



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SISTEMÁTICA, USO E CONSERVAÇÃO**  
**DA BIODIVERSIDADE**

**ANA KAMILA MEDEIROS LIMA**

**EFEITO DE MICROPARTÍCULAS DE TiO<sub>2</sub> PRESENTES EM FILTROS SOLARES**  
**EM SEMENTES E PLÂNTULAS DE ALFACE (*Lactuca sativa* L.)**

**FORTALEZA**

**2021**

ANA KAMILA MEDEIROS LIMA

EFEITO DE MICROPARTÍCULAS DE TiO<sub>2</sub> PRESENTES EM FILTROS SOLARES EM  
SEMENTES E PLÂNTULAS DE ALFACE (*Lactuca sativa* L.)

Dissertação apresentada ao programa de Pós Graduação em Sistemática, Uso e Conservação da Biodiversidade da Universidade Federal do Ceará, como um dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Sistemática, Uso e Conservação da Biodiversidade. Área de concentração: Biodiversidade

Orientador: Emilio de Castro Miguel  
Co-orientadora: Thaiz B.A.R. Miguel

FORTALEZA

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- L696e** Lima, Ana Kamila Medeiros.  
Efeito de micropartículas de TiO<sub>2</sub> presentes em filtros solares em sementes e plântulas de alface (*Lactuca sativa* L.) / Ana Kamila Medeiros Lima. – 2021.  
68 f.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Sistemática, Uso e Conservação da Biodiversidade, Fortaleza, 2021.  
Orientação: Prof. Dr. Emilio de Castro Miguel.  
Coorientação: Prof. Dr. Thair B.A.R. Miguel.
1. Dióxido de titânio. 2. Filtros solares. 3. Fitotoxicidade. 4. Morfologia vegetal. 5. Anatomia vegetal. I. Título.

CDD 578.7

---

ANA KAMILA MEDEIROS LIMA  
EFEITO DE MICROPARTÍCULAS DE TiO<sub>2</sub> PRESENTES EM FILTROS SOLARES EM  
SEMENTES E PLÂNTULAS DE ALFACE (*Lactuca sativa* L.)

Dissertação apresentada ao programa de Pós Graduação em Sistemática, Uso e Conservação da Biodiversidade da Universidade Federal do Ceará, como um dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Sistemática, Uso e Conservação da Biodiversidade. Área de concentração: Biodiversidade.

Aprovado em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

Dr. Emilio de Castro Miguel (Orientador)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Dra. Thaiz Batista Azevedo Rangel Miguel (Co-orientadora)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Dr. Saulo Pireda Fernandes

Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF)

---

Dra. Maria Izabel Gallão

Universidade Federal do Ceará (UFC)

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus. Por tudo.

À minha mãe, Karina Medeiros, por ser o meu exemplo a seguir, de filha, mãe, profissional, amiga, de tudo. Por ser aquela que sempre foi a primeira pessoa a vibrar em cada conquista alcançada e nessa, não seria diferente. Por me dar um amor incondicional. E por me ajudar no laboratório quando eu não tinha ninguém e não conseguia fazer só.

À minha família, carinhosamente chamada de Medeirada, por todo o apoio nessa longa jornada de quatro anos e meio e agora mais dois de mestrado, mas principalmente pelo apoio em uma jornada maior, que se iniciou há 24 anos. Vocês são minhas melhores companhias e todos sabem a importância de vocês na minha vida. Mais uma coisa, eu amo nosso grupo no Whatsapp.

Ao meu avô, que não está mais presente fisicamente, mas tá comigo todos os dias nas nossas conversas e na força que ele me dá, tenho certeza que lá do céu eu tô dando muito orgulho a ele. Esse sonho é nosso.

Ao meu namorado, Fernando, por ter sido um dos meus maiores incentivadores nessa e em toda jornada que eu decidir trilhar e por sempre ter acreditado em mim e no meu esforço, por me ajudar em qualquer coisa que eu peça, mesmo sem saber. Por ser meu IC nas horas vagas e ir medir sementes comigo aos domingos, te amo.

À Lara Louise, pela amizade, cumplicidade, por toda a ajuda, que não é pouca, e por sempre me dar forças e me lembrar de que sou capaz. Essa é mais uma do meu time de IC nas horas vagas, obrigada por tudo.

Ao professor Dr. Emilio de Castro Miguel, meu orientador, que também esteve comigo nesses anos de graduação e mestrado, que me ensinou muito do que sei hoje, que teve paciência comigo, que cuida de mim com a exigência de um professor e carinho de pai. Além de orientador, é terapeuta, é amigo e tenho certeza que independente do caminho, é uma pessoa que sei que posso sempre contar. Obrigada por essa parceria que deu certo, esse momento é nosso!

À Dra. Thaiz Batista Azevedo Rangel Miguel, pela co-orientação e mais que isso, por todas as vezes que me deu palavras de incentivo, reconfortantes e que realmente foram muito importantes nos momentos em que eu quis desistir.

À Dra. Maria Izabel Gallão, membro da minha banca examinadora, mas antes disso uma pessoa que fez toda a diferença na minha vida acadêmica, essa conquista também é um pouco sua, prof!

Ao Dr. Saulo Pireda Fernandes, por fazer parte da banca e oferecer contribuições tão pertinentes para mim e meu trabalho.

Ao time do Laboratório de Biomateriais, sou muito feliz por fazer parte desse time com vocês, Emilio, Thaiz, Kennedy, Marlos, Alexya, Bruna, Lívia e Conceição. Já disse pessoalmente, mas sem vocês eu não teria conseguido, mil vezes obrigada por chegarem junto comigo no olho do furacão e saibam que sempre estarei aqui também. Ao Sergimar Kennedy, valeu fera, você sempre ajuda e sempre tem uma solução pra tudo, muito obrigada pela ajuda e paciência.

À Central Analítica da UFC pelo espaço e aprendizado.

À Coordenação e Corpo Docente do PPGSis pela torcida e pelo empenho com o programa. À minha turma, por dividirmos essa jornada juntos. Ao secretário do PPGSis Jessé Teixeira por estar sempre disponível e pronto pra ajudar sempre que precisei.

Aos meus amigos, Renata, Bruno, Giovanna, Izaíra, Yan, Lucas, Heberon, Cassiano e Cibele vocês que me deram força, me escutaram incontáveis vezes chorando e reclamando e dizendo que ia desistir, que comemoraram comigo quando as coisas davam certo. Obrigada por todos os momentos de alegrias e tristezas, e pelos sorrisos e abraços também.

Ao Yan Torres, que me ajudou com a estatística e com o apoio moral, por me ensinar, ajudar e escutar, você não imagina o quanto foi importante pra isso tudo! Ao Heberon Menezes pela força com as imagens e com qualquer dúvida que surgisse.

Ao Breno Teófilo, um grande amigo, você é o meu orgulho e exemplo. Obrigada pelas reuniões na pandemia, pelos conselhos e por me ajudar no trabalho quando não sei mais o que fazer.

À FUNCAP, por possibilitar, por meio da bolsa, que eu pudesse fazer o mestrado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Remember to look up at the stars and not down at your feet. Try to make sense of what you see and wonder about what makes the universe exist. Be curious. And however difficult life may seem, there is always something you can do and succeed at. It matters that you don't just give up. (Hawking, 2010)

## RESUMO

A tecnologia de redução do diâmetro de partículas é um diferencial na composição de protetores solares e em diversos segmentos, como o farmacêutico e o cosmético pelo surgimento de novas técnicas e aperfeiçoamento de produtos. Uma das principais partículas utilizadas na formulação desses protetores é o dióxido de titânio ( $\text{TiO}_2$ ). O uso de micropartículas em filtros solares inorgânicos permite uma maior adesão à pele, melhor viscosidade e textura do produto. Existe uma gama de estudos sobre a penetração e a toxicidade desses compostos em humanos, porém é necessário expandir o espectro de estudo englobando outros grupos de seres vivos e o ambiente por que essa série de questões não acaba no homem. Outras perspectivas devem ser observadas como a incorporação dessas partículas por outros sistemas biológicos e seus efeitos no organismo. O objetivo desse trabalho é avaliar os efeitos e a fitotoxicidade de nanopartículas de dióxido de titânio em plantas de *Lactuca sativa* L. (alface) por meio de ensaios laboratoriais de germinação e crescimento com exposição ao dióxido de titânio e análise dos resultados utilizando técnicas de microscopia: Microscopia óptica e Microscopia eletrônica de varredura

**Palavras-chave:** Dióxido de titânio. Filtros solares. Fitotoxicidade. Morfologia vegetal. Anatomia vegetal.



## **ABSTRACT**

The technology for reducing the diameter of particles is a differential in the composition of sunscreens and in several segments, such as pharmaceuticals and cosmetics, due to the emergence of new techniques and product improvement. One of the main particles used in the formulation of these protectors is titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>). The use of microparticles in inorganic sunscreens allows greater adhesion to the skin, better viscosity and texture of the product. There is a range of studies on the penetration and toxicity of these compounds in humans, however it is necessary to expand the study spectrum to include other groups of living beings and the environment, because this series of issues does not end in man. Other perspectives must be observed, such as the incorporation of these particles by other biological systems and their effects on the organism. The objective of this work is to evaluate the effects and phytotoxicity of titanium dioxide nanoparticles in plants of *Lactuca sativa* L. (lettuce) by means of laboratory tests of germination and growth with exposure to titanium dioxide and analysis of the results using microscopy techniques: Optical Microscopy and Scanning Electron Microscopy

**Keywords:** Sunscreens. Titanium dioxide. Phytotoxicity. Plant morphology. Plant anatomy.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Índice de germinação das sementes de <i>Lactuca sativa</i> L. (Asteraceae) em diferentes tratamentos com de titânio TiO <sub>2</sub>	17
Figura 2 -	Gráfico do crescimento médio de plântulas de <i>Lactuca sativa</i> durante 7 dias em diferentes tratamentos	18
Figura 3 -	Padrão de distribuição não normal obtido por meio do teste de Kruskal-Wallis dos dados de crescimento de <i>Lactuca sativa</i> (Asteraceae) em diferentes tratamentos de TiO <sub>2</sub>	19
Figura 4 -	Tamanho médio diário de <i>Lactuca sativa</i> L. (Asteraceae) com diferentes tratamentos de TiO <sub>2</sub> durante 7 dias	20
Figura 5 -	Peso úmido x peso seco do material vegetal de <i>Lactuca sativa</i> L. (Asteraceae) após 7 dias em diferentes tratamentos com dióxido de titânio TiO <sub>2</sub>	21
Figura 6 -	Prancha de microscopia ótica da radícula de <i>Lactuca sativa</i> no 3º dia pós-semeadura em diferentes tratamentos	23
Figura 7 -	Prancha de microscopia eletrônica de varredura de coifa de <i>Lactuca sativa</i> no 3º dia pós-semeadura em diferentes tratamentos	25
Figura 8 -	Prancha de microscopia ótica do eixo hipocótilo-radicular de <i>Lactuca sativa</i> no 3º dia pós-semeadura em diferentes tratamentos	27
Figura 9 -	Prancha de microscopia eletrônica de varredura da zona pilífera de <i>Lactuca sativa</i> no 3º dia pós-semeadura em diferentes tratamentos	29
Figura 10 -	Prancha de microscopia ótica da folha de <i>Lactuca sativa</i> no 3º dia pós-semeadura em diferentes tratamentos	32
Figura 11 -	Prancha de microscopia eletrônica de varredura da folha de <i>Lactuca sativa</i> no 3º dia pós-semeadura em diferentes tratamentos.	33
Figura 12 -	Prancha de microscopia ótica de radícula de <i>Lactuca sativa</i> no 7º dia pós-semeadura em diferentes tratamentos	35
Figura 13 -	Prancha de microscopia ótica do eixo hipocótilo-radicular de <i>Lactuca sativa</i> no 7º dia pós-semeadura em diferentes tratamentos.	37
Figura 14 -	Prancha de microscopia eletrônica de varredura da zona pilífera de <i>Lactuca sativa</i> no 7º dia pós-semeadura em diferentes tratamentos	38
Figura 15 -	Prancha de microscopia ótica da folha de <i>Lactuca sativa</i> no 7º dia	40

pós-semeadura em diferentes tratamentos

Figura 16 -	Prancha de microscopia eletrônica de varredura da folha de <i>Lactuca sativa</i> no 7º dia pós-semeadura em diferentes tratamentos	42
Figura 17 -	Gráfico do crescimento médio de plântulas de <i>Lactuca sativa</i> durante 7 dias submetidas a diferentes tratamentos pós germinação	44
Figura 18 -	Peso úmido X peso seco do material vegetal de <i>Lactuca sativa</i> (Asteraceae) após 7 dias submetidas a diferentes tratamentos com dióxido de titânio TiO <sub>2</sub> pós germinação	45
Figura 19 -	Prancha de microscopia ótica da radícula de <i>Lactuca sativa</i> no 7º dia pós-semeadura em diferentes tratamentos	46
Figura 20 -	Prancha de microscopia ótica do eixo hipocótilo-radicular de <i>Lactuca sativa</i> no 7º dia pós-semeadura em diferentes tratamentos.	48
Figura 21 -	Prancha de microscopia eletrônica de varredura da zona pilífera de <i>Lactuca sativa</i> no 7º dia pós-semeadura em diferentes tratamentos	50
Figura 22 -	Prancha de microscopia ótica da folha de <i>Lactuca sativa</i> no 7º dia pós-semeadura em diferentes tratamentos	52
Figura 23 -	Prancha de microscopia eletrônica de varredura da folha de <i>Lactuca sativa</i> no 7º dia pós-semeadura em diferentes tratamentos	53
Figura 24 -	Prancha de microscopia ótica de raiz, hipocótilo e da folha de <i>Lactuca sativa</i> no 7º dia pós-semeadura em um tratamento com diferentes tempos de exposição	55

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
2	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	13
2.1	<b>O uso de partículas de TiO<sub>2</sub> em filtros solares</b> .....	13
2.2	<b>Partícula de TiO<sub>2</sub> no meio ambiente</b> .....	15
2.3	<b>A alface como modelo experimental (<i>Lactuca sativa</i> L.)</b> .....	17
3	<b>OBJETIVOS</b> .....	19
3.1	<b>Objetivo geral</b> .....	19
3.2	<b>Objetivos específicos</b> .....	19
4	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	20
4.1	<b>Obtenção do TiO<sub>2</sub></b> .....	20
4.2	<b>Delineamento experimental</b> .....	20
4.2.1	<i>Germinação e Crescimento</i> .....	20
4.2.2	<i>Translocação</i> .....	21
4.3	<b>Técnicas de Microscopia</b> .....	22
4.3.1	<i>Microscopia Óptica (MO)</i> .....	22
4.3.3	<i>Análise de dados e Estatística</i> .....	23
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	24
5.1	<b>Germinação e crescimento</b> .....	24
5.2	<b>Crescimento e translocação</b> .....	50
6	<b>CONCLUSÃO</b> .....	64
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	65

## 1 INTRODUÇÃO

O uso comercial e industrial de partículas com diâmetro reduzido cresceu rapidamente nos últimos anos sendo aplicados em diversos segmentos (Weir *et al.*, 2012) como cosméticos (Hanigan *et al.*, 2018), farmacológicos (Namdeo *et al.*, 2008), agricultura (Rodríguez-González, Terashima e Fujishima, 2019) entre outros. No entanto, a compreensão da interação, no nível celular e molecular, desses compostos em sistemas biológicos é insuficiente (Maynard *et al.*, 2006). Segundo (Haynes *et al.*, 2017) os estudos investigando os efeitos fotocatalíticos causados pelo nano dióxido de titânio em organismos aquáticos são escassos. Dentre as mais diversas aplicações, está o uso de micropartículas (MPs) e nanopartículas (NPs) em protetores solares (Flor, Davolos e Correa, 2008; Sendra, Sánchez-Quiles, *et al.*, 2017).

O conhecimento dos efeitos e às consequências do uso regular de filtros solares com dióxido de titânio em humanos e meio ambiente é escasso (Arvidsson *et al.*, 2012; Newman *et al.*, 2009; Smijs e Pavel, 2015). Poucos trabalhos tratam da ecotoxicidade desses compostos em organismos (Haynes *et al.*, 2017) e, além disso, é necessário um melhor entendimento das relações físico-químicas e como elas estão relacionadas ao desenvolvimento inicial da planta (Andersen *et al.*, 2016). Tal tema merece mais atenção uma vez que pelo elevado uso de filtros solares, grande quantidade de componentes é despejada na natureza diariamente (Tovar-Sánchez, Sánchez-Quiles e Rodríguez-Romero, 2019). Essas duas condições citadas anteriormente, o uso crescente desses produtos e a carência de estudos relacionados ao uso, em longo prazo podem causar efeitos danosos na morfologia ou fisiologia desses organismos, fauna e flora, pois a interação desses produtos com sistemas biológicos resulta em bioacumulação.

Com o uso crescente dos filtros solares inorgânicos (Hanigan *et al.*, 2018; Venkatesan *et al.*, 2018), mais resíduos químicos são introduzidos no meio ambiente. Dessa forma, a análise dos efeitos que esses produtos podem causar em humanos e outras espécies é feita pelas indústrias farmacêutica e cosmética durante a realização de testes dermatológicos que sugerem que o TiO<sub>2</sub> não é tóxico à pele humana (Nohynek *et al.*, 2008). Também foram analisadas as diferenças de bloqueio UV e aspectos físico-químicos que podem afetar a eficácia pelo uso de partículas micro ou nanométricas na produção desses filtros (Smijs e Pavel, 2011).

Embora não seja possível afirmar sobre a possibilidade da ausência de riscos

quanto ao uso de materiais com diâmetro reduzido em cosméticos e medicamentos, o uso de nanopartículas (NPs) têm efeito benéfico aos seres humanos e não apresenta risco à pele ou à saúde (Nohynek *et al.*, 2008). No entanto, é necessário ampliar o estudo da interação desses tipos de partículas com outros grupos de organismos e meio ambiente por conta da liberação de resíduos com o aumento do uso desses produtos.

Nesse contexto existe a necessidade de realizar estudos mais detalhados sobre a interação entre outros organismos que não o ser humano e essas NPs de TiO<sub>2</sub> residuais de filtros solares para entender mais sobre os efeitos ecotoxicológicos que esse nanomaterial pode causar.

A alface (*Lactuca sativa* L. Asteraceae) foi escolhida como modelo para esse estudo por ser um modelo bem estabelecido na literatura, de fácil manutenção e rápido para testes de ecotoxicidade pela grande quantidade de estudos na área com esses exemplares (Barrena *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2015).

Devido ao acúmulo de resíduos no meio ambiente provenientes do aumento do uso dos filtros solares, é necessário ampliar a quantidade de estudos relacionados com a toxicidade de compostos desses produtos em outros grupos de organismos. Nesse contexto esse trabalho busca explorar mais detalhadamente essa relação entre as NPs de dióxido de titânio e a espécie vegetal proposta.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 O uso de partículas de TiO<sub>2</sub> em filtros solares

O Dióxido de Titânio (TiO<sub>2</sub>) e o Óxido de Zinco (ZnO) são materiais semicondutores e seus mecanismos de absorção da luz UV envolvem transição entre bandas de valência e de condução do sólido. Esses dois componentes são amplamente usados em filtros solares inorgânicos principalmente pela sua capacidade de refletir a radiação ultravioleta (UV) e por apresentarem baixo potencial irritante, sendo o tipo de composto mais recomendado para filtros solares infantis (Flor, Davolos e Correa, 2008).

Recentemente, o uso desses compostos (TiO<sub>2</sub> e ZnO) em suas formas nanoestruturadas, agregaram melhor usabilidade aos protetores solares, pois, os filtros se tornaram mais aceitos já que eles ficaram mais leves, menos viscosos e pegajosos (Lu *et al.*,

2015). A grande inovação científica na tecnologia de filtros solares inorgânicos está no fato de que essas partículas não absorvam e nem espalhem radiação visível (Flor, Davolos e Correa, 2008). Ainda, segundo Balogh *et al.* (2011), a maior eficácia do uso de dióxido de titânio na forma de nanopartículas (NPs) com diâmetros entre 60 nm e 120 nm, apesar de serem utilizadas partículas com tamanho variando entre 50 e 200 nm (Newman, Stotland e Ellis, 2009; Nohynek, Dufour e Roberts, 2008). Nesse contexto, esses trabalhos buscaram caracterizar o uso, segurança e estado regulatório, em relação à espécie humana, de partículas nanométricas de dióxido de titânio utilizadas na confecção de protetores solares.

Portanto é indispensável a ampliação de estudos no contexto da nanotoxicologia para fornecer informações relacionadas aos riscos ambientais que o acúmulo desse composto pode trazer ao meio ambiente e para servir de base para a criação de estratégias de conservação incluindo esse ponto de vista.

Nesse contexto da nanotoxicologia, há tendência de certas substâncias apresentarem propriedades toxicológicas em diferentes estados como suspensões, soluções ou partículas (Nohynek *et al.*, 2008). Mas existem exceções nas quais a mudança de estado de uma substância pode aumentar ou diminuir a toxicidade (Nohynek *et al.*, 2008).

A preocupação quanto ao uso de dióxido de titânio é resultado da combinação de diferentes propriedades (tamanho, formação de complexos com proteinase e geração de radicais livres), pois o  $\text{TiO}_2$  e o  $\text{ZnO}$  são conhecidos como fotocatalisadores, sendo utilizados na geração de energia elétrica em células fotovoltaicas (Lu *et al.*, 2018). A translocação dessas partículas é possível pela formação de complexos que apresentam propriedades bioquímicas distintas da nanopartícula não complexada ou de maiores tamanhos (Newman *et al.*, 2009). No entanto, de acordo com estudo feito por Newman *et al.* (2009), ainda não há necessidade de maiores preocupações sobre a toxicidade de filtros solares contendo  $\text{TiO}_2$ , pois a penetração dessas nanopartículas através do estrato córneo da pele não foi significativo a ponto de causar danos às células e DNA (Balogh *et al.*, 2011) e em células de mamíferos (Nohynek *et al.*, 2008).

Nesse contexto, o uso de protetores é amplamente indicado não só para turistas que visitam praias, mas também para pessoas que estão diretamente em contato com o sol, pois previne do envelhecimento, e doenças relacionadas à exposição a radiação solar, como câncer de pele que corresponde a 33% dos diagnósticos de câncer no Brasil (Sociedade Brasileira de Dermatologia, 2018). Levando em consideração que o mercado de protetores solares atingiu a produção de aproximadamente 4.200 toneladas em 2002 (Flor, Davolos e Correa, 2008) e a produção de dióxido de titânio foi 1,4 milhão de toneladas em 2006 e essa

produção seria de aproximadamente 2,5 milhões de toneladas em 2025 (Robichaud *et al.*, 2009) é de extrema importância entender que efeitos essa liberação de resíduos pode causar em outros organismos além do ser humano.

