



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

EMANUEL ALVES BEZERRA

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA PARCIAL DE SEMENTES, PLÂNTULAS, E
CALOS CULTIVADOS DE *CALOTROPIS PROCERA* EXPOSTOS À AÇÃO DE
CAMPO MAGNÉTICO**

FORTALEZA

2022

EMANUEL ALVES BEZERRA

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA PARCIAL DE SEMENTES, PLÂNTULAS, E
CALOS CULTIVADOS DE *CALOTROPIS PROCERA* EXPOSTOS À AÇÃO DE CAMPO
MAGNÉTICO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de doutor em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Viana Ramos.
Coorientadora: Profa. Dra Cristina Paiva da
Silveira Carvalho.

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

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

- B469c Bezerra, Emanuel Alves.
Caracterização bioquímica parcial de sementes, plântulas, e calos cultivados de *Calotropis procera* expostos à ação de campo magnético / Emanuel Alves Bezerra. – 2023.
119 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2023.
Orientação: Prof. Dr. Márcio Viana Ramos.
Coorientação: Profa. Dra. Cristina Paiva da Silveira Carvalho.
1. Magnetismo. 2. Germinação. 3. Metabolismo oxidativo. 4. Proteômica. I. Título.

CDD 572

EMANUEL ALVES BEZERRA

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA PARCIAL DE SEMENTES, PLÂNTULAS, E
CALOS CULTIVADOS DE *CALOTROPIS PROCERA* EXPOSTOS A AÇÃO DE CAMPO
MAGNÉTICO.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de doutor em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Aprovado em 22 de julho de 2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr Márcio Viana Ramos (Orientador)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr Cleverson Diniz Teixeira de Freitas

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr Raimundo Nogueira da Costa Filho

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra Gabrielen de Maria Gomes Dias

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra Ayrles Fernanda Brandão da Silva

Perícia Forense do Estado do Ceará (PEFOCE)

A Deus.

Aos meus pais, Messias e Antonia.

À equipe do Laboratório de Plantas
Laticíferas.

Aos meus colegas do Departamento de
Bioquímica e Biologia Molecular externos ao
Laboratório de Plantas Laticíferas.

À Universidade Federal do Ceará (UFC)

À Prefeitura Municipal de Crateús

À Fundação Cearense de Apoio ao
Desenvolvimento Científico e Tecnológico
(FUNCAP)

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, pela proteção, pela saúde, pelas condições de desenvolvimento do trabalho, pela força dada nos momentos difíceis, enfim por todas as Suas bênçãos imensuráveis dadas para a conclusão deste trabalho.

Aos meus pais, por sempre fazerem parte da minha vida e estarem ao meu lado em todos os momentos vida, zelando sempre pela minha vida e educação.

Ao meu orientador Prof. Dr Márcio Viana Ramos, pela oportunidade dada de fazer este curso em seu laboratório, pela compreensão com as minhas dificuldades, paciência e todas as suas orientações.

À minha coorientadora Prof. Dra Cristina Paiva da Silveira Carvalho, por todas as orientações, compreensões e oportunidades dadas em seu laboratório, que me fizeram crescer profissionalmente.

Ao Professor Raimundo Nogueira da Costa Filho pelas orientações na área de Física e acompanhamento da pesquisa com o campo magnético, sempre repassando informações fundamentais para o bom desenvolvimento da pesquisa.

Ao Prof Dr Nildo Loiola Dias pelas orientações dadas na área de Física e por todo apoio e manutenção da bobina de Helmholtz, fundamentais para a obtenção do campo magnético e para o desenvolvimento da pesquisa

À Ayrles Fernandes Brandão da Silva, por sempre participar e nos momentos cruciais da minha pesquisa em todo o doutorado.

Ao Francisco Dalton Barreto de Oliveira e à Ana Luiza Sobral Paiva pelos seus conhecimentos repassados na área de proteômica.

À todos os meus colegas dos Laboratório de Plantas Laticíferas e Laboratório de Biotecnologia Vegetal, pela parceria e participações na minha pesquisa.

À todos Professores e colegas do departamento de Bioquímica e Biologia Molecular externos aos Laboratórios onde realizei a minha pesquisa, pelas contribuições nas disciplinas cursadas e contribuíram assim com o meu desenvolvimento acadêmico.

Aos membros da banca examinadora, pela gentileza de participar e contribuir com minha tese.

À Universidade Federal do Ceará localizada em Fortaleza, pela oportunidade de realizar este curso de doutorado.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), pela bolsa de estudo para realização de doutorado

RESUMO

Campo magnético (CM) é um componente natural do meio ambiente e afeta os organismos vivos com intensidades entre 25- μ T e 65- μ T, conforme diferentes localizações geográficas. Entretanto, pode atuar como um agente de estresse abiótico. Há relatos na literatura sobre efeitos de campos magnéticos sobre plantas, sendo a maioria dos estudos com espécies de importância agrônômica. Neste projeto, foi caracterizado, em termos bioquímicos, o efeito de exposição ao CM (5 dias), realizado com sementes, calos e plântulas de *Calotropis procera* (Apocynaceae), uma espécie de planta laticífera que apresenta potencial terapêutico. Sementes de *C. procera* foram expostas a CM e analisadas antes da sementeira. Sementes de *C. procera* foram germinadas sob efeito do CM (2 mT) ou expostas a CM e então germinadas, sendo este CM gerado por uma bobina de Helmholtz. Plântulas e calos *in vitro* foram expostos ao CM e então analisados. A exposição ao CM reduziu o tempo de germinação das sementes e aumentou a taxa de germinação. Isto foi acompanhado por maior matéria fresca e seca. A atividade de enzimas antioxidantes como CAT, POX e APX foram alteradas nas sementes após a exposição ao CM. O aumento dos teores de peróxido de hidrogênio e malondialdeído foram indicadores de estresse oxidativo. A integridade do DNA não foi alterada, enquanto a densidade celular, a quantidade de proteína solúvel e DNA aumentaram, em relação às sementes pertencentes ao tratamento controle. Análises de proteômica/bioinformática corroboraram esses dados. No geral, essas observações indicaram estresse oxidativo em sementes submetidas ao CM. No entanto, isso não afetou a germinação das sementes. Ao contrário, melhorou o desempenho da germinação em termos de tempo e proporção. Este estudo indica que a exposição ao CM induz um equilíbrio intrigante entre estresse oxidativo (potencialmente prejudicial) e germinação acelerada (efeito desejado) de sementes. Tais efeitos podem ser apreciados tecnologicamente para a produção de mudas, principalmente de sementes recalcitrantes de espécies agrônômicas importantes. Plântulas e calos também tiveram crescimento favorecido pela exposição ao CM, com maior concentração de pigmentos fotossintéticos e menor teor de lignina, nos calos. A exposição ao CM propiciou crescimento e desenvolvimento mais rápido de *C. procera* e essa observação parece estar associada a uma condição redox favorável à ativação do metabolismo celular, indicado por aumento do teor de DNA e de proteínas solúveis e aumento diferencial de proteínas envolvidas em atividade metabólica celular voltada para o crescimento e desenvolvimento vegetal.

Palavras-chave: magnetismo; germinação; metabolismo oxidativo; proteômica.

ABSTRACT

Magnetic field (MF) is a natural component of the environment and affects living organisms with intensities between 25 μ T and 65 μ T, depending on different geographic locations. However, it can act as an abiotic stressor. There are reports in the literature about the effects of magnetic fields on plants, most of the studies with species of agronomic importance. In this project, the effect of exposure to MF (5 days) was characterized, in biochemical terms, with seeds, callus and seedlings of *Calotropis procera* (Apocynaceae), a species of laticiferous plant that has therapeutic potential. *C. procera* seeds were exposed to MF and analyzed before sowing. *C. procera* were germinated under MF (2 mT) or exposed to MF and then germinated, this MF being generated by a Helmholtz coil. Seedlings and callus were exposed to MF and then analyzed. Exposure to MF reduced seed germination time and increased germination rate. This was accompanied by increased fresh and dry matter. Antioxidant enzymes activity: such as CAT, POX, and APX were altered in seeds after exposure to MF. The increase in the levels of hydrogen peroxide and malondialdehyde were indicators of oxidative stress. DNA integrity was not altered, while the cell density, amount of soluble protein and DNA increased, in relation to control treatment. Proteomics/bioinformatics analyses corroborated these data. Overall, these observations indicated oxidative stress in seeds submitted to MF. However, this did not affect seed germination. On the contrary, it improved germination performance in terms of time and proportion. This study indicates that exposure to MF induces an intriguing balance between oxidative stress (potentially harmful) and accelerated germination (desired effect) of seeds. Such effects can be technologically appreciated for the production of seedlings, mainly of recalcitrant seeds of important agronomic species. Seedlings and callus also had growth favored by exposure to MF, with higher concentration of photosynthetic pigments and lower lignin content in the callus. Exposure to MF provided faster growth and development of *C. procera* and this observation seems to be associated with a redox condition favorable to the activation of cellular metabolism, indicated by an increase in the content of DNA, soluble proteins and a differential increase in proteins involved in cellular metabolic activities, typical of growth.

