhury A (2014) Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Front Environ Sci* 2:53. doi: 10.3389/fenvs.2014.00053

Gao H, Xu P, Li J, et al (2017) AgNO<sub>3</sub> prevents the occurrence of hyperhydricity in *Dianthus chinensis* L. by enhancing water loss and antioxidant capacity. *Vitr Cell Dev Biol - Plant* 53:561–570. doi: 10.1007/s11627-017-9871-0

Giannopolitis CN, Ries SK (1977) Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiol* 59:309–14. doi: 10.1104/PP.59.2.309

Gill SS, Anjum NA, Gill R, et al (2015) Superoxide dismutase—mentor of abiotic stress tolerance in crop plants. *Environ Sci Pollut Res* 22:10375–10394. doi: 10.1007/s11356-015-4532-5

Gogosz AM, Cosmo NL, Bona C, Souza LA de (2010) Morfoanatomia da plântula de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae). *Acta Bot Brasilica* 24:613–623. doi: 10.1590/S0102-33062010000300003

Hossain Z, Mustafa G, Komatsu S (2015) Plant responses to nanoparticle stress. *Int J Mol Sci* 16:26644–26653. doi: 10.3390/ijms161125980

Javed R, Mohamed A, Yücesan B, et al (2017) CuO nanoparticles significantly influence *in vitro* culture, steviol glycosides, and antioxidant activities of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Plant Cell, Tissue Organ Cult* 131:611–620. doi: 10.1007/s11240-017-1312-6

Jiang H-S, Qiu X-N, Li G-B, et al (2014) Silver nanoparticles induced accumulation of reactive oxygen species and alteration of antioxidant systems in the aquatic plant *Spirodela polyrhiza*. *Environ Toxicol Chem* 33:1398–1405. doi: 10.1002/etc.2577

Kim DH, Gopal J, Sivanesan I (2017) Nanomaterials in plant tissue culture: The disclosed and undisclosed. *RSC Adv* 7:36492–36505. doi: 10.1039/C7RA07025J

Kole C, Kole P, Randunu KM, et al (2013) Nanobiotechnology can boost crop production and quality: First evidence from increased plant biomass, fruit yield and phytomedicine content in bitter melon (*Momordica charantia*). *BMC Biotechnol* 13:37. doi: 10.1186/1472-6750-13-37

Krishnaraj C, Jagan EG, Ramachandran R, et al (2012) Effect of biologically synthesized silver nanoparticles on *Bacopa monnieri* (Linn.) Wettst. plant growth metabolism. *Process Biochem* 47:651–658. doi: 10.1016/j.procbio.2012.01.006

Lahiani MH, Dervishi E, Chen J, et al (2013) Impact of carbon nanotube exposure to seeds of valuable crops. *ACS Appl Mater Interfaces* 5:7965–7973. doi: 10.1021/am402052x

Ma X, Geiser-Lee J, Deng Y, Kolmakov A (2010) Interactions between engineered nanoparticles (ENPs) and plants: Phytotoxicity, uptake and accumulation. *Sci Total Environ* 408:3053–3061. doi: 10.1016/J.SCITOTENV.2010.03.031

Mahendran D, Kishor PBK, Geetha N, Venkatachalam P (2017) Phycocompound-coated silver