## 2.2 Partícula de TiO<sub>2</sub> no meio ambiente

À vista do que já foi dito até aqui, deve haver uma preocupação ambiental em torno da liberação de resíduos de titânio provenientes de protetores solares e que o uso indiscriminado pode trazer efeitos aos ecossistemas que entrarem em contato com esses resíduos.

Já que esse material é despejado no solo, a preocupação quanto ao acúmulo de partículas no meio ambiente, torna pertinente a avaliação dos efeitos causados nas plantas a partir da absorção desse componente (Kim *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2010). Segundo Barbosa *et al.*, (2018) o dióxido de titânio tende a formar agregados de partículas, portanto, é importante compreender como a interação dessas NPs ou seus agregados pode acontecer com diferentes organismos.

O peso e a biomassa de algas da espécie *Chlorella vulgaris* (Kessler e Huss, 1992), Oocystaceae, diminuiu com a exposição a diferentes concentrações de dióxido de titânio. As interações ocorridas entre partículas e microalgas geram estresse a esses organismos em ecossistemas aquáticos oligotróficos e eutróficos (Dauda, Chia e Bako, 2017).

Estudos realizados por Lodeiro *et al.*, (2017); Sendra *et al.*, (2017); Deng *et al.*, (2017) em outros tipos de organismos, como diatomáceas comprovaram que essas NPs por algum mecanismo desconhecido inibem o crescimento do organismo quando expostas a altas concentrações. As descobertas nesse segmento são muito relevantes para o entendimento do impacto ecológico que pode ser causado pelas NPs que são liberadas no ambiente (Deng *et al.*, 2017). Além do fato de serem extremamente úteis para a criação de novas estratégias de conservação mais efetivas pela utilização dessa variável.

Em experimentos feitos em algas marinhas *Nitzschia closterium*, as partículas se mostraram mais prejudiciais aos organismos, quando em contato com a água do mar e quanto menor o tamanho das partículas, maior inibição do crescimento devido ao estresse oxidativo induzido pela partícula (Xia *et al.*, 2015). Ainda, a toxicidade das NPs varia muito de água do mar para água doce (Xia *et al.*, 2015).

Em testes sobre o efeito do TiO<sub>2</sub> na atividade fotossintética realizados com a



espécie *Ulmus elongata* (Ulmaceae), foi observado que o modelo não apresentou efeito significativo quanto ao acúmulo de metais. No entanto, como uma resposta fisiológica, o crescimento das folhas foi reduzido devido ao estresse sofrido pela planta (Gao *et al.*, 2013).

Há um interesse crescente no impacto que o TiO<sub>2</sub> pode causar em ambientes aquáticos, usando não apenas abordagem toxicológica, que é o que se propõem a maioria dos estudos nessa área, mas também abordagem ecotoxicológica, visto que há uma diferença de impacto entre os organismos com diferentes níveis de complexidade (Haynes *et al.*, 2017).

Outros grupos de organismos também requerem estudos relacionados com micro e nanopartículas porque o impacto que elas causam não reside apenas em ecossistemas aquáticos. Estudos de fitotoxicidade foram realizados através da utilização de sementes de *Linum usitatissimum* (Linaceae), e foram utilizadas medidas como peso, índice de germinação e crescimento radicular, nas quais as partículas mostraram diferentes atuações, tais como inibição da germinação e aumento da biomassa das raízes em relação aos controles testados (Clément *et al.*, 2013).

Microcrustáceos, algas e plantas foram utilizadas para a realização de testes de toxicidade aguda e crônica, dentre os quais, os cladóceros *Daphnia magna* mostraram sensibilidade aguda para nanopartículas em comparação com os demais. Esses diferentes grupos de organismos foram testados a fim de avaliar o potencial tóxico nos diferentes exemplares. Também foi observado que a toxicidade é influenciada pelo tamanho das partículas, em que as NPs se mostraram mais tóxicas que as MPs (Clément *et al.*, 2013).

Ensaio realizado utilizando embriões de *zebrafish* (*Danio rerio*) testaram como acontece a bioacumulação de dióxido de titânio, a qual foi aumentando e chegou a uma situação estacionária em torno de 48 horas de exposição. Os testes foram realizados utilizando titânio iônico e em forma de NP, no entanto, rapidamente o organismo conseguiu eliminar o titânio independente da forma em que ele foi acumulado (Oliver *et al.*, 2015). O dióxido de titânio, portanto, não se mostrou bioacumulável em exemplares de *zebrafish*, todavia mais estudos sobre bioacumulação e ecotoxicidade são necessários e devem levar em consideração características físico-químicas e outros fatores ambientalmente relevantes. (Oliver *et al.*, 2015).

Outros estudos sobre a utilização do dióxido de titânio em forma de micropartículas foram realizados em indivíduos da espécie *Helix aspersa*, caracol comumente utilizado como bioindicador do estresse oxidativo. Neste estudo foi observado que a exposição dos exemplares às NPs desencadeou um alto estresse oxidativo, causando uma peroxidação lipídica da membrana e afetando alguns parâmetros toxicológicos da espécie

modelo. Portanto, a liberação de TiO<sub>2</sub> no ambiente pode representar riscos aos diferentes ecossistemas (Houssein, 2017).

Ensaio realizados em plantas (*Allium cepa* e *Nicotiana tabacum*) *in vivo* e em linfócitos humanos *in vitro* mostraram que as NPs de dióxido de titânio eram genotóxicas tanto para linfócitos humanos quanto vegetais e houve a formação de malondialdeído (MDA), marcador de estresse oxidativo, como consequência da peroxidação lipídica e que isso pode ser um dos fatores da genotoxicidade de partículas de TiO<sub>2</sub> (Ghosh *et al.*, 2010).

Nesse contexto, mais testes são essenciais para entender melhor o comportamento dessas NPs e o que elas podem causar a partir do momento em que entram em contato ou são incorporadas por outros organismos. Portanto, a seguir será apresentado o modelo vegetal escolhido para esse estudo, a espécie *Lactuca sativa*.

### 2.3 A alface como modelo experimental (*Lactuca sativa* L.)

O gênero *Lactuca* L. (Compositae) compreende aproximadamente 100 espécies, no qual os genótipos de alface comestíveis foram divididos em seis grupos de alface predominantes no cultivo do país que atendem à demanda do mercado consumidor, que são: crespa, lisa, americana, mimosa, romana e vermelha (Sala e Costa, 2012). A espécie *L. sativa* L. (Asteraceae) é uma planta originada do leste do Mediterrâneo com introdução primeiro na Europa, por volta do século XV, posteriormente chegou ao Brasil na época da sua colonização (Sala e Costa, 2012).

Caracteriza-se como uma hortaliça folhosa, herbácea, dicotiledônea e autógama. A estrutura que é popularmente conhecida como a semente da alface, na verdade, é um fruto seco, simples e indeiscente do tipo aquênio e que contém uma semente aderida no pericarpo (Sala e Costa, 2012).

Essa planta foi escolhida como modelo de estudo devido a sua ampla distribuição, por ser a hortaliça folhosa mais importante no mundo pelo seu alto consumo e pela facilidade de cultivo *in vitro* (Sala e Costa, 2012). Além disso, *L. sativa* é um modelo bem estabelecido na literatura de ecotoxicidade com detalhes experimentais sobre a reação da planta, crescimento e condições de exposição (Larue *et al.*, 2014).

O valor energético dos tipos de alface é baixo, mas a hortaliça contém as vitaminas B e C. Sua semente pode ser utilizada para produção de óleo. Além de ser uma planta que é cultivável em todas as épocas do ano fora ou dentro de estufas (Vries, 1997).

Outro ponto favorável ao uso da alface como modelo está relacionado à grande área de superfície foliar, onde se localizam os estômatos, na face abaxial da folha, uma das estruturas mais analisadas em estudos relacionados à translocação ou interação com nanopartículas (Pariona *et al.*, 2017).

A falta de dados e estudos científicos a respeito da ecotoxicidade de nanopartículas é certa, ainda que alguns trabalhos que contemplem a problemática existem lacunas. Essas, por sua vez, são sobre organismos terrestres e ecossistemas e também em sedimentos, pois os poucos estudos existentes, em sua maioria, são sobre organismos marinhos (Bour *et al.*, 2015).

Ensaio foram realizados com as sementes de alface, testando sua germinação, buscando entender melhor o impacto de NPs sobre o desenvolvimento de plântulas e, embora alguns resultados tenham mostrado efeitos não nocivos, existem evidências de que as sementes sofreram pequenas taxas de estresse, o que poderia estar relacionado a um dano maior em longo prazo (Barrena *et al.*, 2009).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

- Descrever o efeito das interações entre as plântulas de *Lactuca sativa* e micropartículas de TiO<sub>2</sub>.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a influencia do TiO<sub>2</sub> no crescimento e no incremento do peso da planta;
- Observar e descrever mudanças na anatomia da alface após a interação com o TiO<sub>2</sub>, utilizando técnicas de microscopia ótica e eletrônica de varredura;
- Investigar a incorporação do TiO<sub>2</sub> à planta por meio da observação de modificações estruturais;

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Obtenção do TiO<sub>2</sub>

As partículas de dióxido de titânio foram gentilmente cedidas pelo Grupo de Química de Materiais Avançados (GQMat) coordenado pelo Dr. Pierre Fachine - Departamento de Química Analítica e Físico-Química, Universidade Federal do Ceará - UFC, Campus do Pici, CP 12100, CEP 60451-970 Fortaleza, CE, Brasil. Essa partícula foi caracterizada em estudo prévio (Barbosa *et al.*, 2018) de onde foram retiradas as informações seguintes. A partícula utilizada sofreu um processo sonoquímico para redução de tamanho e tem o tamanho médio de  $104,4 \pm 2,29$  nm. Seu potencial zeta é de  $-17,36 \pm 0,11$  e valor de tamanho hidrodinâmico de  $297,46 \pm 3,66$  nm.

### 4.2 Delineamento experimental

#### 4.2.1 Germinação e Crescimento

O experimento foi realizado com sementes de *L. sativa*, ‘Crespa Grand Rapids’ da marca ISLA PAK© adquiridas em comércios de Fortaleza, Ceará, Brasil. O foco desse ensaio é analisar o processo de germinação e crescimento da planta ao ser submetida a diferentes concentrações de TiO<sub>2</sub>.

As sementes foram expostas pelo tempo de 2 horas, de acordo com o teste piloto, à diferentes concentrações de micropartículas de dióxido de titânio: 12,5; 25; 50; e 100 ppm. O ensaio foi realizado em placas de Petri com dimensões de 90 por 15 mm, entre papel Germitest de gramatura 65 g/m<sup>2</sup> e pH neutro, temperatura de 25 °C. Foram colocadas 10 sementes em 5 placas para cada tratamento conforme as concentrações estabelecidas totalizando 50 sementes/concentração, além das placas de controle igualmente preparadas. O controle negativo foi realizado com água destilada e controle positivo, com solução de dicromato de potássio (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) 0,2 M para futuras comparações e análises. Além disso, cada tratamento estabelecido e os dois controles contaram com placas exclusivas para as microscopias que não foram usadas para os testes morfométricos nem estatísticos.

O experimento foi realizado durante sete dias, sendo as placas reumidificadas

diariamente com 1,5 ml de água destilada. Foram avaliados o Índice de Velocidade de Germinação (IVG) e o Tempo Médio de Germinação (TMG). Também foi medido o crescimento, por meio da utilização de paquímetro digital, o peso úmido e peso seco das plantas germinadas no sétimo (último) dia do ensaio.

No terceiro e sétimo dia do ensaio foram realizadas coletas das plântulas para análise posterior de raiz, hipocótilo e folha para as análises das microscopias (óptica e eletrônica).

Para ter um conhecimento melhor do efeito que o dióxido de titânio pode ter nas plantas além de terem sido feitos testes usando o nanomaterial para quebrar a dormência das sementes, foram realizados outros ensaios de exposição dessa vez pós germinação, que ocorreram no terceiro dia da semeadura, onde novamente, as plântulas recém germinadas foram expostas pelo mesmo tempo de 2 hora e nas mesmas concentrações usadas anteriormente (12,5 ppm, 25 ppm, 50 ppm e 100 ppm) além dos dois controles, positivo e negativo. Essa exposição ocorreu utilizando placas de Petri com dimensões de 90 por 15 mm, entre papel Germitest de gramatura 65 g/m<sup>2</sup> e pH neutro, temperatura de 25 °C. Foram colocadas 10 sementes em 5 placas para cada tratamento conforme as concentrações estabelecidas totalizando 50 sementes/concentração, além das placas de controle e as placas destinadas às microscopias igualmente preparadas. Após a exposição, as plântulas foram realocadas em novas placas de petri limpas e esterilizadas bem como o papel germitest e continuaram sendo reumidificadas e medidas diariamente até o sétimo (último) dia do ensaio conforme descrito acima sobre os ensaios anteriores.

Nos ensaios de toxicidade no crescimento pós-germinação, as coletas das plântulas para análises de microscopia foram coletadas apenas ao fim do experimento (sétimo dia) para análise do efeito causado pelo titânio em outro estágio de desenvolvimento dos organismos.

#### **4.2.2 Translocação**

Para a investigação da translocação das partículas de TiO<sub>2</sub> em diferentes tempos, 50 sementes foram colocadas pra germinar apenas com água destilada em placas de Petri esterilizadas com dimensões de 90x15 mm, entre papel Germitest de gramatura 65 g/m<sup>2</sup> e pH neutro, a uma temperatura de 25°C, com o papel moldado no formato da placa.

Três dias após a germinação, as plântulas foram submetidas à interação com micropartículas de TiO<sub>2</sub> na concentração de 50ppm (que causou maior dano estrutural), por 1,

2, 4, 8 e 16h.

Subsequentemente o material vegetal foi fixado em solução de glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,2 e processadas para microscopia óptica (MO) e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

### **4.3 Técnicas de Microscopia**

#### **4.3.1 Microscopia Óptica (MO)**

Após a coleta e fixação, o material foi processado, iniciando pela lavagem do material em etanol 50%. A desidratação em série crescente de etanol, 50%, 70%, 80%, 90% e três séries etanol 100%, sendo 40 minutos cada intervalo. Após a desidratação foi realizada a inclusão das amostras em historesina (Leica). Posteriormente as amostras montadas em blocos foram cortadas utilizando o micrótomo rotativo (Leica RM2255) a 4 $\mu$ m e dispostas em lâminas. Subsequentemente as lâminas foram coradas em solução aquosa de Azul de Toluidina (AT) 1% pH 4,0, durante 30 segundos, em temperatura ambiente (T. P. O'Brien, N. Feder, 2005). Os cortes foram observados no microscópio óptico (Primo Star Zeiss) e fotodocumentados com o auxílio do programa Zen Lite (Zeiss).

#### **4.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

Após a coleta do material, foi realizada a fixação em solução aquosa contendo glutaraldeído de 2,5%, formaldeído 4%, em tampão cacodilato de sódio 0,05 M, pH 7,2, em temperatura ambiente, durante 24 horas. Após essa etapa ocorreu a lavagem do material em tampão cacodilato de sódio 0,05M, por três vezes, durante 45 min cada lavagem. Posteriormente, as amostras foram desidratadas, em série cetônica crescente de 50%, 70%, 90%, 100%, por 40 minutos em cada etapa. Após a desidratação foi feita a secagem do material em equipamento de ponto crítico (K850 Critical Point Dryer).

As amostras secas foram fixadas em *stubs* de alumínio usando fita de carbono dupla face e, em seguida, cobertas por *sputtering* com uma camada de 20 nm de ouro, utilizando-se o aparelho Quorum Q150T ES. A observação das amostras e captura das imagens foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura Quanta FEG 450 (FEI) com 20kV de aceleração de voltagem do feixe.

### 4.3.3 Análise de dados e Estatística

Para a criação do banco de dados foi feita uma planilha no Microsoft Excel. Para a obtenção dos gráficos de crescimento, peso e germinação foi usado o programa *Graphpad Prism*, 8ª versão. Além do programa R que foi utilizado para os testes de normalidade, significância e checagem de *outliers* e o restante dos gráficos que fazem parte deste trabalho.

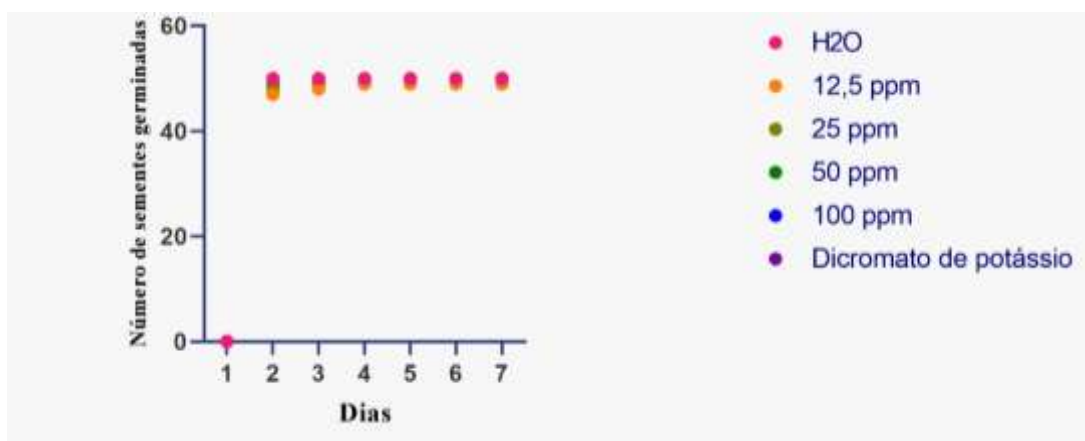


## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Germinação e crescimento

De acordo com a **Figura 1** abaixo, que representa o índice de germinação, é possível comprovar que no primeiro dia de semeadura nenhuma semente germinou. No segundo dia, mais de 90% das sementes germinaram, no terceiro dia aumentou mais um pouco e a partir do quarto dia esse número se manteve estável. Com isso, é possível admitir que o titânio não afetou de maneira significativa o processo de germinação em si, pois soluções aquosas de diferentes concentrações foram utilizadas para quebrar a dormência das sementes e iniciar o ciclo de vida dos indivíduos. Visto que todos os tratamentos e controles obtiveram resultados semelhantes, portanto, o  $\text{TiO}_2$  não se mostrou inibidor ou causou algum retardamento na etapa da germinação das plantas de alface. Esse resultado é corroborado por (Andersen *et al*, 2016) que afirma que nanomateriais sintéticos, como o dióxido de titânio, não causam toxicidade aguda generalizada durante a germinação e no crescimento inicial de 10 espécies testadas, onde a alface era uma delas. Testes como conteúdo de clorofila na planta, germinação e alongamento realizados por (Iannone *et al*, 2016) concluíram que metais pesados como óxido de ferro não afetaram a taxa de germinação.

**Figura 1.** Índice de germinação das sementes de *Lactuca sativa* L. (Asteraceae) em diferentes tratamentos com dióxido de titânio  $\text{TiO}_2$ .



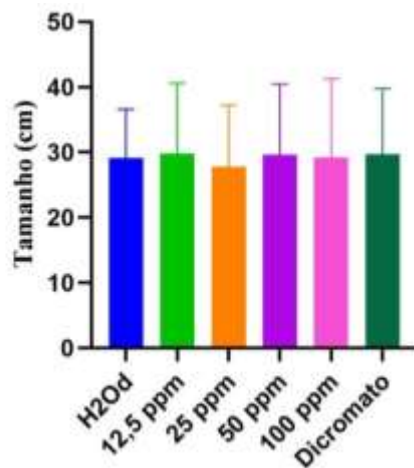
Distribuição média com erro médio padrão (EMP) da porcentagem de sementes germinadas de *Lactuca sativa* ao fim do 7º dia de experimento em que as sementes foram semeadas. Controle negativo, água destilada ( $\text{H}_2\text{O}$ ) e o positivo dicromato de potássio ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) e diferentes concentrações de MP's de dióxido de titânio  $\text{TiO}_2$  (12,5 ppm, 25 ppm, 50 ppm e 100ppm).

De acordo com o **Figura 1** acima, é possível notar que o controle negativo (sem

tratamento) foi o que apresentou o maior índice de germinação conforme o esperado uma vez que as sementes do grupo não foram submetidas a nenhum tratamento com titânio. Todas as sementes que foram expostas às concentrações de  $\text{TiO}_2$  e o controle positivo com dicromato de potássio ficaram próximo à porcentagem de germinação da água. A única concentração que ainda apresentou alguma diferença em relação às demais foi a de 12,5ppm, mesmo que não significativa. É possível comprovar pelo gráfico acima de pontos onde praticamente todos os pontos se sobrepõem em uma faixa muito próxima ao valor total de sementes (50) testadas por tratamento.

Além disso, vale ressaltar que a germinação das sementes ocorreu dentro do prazo normal esperado de até dois dias de germinação segundo Grasso *et al.*, (2018) e se, por ventura, esse tempo for mais longo, pode ser devido à influência do lote que pode apresentar um tempo de germinação retardado ou de outros parâmetros de tempo de germinação que variam bastante entre os estudos. Por exemplo, Manesh *et al.*, (2018) só avaliou as sementes germinadas após um período de 5 dias. Portanto, o período de germinação é um parâmetro que pode variar entre os trabalhos. É possível notar que a partir do terceiro dia os marcadores referentes a cada concentração começam a se igualar.