Keywords: magnetism; germination; oxidative metabolism; proteomics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Orientação dos momentos dipolo magnéticos de materiais magneticamente ordenados.....	17
Figura 2 -	Linhas de força magnética.....	19
Figura 3 -	Bobina de Helmholtz com suas linhas de campo magnético.....	21
Figura 4 -	Porcentagem de germinação diária das sementes de <i>C. procera</i> expostas ao campo magnético antes da sementeira.....	45
Figura 5 -	Porcentagem de germinação total por dia das sementes de <i>C. procera</i> expostas ao campo magnético antes da sementeira.....	46
Figura 6 -	A -Taxa de germinação e B - Porcentagem total das sementes de <i>C. procera</i> expostas ao campo magnético antes da sementeira.....	47
Figura 7 -	A - Massa fresca e B - Massa seca de sementes de <i>C. procera</i> expostas ao campo magnético antes da sementeira.....	48
Figura 8 -	Atividade de enzimas antioxidantes e ROS.....	50
Figura 9 -	Ensaio de peroxidação lipídica.....	51
Figura 10 -	Verificação de integridade de DNA.	52
Figura 11 -	Contagem de células por microscopia confocal.....	54
Figura 12 -	A - Quantidade de DNA genômico; B - Quantidade de proteínas totais solúveis.....	55
Figura 13 -	Representação esquemática de mudanças metabólicas em sementes de <i>Calotropis procera</i> após tratamento em campo magnético pré-sementeira.....	57
Figura 14 -	Porcentagem de germinação total por dia das sementes de <i>C. procera</i> expostas ao campo magnético de 2 mT.....	66
Figura 15 -	Parâmetros de germinação de sementes de <i>C. procera</i> expostas ao campo magnético de 2 mT, 5 dias após sementeira.....	67
Figura 16 -	Atividade de enzimas antioxidantes e ROS.....	69
Figura 17 -	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS PAGE) de extratos proteicos de sementes de <i>C. procera</i>	71
Figura 18 -	Distribuição em Diagrama de Venn das proteínas diferencialmente acumuladas em sementes semeadas de <i>Calotropis procera</i>	72

Figura 19 -	Proteínas diferencialmente acumuladas em sementes semeadas de <i>Calotropis procera</i> de acordo com a função biológica.....	73
Figura 20 -	Provável rede de interação de proteínas diferencialmente acumuladas em sementes semeadas de <i>C. procera</i> após análise de bioinformática na plataforma STRING.....	82 a 84
Figura 21 -	Representação esquemática de mudanças metabólicas em sementes de <i>Calotropis procera</i> semeadas em campo magnético (CM) e semeadas após tratamento em campo magnético pré-semeadura (PCM).....	86
Figura 22 -	Parâmetros de crescimento.....	95
Figura 23 -	Atividade de enzimas antioxidantes e ROS.....	98
Figura 24 -	Ensaio de peroxidação lipídica.....	99
Figura 25 -	Verificação de integridade de DNA.....	100
Figura 26 -	Pigmentos fotossintéticos em diferentes partes da plântula de <i>C. procera</i>	101
Figura 27 -	Conteúdo de clorofila e lignina.....	103
Figura 28 -	Representação esquemática de mudanças metabólicas em plântulas e calos de <i>Calotropis procera</i> expostos a campo magnético.....	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Efeitos provocados por exposição ao campo magnético em plantas.....	59
Tabela 2 -	Sumário das proteínas diferencialmente encontradas em sementes de <i>Calotropis procera</i> semeadas após tratamento em campo magnético (PCM) e sementes semeadas em exposição ao campo magnético (CM) em relação às sementes semeadas do grupo controle.....	74 a 76
Tabela 3 -	Parâmetros de crescimento em calos de <i>Calotropis procera</i> expostos a campo magnético.....	96

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
1.1	Comportamento magnético da matéria.....	15
1.2	Campo magnético e a vida.....	19
1.3	Campo magnético e plantas.....	22
1.3.1	<i>Campo magnético super fraco.....</i>	23
1.3.2	<i>Campo magnético fraco e de baixa frequência.....</i>	24
1.3.3	<i>Campo magnético forte.....</i>	26
1.3.4	<i>Calotropis procera.....</i>	29
2	JUSTIFICATIVA.....	33
3	OBJETIVOS.....	35
3.1	Objetivo geral.....	35
3.2	Objetivos específicos.....	35
4	CAPÍTULO 1: CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE SEMENTES QUIESCENTES DE <i>CALOTROPIS PROCERA</i> APÓS EXPOSIÇÃO AO CAMPO MAGNÉTICO ESTÁTICO	36
4.1	INTRODUÇÃO.....	37
4.2	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	39
4.2.1	<i>Sementes de Calotropis procera.....</i>	39
4.2.2	<i>Tratamento das sementes em campo magnético.....</i>	39
4.2.3	<i>Germinação das sementes.....</i>	39
4.2.4	<i>Teste da melhor intensidade do campo magnético.....</i>	40
4.2.5	<i>Massa seca e massa fresca.....</i>	40
4.2.6	<i>Parâmetros de germinação.....</i>	40
4.2.7	<i>Extrato enzimático.....</i>	40
4.2.8	<i>Dosagem de proteínas solúveis totais.....</i>	41
4.2.9	<i>Determinação da atividade da catalase (CAT).....</i>	41
4.2.10	<i>Determinação da atividade da ascorbato peroxidase (APX).....</i>	41
4.2.11	<i>Determinação da atividade da peroxidase de fenóis (POX).....</i>	42
4.2.12	<i>Determinação do teor de peróxido de hidrogênio.....</i>	42
4.2.13	<i>Análise de peroxidação lipídica.....</i>	43
4.2.14	<i>Extração e quantificação do DNA genômico.....</i>	43
4.2.15	<i>Ensaio TUNEL fluorométrico.....</i>	43

4.2.16	<i>Contagem de células</i>	44
4.2.17	<i>Análise estatística</i>	44
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.3.1	<i>Parâmetros de germinação e características das sementes</i>	45
4.3.2	<i>Análises bioquímicas</i>	49
5	CAPÍTULO 2: ANÁLISE PROTEÔMICA PARCIAL COMPARATIVA EM SEMENTES DE <i>CALOTROPIS PROCERA</i> SEMEADAS SOB AÇÃO DE CAMPO MAGNÉTICO	58
5.1	INTRODUÇÃO	59
5.2	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	61
5.2.1	<i>Material biológico</i>	61
5.2.2	<i>Exposição ao campo magnético durante a germinação das sementes</i>	61
5.2.3	<i>Parâmetros de análise</i>	61
5.2.4	<i>Extrato enzimático</i>	62
5.2.5	<i>Dosagem de proteínas totais solúveis</i>	62
5.2.6	<i>Atividade das enzimas antioxidantes</i>	62
5.2.7	<i>Conteúdo de peróxido de hidrogênio</i>	62
5.2.8	<i>Análise da peroxidação lipídica</i>	62
5.2.9	<i>Extrato proteico</i>	62
5.2.10	<i>Eletroforese em uma dimensional</i>	63
5.2.11	<i>Análise de espectrometria de massas</i>	64
5.2.12	<i>Identificação das proteínas</i>	64
5.2.13	<i>Análises de bioinformática</i>	64
5.2.14	<i>Rede de interação proteína-proteína</i>	65
5.2.15	<i>Análise estatística</i>	65
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
5.3.1	<i>Parâmetros fisiológicos</i>	66
5.3.2	<i>Enzimas antioxidantes</i>	68
5.3.3	<i>Análise proteômica de sementes de <i>C. procera</i> semeadas tratadas em CM</i>	70
5.3.3.1	<i>Análise do perfil proteico</i>	70
5.3.3.1.1	Proteínas relacionadas ao metabolismo de proteínas.....	77
5.3.3.1.2	Proteínas relacionadas à produção de energia e fotossíntese.....	77
5.3.3.1.3	Proteínas relacionadas à homeostase redox e à defesa contra estresse.....	78

5.3.3.1.4	Proteínas relacionadas ao transporte.....	79
5.3.3.1.5	Proteínas relacionadas a outras funções.....	79
5.3.3.2	<i>Análise da rede de interação de proteína.....</i>	81
6	CAPÍTULO 3: EFEITO DE CAMPO MAGNÉTICO SOBRE PLÂNTULAS E CALOS DE <i>CALOTROPIS PROCERA</i> EM MEIO DE CULTURA	87
6.1	INTRODUÇÃO	88
6.2	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	90
6.2.1	<i>Material biológico.....</i>	90
6.2.1.1	<i>Plântulas de Calotropis procera.....</i>	90
6.2.1.2	<i>Indução de calos de Calotropis procera.....</i>	90
6.2.2	<i>Aplicação do campo magnético.....</i>	91
6.2.2.1	<i>Aplicação do campo magnético em plântulas de C. procera.....</i>	91
6.2.2.2	<i>Aplicação do campo magnético nas culturas de calos.....</i>	91
6.2.3	<i>Parâmetros de crescimento.....</i>	91
6.2.3.1	<i>Parâmetros de crescimento das plântulas.....</i>	91
6.2.3.2	<i>Parâmetros de crescimento dos calos.....</i>	92
6.2.4	<i>Extrato enzimático.....</i>	92
6.2.5	<i>Dosagem de proteínas totais solúveis.....</i>	92
6.2.6	<i>Atividade das enzimas antioxidantes.....</i>	92
6.2.7	<i>Conteúdo de peróxido de hidrogênio.....</i>	92
6.2.8	<i>Análise da peroxidação lipídica.....</i>	93
6.2.9	<i>Ensaio TUNEL fluorométrico.....</i>	93
6.2.10	<i>Quantificação da clorofila e lignina.....</i>	93
6.2.11	<i>Pigmentos fotossintéticos.....</i>	93
6.2.12	<i>Análise estatística.....</i>	93
6.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	95
6.3.1	<i>Parâmetros de crescimento.....</i>	95
6.3.2	<i>Enzimas antioxidantes.....</i>	97
6.3.3	<i>Pigmentos fotossintéticos.....</i>	101
7	CONCLUSÃO.....	105
8	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	106
8.1	Sementes.....	106
8.2	Plântulas.....	106