- nanoparticles and seaweed extracts induced high-frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from *Gloriosa superba* L. J Appl Phycol 1-12. doi:10.1007/s10811-017-1293-1
- Mittler R (2017) ROS are good. Trends Plant Sci 22:11–19. doi: 10.1016/J.TPLANTS.2016.08.002
- Mozafari A akbar, Havas F, Ghaderi N (2018) Application of iron nanoparticles and salicylic acid in *in vitro* culture of strawberries (*Fragaria × ananassa* Duch.) to cope with drought stress. Plant Cell, Tissue Organ Cult 132:511–523. doi: 10.1007/s11240-017-1347-8
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15:473–497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- O'Brien TP, Feder N, McCully ME (1964) Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. Protoplasma 59:368–373. doi: 10.1007/BF01248568
- Pandey C, Khan E, Mishra A, et al (2014) Silver nanoparticles and its effect on seed germination and physiology in *Brassica juncea* L. (Indian Mustard) Plant. Adv Sci Lett 20:1673–1676. doi: 10.1166/asl.2014.5518
- Rostami AA, Shahsavar A (2009) Nano-Silver particles eliminate the *in vitro* contaminations of olive “Mission” explants. Asian J Plant Sci. doi: 10.3923/ajps.2009.505.509
- Sarmast MK, Niazi A, Salehi H, Abolmoghdam A (2015) Silver nanoparticles affect ACS expression in *Tecomella undulata* *in vitro* culture. Plant Cell Tissue Organ Cult 121:227–236. doi: 10.1007/s11240-014-0697-8
- Sarmast MK, Salehi H (2016) Silver nanoparticles: An influential element in plant nanobiotechnology. Mol Biotechnol 58:441–449. doi: 10.1007/s12033-016-9943-0
- Satish L, Rameshkumar R, Rathinapriya P, et al (2015) Effect of seaweed liquid extracts and plant growth regulators on *in vitro* mass propagation of brinjal (*Solanum melongena* L.) through hypocotyl and leaf disc explants. J Appl Phycol 27:993–1002. doi: 10.1007/s10811-014-0375-6
- Scalzo J, Donno D, Miller S, et al (2016) Effect of genotype, medium and light on *in vitro* plant proliferation of *Vaccinium* spp. New Zeal J Crop Hortic Sci 44:231–246. doi: 10.1080/01140671.2016.1206946
- Sharma P, Bhatt D, Zaidi MGH, et al (2012) Silver nanoparticle-mediated enhancement in growth and antioxidant status of *Brassica juncea*. Appl Biochem Biotechnol 167:2225–2233. doi: 10.1007/s12010-012-9759-8
- Siddiqui MH, Al-Wahaibi MH (2014) Role of nano-SiO<sub>2</sub> in germination of tomato (*Lycopersicon esculentum* seeds Mill.). Saudi J Biol Sci 21:13–17. doi: 10.1016/J.SJBS.2013.04.005
- Spinoso-Castillo JL, Chavez-Santoscoy RA, Bogdanchikova N, et al (2017) Antimicrobial and hormetic effects of silver nanoparticles on *in vitro* regeneration of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) using a temporary immersion system. Plant Cell, Tissue Organ Cult 129:195–207. doi: 10.1007/s11240-017-1169-8
- Syu Y, Hung J-H, Chen J-C, Chuang H (2014) Impacts of size and shape of silver nanoparticles on *Arabidopsis* plant growth and gene expression. Plant Physiol Biochem 83:57–64. doi: 10.1016/J.PLAPHY.2014.07.010
- Thuesombat P, Hannongbua S, Akasit S, Chadchawan S (2014) Effect of silver nanoparticles on rice (*Oryza sativa* L. cv. KDML 105) seed germination and seedling growth. Ecotoxicol Environ Saf

104:302–309. doi: 10.1016/j.ecoenv.2014.03.022

Torney F, Trewyn BG, Lin VS-Y, Wang K (2007) Mesoporous silica nanoparticles deliver DNA and chemicals into plants. *Nat Nanotechnol* 2:295–300. doi: 10.1038/nnano.2007.108

Tripathi A, Liu S, Singh PK, et al (2017) Differential phytotoxic responses of silver nitrate (AgNO<sub>3</sub>) and silver nanoparticle (AgNps) in *Cucumis sativus* L. *Plant Gene* 11:255–264. doi: 10.1016/J.PLGENE.2017.07.005

Venkatachalam P, Kalaiarasi K, Sreeramanan S (2015) Influence of plant growth regulators (PGRs) and various additives on *in vitro* plant propagation of *Bambusa arundinacea* (Retz.) Wild: A recalcitrant bamboo species. *J Genet Eng Biotechnol* 13:193–200. doi: 10.1016/J.JGEB.2015.09.006

Venkatachalam P, Malar S, Thiyagarajan M, et al (2017) Effect of phytochemical coated silver nanocomplexes as novel growth-stimulating compounds for plant regeneration of *Alternanthera sessilis* L. *J Appl Phycol* 29:1095–1106. doi: 10.1007/s10811-016-0977-2

Vinković T, Novák O, Strnad M, et al (2017) Cytokinin response in pepper plants (*Capsicum annuum* L.) exposed to silver nanoparticles. *Environ Res* 156:10–18. doi: 10.1016/j.envres.2017.03.015

Vishwakarma K, Shweta, Upadhyay N, et al (2017) Differential phytotoxic impact of plant mediated silver nanoparticles (AgNPs) and silver nitrate (AgNO<sub>3</sub>) on *Brassica* sp. *Front Plant Sci* 8:1501. doi: 10.3389/fpls.2017.01501

Yin L, Cheng Y, Espinasse B, et al (2011) More than the Ions: The effects of silver nanoparticles on *Lolium multiflorum*. *Environ Sci Technol* 45:2360–2367. doi: 10.1021/es103995x

Yu R, Baniaga AE, Jorgensen SA, Barker MS (2017) A successful *in vitro* propagation technique for resurrection plants of the Selaginellaceae. *Am Fern J* 107:96–104. doi: 10.1640/0002-8444-107.2.96