**Figura 2.** Gráfico do crescimento médio de plântulas de *Lactuca sativa* durante 7 dias em diferentes tratamentos.

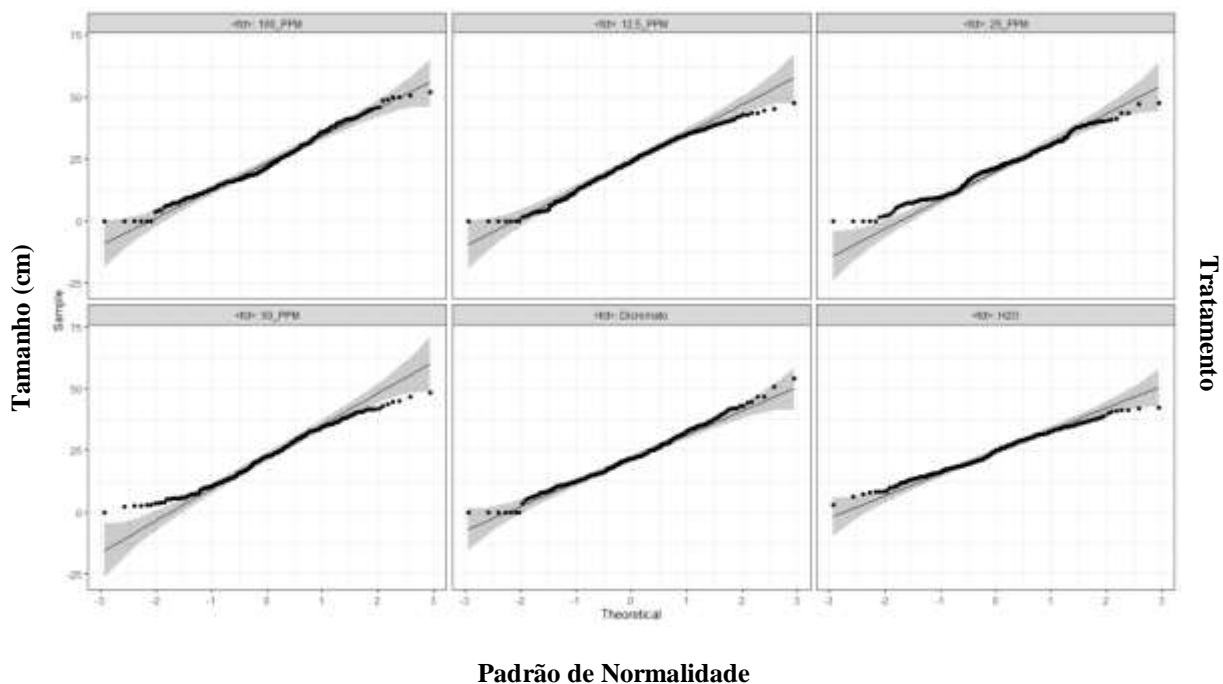


Tamanho e Erro Padrão Médio (EMP) das plântulas de *Lactuca sativa* nos tratamentos com dois controles, o negativo, água destilada ( $\text{H}_2\text{O}$ ) e o positivo dicromato de potássio ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) e diferentes concentrações de NP's de dióxido de titânio  $\text{TiO}_2$  (12,5 ppm, 25 ppm e 100ppm), após 7 dias de semeadura.

Em seguida da análise do processo de germinação das sementes, vem o crescimento representado no **Figura 2** acima. Um teste de anova de amostras repetidas

deveria ser feita para ver o efeito do dia/tratamento no crescimento. No entanto, conforme mostra o **Figura 3** abaixo, não foi possível realizar esse teste devido a não normalidade dos dados, pois, as bolinhas representadas nos gráficos que equivalem às medidas não estão na faixa sombreada cinza ao longo da extensão da linha nos gráfico, onde deveriam estar para serem considerados dados normais. Porém, foi realizado o teste de Kruskal-Wallis, um teste análogo, entretanto usado para dados não normais, mas com diferenças significativas encontradas no teste (*Kruskal-Wallis chi-squared* = 22.296, *df* = 5, *p-value* = 0.00046).

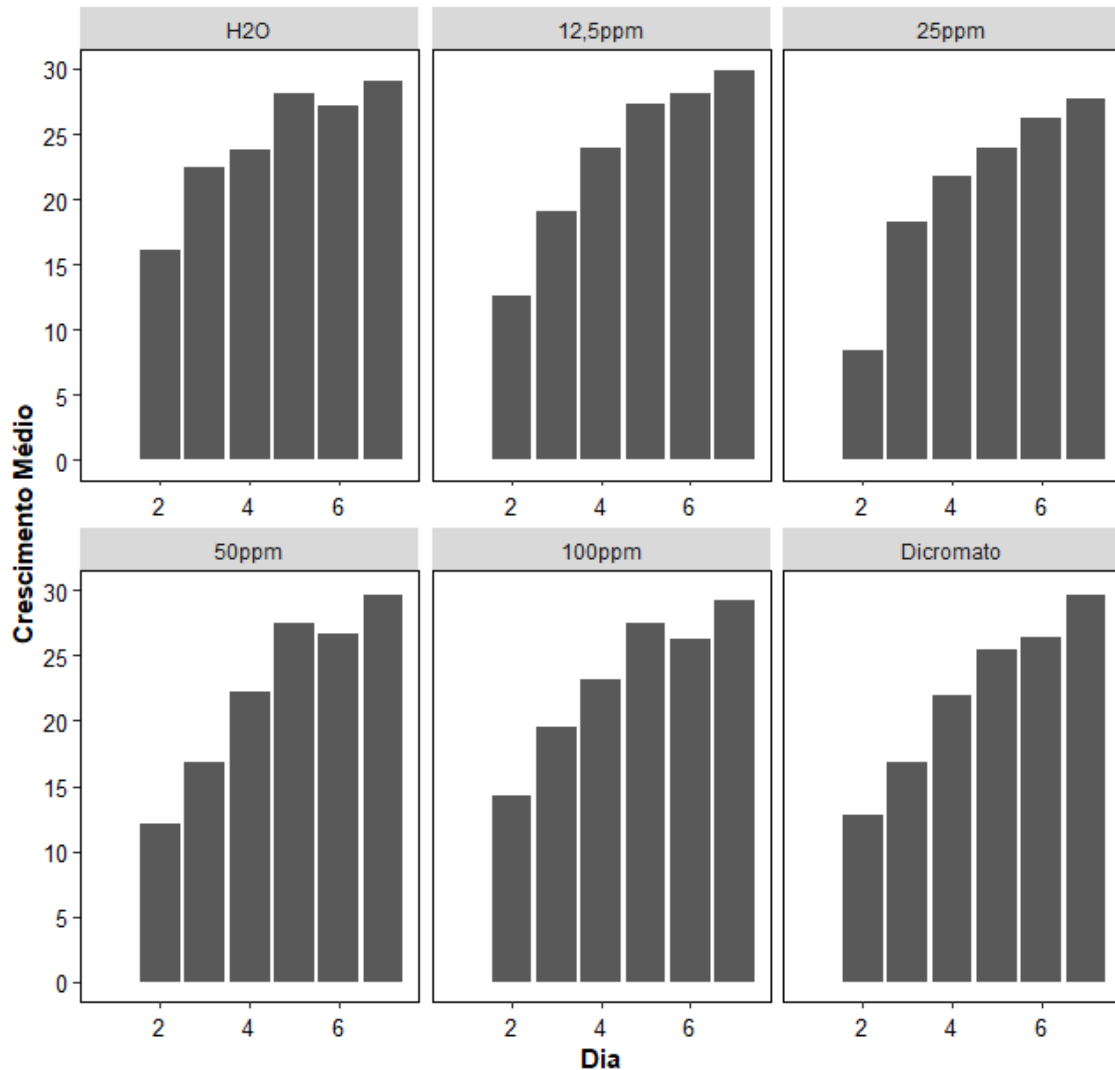
**Figura 3.** Padrão de distribuição não normal obtido por meio do teste de Kruskal-Wallis dos dados de crescimento de *Lactuca sativa* (Asteraceae) em diferentes tratamentos de TiO<sub>2</sub>.



Representação da não normalidade dos dados de crescimento das sementes de *Lactuca sativa* no experimento com dois controles, o negativo, água destilada (H<sub>2</sub>O) e o positivo dicromato de potássio (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) e diferentes concentrações de NP's de dióxido de titânio TiO<sub>2</sub> (12,5 ppm, 25 ppm, 50 ppm e 100ppm). Onde os pontinhos pretos representam o tamanho dos indivíduos e a sombra cinza representa o padrão que deveria ocorrer para considerar os dados normais.

Em seguida, foi realizado um teste de anova para comparar o crescimento médio entre os tratamentos e não foi encontrada diferença significativa ( $F(5, 187) = 0.43, p = 0.82$ ) entre os tratamentos, havendo comparação tanto com os controles quanto com as outras concentrações de titânio (todos os pares possíveis). Isso fica evidenciado na **Figura 4** abaixo onde é possível observar um compilado de gráficos sobre o tamanho médio dos grupos de acordo com cada tratamento durante o experimento.

**Figura 4.** Tamanho médio diário de *Lactuca sativa* L. (Asteraceae) com diferentes tratamentos de TiO<sub>2</sub> durante 7 dias.



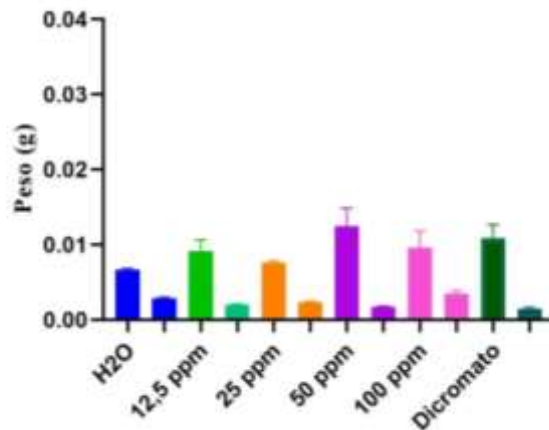
Seis representações do crescimento médio (mm) diário das sementes de *Lactuca sativa* durante os sete dias de experimento de acordo com o tratamento utilizado pré-germinação sendo dois controles, o negativo, água destilada (H<sub>2</sub>O) e o positivo, dicromato de potássio (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) e diferentes concentrações de NP's de dióxido de titânio TiO<sub>2</sub> (12,5 ppm, 25 ppm, 50 ppm e 100ppm). Note que em cada representação o valor mais alto do eixo y varia de acordo com o crescimento médio em cada tratamento.

O tamanho da plântula não variou de forma significativa, quando comparados nos mesmos dias, indicando que o TiO<sub>2</sub> não modifica o padrão de crescimento da planta. Note os grupos das concentrações 12,5 e 25 ppm são muito próximos entre si assim como os grupos 50 e 100 ppm também. De acordo com Clemente, (2012) existem vários guias para a condução de ensaios toxicológicos mas isso ainda não está bem definido para os testes nanoecotoxicológicos e órgãos como a OECD (*Organisation for Economic Co-operation and Development*) sugerem que a CL50 seja encontrada até a concentração de 100 ppm.

O próximo aspecto a ser analisado relacionado aos experimentos de germinação e

crescimento é a comparação entre o peso úmido e peso seco, medidos no sétimo dia de experimento. O **Figura 5** abaixo representa peso úmido e seco de cada tratamento feito durante o ensaio.

**Figura 5.** Peso úmido x peso seco do material vegetal de *Lactuca sativa* L. (Asteraceae) após 7 dias em diferentes tratamentos com dióxido de titânio TiO<sub>2</sub>.



Comparação entre peso úmido (barras maiores exatamente nos marcadores que nomeiam os tratamentos) e peso seco (barras menores, barras alternadas onde não estão nomeados os tratamentos) de *Lactuca sativa* nos tratamentos com dois controles, o negativo, água destilada (H<sub>2</sub>O) e o positivo dicromato de potássio (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) e diferentes concentrações de NP's de dióxido de titânio TiO<sub>2</sub> (12,5 ppm, 25 ppm, 50 ppm e 100ppm), após 8 dias de semeadura.

A medição do peso seco nos diferentes tratamentos não apresentou diferença significativa entre os grupos, no entanto, Movafeghi *et al*, (2018) que trabalhou com a espécie de planta aquática *Spirodela polyrrhiza* citou a diminuição do peso seco como um dos parâmetros afetados pelo titânio. O menor peso seco dentre os tratamentos com titânio é o do grupo de 50 ppm, corroborando com o sugerido pela OECD que a CL50 seria encontrada até a concentração de 100 ppm (Clemente, 2012).

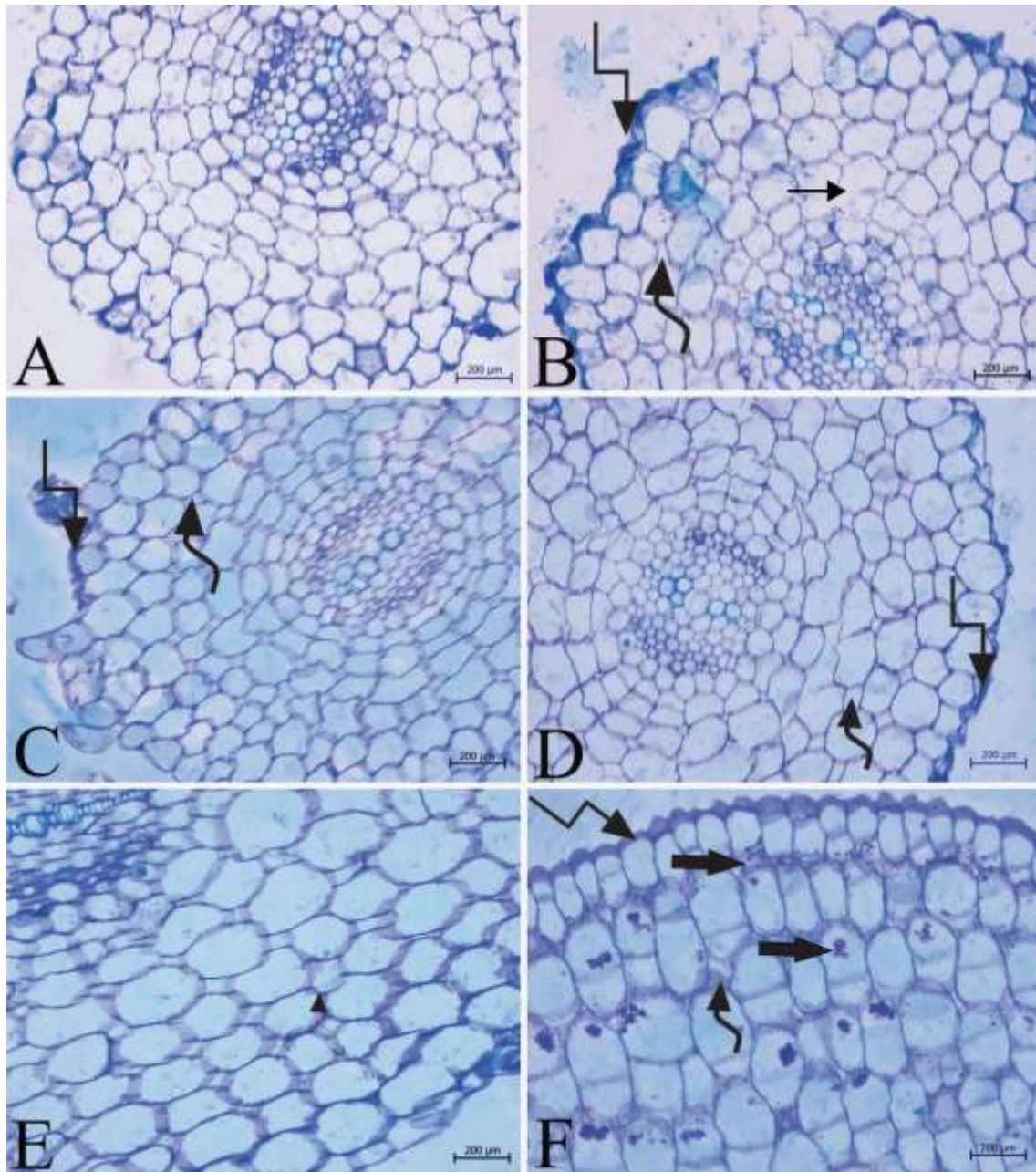
Partindo para a observação do peso úmido, ainda há certa semelhança entre os grupos, porém as diferenças são mais notórias entre o peso úmido do que no peso seco. Os grupos do dicromato, 12,5 ppm e 25 ppm foram os que mais se assemelharam ao controle negativo em relação ao peso úmido. Já os grupos 50 ppm e 100 ppm, foram os que apresentaram a maior medida em relação ao dado critério, o de 50 ppm sendo o maior peso úmido de todos. Nesse caso o grupo de 50 ppm foi o que apresentou o maior peso úmido enquanto seu peso seco foi praticamente o menor em relação aos outros grupos. De acordo com as microscopias será possível constatar se o incremento de peso está relacionado com algum estresse ou dano sofrido pela planta visto que nem o grupo que foi nutrido apenas com água teve um incremento de peso como o grupo de 50 ppm. Pois, de acordo com Balaji B *et*

*al.*, (2007) o peso fresco da planta *Hordeum vulgare* L., espécie trabalhada no estudo, deveria diminuir em resposta ao estresse sofrido como resposta à toxicidade.

No entanto, Tombuloglu *et al.*, (2018) mostrou em seus ensaios com NPs de ferro magnético e *Hordeum vulgare* L. que em certas concentrações o peso fresco pode aumentar e ser até maior que o peso do controle sem tratamento e que a partir de uma concentração muito alta, em seus ensaios 500 e 1000 ppm, efetivamente o peso fresco sofre uma alta diminuição.

As microscopias, para análise qualitativa, dos ensaios de germinação e crescimento serão analisadas a fim de entender melhor que tipos de danos morfológicos e anatômicos podem ser causados pelo dióxido de titânio.

**Figura 6.** Pranchas de microscopia ótica da radícula de *Lactuca sativa* no 3º dia pós-semeadura em diferentes tratamentos.



Microscopia ótica da raiz de *Lactuca sativa* 3 dias após germinação, em tratamentos diferentes. A: Sem tratamento. B: 12,5 ppm de  $\text{TiO}_2$ . C: 25 ppm de  $\text{TiO}_2$ . D: 50 ppm de  $\text{TiO}_2$ . E: 100 ppm de  $\text{TiO}_2$ . F: Dicromato de potássio. As setas indicam aspectos a serem observados nas imagens. Seta angulada: espessamento/irregularidade da epiderme; Seta curvada: aumento do espaço intercelular; Seta preta grossa: inclusões (NPs); Seta preta fina: rompimento de parede celular.

Na **Figura 6** acima é possível observar que há espessamento precoce da parede celular das células epidermais, como evidenciado pela seta que é bastante diferente do encontrado no controle negativo (**figura 6A**) onde essa mesma característica também foi encontrada nas imagens de (Manesh *et al.*, 2018) onde plantas de rabanete (*Raphanus sativus*)

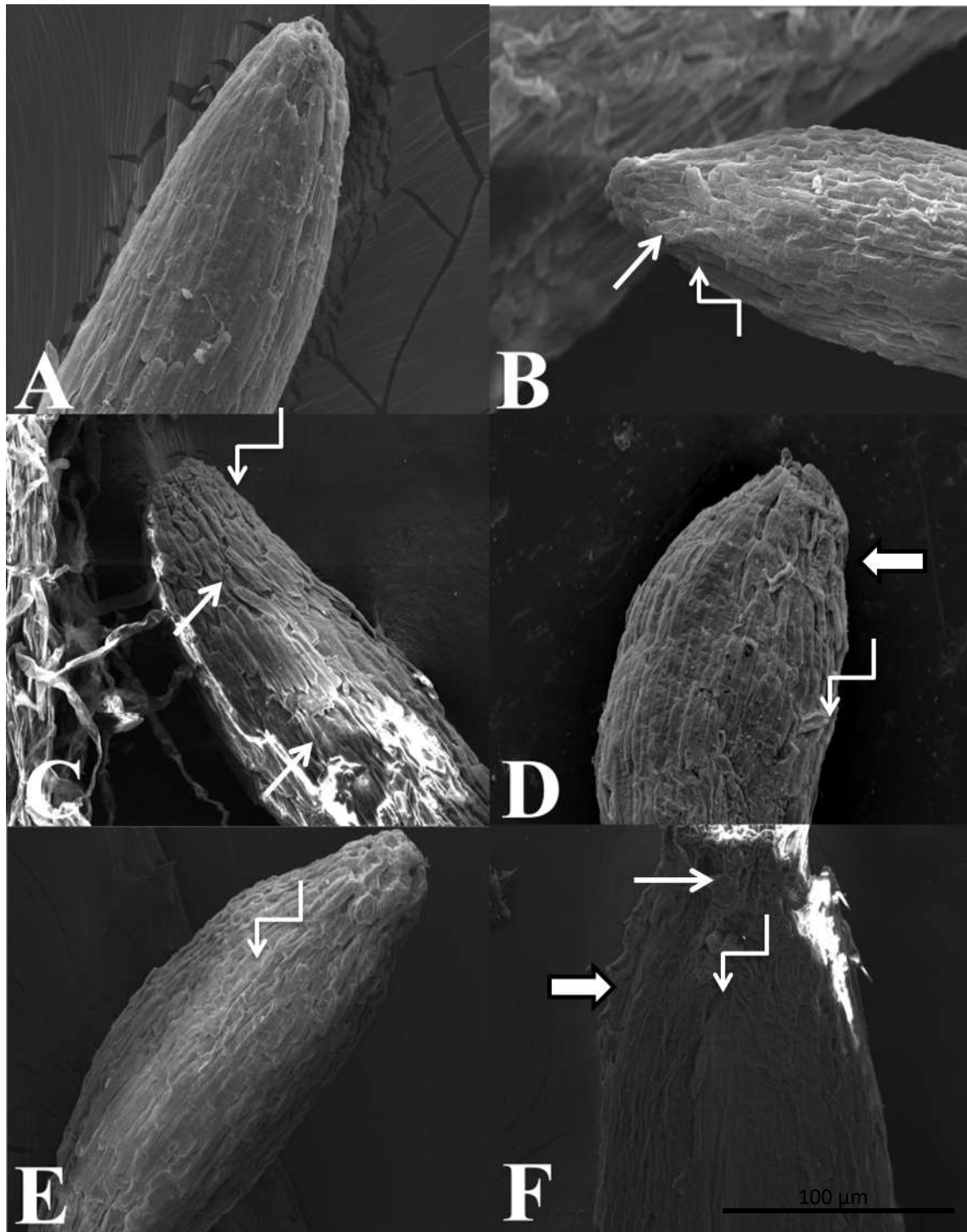
também passaram por exposição ao titânio. Além disso, é possível notar um aumento no espaço intercelular que já se apresenta nos grupos 12,5, 25 e 50 (**Figuras 6B, 6C e 6D**), mas, se apresenta mais expressivo no grupo de 100 (**Figura 6E**), provavelmente pela desorganização celular diferentemente do trabalho de (Manesh *et al.*, 2018) no qual as amostras analisadas apresentaram poucos espaços intercelulares.

Além disso, foram notadas inclusões celulares provavelmente provenientes dos compostos aos quais as plantas foram submetidas, mas nessa prancha essas inclusões só aparecem na **Figura F** (dicromato de potássio), mas que é uma possível alteração que também pode ocorrer nos tratamentos com titânio. De acordo com Bellani *et al.*, (2020) as partículas de dióxido de titânio foram observadas em formato de agregados no vacúolo, no citoplasma e no espaço entre a parede celular e a membrana plasmática.

Agora, sob outra perspectiva, a da microscopia eletrônica de varredura, uma das diferenças mais visíveis entre a raiz da planta que não foi submetida a nenhum tratamento e as demais é a turgidez celular aparente (**Figura 7**) corroborando com Balaji B *et al.*, (2007) que trouxe o encolhimento das células da epiderme e do parênquima paliçádico em raízes, caules e folhas de cevada como sendo uma das mudanças anatômicas sofridas pela planta em resposta à toxicidade por metais pesados. Causa de deformação na morfologia do órgão e irregularidades na epiderme. Ainda, outro ponto a ser tocado é a descamação celular, que aconteceu em alguns pontos como nas figuras **7B, 7C e 7F** que deixam visíveis alguns “buracos” criados na superfície da raiz. Em testes realizados com nanotubos de carbono por Begum e Fugetsu, (2012) foi observado que as plantas tiveram epiderme e capas radiculares rompidas, corroborando com os resultados aqui exibidos.