8.3	Calos.....	106
	REFERÊNCIAS.....	107
	APÊNDICE A - SÍMBOLOS DAS DIFERENTES PROTEÍNAS DA REDE DE INTERAÇÃO PROTEÍNA-PROTEÍNA EM SEMENTES DE <i>CALOTROPIS PROCERA</i> SEMEADAS EM CAMPO MAGNÉTICO (CM) E SEMENTES SEMEADAS APÓS EXPOSIÇÃO AO CAMPO MAGNÉTICO (PCM).....	119

1 INTRODUÇÃO

1.1 Comportamento magnético da matéria

O magnetismo tem sua origem a partir de cargas eletricamente carregadas, desde prótons, elétrons e nêutrons que compõem a matéria. Magnetismo é inerente a todas as substâncias (VANSOUSKII, 1974). Sendo a palavra magnetismo derivada da palavra Magnésia, que é uma unidade regional da Grécia onde foi registrada pela primeira vez a ocorrência natural e em abundância de uma pedra formada por óxido de ferro magnético chamada de magnetita que demonstrava um comportamento peculiar de atrair metais.

Rigorosos estudos científicos, sobre eletricidade e magnetismo, começaram no século XVIII e as bases atômicas destes fenômenos foram elucidadas no século XX, com a descoberta da estrutura atômica. Conforme tal estrutura, vários tipos de magnetismo foram descobertos, como magnetismo nuclear, diamagnetismo, paramagnetismo, ferromagnetismo, antiferromagnetismo, superparamagnetismo, facilitando o entendimento da interação atômica e consequentemente da molécula com fenômenos magnéticos (SAINI et al, 1988).

O magnetismo nuclear é gerado do movimento orbital de partículas nucleares: prótons e nêutrons (BOWRON et al, 2018) e possui um vetor somatório individual, chamado de momento magnético dipolo. Dessa forma, quando existe o número par de prótons ou nêutrons, em um núcleo atômico, os vetores momentos magnético dipolo se orientam em direções opostas e se anulam, obtendo um valor igual a zero. No entanto, quando o número de prótons ou nêutrons, ou ambos são ímpares, surge uma rede nuclear de momento magnético dipolo podendo responder a um campo magnético externo juntamente com seus elétrons, que são partículas ao redor do núcleo atômico e que respondem a campo magnético externo.

Diamagnetismo, paramagnetismo, ferromagnetismo, antiferromagnetismo, superparamagnetismo são tipos de magnetismo dependentes dos elétrons. De acordo com o mecanismo quântico, os elétrons ocupam níveis de energia prescritos ao redor do núcleo atômico conhecidas como camadas e subcamadas. Na presença de um campo magnético externo, há mais divisões no nível de energia e os elétrons passam a ser determinados também pelo número quântico magnético orbital " m_l " e pelo número quântico magnético spin " m_s ".

O diamagnetismo é demonstrado em átomos que possuem elétrons pareados em cada subnível de energia, que não formam uma rede de momento dipolo magnético devido aos momentos individuais dos elétrons se cancelarem por ter um par de *spin* oposto. No entanto poderá haver uma leve alteração assimétrica no movimento orbital dos elétrons se esse átomo

for colocado próximo a um campo magnético externo e uma pequena rede de magnetização poderá ser formada e detectada. Sendo esta magnetização caracterizada pela soma dos vetores dos momentos dipolo magnéticos. Dessa forma, todas as amostras de materiais possuem um comportamento diamagnético muitas vezes obscurecido pelo paramagnetismo ou ferromagnetismo, que são formas de magnetismo que podem predominar em uma amostra de matéria. O paramagnetismo é demonstrado em átomos e íons que possuem elétrons não pareados em suas órbitas mais externas. Dessa forma, os momentos dipolo magnético desses elétrons não são cancelados pela ausência de um elétron com *spin* contrário e isso faz surgir um momento dipolo magnético intrínseco nesses átomos e íons na ausência de um campo magnético externo. No entanto não há magnetização nesse caso, pois em uma coleção desses íons ou átomos, em um volume de matéria, a orientação do vetor momento dipolo magnético é randômica. Quando um campo magnético externo é aplicado, nessa matéria, um volume de magnetização é verificado devido à orientação dos momentos dipolo magnético da matéria demonstrar preferência à orientação paralela, na mesma direção do campo aplicado, diferentemente dos momentos dipolo magnéticos da matéria diamagnética que se orientam de forma antiparalela em relação a um campo magnético aplicado. Este comportamento da matéria é chamado de paramagnético. Além dos íons normais, os radicais livres orgânicos são um exemplo de compostos com comportamento paramagnético (DELAN et al.,2019).

Enquanto diamagnetismo e paramagnetismo são propriedades de átomos, íons ou moléculas, o ferromagnetismo é uma propriedade de um grupo, seja de átomos ou moléculas de cristais sólidos e com algumas características diferentes. Quando átomos paramagnéticos estão próximos, os momentos dipolos magnéticos dos átomos vizinhos interagem entre si, alinhando-se paralelamente e formando um tipo de interação cooperativa, produzindo domínios que são sempre espontaneamente magnetizados. Em um material ferromagnético não magnetizado, estão presentes vários desses domínios com orientações randômicas que se cancelam entre si produzindo uma rede de magnetização igual a zero. No entanto, esses materiais, se forem expostos a um campo magnético fraco, serão rapidamente magnetizados até a saturação (máximo de magnetização). Nesse caso a rede de momentos dipolo magnético dos domínios se alinham paralelamente em direção ao campo magnético externo e essa magnetização fica retida em um volume dos materiais ferromagnéticos quando o campo externo é removido. Todavia, diamagnetismo, paramagnetismo e ferromagnetismo são fenômenos que podem coexistir em uma mesma amostra (WANG et al., 2006). No ferromagnetismo os momentos dipolos magnético podem se orientar todos paralelamente na mesma direção do campo magnético externo.No entanto podem existir também momentos dipolos magnéticos

antiparalelos em algumas matérias. Nesse caso, como há predominância de momentos dipolos paralelos, a amostra se comporta como ferromagnética. Em oposição ao comportamento do ferromagnetismo existe o fenômeno do antiferromagnetismo em que um grupo de átomos ou moléculas não forma rede de magnetização espontânea, ou seja, os momentos dipolos magnéticos ficam orientados de forma antiparalela. Dessa forma existem duas classes de substâncias magneticamente ordenadas: ferromagnéticas e antiferromagnéticas. No caso de substâncias ferromagnéticas os momentos dipolos magnéticos se organizam em feixes paralelos e formam domínios de magnetização espontâneos. Nas substâncias antiferromagnéticas, por sua vez, os momentos dipolos magnéticos se organizam em sentido antiparalelo e demonstram magnetização espontânea como em materiais ferromagnéticos.

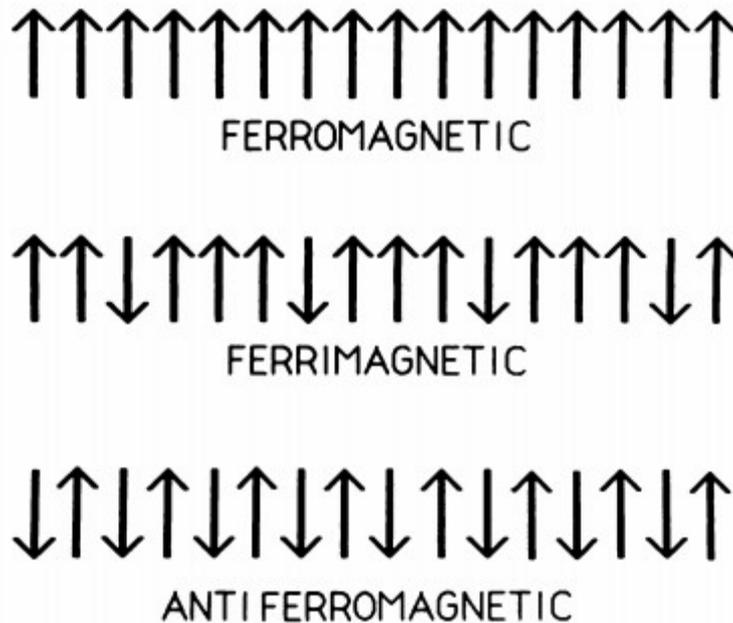


Figura 1. Orientação dos momentos dipolo magnéticos de materiais magneticamente ordenados. Em materiais ferromagnéticos, momentos dipolos magnéticos ficam paralelos um ao outro formando domínios de magnetização espontânea, ou excesso de momentos dipolos paralelos são responsáveis pela formação de um domínio de magnetização espontânea. Em matérias antiferromagnéticas existe uma distribuição uniforme de momentos dipolos magnéticos paralelo e antiparalelo, dessa maneira nenhum domínio de magnetização espontânea é formado.