**Figura 7.** Pranchas de microscopia eletrônica de varredura de coifa de *Lactuca sativa* no 3º dia pós-semeadura em diferentes tratamentos.

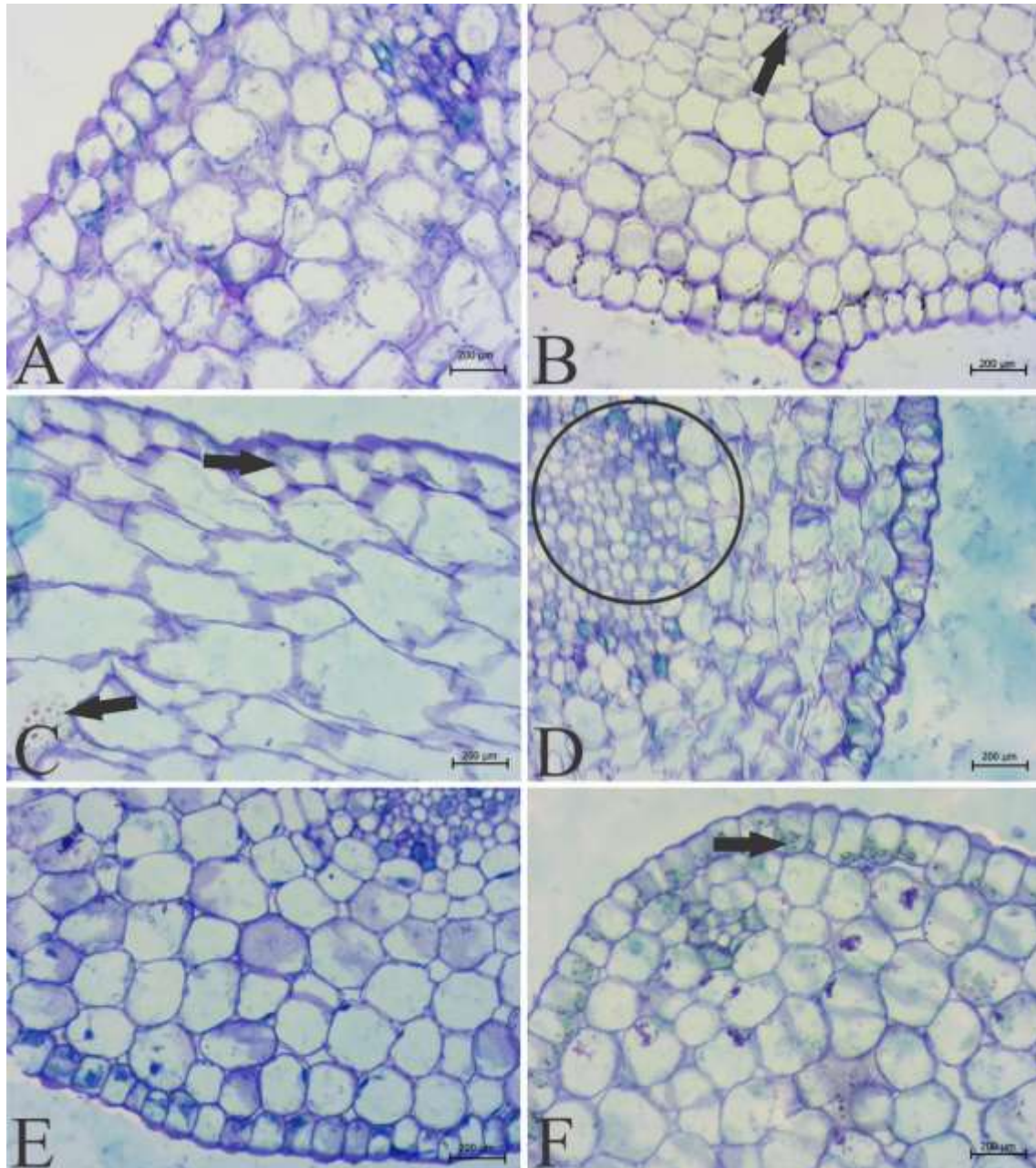


Microscopia eletrônica de varredura da coifa de *Lactuca sativa* 3 dias após a germinação, em tratamentos diferentes. A: Sem tratamento. B: 12,5 ppm de  $\text{TiO}_2$ . C: 25 ppm de  $\text{TiO}_2$ . D: 50 ppm de  $\text{TiO}_2$ . E: 100 ppm de  $\text{TiO}_2$ . F: Dicromato de potássio. As setas indicam aspectos a serem observados nas imagens. Branca angulada: turgidez celular; Branca fina: descamação celular; Branca larga: irregularidade na epiderme.

A seguir, nas pranchas que representam o eixo hipocótilo, ainda no 3º dia, **Figura**

**8** abaixo, é possível notar a presença das inclusões não apenas nas amostras que foram tratadas com dicromato, mas também em amostras que foram tratadas com titânio como nas figuras **8B** e **8C**. Ainda falando das inclusões, as setas mostram que elas aparecem não só na epiderme, da mesma forma essas inclusões também foram encontradas nos ensaios de (Manesh *et al.*, 2018). No córtex e no caso da imagem **8B** também é possível perceber as inclusões inclusive no feixe vascular provavelmente porque, segundo Cox *et al.*, (2017); Raliya *et al.*, (2015), uma vez que as partículas são absorvidas por células da raiz ou da folha elas são translocadas pela planta por todo o sistema vascular.

**Figura 8.** Prancha de microscopia ótica do eixo hipocótilo-radicular de *Lactuca sativa* no 3º dia pós-semeadura em diferentes tratamentos.



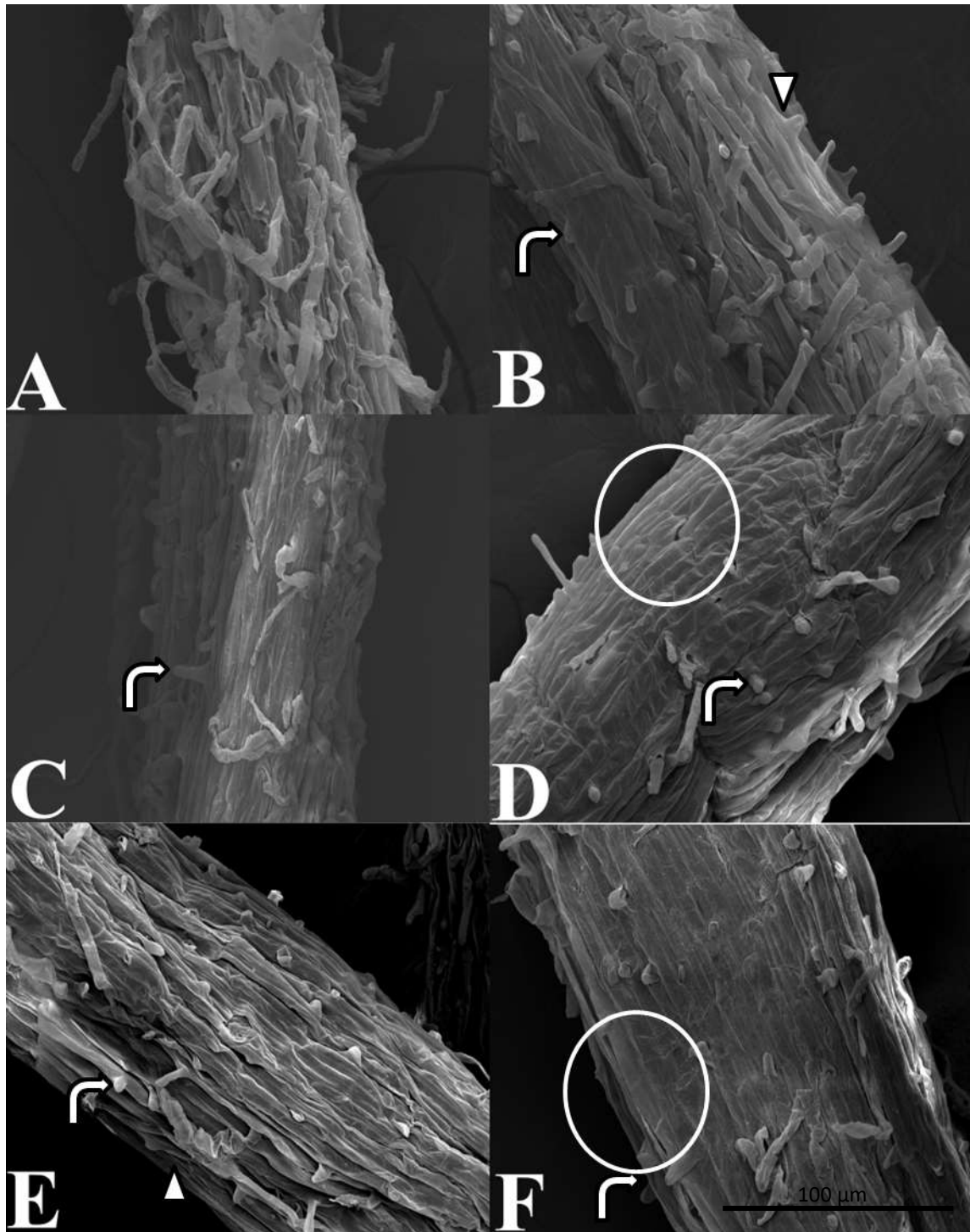
Microscopia ótica do eixo hipocótilo radicular de *Lactuca sativa* 3 dias após a germinação, em tratamentos diferentes. A: Sem tratamento. B: 12,5 ppm de  $\text{TiO}_2$ . C: 25 ppm de  $\text{TiO}_2$ . D: 50 ppm de  $\text{TiO}_2$ . E: 100 ppm de  $\text{TiO}_2$ . F: Dicromato de potássio. As setas indicam aspectos a serem observados nas imagens. Seta angulada: espessamento/irregularidade da epiderme; Seta curva: aumento do espaço intercelular; Seta preta grossa: inclusões (MPs); Seta preta fina: rompimento de parede celular. Ponta de seta: Círculo preto: desestruturação do feixe vascular.

Além das inclusões, outro ponto a ser ressaltado na prancha da **Figura 8** acima é a irregularidade da morfologia celular encontrada no meristema cortical (figura **8C** e **8D**), onde,

acompanhada dessa disformia existe também uma retração do citoplasma que pode ser apontada como um sinal de estresse sofrido pela planta devido ao tratamento ao qual ela foi submetida. No trabalho realizado com plantas de alface por Begum, Ikhtiari e Fugetsu, (2011) alterações citoplasmáticas também foram tidas como danos celulares anteriores à morte celular com a desintegração da membrana e liberação de seus constituintes.

Na imagem **8D** ainda ocorreu uma desestruturação do feixe vascular que não ocorreu nos outros tratamentos, nem mesmo no controle com tratamento de dicromato de potássio trazendo o 50 ppm como uma concentração que causa mais danos anatômicos à planta do que a maior concentração testada nos ensaios que foi 100 ppm, pois neste caso ela não apresentou grandes danos.

**Figura 9.** Pranchas de microscopia eletrônica de varredura da zona pilífera de *Lactuca sativa* no 3º dia pós-semeadura em diferentes tratamentos.



Microscopia eletrônica de varredura da zona pilífera de *Lactuca sativa* 3 dias após a germinação, em tratamentos diferentes. A: Sem tratamento. B: 12,5 ppm de  $\text{TiO}_2$ . C: 25 ppm de  $\text{TiO}_2$ . D: 50 ppm de  $\text{TiO}_2$ . E: 100 ppm de  $\text{TiO}_2$ . F: Dicromato de potássio. As setas coloridas indicam aspectos a serem observados nas imagens. Ponta de seta branca: poucos pelos; Seta dobrada branca: pelos curtos; Círculo branco: ausência de pelos;

Ainda sobre o eixo hipocótilo radicular, a **Figura 9** acima trás as imagens de

varredura que evidenciam em todas as imagens exceto a do controle negativo (sem tratamento, **9A**) a atrofia dos pelos que compõem a zona pilífera. Além da atrofia do pelos existem algumas zonas onde além de curtos, a quantidade de pelos também é reduzida em comparação aos controles. Existem ainda as regiões onde há a ausência completa de pelos mostrando claramente que há um grande impacto dos tratamentos na morfologia dessa área embora as figuras anteriores, em alguns casos, não evidenciam danos anatômicos muito grandes. Uma das evidências da toxicidade causada por nanotubos de carbono, segundo Begum e Fugetsu, (2012) é a pouca quantidade e comprimento de pelos radiculares, em alguns casos a ausência dos mesmos. Podemos sugerir que os danos encontrados nessa região foram causados pelo titânio.

A seguir, para finalizar as amostras coletadas no 3º dia dos ensaios de germinação e crescimento serão avaliadas as microscopias, ótica e de varredura, das folhas cotiledonares de *Lactuca sativa* nas **Figuras 10 e 11**.

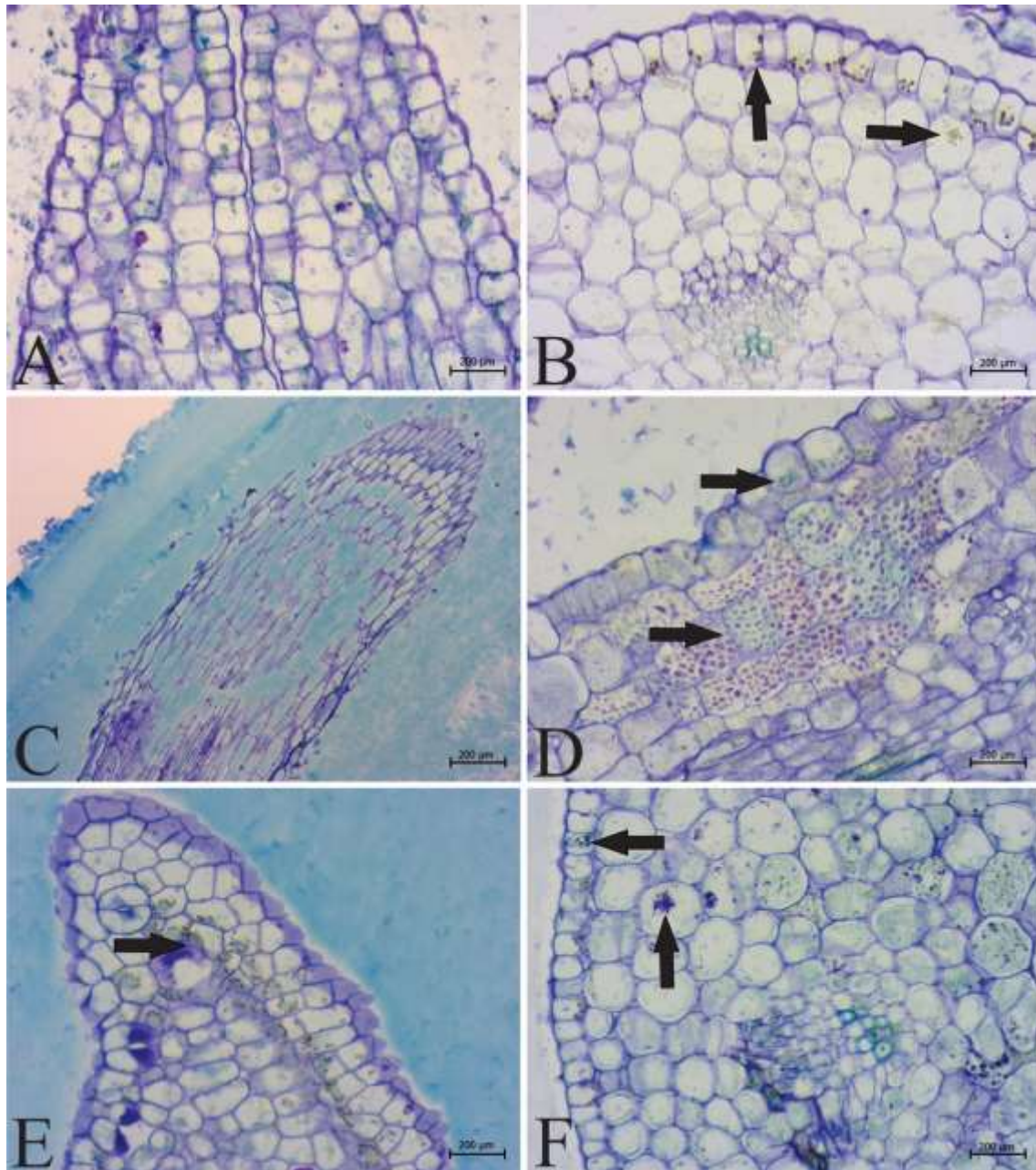
O principal ponto a ser destacado nas imagens é a presença das inclusões tanto nos tratamentos com titânio como no controle com dicromato. A quantidade delas varia de acordo com a concentração do tratamento. Durante o estudo de (Santos Filho, Dos *et al.*, 2019) foi observado que as partículas de titânio não possuem um tamanho homogêneo, pois, foram encontradas partículas de diferentes tamanhos e isso pode explicar alguns danos causados pelo TiO<sub>2</sub>, conforme é possível enxergar na Figura 10 essas inclusões se mostrando de maneiras distintas. Não só a presença, mas também a translocação das partículas para outros órgãos como caule e raiz foi evidenciado por (Chichiriccò e Poma, 2015) através da penetração pela epiderme foliar pelos estômatos. Todas as imagens que apresentam inclusões, evidenciadas pelas setas pretas possuem uma grande quantidade que se estende por muitas células ao longo da amostra, mas a imagem **10D**, mais uma vez do grupo de 50 ppm, é a que apresenta a diferença mais expressiva em relação às demais concentrações e aos controles. Ressaltando um fato diferente do esperado que não é a maior concentração que apresenta o maior dano.

Analisando os danos causados às folhas cotiledonares pela técnica de microscopia eletrônica de varredura, os principais indicadores morfológicos são os tricomas, que no caso das amostras em questão são glandulares (Fahn, 1982). Na maioria das imagens apresentadas, os tricomas estão presentes nas imagens **11C**, **11D**, **11G**, **11H**, **11J** e **11K** ou eles são atrofiados ou deformados, em comparação aos tricomas saudáveis indicados nas outras imagens pelo retângulo branco. Nas imagens **11E** e **11F** há a ausência desses tricomas, o que também pode ser um indicativo de estresse sofrido devido ao tratamento. É possível que a

diminuição ou ausência dos tricomas seja realmente um dano, uma vez que, (Kolenčík *et al.*, 2020) apontou em seu trabalho uma redução da quantidade de tricomas glandulares presentes na folha de *Helianthus annuus* L.

Além dos tricomas, outros aspectos a serem observados são a irregularidade da epiderme e a descamação celular também é bastante evidente, principalmente nas amostras do grupo de 100 ppm (figuras **11I** e **11J**). Esses danos na superfície são corroborados por (Kolenčík *et al.*, 2020) que apontou que os danos na cutícula e parede celular de *Helianthus annuus* L. aumentam quanto maior a exposição ao dióxido de titânio e óxido de zinco.

**Figura 10.** Prancha de microscopia ótica da folha de *Lactuca sativa* no 3º dia pós-semeadura em diferentes tratamentos.

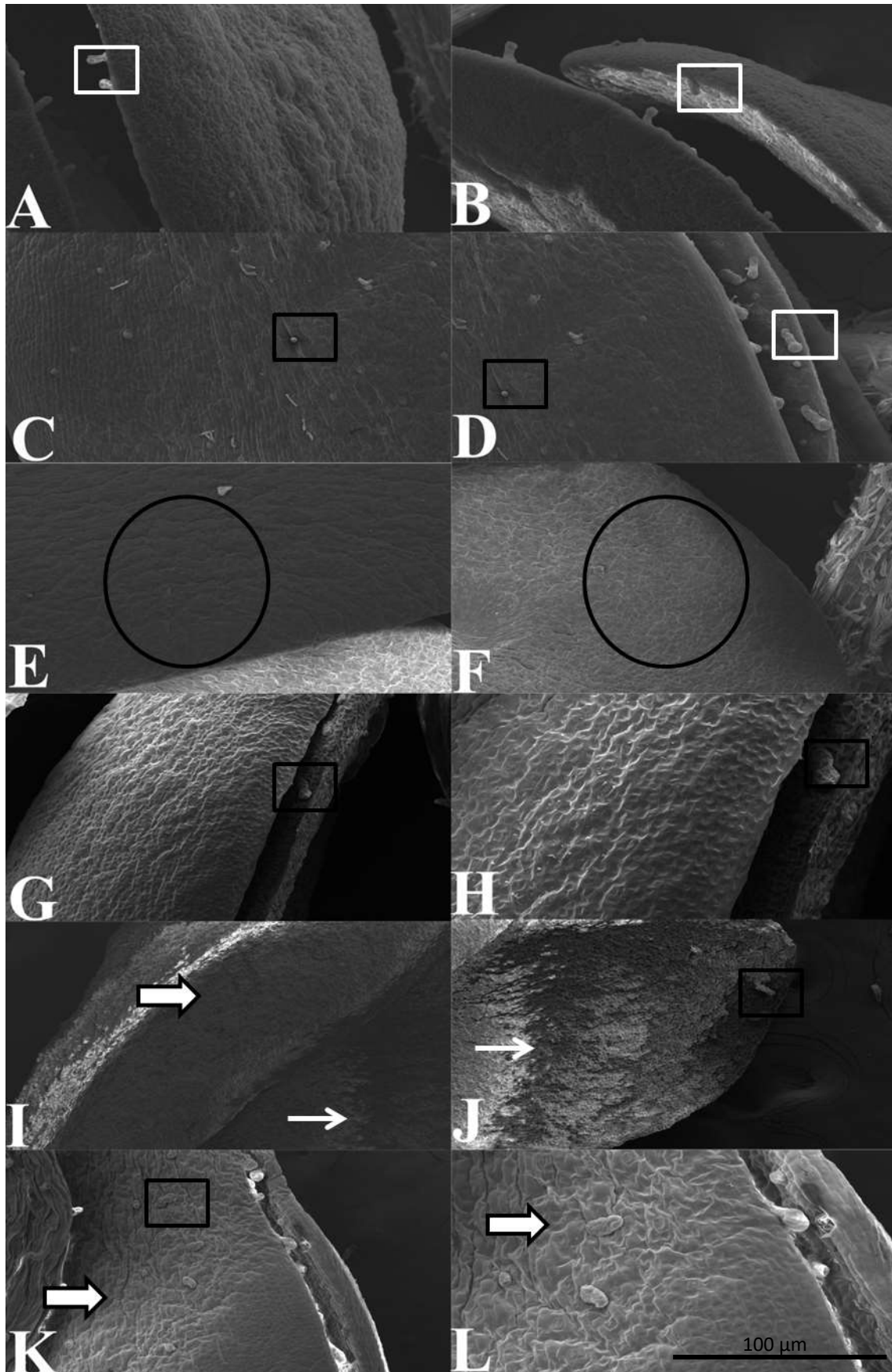


Microscopia ótica da folha de *Lactuca sativa* 3 dias após a germinação, em tratamentos diferentes. A: Sem tratamento. B: 12,5 ppm de  $\text{TiO}_2$ . C: 25 ppm de  $\text{TiO}_2$ . D: 50 ppm de  $\text{TiO}_2$ . E: 100 ppm de  $\text{TiO}_2$ . F: Dicromato de potássio. As setas indicam aspectos a serem observados nas imagens. Seta preta larga: inclusões (MPs);

**Figura 11.** Pranchas de microscopia eletrônica de varredura da folha de *Lactuca sativa* no 3º



dia pós-semeadura em diferentes tratamentos.