Fonte: SAINI et al, (1988)

O comportamento magnético da matéria é baseado em átomos e na estrutura química da molécula, mas pode ser modificada por condições físicas de temperatura e pelo histórico magnético da matéria. As principais características do magnetismo estão sumarizadas no quadro 1.

QUADRO 1: Propriedades das diferentes formas de magnetismo.

Tipo de magnetismo	Rede de alinhamento ao campo externo	Magnetização remanescente	Dependência de temperatura	Estrutura
Diamagnetismo	Antiparalelo	Não	Não	Todos os materiais
Paramagnetismo	Paralelo	Não	Sim	Íons, átomos, moléculas
Superparamagnetismo	Paralelo	Não	Sim	Pequenos cristais sólidos
Ferromagnetismo	Paralelo	Sim	Sim	Grandes cristais sólidos

Adaptado de SAINI et al., 1988.

As aplicações de materiais magnéticos atualmente representam um exemplo de exploração de um simples fenômeno físico. Além disso, o comportamento de uma amostra material sob a influência de um campo magnético é muito importante, principalmente em estudos biomagnéticos, pois um sistema vivo é caracterizado por um conjunto de substâncias. Recentemente, estudos científicos levaram à descoberta de que partículas magnéticas são sintetizadas por bactérias, insetos, pássaros e peixes, permitindo que os mesmos se desloquem por longas distâncias utilizando o campo magnético terrestre, geomagnético (PAKHOMOV et al., 2018). Por outro lado, alguns estudos têm utilizado o campo magnético em diferentes intensidades, para observar o crescimento e desenvolvimento de plantas (NYAKANE et al., 2019).

Ressaltando que, para a utilização do campo magnético, é importante entender sobre o fenômeno do magnetismo e a relação que uma amostra terá, quando entrar em contato com um campo magnético.

1.2 Campo magnético e a vida

Campo magnético é definido como a região próxima a um ímã que influencia a matéria de forma diferente, dependendo de sua característica: diamagnética, paramagnética ou ferromagnética. O físico Michel Faraday conseguiu mostrar o campo magnético de forma visual e suas propriedades, introduzindo o conceito de linhas de força que se comportam de formas diferentes, dependendo da origem do campo magnético. Para uma barra magnética (um ímã) que é dividida em polo norte e polo sul, as linhas de forças começam no polo norte e se curvam retornando para a barra magnética pelo o polo sul (Figura 2 A). Essas linhas obedecem à direção da grandeza B , densidade de fluxo magnético (GALITSKI et al., 2019).

Por muito tempo os fenômenos elétricos e magnéticos foram estudados de forma separada e que não mantinham qualquer relação entre si. Mas no século XIX essa visão mudou, depois que o físico Hans Christian Oersted provou que fenômenos elétricos poderiam gerar magnetismo e que fenômenos magnéticos poderiam gerar eletricidade. Ao colocar uma bússola próximo a um fio de um circuito elétrico, Oersted observou que a agulha era defletida quando passava corrente elétrica pelo fio. Assim, foi concluído pelo cientista que o magnetismo tinha relação com a eletricidade. Dessa forma, um campo magnético não é gerado apenas por um ímã, mas também pode ser gerado por movimento de cargas elétricas. Oersted, portanto, foi o primeiro a observar que ao redor de fios condutores com corrente elétrica havia a produção de campo magnético. Dessa forma, o campo magnético foi definido também como o estado físico do espaço em volta de correntes elétricas em condutores (MARTINS, 2018). Mas diferentemente dos ímãs, as linhas de forças magnéticas são circulares e têm como centro o fio condutor de corrente elétrica (Figura 2 B).

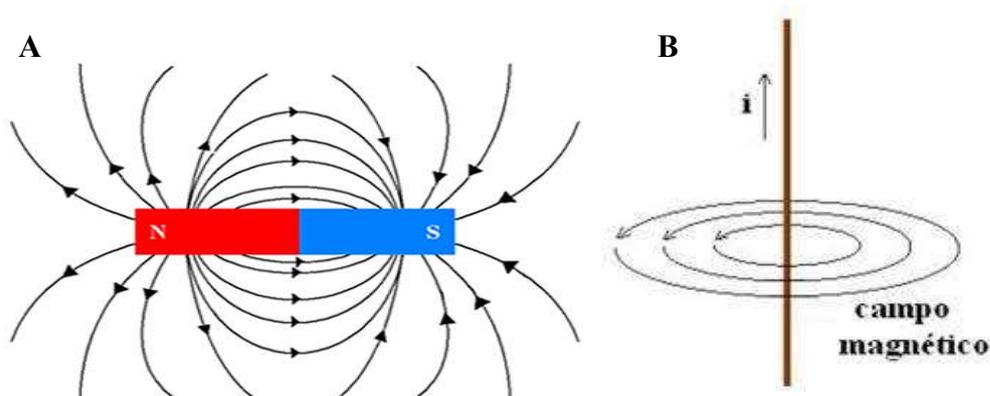


Figura 2. Linhas de força magnética. **A** - Linhas de forças magnéticas criada por um campo magnético de um ímã; **B** - Linhas de forças magnéticas em um campo magnético criado por um fio condutor de corrente elétrica.

FONTE: ROBERT, (2003)

Para descrever matematicamente um campo magnético gerado por corrente elétrica é preciso entender uma grandeza vetorial denominada densidade de fluxo magnético \mathbf{B} , que é definido por uma força em uma carga Q que se move a uma velocidade v no campo: $F_m=Q.v.B$. Essa força é denominada de força magnética. No entanto, em uma corrente elétrica existem várias cargas em movimento, dessa forma várias forças magnéticas e, conseqüentemente, o vetor \mathbf{B} total será uma soma dos vetores de densidade de fluxo magnético das cargas em movimento. Assim, para o cálculo dessa densidade de fluxo magnético \mathbf{B} é utilizada a lei de Biot-Savart (ROBERT, 2003):

$$\mathbf{B} = \frac{\mu_0}{4\pi} \int_l \frac{I d\mathbf{l} \times \hat{\mathbf{R}}}{R^2}$$

Onde μ_0 é a permeabilidade do vácuo no espaço livre, R é a distância entre as cargas, $\hat{\mathbf{R}}$ é o vetor unitário ao longo de R , l é o comprimento do fio, I é a intensidade da corrente elétrica. Dessa forma, o campo magnético é mensurado e a unidade para \mathbf{B} é o tesla (T).

Como exemplo de campo magnético, pode-se citar também o globo terrestre, possuindo o polo Norte magnético e o polo Sul magnético. Entre os anos de 1544 e 1603, Willian Gilbert observou que as bússolas apontavam sempre para o Norte, dessa forma foi descoberto que o globo terrestre é um campo magnético natural (VASILIEV, 2018).

Frequentemente nas atividades humanas é necessária a produção de um campo magnético artificial. Em decorrência dos estudos desenvolvidos por Michael Faraday houve o desenvolvimento do eletromagnetismo que proporcionou o conhecimento sobre indução magnética, criando a possibilidade para o surgimento de uma ampla quantidade de tecnologias satisfatórias e aplicações relacionadas ao fenômeno do magnetismo. Dessa forma, com o entendimento das relações entre magnetismo e eletricidade, diversas tecnologias foram criadas, como exemplos: bússola, microfones, cartões magnéticos, alto-falantes, ressonância magnética, eletroímãs, captadores de instrumentos musicais, discos rígidos, motores elétricos, bobina de Helmholtz, dentre outras aplicações (CALDEIRA, 2010).

Para essas aplicações são utilizadas algumas fontes de campo magnético, como fio condutor retilíneo, espira circular, bobina chata, solenoide e bobina de Helmholtz.

Através desses geradores de campo magnético, foi criada a bobina de Helmholtz, um aparelho muito importante para desenvolvimentos de estudos biomagnéticos (NELSON et al., 2019). Esse aparelho consiste em duas bobinas circulares idênticas e paralelas separadas por uma distância igual ao raio das mesmas. As bobinas são constituídas de várias espiras, havendo

o número de espiras para cada bobina. Com essa estrutura o aparelho é capaz de conduzir e de gerar um campo magnético uniforme entre as bobinas (Figura 3).

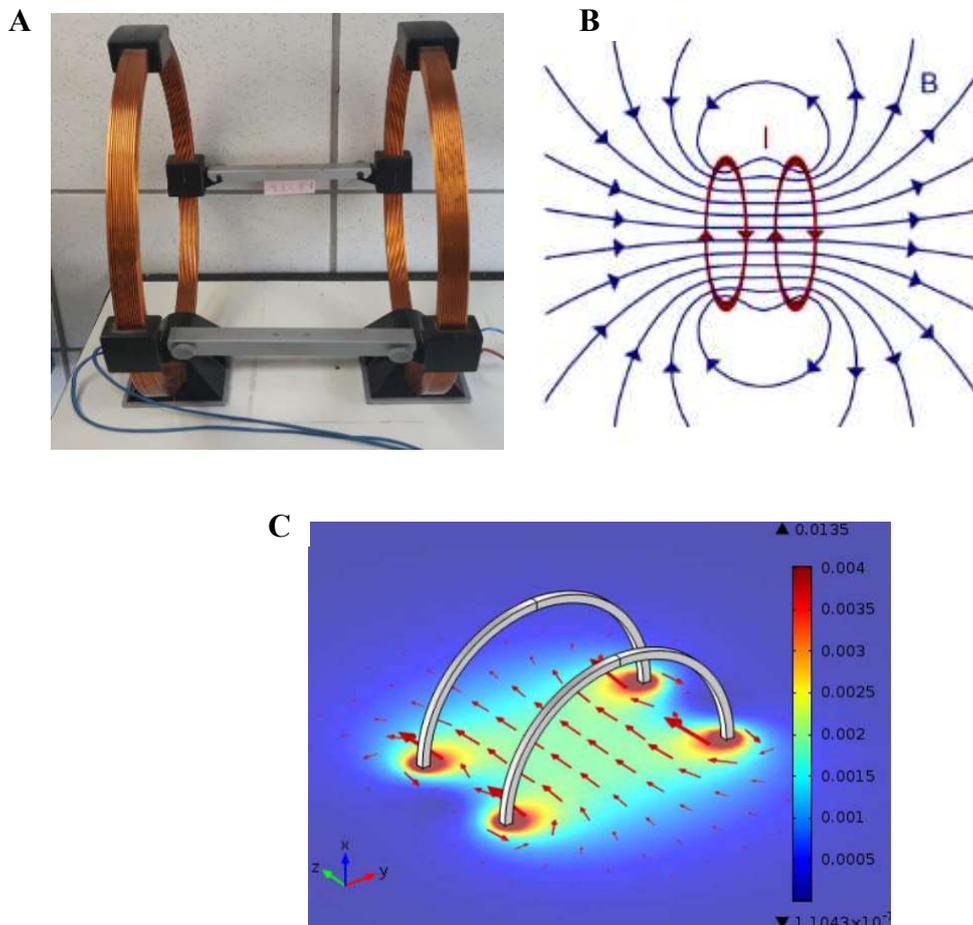


Figura 3. Bobina de Helmholtz com suas linhas de campo magnético **A** - Bobina de Helmholtz (Autor da tese); **B** - Desenho das linhas de força de uma bobina de Helmholtz (CALDEIRA, 2010); **C**- Modelo computacional da densidade de fluxo magnético em uma bobina de Helmholtz circular (ALVAREZ et al., 2012).

Além da utilização para estudos biomagnéticos, a bobina de Helmholtz possui as seguintes aplicações: a determinação das componentes vertical e horizontal do campo magnético terrestre; anulação em determinado volume do campo magnético terrestre; estudo dos efeitos de campos magnéticos em componentes ou equipamentos eletrônicos; desmagnetização de pequenas peças de materiais ferromagnéticos usados na ciência de naves espaciais (ROBERT, 2003). Dentre os estudos biomagnéticos, as pesquisas realizadas com plantas são destaques, tendo em vista o uso dessa tecnologia no melhoramento do desenvolvimento vegetal.

1.3 Campo magnético e plantas

As mudanças climáticas são, atualmente, uma grande preocupação mundial principalmente em relação aos seus impactos na produção agrícola. No tocante a este assunto, agricultores ao redor do mundo têm enfrentado problemas críticos como a redução do potencial das culturas e a irregularidade pluviométrica. Esses eventos podem ter como consequências secas prolongadas, com conseqüente diminuição da disponibilidade de água para irrigação dos cultivos de plantas. Outro problema relacionado à preocupação mundial é a alta demanda de alimentos no mundo ocasionado pelo aumento da população humana no planeta.

Dessa forma, pesquisas recentes têm relatado que o tratamento magnético em plantas pode ter efeito positivo sobre a qualidade de culturas agrícolas, ocasionando melhorias no desenvolvimento de plantas e na melhor capacidade de absorção da água, com conseqüente melhoria da produtividade dos cultivos (SARRAF et al., 2020). No entanto, pesquisas com o tratamento magnético de plantas são dependentes da espécie e das características do campo magnético, como a intensidade dos mesmos e o tempo de exposição da planta ao campo (NYAKANE et al., 2019).

No planeta Terra todos os organismos vivos estão sob influência do campo magnético terrestre, também denominado campo geomagnético (do inglês: Geomagnetic Field (GMF)) que possui uma intensidade média de 50 μT , pois existem importantes diferenças na superfície da Terra com relação aos componentes força e direção do campo magnético terrestre. O componente vertical do campo magnético terrestre atinge seu valor máximo, aproximadamente de 67 μT , nos polos magnéticos, enquanto que no Equador assume o valor de zero. Já o componente horizontal é máximo no Equador, aproximadamente 33 μT , e é zero nos polos magnéticos (KOBAYASHI et al., 2004). Apesar de ser um componente do meio ambiente, GMF é considerado um tipo de estresse abiótico (WANG et al., 2006).

Devido ao conhecimento da relação entre magnetismo e eletricidade, o homem tem criado diversas fontes de campo eletromagnético, que diferem em frequência e intensidade para a estimulação e desenvolvimento de plantas. O eletromagnetismo tem sido observado como a combinação de campo elétrico e campo magnético. No entanto, o campo elétrico pode ser facilmente bloqueado ou enfraquecido por materiais condutores, enquanto que o campo magnético pode atravessar diversos materiais. Além disso, à medida que se aumenta a distância das fontes de ambos os campos a intensidade também diminui.

Embora presente naturalmente em todo o planeta, poucos são os estudos sobre o efeito da exposição de sistemas biológicos a campo magnético artificial, que seria aumentado em

relação ao natural. De acordo com Galland e Pazur (2005), há quatro tipos de campo magnético, baseado na sensibilidade das plantas: campo magnético fraco homogêneo (0 a 100 μT); campo magnético forte homogêneo (mT a T); campo magnético forte não homogêneo; e campos magnéticos de frequência extremamente baixa e de baixa a moderada frequência de densidade de fluxo magnético (centenas de μT). Para Belyavskaya (2004), um campo magnético fraco fica entre 100 nT a 0,5 mT, enquanto o extremamente baixo está abaixo de 100 nT. Estas classificações tornam-se importante para o desenvolvimento de pesquisas relacionando a exposição de plantas ao campo magnético.

1.3.1 Campo magnético super fraco

Um campo magnético próximo é considerado super fraco quando a sua intensidade é próxima a zero Tesla. Para ser gerado um campo magnético próximo a nulo tem que haver ausência da principal componente do campo geomagnético estático, o que pode ser obtido por compensação do campo geomagnético ou por blindagem.

O uso do campo magnético super fraco, próximo a zero, possibilita investigar o modo como as condições espaciais afetariam o desenvolvimento das plantas. Em condições de campo magnético próximo a zero a germinação de sementes de alfafa (*Medicago sativa* L.), centeio (*Secale cereale* L.), calêndula francesa (*Tagetes pátula* L.), calêndula (*Calendula officinalis* L.), trigo mourisco (*Fagopyrum esculentum* L.), trigo (*Triticum aestivum* L.) e agrião (*Lepidium sativum* L.) não demonstraram diferença significativa em relação ao campo geomagnético. Após cinco dias de incubação, o desenvolvimento dessas mesmas plantas variou conforme cada espécie. O desenvolvimento da calêndula, por exemplo, não foi influenciado pelo campo magnético super fraco. Em relação ao crescimento das raízes, o centeio e o trigo tiveram seu crescimento inibido pelo campo, mas o crescimento das raízes de alfafa e agrião foi estimulado pelo campo magnético nulo (SILVA e DOBRÁNSZKI, 2016).

Em soja, por exemplo, foi possível observar mudanças estruturais e anatômicas na germinação e formação de plântulas durante os cinco dias de exposição a campo magnético nulo. Foi observada alteração no processo de síntese da celulose e conseqüente alteração no desenvolvimento da parede celular (DE MICCO et al. 2008). Em *Arabidopsis* submetida a campo magnético próximo a zero em relação às plantas controles (GMF) não houve diferença significativa na formação de biomassa, mas o crescimento e desenvolvimento reprodutivo foram afetados negativamente. Nesse caso, houve um atraso na floração da planta e a produção

de sementes foi menor que a produção de sementes das plantas não submetidas ao campo magnético nulo (XU et al., 2013).