Microscopia eletrônica de varredura da folha de *Lactuca sativa* com 3 dias após a germinação, em tratamentos

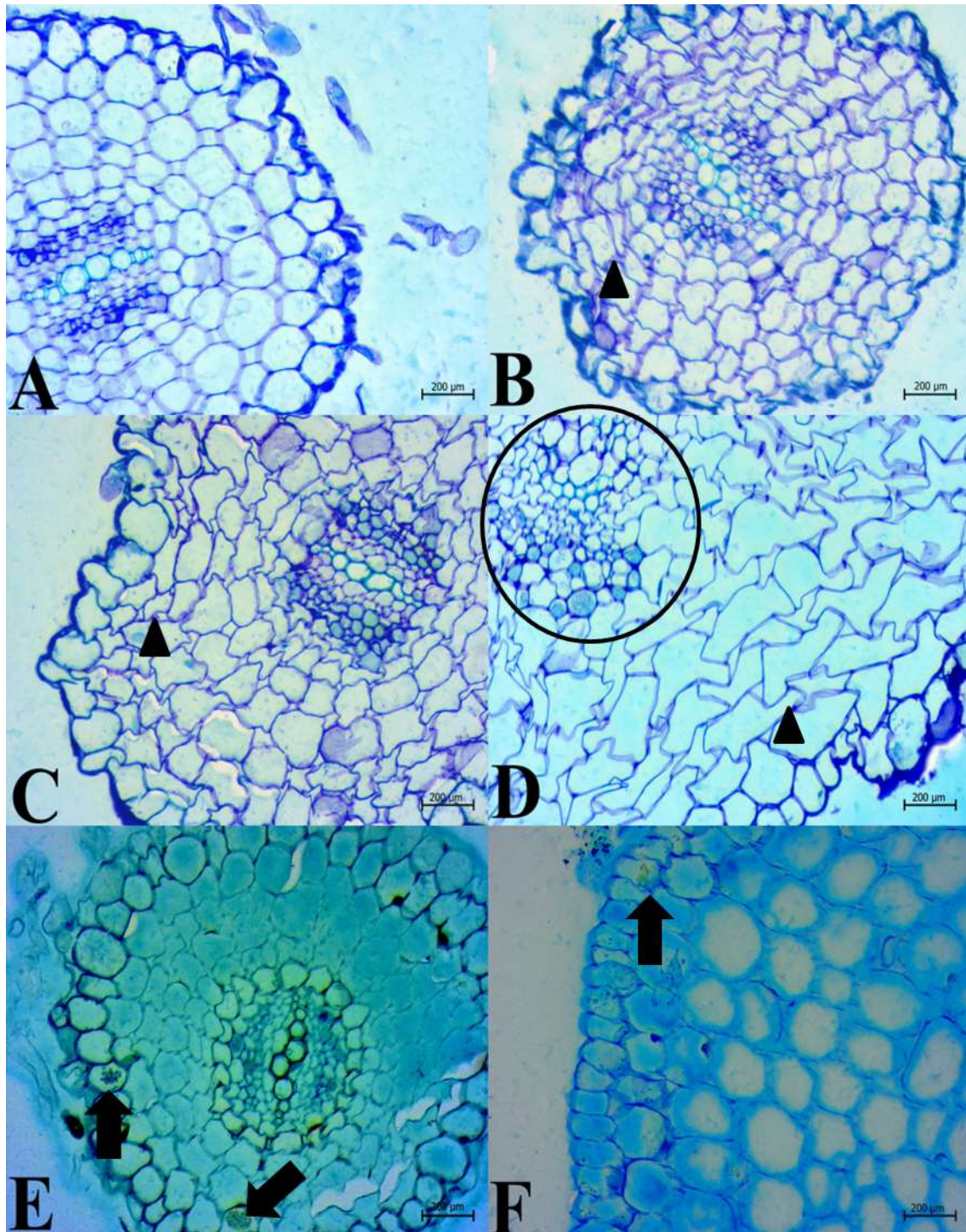
diferentes. A e B: Sem tratamento. C e D: 12,5 ppm de TiO<sub>2</sub>. E e F: 25 ppm de TiO<sub>2</sub>. G e H: 50 ppm de TiO<sub>2</sub>. I e J: 100 ppm de TiO<sub>2</sub>. K e L: Dicromato de potássio. As setas coloridas indicam aspectos a serem observados nas imagens. Retângulo branco: presença de tricomas; Retângulo preto: tricomas deformados ou pouco desenvolvidos; Círculo preto: ausência de tricomas; Rosa claro: epiderme irregular; Branca fina: descamação celular.

A seguir serão apresentadas as pranchas referentes às imagens feitas das amostras de radícula, hipocótilo e folhas cotiledonares de *Lactuca sativa* coletadas no 7<sup>o</sup> (último) dia dos experimentos de germinação e crescimento.

Na **Figura 12** a seguir um aspecto bastante chamativo é a alteração da morfologia celular na região cortical da radícula e que ela ocorre praticamente de forma gradativa partindo da concentração de 12,5 ppm (figura **12B**) chegando ao seu ápice de desordem e deformação no grupo de 50 ppm (figura **12D**) onde, nessa imagem, além da disformia é encontrada a desestruturação do feixe vascular trazendo mais uma vez essa concentração como a mais danosa anatomicamente para a planta. Em concordância com estudos realizados com sementes de rabanete, (Manesh *et al.*, 2018) e (Chichiriccò e Poma, 2015) mostraram que a exposição a NPs durante o alongamento da raiz está associado com o surgimento de células anormais.

Além dessas características citadas as inclusões também são encontradas, no entanto apenas nas figuras **12E** e **12F**, grupos 100 ppm e dicromato, respectivamente. Sobre essas inclusões de NPs, (Chichiriccò e Poma, 2015) foi observado que elas podem se acumular no rizoderma das plantas e penetrar na parede celular e até mesmo serem translocadas. Para a confirmação dessa hipótese, análises ultraestruturais com microscopia eletrônica de transmissão se fazem necessárias para desvendar a dinâmica de translocação dessas partículas.

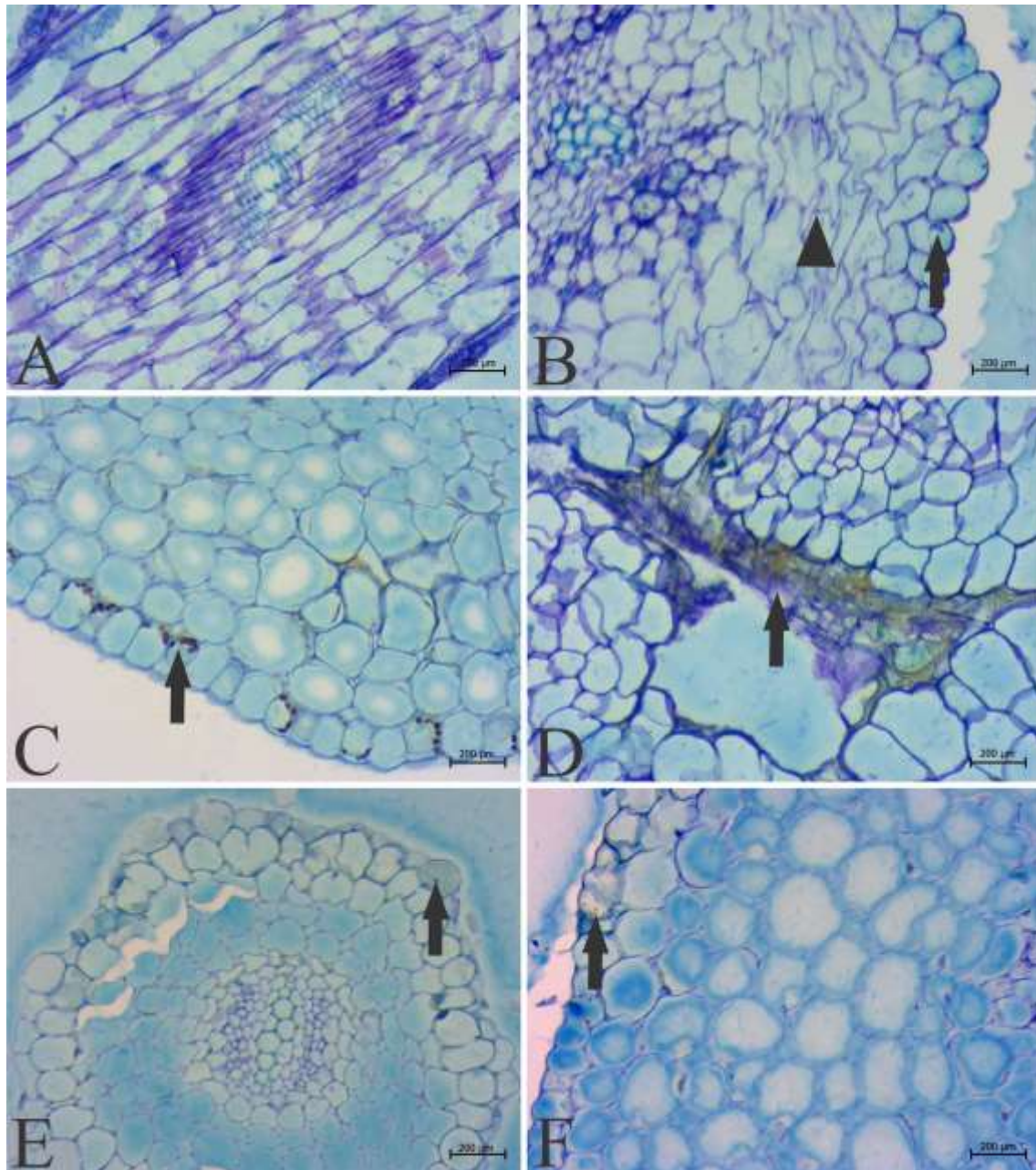
**Figura 12.** Prancha de microscopia ótica de radícula de *Lactuca sativa* no 7º dia pós-semeadura em diferentes tratamentos.



Microscopia ótica da radícula de *Lactuca sativa* 7 dias após a germinação, em tratamentos diferentes. A: Sem tratamento. B: 12,5 ppm de  $\text{TiO}_2$ . C: 25 ppm de  $\text{TiO}_2$ . D: 50 ppm de  $\text{TiO}_2$ . E: 100 ppm de  $\text{TiO}_2$ . F: Dicromato de potássio. As setas indicam aspectos a serem observados nas imagens. Preta larga: inclusões (NPs); Ponta de seta: disformia/irregularidade celular; Círculo preto: desestruturação do feixe vascular;

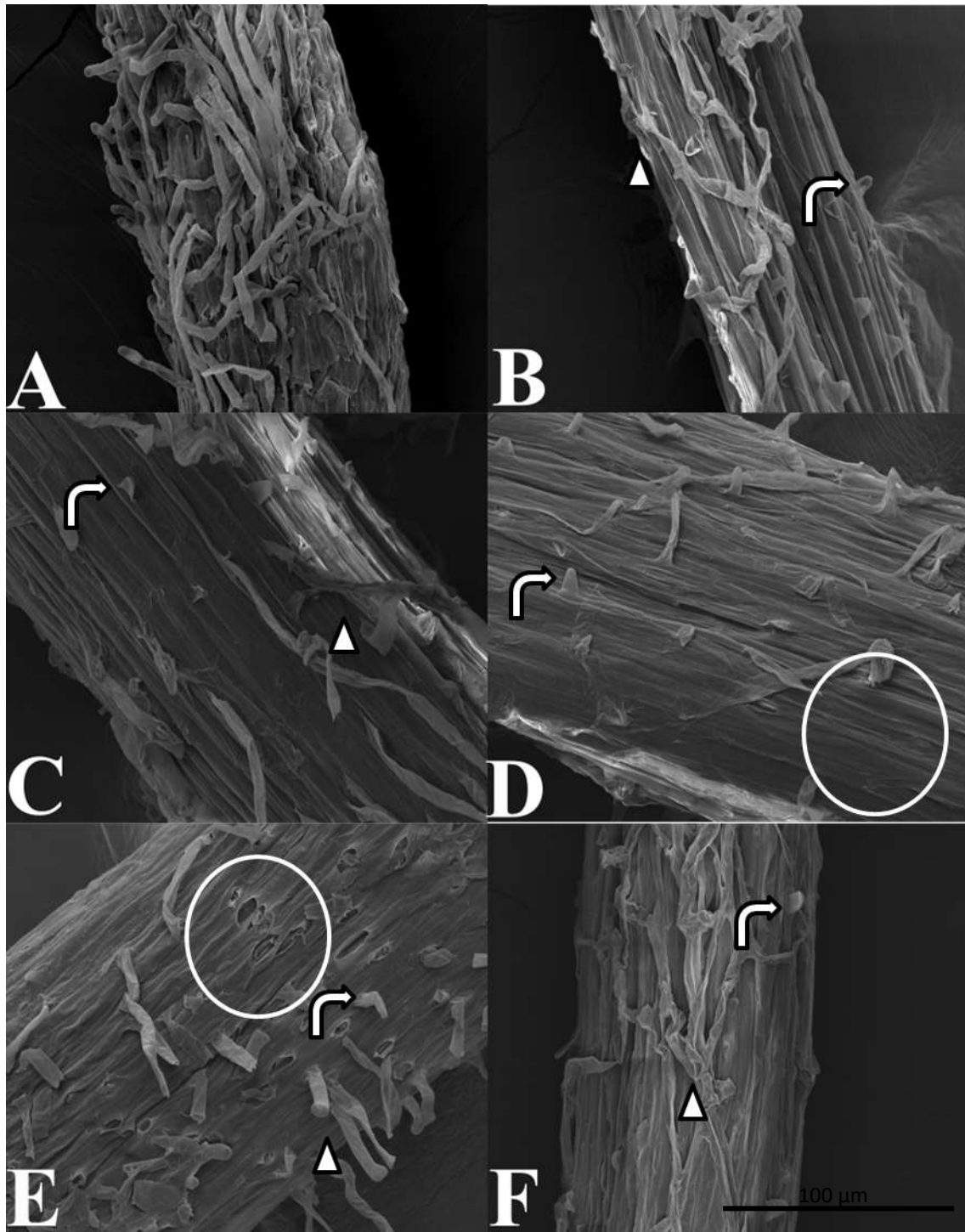
A seguir, na **Figura 13** são apresentadas as imagens da região do hipocótilo trazendo, além da disformia celular cortical, que dessa vez se apresenta mais agressiva nas células da figura **13B** (grupo 12,5 ppm), as inclusões, também encontrada por Santos Filho, Dos *et al*, (2019) descritas como corpos oleosos e com disposição periférica, que vão aumentando gradativamente de acordo com o aumento das concentrações chegando em seu ápice no tratamento de 50 ppm, sendo o dano mais aparente e expressivo apresentado até esse momento dessa dada concentração.

**Figura 13.** Prancha de microscopia ótica do eixo hipocótilo-radicular de *Lactuca sativa* no 7º dia pós-semeadura em diferentes tratamentos.



Microscopia ótica do eixo hipocótilo radicular de *Lactuca sativa* 7 dias após a germinação, em tratamentos diferentes. A: Sem tratamento. B: 12,5 ppm de  $\text{TiO}_2$ . C: 25 ppm de  $\text{TiO}_2$ . D: 50 ppm de  $\text{TiO}_2$ . E: 100 ppm de  $\text{TiO}_2$ . F: Dicromato de potássio. As setas indicam aspectos a serem observados nas imagens. Preta larga: inclusões (NPs); Ponta de seta: disformia/irregularidade celular.

**Figura 14.** Prancha de microscopia eletrônica de varredura da zona pilífera de *Lactuca sativa* no 7º dia pós-semeadura em diferentes tratamentos.

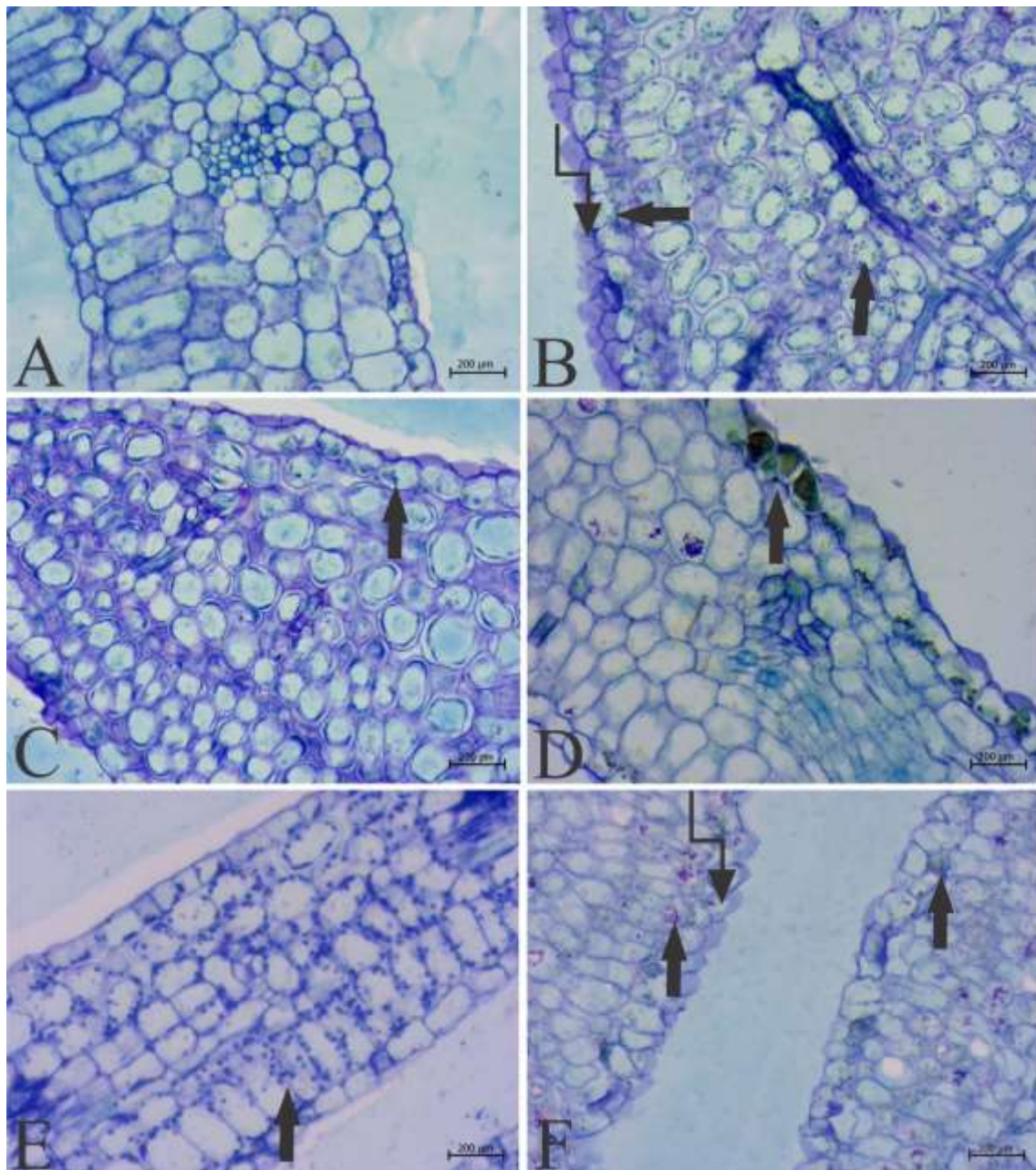


Microscopia eletrônica de varredura da zona pilífera de *Lactuca sativa* 7 dias após a germinação, em tratamentos diferentes. A: Sem tratamento. B: 12,5 ppm de  $\text{TiO}_2$ . C: 25 ppm de  $\text{TiO}_2$ . D: 50 ppm de  $\text{TiO}_2$ . E: 100 ppm de  $\text{TiO}_2$ . F: Dicromato de potássio. As setas indicam aspectos a serem observados nas imagens. Ponta de seta: poucos pelos; Seta dobrada: pelos curtos; Círculo branco: ausência de pelos;

Relacionada à **Figura 14** acima os aspectos referentes à zona pilífera que são a pouca quantidade de pelos, a atrofia dos pelos existentes e regiões com ausência dos mesmos que é observada apenas as figuras **14D** e **14E**, que são os grupos de 50 e 100 ppm. Já a pouca quantidade de pelos e a atrofia dos mesmos está presente em praticamente todos os grupos, assim como Begum, Ikhtiari e Fugetsu, (2011) também observaram danos na raiz nas zonas pilífera e de alongamento. Observando esses danos morfológicos, as análises de transcriptoma de (García-Sánchez, Bernal e Cristobal, 2015) apontaram um efeito específico das NPs nas células epidérmicas que originam os pelos radiculares.

A seguir, as **Figuras 15** e **16**, com pranchas de microscopia ótica e varredura, respectivamente, de folhas cotiledonares mostram algumas alterações importantes. As inclusões aparecem por praticamente todo o mesófilo. Além das inclusões mais expressivas se mostrarem na epiderme e, mais uma vez, o grupo de 50 ppm se mostrou o mais danoso. Além de algumas imagens apresentarem esse espessamento da epiderme que não se apresenta na amostra de controle que não sofreu nenhum tipo de tratamento, então isso possivelmente é um indicativo de estresse sofrido pela planta levando em consideração o aumento da superfície da raiz do repolho observada por Begum, Ikhtiari e Fugetsu, (2011) que foi tratada com grafeno (nanomaterial de carbono) e que o excesso desse material tenha resultado no intumescimento.

**Figura 15.** Prancha de microscopia ótica da folha de *Lactuca sativa* no 7º dia pós-semeadura em diferentes tratamentos.