1.3.2 Campo magnético fraco e de baixa frequência

O campo magnético fraco possui uma intensidade entre 100 nT a 0,5 mT. A maioria das pesquisas realizadas com essa faixa de intensidade de campo também demonstraram diferentes resultados indicando mais uma vez que as respostas ao campo magnético variam de espécie para espécie de planta.

Em uma pesquisa com sementes e plântulas de repolho (*Brassica oleracea* L.) exposto a um campo magnético de 0,4 a 0,5 mT, após a remoção do campo, houve diminuição do crescimento das plântulas e diminuição da germinação das sementes também (NAMBA et al., 1995). A 100 μ T em uma frequência de 50 Hz um campo magnético foi usado para agrião de jardim, no intuito de uma estimulação das sementes pré-semeadura, e foi observado uma aceleração de crescimento e um aumento da massa verde (GUTTZEIT, 2001). Já para a espécie arbórea carvalho (*Quercus súber* L.), dos três genótipos estudados, um apresentou inibição de crescimento de plântulas, quando os embriões somáticos foram isolados e expostos a um campo magnético de 15 μ T em uma frequência de 50 Hz durante 8 semanas (CELESTINO et al., 1998).

Como mencionado anteriormente, um campo eletromagnético é a combinação de um campo elétrico com campo magnético. Em outro experimento, fundamentado no movimento dos íons, através dos canais de membrana, o campo eletromagnético fraco foi sintonizado nas frequências de ressonância dos íons cálcio Ca^{2+} e potássio K^{+} , respectivamente. A planta utilizada para tal pesquisa foi o rabanete (*Raphanus sativus* L.), no qual a sementes dessa planta foram expostas por 21 dias a um campo magnético (SMITH et al., 1993). De acordo com os autores se as condições energéticas estivessem configuradas de acordo com as dimensões do canal iônico, assim que essas condições energéticas fossem estabelecidas outros parâmetros também se encaixariam e os resultados esperados seriam nenhum efeito do campo magnético, ou nenhum efeito inibitório. Nesta pesquisa, as sementes de rabanete expostas à frequência de Ca^{2+} demonstraram uma germinação mais lenta que as plantas não expostas ao campo magnético, mas as plântulas cresceram rapidamente. Diferentemente das sementes expostas à frequência de Ca^{2+} , as sementes de rabanete, expostas à frequência sintonizada do íon K^{+} , germinaram mais rápido que as sementes não expostas, mas as plântulas cresceram mais lentamente que as plântulas do tratamento controle, enquanto que o peso das raízes das plântulas submetidas ao campo magnético foi maior que o das raízes das plântulas controles.

Em outro experimento, na mesma linha das frequências dos canais iônicos, Davies (1996) sintonizou um campo eletromagnético na frequência de ressonância de Ca^{2+} utilizado para sementes de rabanete (*Raphanus sativus* L.), mostarda (*Sinapis alba* L.) e cevada (*Hordeum vulgare* L.) e foi encontrada uma resposta específica de cada espécie das sementes em relação ao campo magnético. Para o rabanete e a cevada o campo eletromagnético estimulou parâmetros de crescimento da parte aérea, como massa seca total da parte aérea, massa seca das folhas, diâmetro do caule e altura da planta. Apenas em rabanete houve crescimento da massa seca das raízes. No entanto, em mostarda nenhum parâmetro de crescimento foi estimulado pelo campo eletromagnético em relação às plantas não expostas ao campo magnético. Em relação à cevada foi observado o aumento da massa fresca de raízes expostas ao campo eletromagnético, tendo sido observada também a diminuição do diâmetro e da massa seca das raízes das plantas expostas ao campo magnético, quando comparadas ao controle.

Em sementes de trigo (*Triticum aestivum* L.), um campo eletromagnético de baixa frequência, 50 Hz, teve efeitos estimulantes e inibitórios, dependendo do tempo de exposição das sementes ao campo. Uma simples exposição de 15 horas aumentou a porcentagem de germinação do trigo. No entanto, a aplicação desse mesmo campo nas sementes de trigo durante seis dias, de forma contínua, foi danosa para as sementes, diminuindo em até 84% a germinação e diminuindo o tamanho das plântulas em até 33% em relação às sementes e plântulas de trigo do tratamento controle (AKSYONOV et al., 2007).

Em carvalho (*Quercus súber* L.), Celestino et al., (20 00) utilizaram um campo eletromagnético de 50 Hz e 15 μT através de um sistema de bobina de Helmholtz e não observaram diferença significativa no percentual de germinação das sementes expostas ao campo magnético e no tratamento controle. No entanto, os autores observaram maior brotação e crescimento de plântulas expostas ao campo magnético.

Para testar o rendimento de milho (*Zea mays* L.) e trigo (*Triticum aestivum* L.), foi utilizado, por cinco anos, um campo eletromagnético de 380 kV gerado por uma linha de transmissão entre 2 cidades. Essas culturas foram plantadas em diferentes distâncias da linha 40, 14, 8 e 2 metros. Neste experimento o campo elétrico teve uma força de 0,2 a 4 kV/m e o campo magnético uma intensidade entre 0,4 e 4,5 μT (SOJA et al., 2003). Os grãos de trigo de inverno tiveram melhores rendimentos quando a força do campo foi menor, ou seja, quando as culturas eram plantadas mais distantes das linhas de transmissão. Na cultura de milho não foi registrada nenhuma diferença significativa entre sementes semeadas próximo ou distante das linhas de transmissão.

Em outro experimento, foi verificada, em condições de laboratório, a influência de linhas de transmissão possuindo um campo magnético de 84 μT com 400 kV e um campo magnético de 45 μT . Foram verificados diminuição dos parâmetros da área foliar e massa fresca das folhas, mas a extensão da folha foi dependente da intensidade do campo magnético (HASAN et al., 2011).

À luz de aspectos bioquímicos foi investigada a influência das linhas de transmissões sobre o conteúdo de nitrogênio, de proteínas e de clorofila, além da influência sobre a atividade da peroxidase (POX) em folhas de dendê (*Elaeis guineensis* var. *Tenera*) por Mahmood et al., (2013). As plantas de dendê foram expostas a um campo eletromagnético com 275 kV durante 6 meses e 7 anos a diferentes distâncias da linha de transmissão: 0; 8,8; 17,6; 26,4; 35,2; 44; 52,8 e 61,6 metros. Nas plantas cultivadas a 8,8 metros da linha de transmissão o conteúdo de clorofila a, b e clorofila total foram maiores, enquanto à medida que aumentava a distância das plantas cultivadas da linha de transmissão o conteúdo das clorofilas decrescia. O conteúdo de proteínas das folhas das plantas expostas ao campo não mostrou diferença significativas no cultivo exposto durante sete anos, no entanto três padrões de bandas de proteína diferentes surgiram nas folhas das plantas expostas por seis meses indicando três tipos de proteínas diferentes. Em relação à atividade da POX, à medida que o cultivo das plantas se aproximava da linha de transmissão, ou seja, que a intensidade do campo magnético aumentava, era registrado um aumento da atividade dessa proteína. Esses resultados sugerem que estaria havendo uma resposta ao estresse nas plantas cultivadas próximas à fonte de campo magnético.

Rezaiiasl et al., (2012) expuseram sementes de pepino (*Cucumis sativus* L.) a um campo magnético de 20 μT e 5 μT por um período de 30 minutos para verificação de mudanças ou não nos parâmetros das frutas e flores dessa planta. Foi verificado que as duas intensidades testadas de campo magnético influenciaram negativamente os parâmetros de frutas e flores, apesar de ter sido observado aumento no número de frutos e aumento do comprimento do caule principal.

1.3.3 Campo magnético forte

Como mencionado anteriormente, o campo magnético é considerado forte para as plantas em uma intensidade que vai de 1 mT a 1 T. Nessa faixa de intensidade, alguns estudos biomagnéticos com plantas demonstraram um efeito positivo no crescimento e desenvolvimento de diferentes espécies vegetais, principalmente na faixa de 1,5 mT a 250 mT. Os efeitos positivos foram verificados principalmente na germinação de sementes e em

parâmetros de crescimento de plantas de diferentes espécies, o que resultou em aumento da biomassa vegetal aumento do rendimento das culturas.

Aguilar et al., (2009) utilizaram um campo de 60 mT e 100 mT em diferentes tempos (7,5 minutos; 15 minutos e 30 minutos) em sementes de milho. A germinação foi melhorada em até 23% e 30% das plântulas aumentaram a sua massa seca, após exposição por 7,5 minutos a um campo magnético com intensidade de 100 mT. Mas apesar desses resultados positivos, essa pesquisa também detectou que as respostas eram dependentes da cultivar de milho utilizado, demonstrando que houve efeitos neutros e negativos quando se comparavam a exposição ao campo magnético a seus respectivos controles dentro da própria cultivar.

Também foi investigada a influência de um campo magnético de 2,1 mT e 17,5 mT em festuca alta (*Festuca arundinacea* S.) e azevém perene (*Lolium perenne* L.). Para esse experimento as plantas foram expostas ao campo magnético quatro vezes durante um período de 10 meses. Verificou-se alguns parâmetros relacionados à germinação e desenvolvimento de plântulas e concluiu-se que em festuca alta e em azevém perene o tempo de germinação decresceu em mais de 10 % e a porcentagem de germinação aumentou em até 10 %. Já em relação ao parâmetro de crescimento, a raiz demonstrou um aumento de 107 % quando as sementes foram expostas ao campo magnético por 24 horas, ou de forma contínua (CARBONELL et al., 2008).

Em uma pesquisa com ervilha (*Pisum sativum* L.) foram utilizadas duas intensidades de campos diferentes, 125 e 250 mT. Bons efeitos sobre a ervilha foram registrados, principalmente quando a exposição ao campo magnético, nas duas intensidades, ocorreu de forma contínua. Neste tipo de exposição, foi observado que o crescimento inicial das plântulas foi estimulado. Na exposição contínua a ambos os campos, foi verificado que o comprimento do caule foi aumentado para 99 %, na exposição ao campo de 125 mT, e o aumento de comprimento na exposição ao campo de 250 mT foi de 97 %. Em relação ao comprimento total das plântulas, a exposição ao campo magnético de 125 mT também demonstrou melhores resultados em relação ao campo de 250 mT. Houve um aumento de 67 % no comprimento das plantas expostas a 125 mT, enquanto que nas plantas expostas a 250 mT o aumento foi de 58 %. Esses resultados foram coletados após sete dias de exposição. Após 10 dias, o comprimento total das plântulas expostas a 125 mT foi de 14 %, enquanto que as expostas a 250 mT estavam 13 % maiores que as plantas não expostas ao campo magnético. Após 10 dias, a massa total das plântulas expostas às duas intensidades (125 mT e 250 mT) foram maiores 53 % que a massa total verificada nas plântulas do tratamento controle (CARBONELL et al., 2011).

Em experimentos realizados com tomate (*Solanum lycopersicum* L.) foi verificada uma influência positiva do campo magnético sobre a planta, em relação ao crescimento e desenvolvimento. O tempo médio de germinação nas sementes expostas ao campo magnético reduzido, mas dependendo da intensidade do campo magnético e do tempo de exposição. Dessa forma, nesse parâmetro avaliado, como um indicador de germinação precoce para avaliar o benefício de exposição de sementes ao campo, o tempo médio de germinação foi considerado como aquele necessário para germinar 10% das sementes expostas ao campo. Nesse experimento com sementes de tomate, foi verificado que o tempo necessário de exposição das sementes a um campo de 125 mT foi de 10 minutos. No entanto, independentemente do tempo de exposição, as sementes de tomate expostas a um campo de 250 mT reduziram o tempo médio de germinação de 10 % do total de sementes expostas ao campo magnético. Em relação às plântulas e ao campo magnético de 250 mT, foi verificado um aumento do comprimento das mesmas, quando exposto cronicamente ao campo magnético, ou seja, a planta foi exposta ao campo magnético desde semente à plântula sem interrupção de exposição (MARTÍNEZ et al., 2009).

Já em outro estudo com tomate, foram utilizados campo magnético de 3 mT e 15 mT durante um período de 25 minutos. Os resultados desse experimento mostraram que as sementes expostas ao campo de 3 mT decresceram o tempo médio de germinação dessas sementes em até 62 %, já as sementes expostas ao campo de 15 mT obtiveram uma redução no tempo de germinação em 30 % (FEIZI et al., 2012).

Já em sementes de triticale (x *Triticosecale* W.) os campos magnéticos de 125 mT e 250 mT influenciaram de forma diferente do que aconteceu com as sementes de tomate. Quando expostas a um campo de 125 mT ou de 250 mT, durante 24 horas, a média da taxa de germinação das sementes foi diminuída em 12 %, mas as sementes expostas ao campo magnético que germinaram mais cedo se transformaram em plântulas mais altas (FLÓREZ et al., 2014).

As culturas de soja (*Glycine max* L.), algodão (*Gossypium hirsutum* L.) e trigo (*Triticum aestivum* L.) foram utilizadas para a verificação de um tratamento magnético ótimo. Para tanto foram testados tempos de 13 a 27 minutos de exposição ao campo magnético, com intensidades de 72 a 128 mT, para as três espécies vegetais. Neste experimento foi verificado que o tempo de exposição foi mais importante que a intensidade. A intensidade de campo magnético ótima verificada para as sementes das três plantas foi a de 100 mT, mas o tempo de exposição variou conforme a espécie, sendo o tempo de exposição de 25 minutos ótimo para a soja e o algodão, enquanto que para o trigo foi de 13 minutos. Para esses parâmetros, campo magnético ótimo e

tempo de exposição ao campo ótimo, foram verificados que o rendimento das culturas de soja, algodão e trigo aumentaram 46 % 32 % e 3 %, respectivamente (PHIRKE et al., 1996).

Em um tratamento antes da semeadura, sementes de tomate (*Solanum lycopersicum* L. híbrido Noxana) foram utilizadas em um experimento com um campo eletromagnético de 12,5 mT, com exposição por 10 minutos ou 15 minutos. Após a exposição, foram avaliados alguns parâmetros de crescimento e desenvolvimento como o diâmetro do caule, número de folhas por planta, massa fresca e massa seca, além do número de flores. Tendo em vista isso, foi verificado que todos esses parâmetros foram aumentados após as sementes de tomate passarem por esse tratamento magnético pré-semeadura. Em relação ao diâmetro do caule houve um aumento entre 5 % e 10 %, o número de folhas por planta aumentou entre 37 % e 47 %, a massa fresca foi aumentada em 14 % ou 15 %, a massa seca aumentou 13 % e o número de flores também aumentou entre 3 % e 12 %. Neste experimento foi realizada a verificação do conteúdo de licopeno e da altura das plantas, em relação ao conteúdo de licopeno não foi observada diferença significativa. Em relação à altura das plantas, as que se originaram das sementes expostas ao campo magnético apresentaram altura menor do que as plantas com origem das sementes do tratamento controle (EFTHIMIADOU et al., 2014).

A direção do campo magnético em relação à amostra biológica também é tão importante quanto a intensidade. Em um experimento realizado com milho cultivado em meio com ágar 0,4 % e uma exposição a um campo magnético de 5000 G, a direção do crescimento da raiz e a taxa de crescimento foi modificada. Neste experimento a raiz ficou paralela às linhas de campo magnético, ou as raízes ficaram em posição oposta às linhas de campo. Quando as raízes estavam na mesma direção das linhas de campo a taxa de crescimento foi 27 % maior que nas raízes controle (10 G) e quando as raízes ficaram opostas às linhas de campo, a taxa de crescimento foi 22 % maior que as raízes do tratamento controle. Quando a posição da direção de crescimento da raiz estava perpendicular às linhas do campo magnético, a taxa de crescimento das raízes do milho foi 15 % maior que o crescimento das raízes controle (KATO, 1988).

1.3.4 Calotropis procera

Calotropis procera é uma planta, cuja distribuição está principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do globo terrestre, encontrada na Austrália, Ilhas do Pacífico, Ilhas do Caribe, América Central e América do Sul (PARIHAR et al., 2016). Na Índia ela é encontrada em altitude de até 1.050 metros, sendo comum em terrenos baldios, na beira da estrada e cresce

em culturas também, onde é considerada como planta invasora. É uma espécie arbustiva que pode atingir 5,4 metros de altura e possui como uma de suas características marcantes um látex leitoso em toda a planta (QUAZI et al., 2013)

No Brasil, *C. procera* foi introduzida como planta ornamental, mas logo apresentou características de plantas invasoras em pastagens, sendo encontrada em várias regiões do país, como Nordeste, Sudeste e Centro Oeste. Sua classificação científica é: Reino - Plantae, Ordem - Gentianales, Família - Apocynaceae, Gênero - *Calotropis* e Espécie - *Calotropis procera*. Conforme a região em que se encontra recebe muitas denominações populares: bombardeira, leiteira, pé-de-balão, janaúba e ciúme (KISMANN et al., 1999).

Morfologicamente, *C. procera* apresenta características como: flores com 5 sépalas brancas, 5 pétalas de formato ovoide, brancas na base e roxas na ponta; os frutos são verdes de formato ovoide e esponjoso com aproximadamente 15 cm de comprimento e quando abertos liberam sementes de massa leve e cor marrom, que possuem vários filamentos brancos de aproximadamente 6 cm de comprimento, que facilitam a sua dispersão pelo vento. A raiz, de cor cinza esbranquiçada, possui um diâmetro que varia de 0,5 a 2 cm, com radículas que variam de 0,2 a 0,5 cm de diâmetro, as folhas são simples e com filotaxia oposta cruzada, são folhas subsésseis e coriáceas de aproximadamente 15 cm de comprimento com 6,5 cm de largura possuindo pelos simples e curtos na parte superior próximo ao local de inserção do pecíolo.

Essa planta desenvolve-se satisfatoriamente em regiões áridas e semiáridas, onde ocorrem baixos índices pluviométricos, em solos degradados e, apesar das condições adversas, mantém-se verde durante o ano inteiro. Por ser uma planta que não exige uma grande disponibilidade de água no solo, o cultivo de *C. procera* poderia minimizar o problema de escassez de alimentos nas regiões secas do planeta, como no Nordeste do Brasil, pois possui um alto potencial forrageiro que poderiam contribuir para rebanhos criados nessas regiões (MELO et al, 2001).