Microscopia ótica da folha de *Lactuca sativa* 3 dias após a germinação, em tratamentos diferentes. A: Sem tratamento. B: 12,5 ppm de  $\text{TiO}_2$ . C: 25 ppm de  $\text{TiO}_2$ . D: 50 ppm de  $\text{TiO}_2$ . E: 100 ppm de  $\text{TiO}_2$ . F: Dicromato de potássio. As setas indicam aspectos a serem observados nas imagens. Seta angulada: espessamento/irregularidade da epiderme; Preta larga: inclusões (NPs);

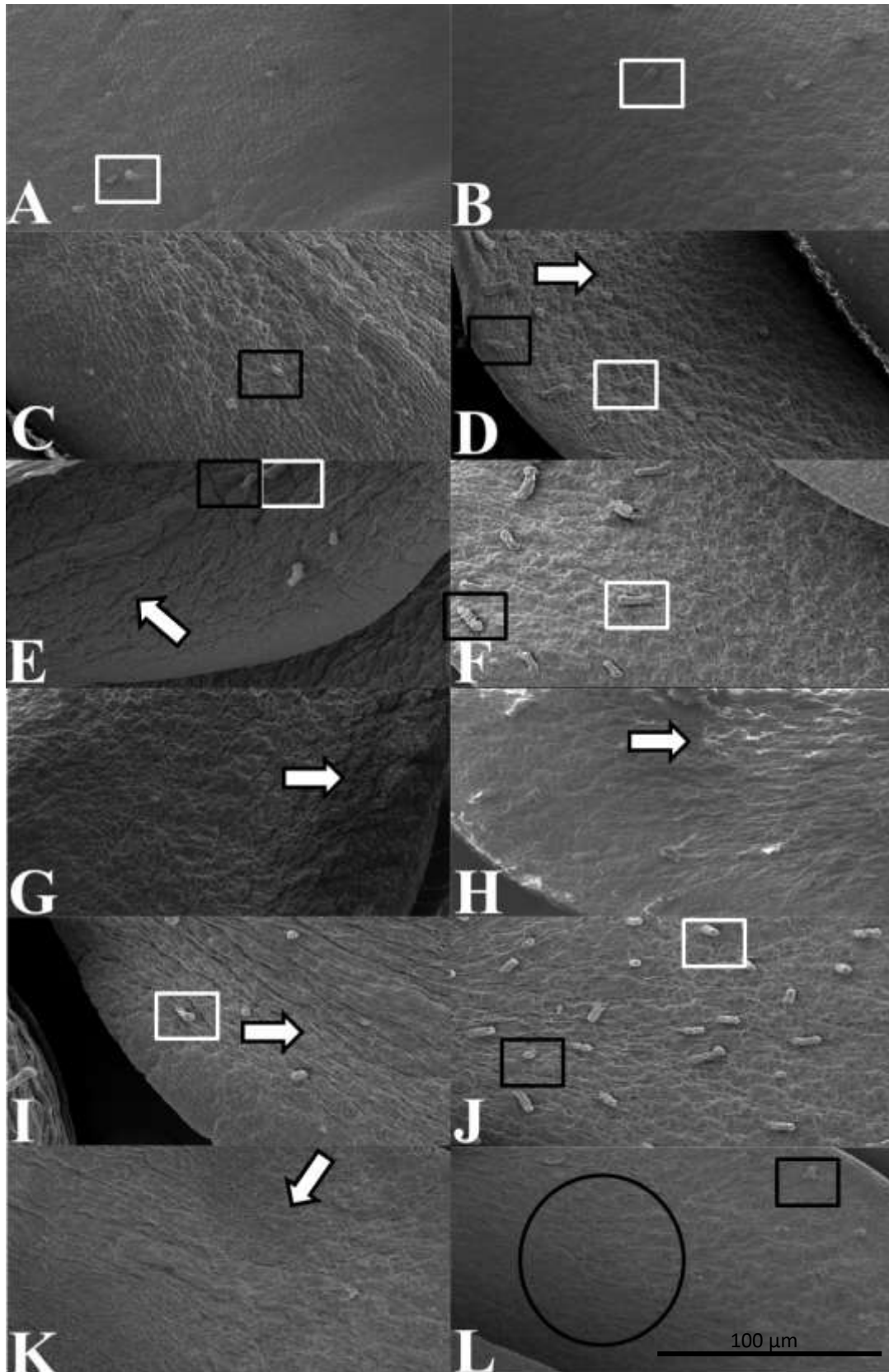
Como nas figuras de MEV das folhas cotiledonares apresentadas anteriormente, os tricomas e algumas mudanças na epiderme diferente dos controles são os indicadores para estresse ou dano sofrido pela planta causado pelo tratamento ao qual ela foi submetida. Mais uma vez, é possível notar que os tricomas estão presentes na maioria das imagens, porém



existe uma mistura em muitas delas entre os saudáveis e os que sofreram algum dano, com isso, é possível inferir que os danos não são tão extremos a ponto de afetarem todas essas estruturas, porém não significa que isso não seja altamente prejudicial para o bom desenvolvimento do indivíduo.

Ainda é necessário observar às regiões que tem a ausência dessas estruturas, além de o fato que em algumas partes a epiderme se apresenta danificada. São esses outros danos causados pelo titânio aos modelos utilizados. Essa evidência morfológica da irregularidade celular e edema da epiderme em alguns pontos é sustentada por Begum e Fugetsu, (2012).

**Figura 16.** Prancha de microscopia eletrônica de varredura da folha de *Lactuca sativa* no 7º dia pós-semeadura em diferentes tratamentos.



Microscopia eletrônica de varredura da folha de *Lactuca sativa* 7 dias após a germinação, em tratamentos

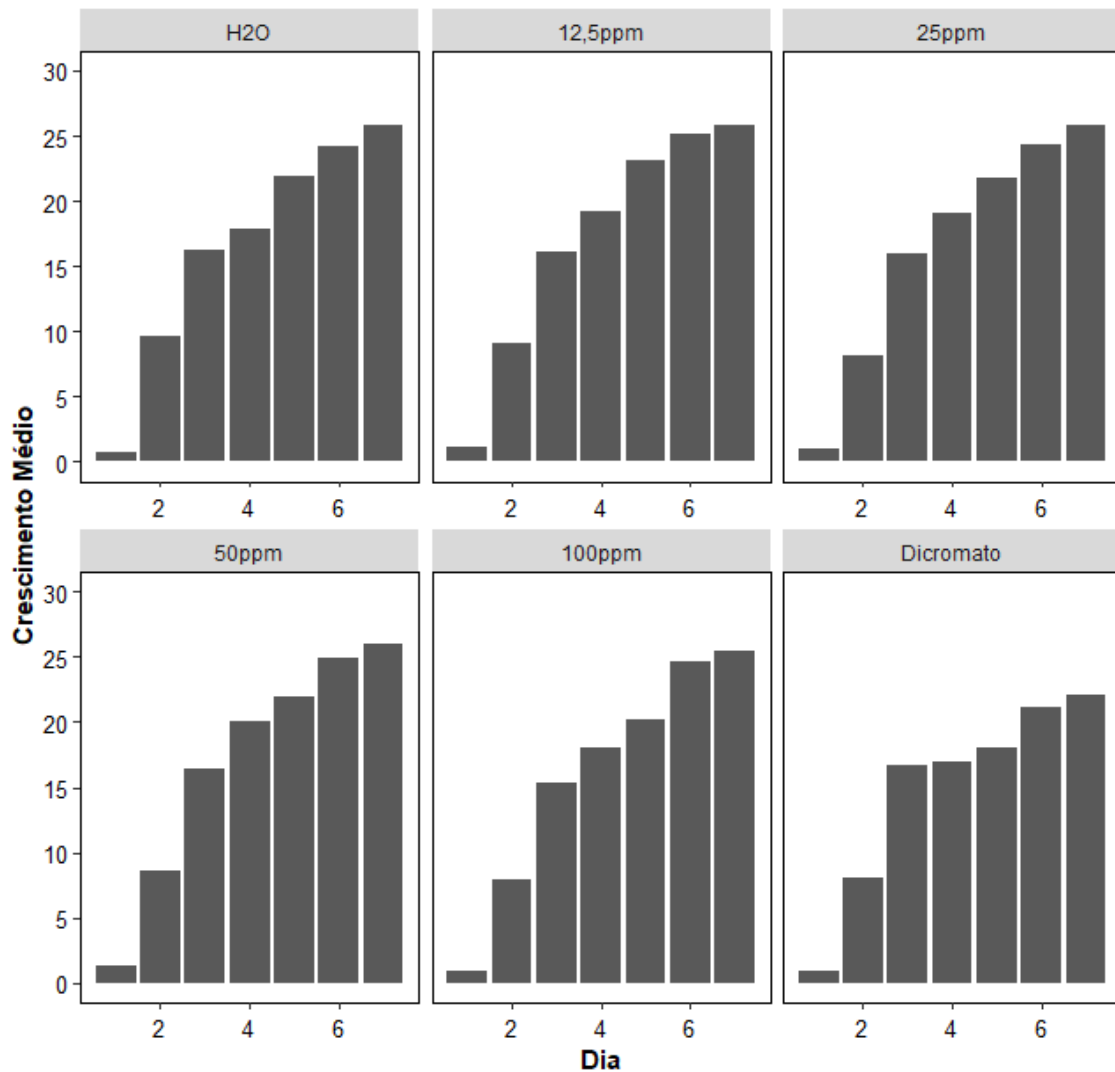
diferentes. A e B: Sem tratamento. C e D: 12,5 ppm de TiO<sub>2</sub>. E e F: 25 ppm de TiO<sub>2</sub>. G e H: 50 ppm de TiO<sub>2</sub>. I e J: 100 ppm de TiO<sub>2</sub>. K e L: Dicromato de potássio. As setas indicam aspectos a serem observados nas imagens. Verde claro: presença de tricomas; Roxa: tricomas deformados ou pouco desenvolvidos; Círculo preto: ausência de tricomas; Rosa claro: epiderme irregular; Escala:

## 5.2 Crescimento e translocação

O crescimento total das plantas no 7º dia foi comparado entre as duas condições de exposição do presente trabalho, no primeiro dia para a quebra da dormência da semente e início da germinação e no terceiro dia que seria após o processo de germinação. Dito isso, na primeira condição de exposição não houve diferenças significativas entre os tratamentos e nem entre os tratamentos e a água, as diferenças significativas obtidas foram entre as concentrações e o dicromato ( $\chi^2$  Kruskal-Wallis = 21.4, g.l. = 5, p-valor < 0.001; Tabela com teste de Dunn Anexo). Partindo para a segunda condição de exposição (3º dia) não houve diferenças significativas entre os tratamentos ( $\chi^2$  Kruskal-Wallis = 2.4, g.l. = 5, p-valor = 0.80).

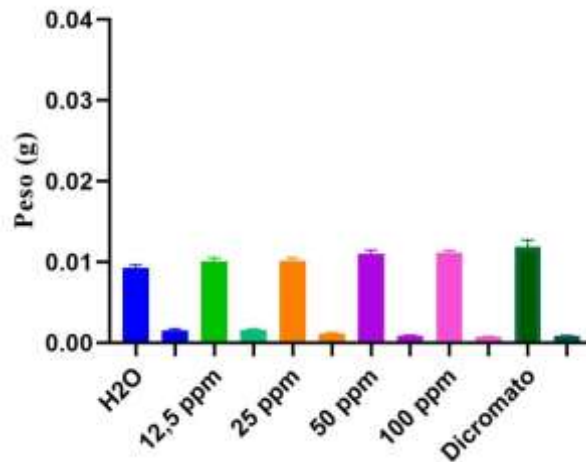
Foi comparado se houve diferença no crescimento dia a dia durante os 7 dias entre a primeira (1º dia) e segunda condição de exposição (3º dia). Nesse contexto, todos tratamentos apresentaram diferenças significativas no crescimento entre as duas condições, exceto o de 25 ppm (p-valor = 0,08).

**Figura 17.** Gráfico do crescimento médio de plântulas de *Lactuca sativa* durante 7 dias submetidas a diferentes tratamentos pós germinação.



Seis representações do crescimento médio (mm) diário das sementes de *Lactuca sativa* durante os sete dias de experimento de acordo com o tratamento utilizado pré-germinação sendo dois controles, o negativo, água destilada (H<sub>2</sub>O) e o positivo, dicromato de potássio (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) e diferentes concentrações de MP's de dióxido de titânio TiO<sub>2</sub> (12,5 ppm, 25 ppm, 50 ppm e 100ppm). Note que em cada representação o valor mais alto do eixo y varia de acordo com o crescimento médio em cada tratamento.

**Figura 18.** Peso úmido X peso seco do material vegetal de *Lactuca sativa* (Asteraceae) após 7 dias submetidas a diferentes tratamentos com dióxido de titânio TiO<sub>2</sub> pós germinação

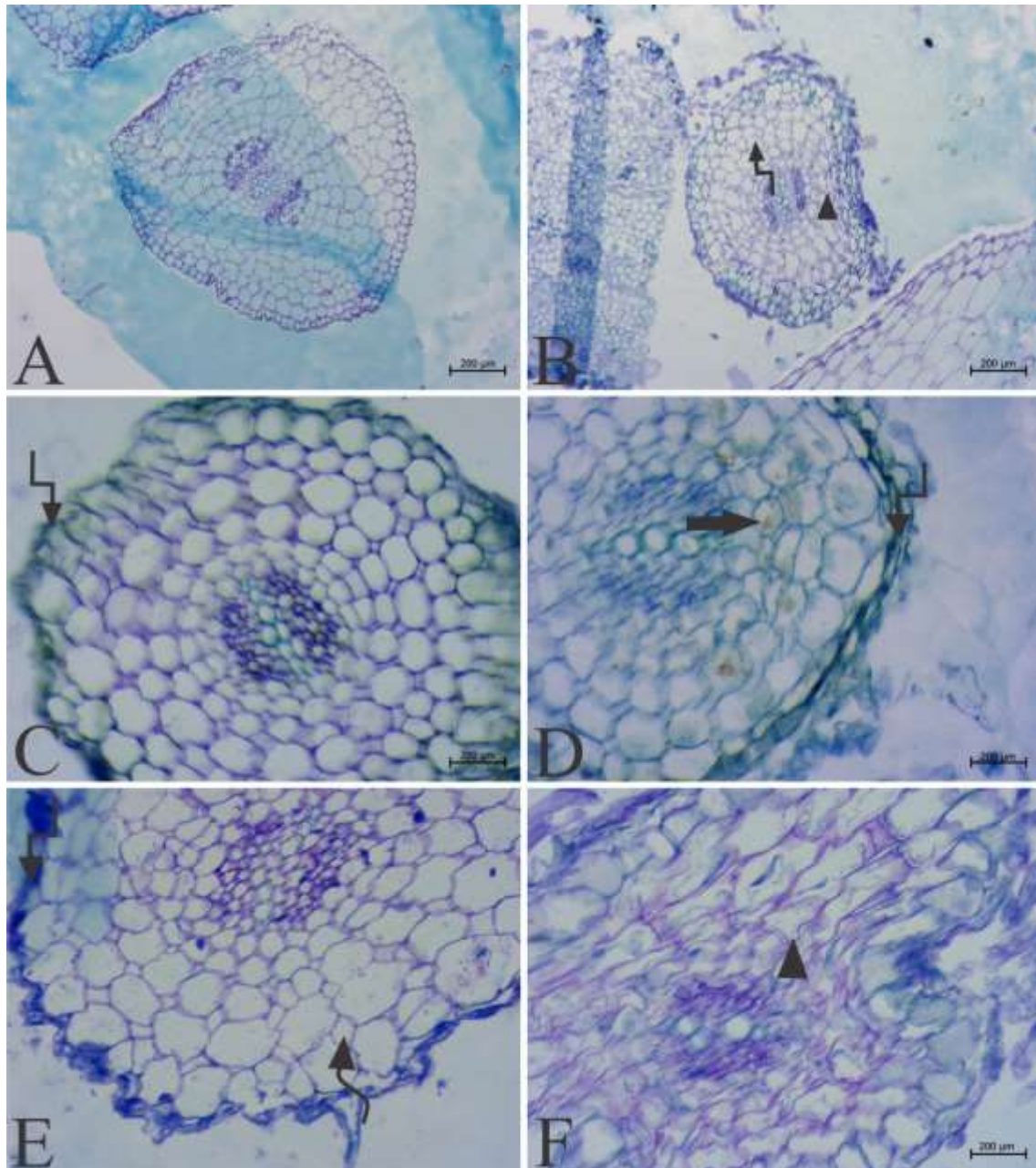


Comparação entre peso úmido (barras maiores exatamente nos marcadores que nomeiam os tratamentos) e peso seco (barras menores, barras alternadas onde não estão nomeados os tratamentos) de *Lactuca sativa* nos tratamentos com dois controles, o negativo, água destilada (H<sub>2</sub>O) e o positivo dicromato de potássio (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) e diferentes concentrações de NP's de dióxido de titânio TiO<sub>2</sub> (12,5 ppm, 25 ppm, 50 ppm e 100ppm), após 7 dias de semeadura.

O gráfico acima corrobora com Rastogi *et al*, (2017) que cita uma das influências que o titânio pode trazer para a planta é o aumento do peso fresco, o que é possível observar em comparação com o controle negativo.

Na **Figura 19** a seguir, é necessário observar, mais uma vez, a presença de algumas características que surgiram apenas nas amostras que foram submetidas a algum tratamento e que não são observadas no controle negativo. Corroborando com os resultados das análises de imagens anteriores que a aparição dessas características configura um dano causado pelo tratamento utilizado. São as características como: a irregularidade da parede celular das células epidermais, a alteração na morfologia de células corticais, onde diferenças como essa no que diz respeito à morfologia celular também foram encontradas em Begum, Ikhtiyari e Fugetsu, (2011) além da aparição das inclusões não só nas extremidades da planta como na endoderme, mostrando que o dano não deve ser apenas superficial visto que a partícula é capaz de impregnar de maneira mais profunda no individuo. Note que, mais uma vez a concentração que apresentou essas características de forma mais robusta foi a 50 ppm.

**Figura 19.** Prancha de microscopia ótica da radícula de *Lactuca sativa* no 7º dia pós-semeadura em diferentes tratamentos.



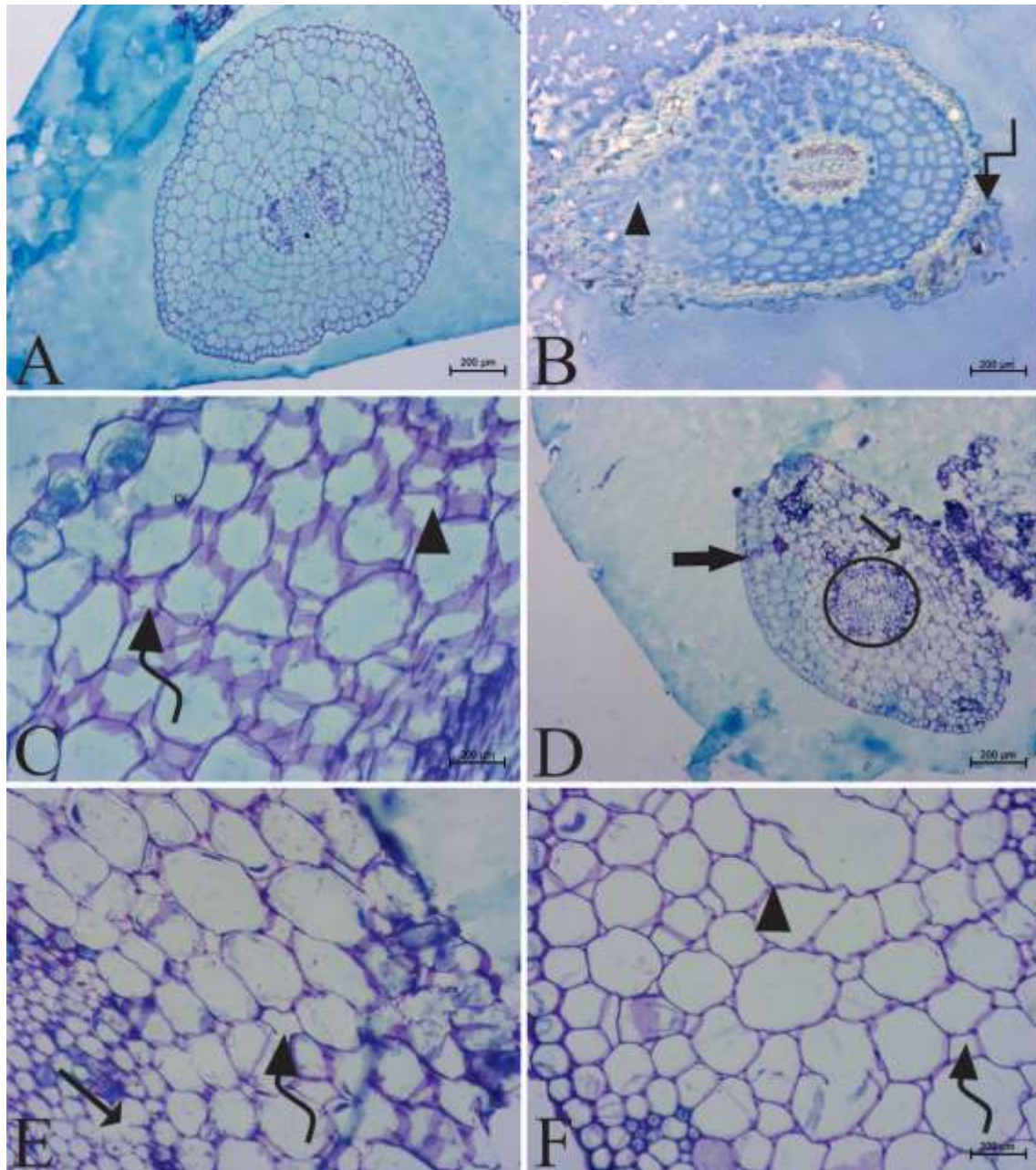
Microscopia ótica da raiz de *Lactuca sativa* 7 dias após a germinação, em tratamentos diferentes. A: Sem tratamento. B: 12,5 ppm de  $\text{TiO}_2$ . C: 25 ppm de  $\text{TiO}_2$ . D: 50 ppm de  $\text{TiO}_2$ . E: 100 ppm de  $\text{TiO}_2$ . F: Dicromato de potássio. As setas indicam aspectos a serem observados nas imagens. Seta angulada: espessamento/irregularidade da epiderme; Seta curva: aumento do espaço intercelular; Seta longa: inclusões (NPs); Ponta de seta: disformia/irregularidade celular;

A respeito do eixo hipocótilo radicular, as imagens apresentam vários indicadores de estresse desde um nível mais superficial na planta como irregularidades na epiderme e aumento do espaço intercelular que provavelmente é proveniente de um arranjo diferente

entre as células visto que Begum e Fugetsu, (2012) apontou vários danos de toxicidade em relação às células da raiz em camadas mais externas como paredes celulares danificadas, rachaduras perda de tecido e descolamento de camadas celulares.

Em um nível mais interno, como a desestruturação do feixe vascular em **19D** (50 ppm) que não era um resultado esperado, porém é o que vem se apresentando ao longo desse trabalho e com os ensaios que foram realizados. Outro ponto notório é o rompimento de parede celular apresentado por algumas células que ocorrem por toda extensão do corte em concordância com Rastogi *et al*, (2017) que aponta o dano à parede celular e membrana plasmática quando as NPs estão presentes em altas concentrações. Além das inclusões que são outro forte indicador de estresse causado pelo titânio. Esses danos também foram encontrados por Santos Filho, Dos *et al*, (2019) ao expor indivíduos de *Allium cepa* a uma concentração de 1000 ppm de dióxido de titânio.

**Figura 20.** Prancha de microscopia ótica do eixo hipocótilo-radicular de *Lactuca sativa* no 7º dia pós-semeadura em diferentes tratamentos.

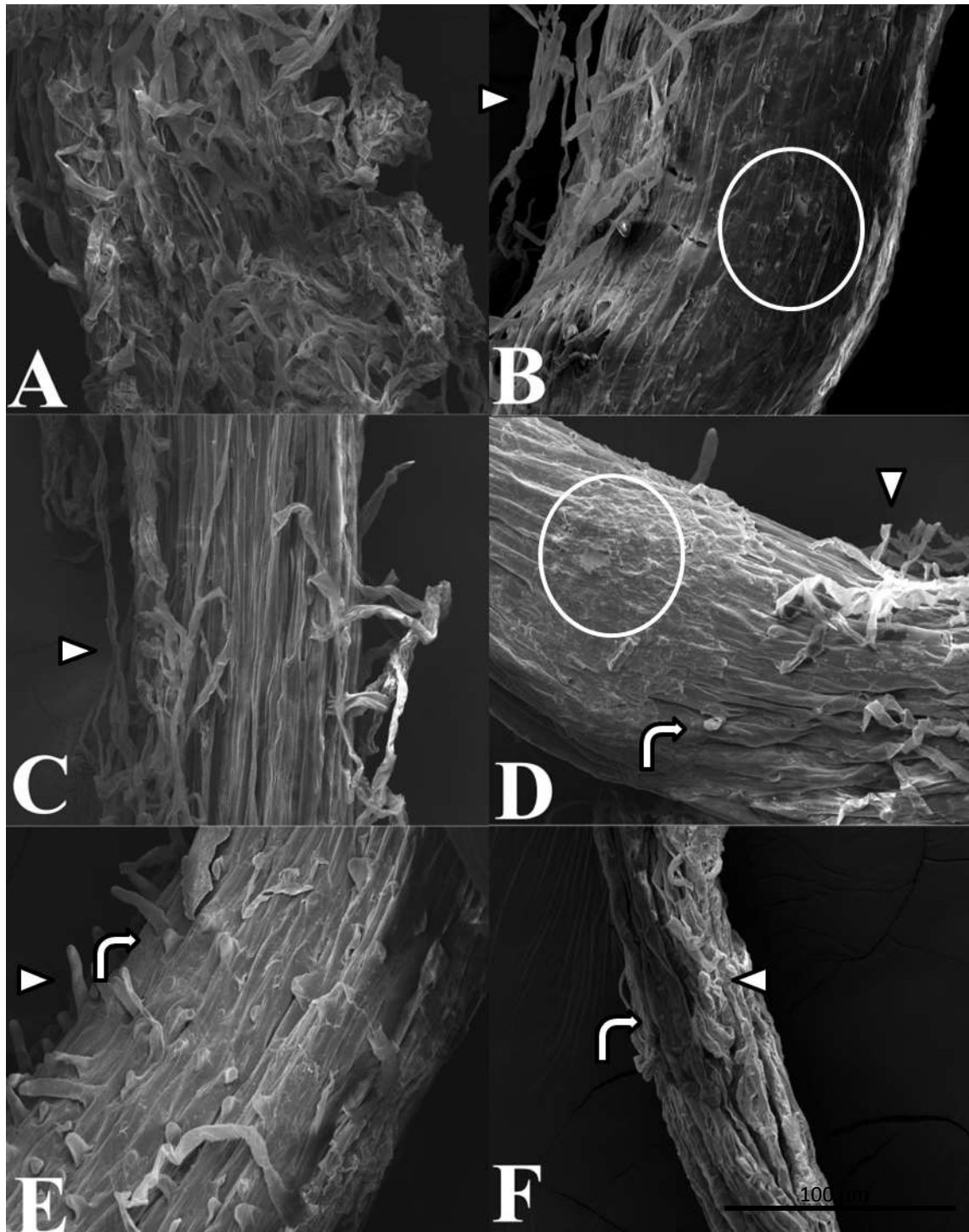


Microscopia ótica do eixo hipocótilo radicular de *Lactuca sativa* 7 dias após a germinação, em tratamentos diferentes. A: Sem tratamento. B: 12,5 ppm de  $\text{TiO}_2$ . C: 25 ppm de  $\text{TiO}_2$ . D: 50 ppm de  $\text{TiO}_2$ . E: 100 ppm de  $\text{TiO}_2$ . F: Dicromato de potássio. As setas indicam aspectos a serem observados nas imagens. Seta angulada: espessamento/irregularidade da epiderme; Seta curva: aumento do espaço intercelular; Seta larga: inclusão; Ponta de seta: disformia/irregularidade celular; Seta fina: rompimento de parede celular; Círculo preto: desestruturação do feixe vascular.



Ao longo das pranchas de zona pilífera que já foram apresentadas, há um padrão de indicadores bem definido que é a ausência de pelos em determinadas regiões, a pouca quantidade em que eles aparecem além de se mostrarem predominantemente atrofiados. O dano causado aos pelos radiculares é corroborado Schwab *et al*, (2016) que também encontrou essas alterações e mostrou que elas podem ocorrer em diferentes concentrações. Uma explicação dada por García-Sánchez, Bernales e Cristobal, (2015) para esse tipo de efeito causado é pela repressão transcricional de genes de desenvolvimento da raiz que previu um fenótipo de raiz alterado em plantas que sofreram exposição a NPs (incluindo dióxido de titânio).

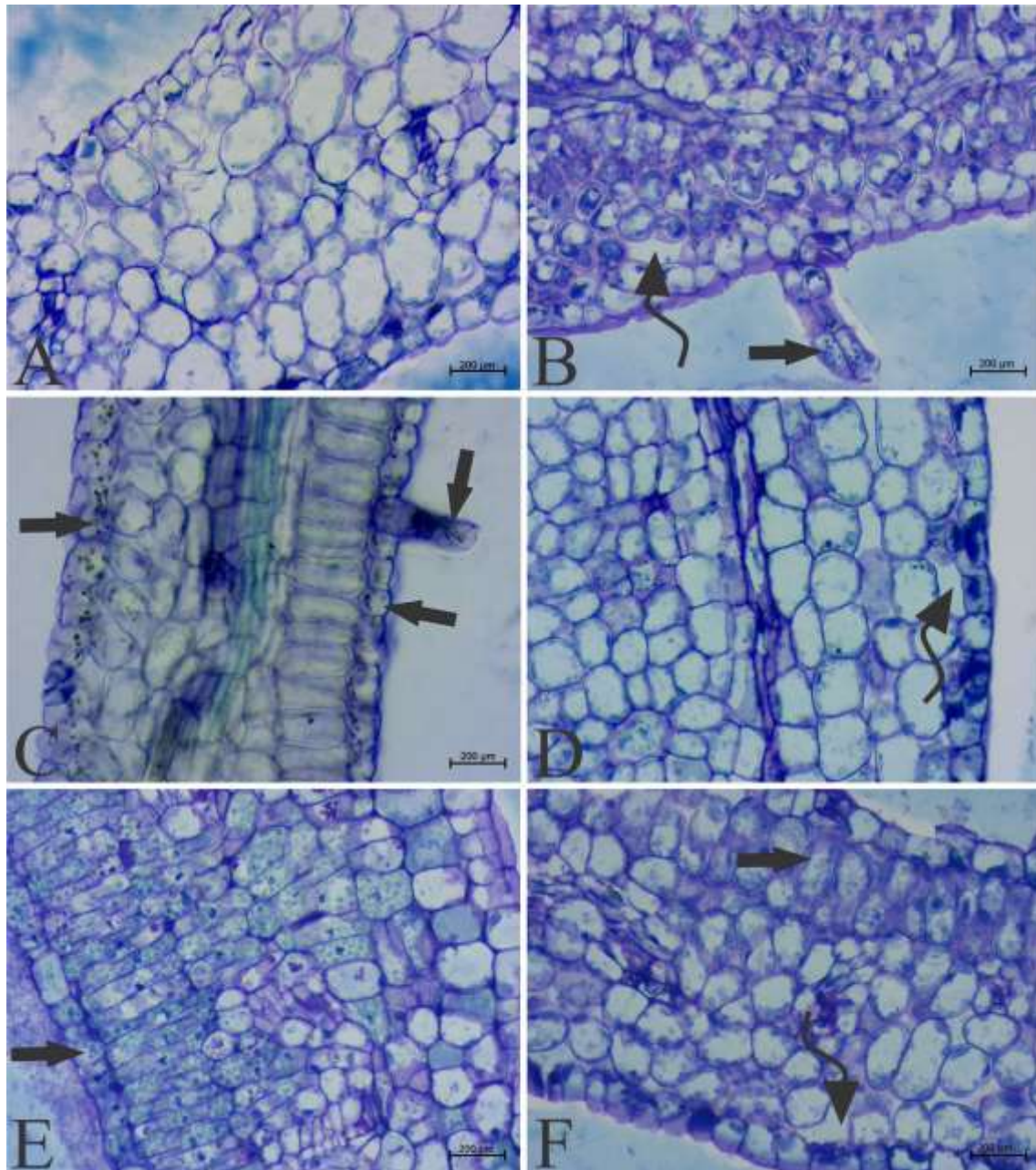
**Figura 21.** Prancha de microscopia eletrônica de varredura da zona pilífera de *Lactuca sativa* no 7º dia pós-semeadura em diferentes tratamentos.



Microscopia eletrônica de varredura da zona pilífera de *Lactuca sativa* com 7 dias após a germinação, em tratamentos diferentes. A: Sem tratamento. B: 12,5 ppm de  $\text{TiO}_2$ . C: 25 ppm de  $\text{TiO}_2$ . D: 50 ppm de  $\text{TiO}_2$ . E: 100 ppm de  $\text{TiO}_2$ . F: Dicromato de potássio. As setas indicam aspectos a serem observados nas imagens. Ponta de seta: poucos pelos; Seta dobrada: pelos curtos; Círculo branco: ausência de pelos.

A seguir, as últimas pranchas dos ensaios de crescimento, de folhas cotiledonares coletadas no 7º dia de ensaio. Nelas é possível observar, na microscopia ótica, a presença de muitas e diferentes inclusões, foi um padrão que se repetiu ao longo desses resultados onde a folha apresenta maior número de inclusões do que os outros órgãos. Ademais, NPs estão sujeitos a várias transformações e agregações na presença de matéria orgânica (Maurer-Jones *et al.*, 2013). Além disso, há outro ponto interessante, as inclusões aparecem até mesmo dentro dos tricomas, sugerindo que eles podem servir como depósito para esse nanomaterial. Conforme observado por (Schwab *et al.*, 2016) os tricomas glandulares são capazes de excretar NPs, fato que foi observado por microscopia eletrônica de transmissão, uma técnica bastante resolutiva para questões como essa e capazes também de acumular essas NPs.

**Figura 22.** Prancha de microscopia ótica da folha de *Lactuca sativa* no 7º dia pós-semeadura em diferentes tratamentos.

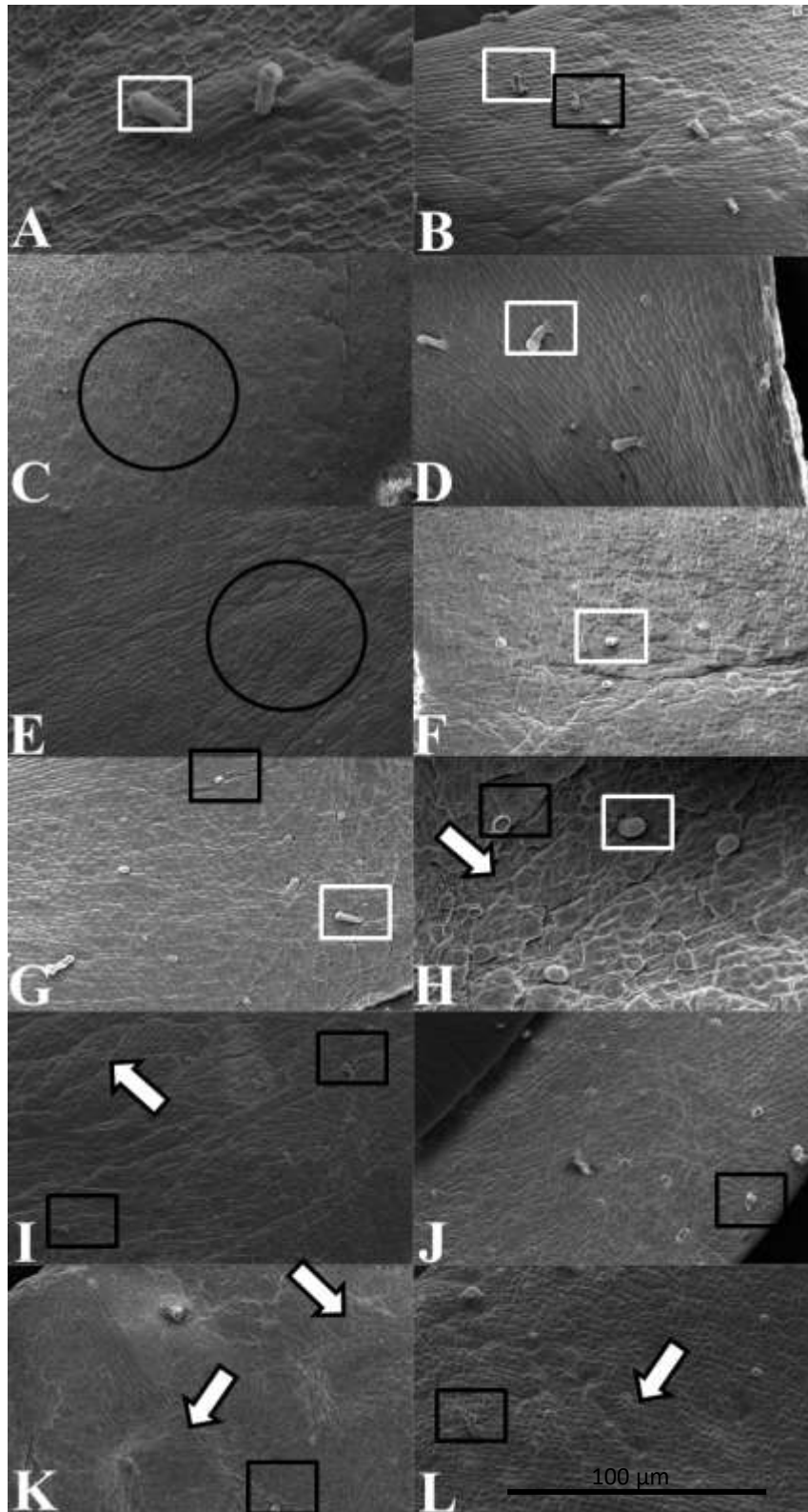


Microscopia ótica do eixo hipocótilo radicular de *Lactuca sativa* 3 dias após a germinação, em tratamentos diferentes. A: Sem tratamento. B: 12,5 ppm de  $\text{TiO}_2$ . C: 25 ppm de  $\text{TiO}_2$ . D: 50 ppm de  $\text{TiO}_2$ . E: 100 ppm de  $\text{TiO}_2$ . F: Dicromato de potássio. As setas indicam aspectos a serem observados nas imagens. Seta preta larga: inclusões (NPs); Seta curva: aumento do espaço intercelular.

Por fim, na microscopia eletrônica de varredura os aspectos relacionados aos danos sofridos pelos tricomas, ausência deles em algumas regiões e irregularidades nas células epidérmicas se mantêm e confirmam a teoria de que esses parâmetros estão diretamente associados ao impacto do titânio no desenvolvimento da planta. Da mesma

forma, (Zehra *et al.*, 2020) atribuiu como resposta à toxicidade causada pelo cobre em seus ensaios a diminuição, a densidade e a área dos tricomas glandulares.

**Figura 23.** Prancha de microscopia eletrônica de varredura da folha de *Lactuca sativa* no 7º dia pós-semeadura em diferentes tratamentos.



Microscopia eletrônica de varredura da folha de *Lactuca sativa* 7 dias após germinação, em tratamentos diferentes. A e B: Sem tratamento. C e D: 12,5 ppm de TiO<sub>2</sub>. E e F: 25 ppm de TiO<sub>2</sub>. G e H: 50 ppm de TiO<sub>2</sub>. I e J: 100 ppm de TiO<sub>2</sub>. K e L: Dicromato de potássio. As setas indicam aspectos a serem observados nas imagens. Retângulo branco: presença de tricomas; Retângulo preto: tricomas deformados ou pouco desenvolvidos; Círculo preto: ausência de tricomas; Seta branca: epiderme irregular.

Como evidenciado pelas pranchas apresentadas anteriormente, foi mostrado que as diferenças morfológicas e anatômicas sofridas pelas células, em diferentes níveis, são provenientes do impacto do dióxido de titânio no organismo. Portanto, é possível inferir que a partícula penetra nas células e ocorre sua translocação ao longo dos órgãos. Na **Figura 17** a seguir, são mostradas as três principais partes da plântula que foram enfatizadas nesse trabalho, a radícula, o hipocótilo e a folha cotiledonar. Além disso, para investigar a partir de quanto tempo em contato com a planta o titânio penetra e transloca.

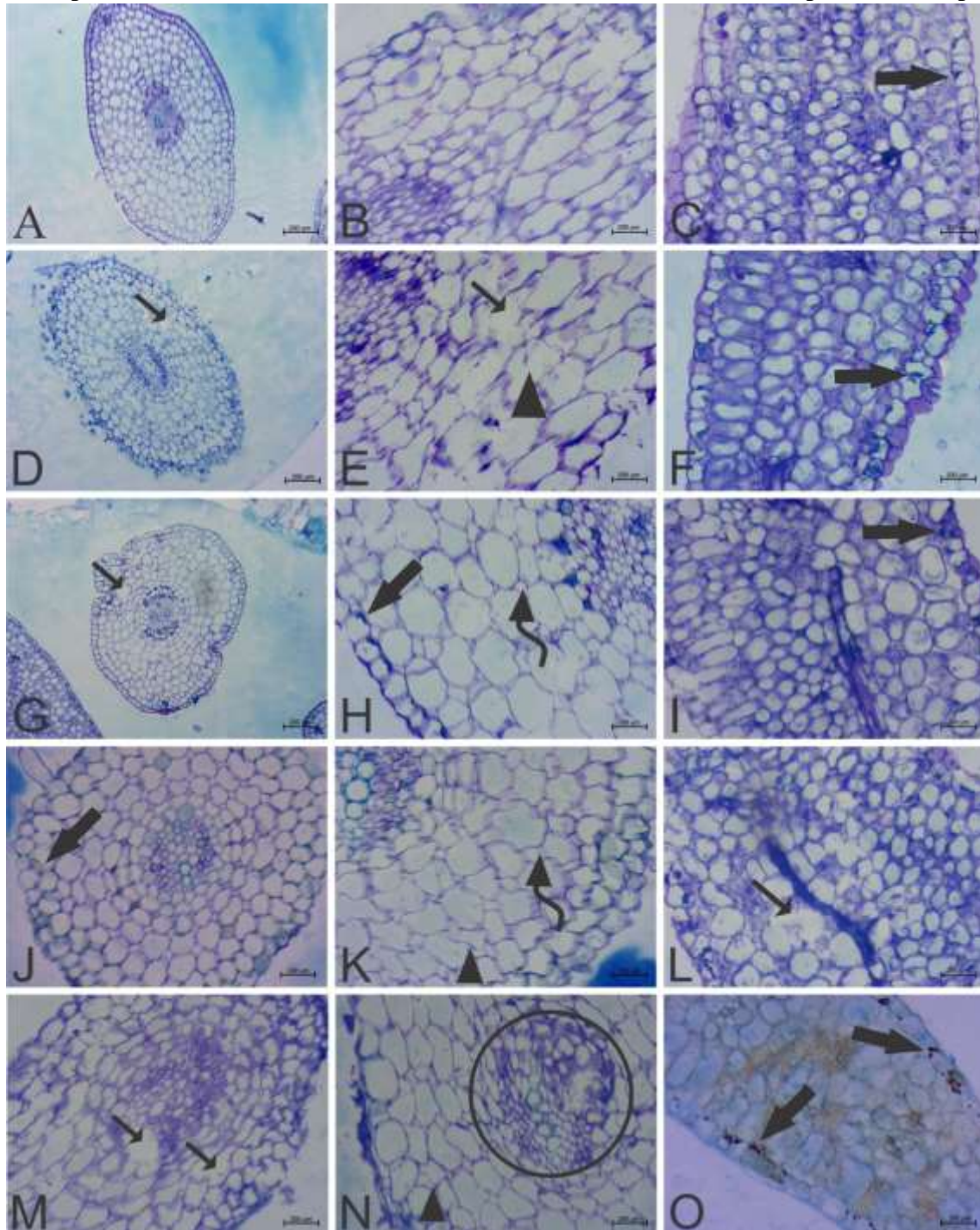
Portanto, os testes foram feitos utilizando a concentração que se provou mais danosa até aqui, a de 50 ppm de titânio que é uma concentração intermediária e não a maior que se era esperado ao início deste trabalho. As plantas foram submetidas à mesma concentração, porém em diferentes intervalos de tempo, como são testes iniciais os tempos escolhidos foram 1h, 2h, 4h, 8h e 16 horas.

Como esperado e seguindo um padrão que foi se desenhando ao longo dessas análises, vários dos indicadores utilizados neste trabalho se mostraram presentes nas imagens como rompimento de parede celular, aumento do espaço intercelular, alteração da morfologia de células corticais, parâmetros esses que foram evoluindo ao longo dos tempos de exposição, finalmente, nas amostras com 16 horas de contato com o dióxido de titânio é possível observar a desestruturação do feixe vascular, assim como as inclusões em grande quantidade presentes na folha isso pode ser explicado por Raliya *et al*, (2015) caso a folha tenha exposição direta à partícula, por meio de aerossol sua concentração pode ser maior nessa região, mostrando que a partícula não só penetrou na plântula como é capaz de chegar à parte aérea em pouco tempo. Estudos realizados por Raliya *et al*, (2015) usando TiO<sub>2</sub> e ZnO mostraram que essas partículas foram capazes de chegar até nos frutos de plantas de tomate analisadas independente do método de exposição. As duas vias de absorção possíveis indicam a bioacumulação de NTFS (N-TiO<sub>2</sub> dopado com nitrogênio e Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> @ SiO<sub>2</sub>) e a consequente entrada de NTFS na cadeia alimentar (Zhang *et al.*, 2019).

Em estudos realizados por Tombuloglu *et al*, (2018) foi mostrado que a cevada é capaz de captar e translocar NPs, nesse estudo de ferro magnético, da raiz até os órgãos

aéreos. Além disso, (Chichiriccò e Poma, 2015) noticiou que a captação cuticular e estomática de NPs e a translocação para o sistema vascular pode ser por vias apoplásticas e simplásticas. Fato esse que pode explicar o encontro de inclusões em regiões corticais e de feixe vascular.

**Figura 17.** Prancha de microscopia ótica de raiz, hipocótilo e da folha de *Lactuca sativa* no 7º dia pós-semeadura em um tratamento com diferentes tempos de exposição.



Microscopia ótica da raiz de *Lactuca sativa* 7 dias após a germinação, no tratamento de 50 ppm de  $\text{TiO}_2$  em diferentes tempos de exposição. A: raiz, 1h. B: hipocótilo, 1h. C: folha, 1h. D: raiz, 2h. E: hipocótilo, 2h. F: folha, 2h. G: raiz, 4h. H: hipocótilo, 4h. I: folha, 4h. J: raiz, 8h. K: hipocótilo, 8h. L: folha, 8h. M: raiz, 16h. N: hipocótilo, 16h. O: folha, 16h. As setas coloridas indicam aspectos a serem observados nas imagens. Curva:

aumento do espaço intercelular; Preta larga: inclusões (NPs); Ponta de seta: disformia/irregularidade celular; seta Fina reta: rompimento de parede celular; Círculo preto: desestruturação do feixe vascular.

Para melhor entendimento dos danos causados às células, é de grande valia a realização de testes que medem o acúmulo de ROS (espécies reativas de oxigênio), que é um bom indicador de estresse oxidativo. Essa medição pode ser feitas por corantes sensíveis a ROS (Begum e Fugetsu, 2012). Portanto, as mudanças na taxa celular de ROS e produtos anti-ROS e de peroxidação nos permitem avaliar o grau de toxicidade dos NMs e a capacidade desintoxicante das células vegetais (Chichiriccò e Poma, 2015).



## CONCLUSÃO

No presente estudo, apesar de não terem sido encontrados problemas relacionados à germinação pelo TiO<sub>2</sub>, é importante ressaltar que no desenvolvimento inicial da plântula de *Lactuca sativa* foram encontrados danos a níveis de radícula, hipocótilo e folhas primárias e eles foram tanto externos e superficiais como evidenciado pelo uso da microscopia eletrônica de varredura, como internos trazidos pelo uso da microscopia ótica.

Relacionado ao incremento de peso, mudanças foram observadas nos gráficos, mesmo não sendo significativas.

Os ensaios mostraram que plântulas de *Lactuca sativa* são capazes de incorporar NPs de TiO<sub>2</sub> e transportar essas partículas via cilindro vascular em razão da observação de inclusões em células do feixe vascular.

As perspectivas para confirmação de novas hipóteses e aprimoramento dos conhecimentos no que tange a questão da interação de nanomateriais com sistemas biológicos são promissoras. Como colocado nesse manuscrito, é necessário a realização de testes que medem ROS, testes bioquímicos para medir estresse oxidativo e uso da microscopia eletrônica de transmissão para entendimento melhor da dinâmica de translocação do TiO<sub>2</sub> usado em filtros solares dentro de organismo de *Lactuca sativa*.

## REFERÊNCIAS

- ANDERSEN, C. P.; KING, G.; PLOCHER, M.; STORM, M.; POKHREL, L. R.; JOHNSON, M. G.; RYGIEWICZ, P. T. Germination and early plant development of ten plant species exposed to titanium dioxide and cerium oxide nanoparticles. **Environmental Toxicology and Chemistry**, [s.l.] [s.n.] v. 35, n. 9, p. 2223–2229, 2016.
- ARVIDSSON, R.; MOLANDER, S.; SANDÉN, B. A. Particle Flow Analysis: Exploring Potential Use Phase Emissions of Titanium Dioxide Nanoparticles from Sunscreen, Paint, and Cement. **Journal of Industrial Ecology**, [s.l.] [s.n.] v. 16, n. 3, p. 343–351, 2012.
- BALAJI B, M. S.; FENGXIANG X, H.; DIEHL, S. V.; MONTS, D. L.; SU, Y. Effects of Zn and Cd accumulation on structural and physiological characteristics of barley plants. **Journal plant physiology**, [s.l.] [s.n.] p. 15–22, 2007.
- BALOGH, T. S.; VELASCO, M. V. R.; PEDRIALI, C. A.; KANEKO, T. M.; BABY, A. R. Proteção à radiação ultravioleta: Recursos disponíveis na atualidade em fotoproteção. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, [s.l.] [s.n.] v. 86, n. 4, p. 732–742, 2011.
- BARBOSA, J. S.; NETO, D. M. A.; FREIRE, R. M.; ROCHA, J. S.; FECHINE, L. M. U. D.; DENARDIN, J. C.; VALENTINI, A.; ARAÚJO, T. G. DE; MAZZETTO, S. E.; FECHINE, P. B. A. Ultrafast sonochemistry-based approach to coat TiO<sub>2</sub> commercial particles for sunscreen formulation. **Ultrasonics Sonochemistry**, [s.l.] [s.n.] v. 48, n. April, p. 340–348, 2018.
- BARRENA, R.; CASALS, E.; COLÓN, J.; FONT, X.; SÁNCHEZ, A.; PUNTES, V. Evaluation of the ecotoxicity of model nanoparticles. **Chemosphere**, [s.l.] [s.n.] v. 75, n. 7, p. 850–857, 2009.
- BEGUM, P.; FUGETSU, B. Phytotoxicity of multi-walled carbon nanotubes on red spinach (*Amaranthus tricolor* L) and the role of ascorbic acid as an antioxidant. **Journal of Hazardous Materials**, [s.l.] [s.n.] v. 243, p. 212–222, 2012.
- BEGUM, P.; IKHTIARI, R.; FUGETSU, B. Graphene phytotoxicity in the seedling stage of cabbage, tomato, red spinach, and lettuce. **Carbon**, [s.l.] [s.n.] v. 49, n. 12, p. 3907–3919, 2011.
- BELLANI, L.; MUCCIFORA, S.; BARBIERI, F.; TASSI, E.; RUFFINI CASTIGLIONE, M.; GIORGETTI, L. Genotoxicity of the food additive E171, titanium dioxide, in the plants *Lens culinaris* L. and *Allium cepa* L. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, [s.l.] [s.n.] v. 849, n. January, p. 503142, 2020.
- BOUR, A.; MOUCHET, F.; SILVESTRE, J.; GAUTHIER, L.; PINELLI, E. **Environmentally relevant approaches to assess nanoparticles ecotoxicity: A review** **Journal of Hazardous Materials**, [s.l.] [s.n.] 2015.
- CHICHIRICCÒ, G.; POMA, A. Penetration and toxicity of nanomaterials in higher plants. **Nanomaterials**, [s.l.] [s.n.] v. 5, n. 2, p. 851–873, 2015.
- CLÉMENT, L.; HUREL, C.; MARMIER, N. Toxicity of TiO<sub>2</sub> nanoparticles to cladocerans, algae, rotifers and plants - Effects of size and crystalline structure. **Chemosphere**, [s.l.] [s.n.] v. 90, n. 3, p. 1083–1090, 2013.
- CLEMENTE, Z. Archive of SID Organisms of Aquatic Ecosystems Archive of SID. [s.l.]

[*s.n.*] v. 6, n. 1, p. 33–50, 2012.

COX, A.; VENKATACHALAM, P.; SAHI, S.; SHARMA, N. Reprint of: Silver and titanium dioxide nanoparticle toxicity in plants: A review of current research. **Plant Physiology and Biochemistry**, [*s.l.*] [*s.n.*] v. 110, p. 33–49, 2017.

DAUDA, S.; CHIA, M. A.; BAKO, S. P. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to *Chlorella vulgaris* Beyerinck (Beijerinck) 1890 (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) under changing nitrogen conditions. **Aquatic Toxicology**, [*s.l.*] [*s.n.*] v. 187, p. 108–114, 2017.

DENG, X. Y.; CHENG, J.; HU, X. L.; WANG, L.; LI, D.; GAO, K. Biological effects of TiO<sub>2</sub> and CeO<sub>2</sub> nanoparticles on the growth, photosynthetic activity, and cellular components of a marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. **Science of the Total Environment**, [*s.l.*] [*s.n.*] v. 575, 2017.

FLOR, J.; DAVOLOS, M. R.; CORREA, M. A. Protetores solares. **Revista Brasileira de Medicina**, [*s.l.*] [*s.n.*] v. 65, n. SPEC. ISS. OCT., p. 6–11, 2008.

GAO, J.; XU, G.; QIAN, H.; LIU, P.; ZHAO, P.; HU, Y. Effects of nano-TiO<sub>2</sub> on photosynthetic characteristics of *Ulmus elongata* seedlings. **Environmental Pollution**, [*s.l.*] [*s.n.*] v. 176, p. 63–70, 2013.

GARCÍA-SÁNCHEZ, S.; BERNALES, I.; CRISTOBAL, S. Early response to nanoparticles in the *Arabidopsis* transcriptome compromises plant defence and root-hair development through salicylic acid signalling. **BMC Genomics**, [*s.l.*] [*s.n.*] v. 16, n. 1, 2015.

GHOSH, M.; BANDYOPADHYAY, M.; MUKHERJEE, A. Genotoxicity of titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticles at two trophic levels: Plant and human lymphocytes. **Chemosphere**, [*s.l.*] [*s.n.*] v. 81, n. 10, p. 1253–1262, 2010.

GRASSO, R.; GULINO, M.; GIUFFRIDA, F.; AGNELLO, M.; MUSUMECI, F.; SCORDINO, A. Non-destructive evaluation of watermelon seeds germination by using Delayed Luminescence. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, [*s.l.*] [*s.n.*] v. 187, p. 126–130, 2018.

HANIGAN, D.; TRUONG, L.; SCHOEPF, J.; NOSAKA, T.; MULCHANDANI, A.; TANGUAY, R. L.; WESTERHOFF, P. Trade-offs in ecosystem impacts from nanomaterial versus organic chemical ultraviolet filters in sunscreens. **Water Research**, [*s.l.*] [*s.n.*] v. 139, p. 281–290, 2018.

HAYNES, V. N.; WARD, J. E.; RUSSELL, B. J.; AGRIOS, A. G. Photocatalytic effects of titanium dioxide nanoparticles on aquatic organisms—Current knowledge and suggestions for future research. **Aquatic Toxicology**, [*s.l.*] [*s.n.*] v. 185, p. 138–148, 2017.

HOUSSEM, K. biomarkers of oxidative stress, lipid peroxidation and ROS production induced by TiO<sub>2</sub> microparticles on Snails *Helix Aspersa*. [*s.l.*] [*s.n.*] v. 27, n. 2, p. 127–133, 2017.

HU, C. W.; LI, M.; CUI, Y. B.; LI, D. S.; CHEN, J.; YANG, L. Y. Toxicological effects of TiO<sub>2</sub> and ZnO nanoparticles in soil on earthworm *Eisenia fetida*. **Soil Biology and Biochemistry**, [*s.l.*] [*s.n.*] v. 42, n. 4, p. 586–591, 2010.

IANNONE, M. F.; GROPPA, M. D.; SOUSA, M. E. DE; FERNÁNDEZ VAN RAAP, M. B.; BENAVIDES, M. P. **Impact of magnetite iron oxide nanoparticles on wheat (*Triticum aestivum* L.) development: Evaluation of oxidative damage**. [*s.l.*] Elsevier B.V., 2016. v. 131

- KIM, S.; SIN, H.; LEE, S.; LEE, I. Influence of metal oxide particles on soil enzyme activity and bioaccumulation of two plants. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, [s.l.] [s.n.] v. 23, n. 9, p. 1279–1286, 2013.
- KOLENČÍK, M. *et al.* Foliar application of low concentrations of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles to the common sunflower under field conditions. **Nanomaterials**, [s.l.] [s.n.] v. 10, n. 8, p. 1–20, 2020.
- LARUE, C.; CASTILLO-MICHEL, H.; SOBANSKA, S.; CÉCILLON, L.; BUREAU, S.; BARTHÈS, V.; OUERDANE, L.; CARRIÈRE, M.; SARRET, G. Foliar exposure of the crop *Lactuca sativa* to silver nanoparticles: Evidence for internalization and changes in Ag speciation. **Journal of Hazardous Materials**, [s.l.] [s.n.] v. 264, p. 98–106, 2014.
- LIU, Y.; BAAS, J.; PEIJNENBURG, W. J. G. M.; VIJVER, M. G. Evaluating the Combined Toxicity of Cu and ZnO Nanoparticles: Utility of the Concept of Additivity and a Nested Experimental Design. **Environmental Science and Technology**, [s.l.] [s.n.] v. 50, n. 10, p. 5328–5337, 2016.
- LODEIRO, P.; BROWNING, T. J.; ACHTERBERG, E. P.; GUILLOU, A.; EL-SHAHAWI, M. S. Mechanisms of silver nanoparticle toxicity to the coastal marine diatom *Chaetoceros curvisetus*. **Scientific Reports**, [s.l.] [s.n.] v. 7, n. 1, p. 1–10, 2017.
- LU, P. J.; FANG, S. W.; CHENG, W. L.; HUANG, S. C.; HUANG, M. C.; CHENG, H. F. Characterization of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in sunscreen powder by comparing different measurement methods. **Journal of Food and Drug Analysis**, [s.l.] [s.n.] v. 26, n. 3, p. 1192–1200, 2018.
- LU, P. J.; HUANG, S. C.; CHEN, Y. P.; CHIUEH, L. C.; SHIH, D. Y. C. Analysis of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in cosmetics. **Journal of Food and Drug Analysis**, [s.l.] [s.n.] v. 23, n. 3, p. 587–594, 2015.
- MANESH, R. R.; GRASSI, G.; BERGAMI, E.; MARQUES-SANTOS, L. F.; FALERI, C.; LIBERATORI, G.; CORSI, I. Co-exposure to titanium dioxide nanoparticles does not affect cadmium toxicity in radish seeds (*Raphanus sativus*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s.l.] [s.n.] v. 148, n. May 2017, p. 359–366, 2018.
- MAYNARD, A. D. *et al.* Safe handling of nanotechnology. **Nature**, [s.l.] [s.n.] v. 444, n. 7117, p. 267–269, 2006.
- MOVAFEGHI, A.; KHATAEE, A.; ABEDI, M.; TARRAHI, R.; DADPOUR, M.; VAFAEI, F. Effects of TiO<sub>2</sub> nanoparticles on the aquatic plant *Spirodela polyrrhiza*: Evaluation of growth parameters, pigment contents and antioxidant enzyme activities. **Journal of Environmental Sciences (China)**, [s.n.] v. 64, p. 130–138, 2018.
- NAMDEO, M.; SAXENA, S.; TANKHIWALE, R.; BAJPAI, M.; MOHAN, Y. M.; BAJPAI, S. K. Magnetic nanoparticles for drug delivery applications. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, [s.l.] [s.n.] v. 8, n. 7, p. 3247–3271, 2008.
- NEWMAN, M. D.; STOTLAND, M.; ELLIS, J. I. The safety of nanosized particles in titanium dioxide- and zinc oxide-based sunscreens. **Journal of the American Academy of Dermatology**, [s.l.] [s.n.] v. 61, n. 4, p. 685–692, 2009.
- NOHYNEK, G. J.; DUFOUR, E. K.; ROBERTS, M. S. Nanotechnology, cosmetics and the skin: Is there a health risk? **Skin Pharmacology and Physiology**, [s.l.] [s.n.] v. 21, n. 3, p. 136–149, 2008.

- OLIVER, A. L. S.; MUÑOZ-OLIVAS, R.; SANZ LANDALUZE, J.; RAINIERI, S.; CÁMARA, C. Bioaccumulation of ionic titanium and titanium dioxide nanoparticles in zebrafish eleutheroembryos. **Nanotoxicology**, [s.l.] [s.n.] v. 9, n. 7, p. 835–842, 2015.
- PARIONA, N.; MARTINEZ, A. I.; HDZ-GARCI, H. M.; CRUZ, L. A. Effects of hematite and ferrihydrite nanoparticles on germination and growth of maize seedlings. [s.l.] [s.n.] p. 1547–1554, 2017.
- RALIYA, R.; NAIR, R.; CHAVALMANE, S.; WANG, W. N.; BISWAS, P. Mechanistic evaluation of translocation and physiological impact of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles on the tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plant. **Metallomics**, [s.l.] [s.n.] v. 7, n. 12, p. 1584–1594, 2015.
- RASTOGI, A.; ZIVCAK, M.; SYTAR, O.; KALAJI, H. M.; HE, X.; MBARKI, S.; BRESTIC, M. Impact of metal and metal oxide nanoparticles on plant: A critical review. **Frontiers in Chemistry**, [s.l.] [s.n.] v. 5, n. October, p. 1–16, 2017.
- ROBICHAUD, C. O.; UYAR, A. E.; DARBY, M. R.; ZUCKER, L. G.; WIESNER, M. R. Estimates of upper bounds and trends in nano-TiO<sub>2</sub> production as a basis for exposure assessment. **Environmental Science and Technology**, [s.l.] [s.n.] v. 43, n. 12, p. 4227–4233, 2009.
- RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, V.; TERASHIMA, C.; FUJISHIMA, A. Applications of photocatalytic titanium dioxide-based nanomaterials in sustainable agriculture. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, [s.l.] [s.n.] v. 40, p. 49–67, 2019.
- SALA, F. C.; COSTA, C. P. DA. Retrospectiva e tendência da alfacicultura brasileira. **Horticultura Brasileira**, [s.l.] [s.n.] v. 30, n. 2, p. 187–194, 2012.
- SANTOS FILHO, R. DOS; VICARI, T.; SANTOS, S. A.; FELISBINO, K.; MATTOSO, N.; SANT’ANNA-SANTOS, B. F.; CESTARI, M. M.; LEME, D. M. Genotoxicity of titanium dioxide nanoparticles and triggering of defense mechanisms in *Allium cepa*. **Genetics and Molecular Biology**, [s.l.] [s.n.] v. 42, n. 2, p. 425–435, 2019.
- SCHWAB, F.; ZHAI, G.; KERN, M.; TURNER, A.; SCHNOOR, J. L.; WIESNER, M. R. Barriers, pathways and processes for uptake, translocation and accumulation of nanomaterials in plants - Critical review. **Nanotoxicology**, [s.l.] [s.n.] v. 10, n. 3, p. 257–278, 2016.
- SENDRA, M.; MORENO-GARRIDO, I.; YESTE, M. P.; GATICA, J. M.; BLASCO, J. Toxicity of TiO<sub>2</sub>, in nanoparticle or bulk form to freshwater and marine microalgae under visible light and UV-A radiation. **Environmental Pollution**, [s.l.] [s.n.] v. 227, p. 39–48, 2017.
- SENDRA, M.; SÁNCHEZ-QUILES, D.; BLASCO, J.; MORENO-GARRIDO, I.; LUBIÁN, L. M.; PÉREZ-GARCÍA, S.; TOVAR-SÁNCHEZ, A. Effects of TiO<sub>2</sub>nanoparticles and sunscreens on coastal marine microalgae: Ultraviolet radiation is key variable for toxicity assessment. **Environment International**, [s.l.] [s.n.] v. 98, p. 62–68, 2017.
- SMIJS, T. G.; PAVEL, S. Titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in sunscreens: focus on their safety and effectiveness. **Nanotechnology, science and applications**, [s.l.] [s.n.] v. 4, p. 95–112, 2011.
- SMIJS, T.; PAVEL, S. **A Case Study: Nano-sized Titanium Dioxide in Sunscreens**. [s.l.] Elsevier B.V., 2015.

T. P. O'BRIEN, N. FEDER, M. E. M. Polyehromatic Staining of Plant Cell Walls by Toluidine Blue O. *[s.l.] [s.n.]* p. 1–8, 2005.

TOMBULOGLU, H.; TOMBULOGLU, G.; SLIMANI, Y.; ERCAN, I.; SOZERI, H.; BAYKAL, A. Impact of manganese ferrite (MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) nanoparticles on growth and magnetic character of barley (*Hordeum vulgare* L.). **Environmental Pollution**, *[s.l.] [s.n.]* v. 243, p. 872–881, 2018.

TOVAR-SÁNCHEZ, A.; SÁNCHEZ-QUILES, D.; RODRÍGUEZ-ROMERO, A. Massive coastal tourism influx to the Mediterranean Sea: The environmental risk of sunscreens. **Science of the Total Environment**, *[s.l.] [s.n.]* v. 656, p. 316–321, 2019.

VENKATESAN, A. K.; REED, R. B.; LEE, S.; BI, X.; HANIGAN, D.; YANG, Y.; RANVILLE, J. F.; HERCKES, P.; WESTERHOFF, P. Detection and Sizing of Ti-Containing Particles in Recreational Waters Using Single Particle ICP-MS. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, *[s.l.] [s.n.]* v. 100, n. 1, p. 120–126, 2018.

VRIES, I. M. DE. Origin and domestication of *Lactuca sativa* L. **Genetic Resources and Crop Evolution**, *[s.l.] [s.n.]* p. 165–174, 1997.

WEIR, A.; WESTERHOFF, P.; FABRICIUS, L.; GOETZ, N. VON; SCI TECHNOL, E. Titanium Dioxide Nanoparticles in Food and Personal Care Products NIH Public Access Author Manuscript. **Environ Sci Technol**, *[s.l.] [s.n.]* v. 46, n. 4, p. 2242–2250, 2012.

XIA, B.; CHEN, B.; SUN, X.; QU, K.; MA, F.; DU, M. Interaction of TiO<sub>2</sub> nanoparticles with the marine microalga *Nitzschia closterium*: Growth inhibition, oxidative stress and internalization. **Science of the Total Environment**, *[s.l.] [s.n.]* v. 508, p. 525–533, 2015.

ZEHRA, A.; CHOUDHARY, S.; WANI, K. I.; NAEEM, M.; KHAN, M. M. A.; AFTAB, T. Exogenous abscisic acid mediates ROS homeostasis and maintains glandular trichome to enhance artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* under copper toxicity. **Plant Physiology and Biochemistry**, *[s.l.] [s.n.]* v. 156, n. June, p. 125–134, 2020.

ZHANG, P.; MA, Y.; ZHANG, Z.; HE, X.; LI, Y.; ZHANG, J.; ZHENG, L.; ZHAO, Y. Species-specific toxicity of ceria nanoparticles to *Lactuca* plants. **Nanotoxicology**, *[s.l.] [s.n.]* v. 9, n. 1, p. 1–8, 2015.

FAHN A. Plant Anatomy. Oxford, UK & New York, USA: **Pergamon Press**. *[s.l.] [s.n.]* 1982.