Em relação à fitoquímica de *C. procera* foram encontradas diversas substâncias químicas em diferentes partes da planta. Nas folhas e caule são encontradas calotropina e calotropogenina, enquanto nas flores são encontrados multiflavonoides e no látex muitos terpenóides. Na planta também foram encontrados cardenólídeos e proceragenina. Essas substâncias possuem diversas propriedades como proteolíticas, coagulantes, digestivas ou bacteriolíticas, podendo apresentar toxicidade (PERWEZ et al., 2009).

C. procera tem atraído a atenção também em função da descoberta de algumas atividades biológicas que a planta possui, a exemplo de atividades anticâncer, antifúngica e inseticida (AHMED, 2006). Nas flores são encontradas atividades anti-inflamatória, analgésica,

bem como efeitos antimicrobianos e larvicida. No látex é reportado que há atividades analgésica e atividade cicatrizante, bem como atividades anti-inflamatórias e antimicrobiana. Já nas raízes há relatos de atividades antiúlcera e antifertilidade (MEENA, 2011).

O extrato de raízes de *C. procera* foi utilizado em um estudo para avaliar atividade antitumoral. No estudo foram preparados quatro tipos de extratos diferentes: extrato metanólico, extrato hexânico, extrato aquoso e extrato de acetato de etila. Esses extratos foram testados em células cancerígenas Hep2. As mudanças nas células cancerígenas foram observadas por microscopia invertida e citometria de fluxo e as células foram coradas com iodeto de propídeo. As células Hep2 foram tratadas com as seguintes concentrações de extratos 1, 5, 10 e 25 µg/mL. Com exceção do extrato aquoso, todos os extratos testados foram citotóxicos para as células cancerígenas na concentração de 10 µg/mL. As mudanças morfológicas verificadas em Hep2 pelo microscópio foram típicas de apoptose e os resultados da citometria de fluxo demonstraram que as células cancerígenas ficaram aprisionadas na fase S, impedindo a divisão celular e confirmando a citotoxicidade dos extratos (MATHUR et al., 2009).

Um estudo com látex seco processado de *C. procera* com atividade anti-inflamatória foi realizado para verificar o efeito anti-hiperglicêmico e antioxidante. Nesse experimento foram administradas doses orais de látex seco a 100 mg/Kg e 400 mg/Kg em ratos com diabetes induzida por aloxana. As doses orais de látex seco diminuíram o nível de glicose no sangue e aumentaram o glicogênio hepático. Foi verificado também que as doses de látex aumentaram o nível de enzimas antioxidantes como superóxido dismutase, catalase e glutathione. O nível de ácido tiobarbitúrico, indicador de dano de membranas, foi encontrado reduzido nos ratos sob tratamento das doses de látex. Para verificar a eficácia do estudo, os resultados das doses de látex foram comparados aos resultados obtidos com uma droga antidiabética, glibenclamida (SOARES et al., 2005).

Outros estudos apontam para o potencial tóxico do látex de *Calotropis procera*, na defesa da planta contra mamíferos, com relatos de efeitos cardiotoxicos e hepatotoxicos, dependendo da dose ingerida. Estudos realizados em ratos observaram morte de animais quando proteínas do látex foram administradas via intraperitoneal, mas quando a porção de borracha, metabólitos secundários e pequenas moléculas foram excluídos do látex, os animais não foram afetados (RAMOS et al., 2019).

Em outro estudo visando testar o efeito de drogas anti-inflamatórias, foi utilizada uma injeção subcutânea com 0,1 mL de solução aquosa contendo 1 % de látex seco. Essa injeção foi aplicada na superfície plantar das patas do rato e foi verificada uma inflamação significativa na

região de aplicação. Para testar os efeitos anti-inflamatórios foram utilizadas as drogas fenilbutazona, prednisolona, mepiramina e ciproptadina. Todas essas drogas foram eficazes em proporções diferentes contra a inflamação provocada pelo látex (KUMAR et al., 2005).

Segundo a Organização Mundial de Saúde, 80 % dos países em desenvolvimento dependem de ervas medicinais para tratamentos básicos de saúde. Nos anos recentes, o uso tradicional de compostos naturais tem recebido muita atenção, tendo em vista sua eficácia e também por serem considerados seguros para o uso humano. Embora com poucas pesquisas científicas sobre *Calotropis procera*, esta é uma planta popular e muito usada na medicina caseira, bem como por uma variedade de grupos étnicos (QUAZI et al., 2013).

Até o momento a pesquisa com campo magnético de plantas possui informações limitadas. Além disso, as plantas mais utilizadas nos estudos com campo magnético são as culturas de importância agrônômica, sendo as pesquisas mais voltadas para abordagens fisiológicas. Ainda existem poucos relatos de estudos bioquímicos de plantas submetidas ao estresse abiótico causado pela exposição desses organismos ao campo magnético.

2. JUSTIFICATIVA

Apesar da influência do campo magnético sobre os sistemas vivos ser conhecida, poucos estudos têm demonstrado como os sistemas biológicos podem ser afetados e como estes podem responder, por meio de mecanismos bioquímicos, à essa fonte de estresse abiótico. No caso de plantas especificamente, os primeiros estudos sobre o efeito do campo magnético em diferentes espécies vegetais levaram à observação de que o campo magnético afeta o metabolismo (AUDUS 1960; PITTMAN 1977). No entanto, os mecanismos bioquímicos que levam algumas espécies vegetais a resistirem ao estresse gerado pelo campo magnético ainda não são muito bem compreendidos, sendo as informações muito escassas, até mesmo para importantes culturas agrícolas.

Admite-se que ao sofrer um estresse abiótico a planta reconhece o estresse por meio da ruptura da estabilidade osmótica e iônica. Em decorrência do estresse também poderá haver danos às proteínas fundamentais para o funcionamento celular. Dessa forma, ocorre o acionamento de mecanismos de sinalização por moléculas mensageiras e proteínas específicas aos tecidos da planta. Com essa sinalização há a alteração da expressão gênica que leva às mudanças no metabolismo da planta e isso irá constituir a resposta fisiológica.

Dentre a diversidade de espécies vegetais que apresentam mecanismos de adaptação a estresse abiótico, destaca-se uma espécie de Apocynaceae denominada de *Calotropis procera* e encontrada principalmente em espaços geográficos de clima quente e seco. Apesar de não ser uma espécie nativa do Brasil ela adaptou-se muito bem às condições ambientais do Nordeste do país, demonstrando ser tolerante ao estresse hídrico e salino.

O estresse abiótico, como é o caso dos estresses hídrico e salino, bem como estresses ocasionados por extremos de temperatura, alagamentos, radiação solar, pesticidas, metais pesados, dentre outros, podem causar graves perturbações no metabolismo do vegetal, podendo influenciar de maneira significativa o crescimento e desenvolvimento da planta. No entanto, algumas espécies vegetais dispõem de mecanismos de defesa que as possibilitam sobreviverem em condições consideradas limitantes ou inóspitas para muitas das espécies agricultáveis.

Considerando o fato de que *C. procera* é uma espécie considerada resistente a muitos estresses abióticos, esta planta foi selecionada para condução de estudos sobre o efeito do campo magnético gerado artificialmente em laboratório. Pretende-se, com o presente estudo, avaliar o efeito do campo magnético sobre sementes e plântulas de *C. procera*, bem como sobre tecidos desdiferenciados, como é o caso dos calos induzidos a partir de hipocótilos desta espécie vegetal. Para tanto serão empregadas metodologias que permitam avaliar aspectos do

crescimento e desenvolvimento da planta, associados aos aspectos bioquímicos relacionados a possíveis mecanismos de defesa vegetal.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar parâmetros fisiológicos e bioquímicos em sementes, plântulas e calos de *Calotropis procera* quando submetidas à exposição de campo magnético artificial sob diferentes condições experimentais.

3.2 Objetivos específicos

Determinar o campo magnético ótimo através da comparação de diferentes intensidades sobre a germinação de sementes de *Calotropis procera*;

Investigar as atividades de enzimas antioxidantes em sementes plântulas e calos de *C. procera* expostos e não expostos ao campo magnético;

Comparar o conteúdo de substâncias indicadoras de estresse oxidativo em sementes, calos e plântulas de *C. procera* expostos e não expostos ao campo magnético;

Analisar possíveis danos ao DNA das células de sementes e plântulas de *C. procera* expostos e não expostos ao campo magnético;

Realizar o estudo proteômico de sementes germinando nas seguintes condições: sob campo magnético, tratadas com campo magnético pré-semeadura e não expostas a campo magnético.

4 CAPÍTULO I: CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE SEMENTES QUIESCENTES DE *CALOTROPIS PROCERA* APÓS EXPOSIÇÃO A CAMPO MAGNÉTICO ESTÁTICO

4.1 INTRODUÇÃO

Para melhorar o rendimento da produção de uma determinada cultura de planta, muitos agricultores de grandes culturas têm recorrido às várias estratégias e tecnologias que possam incrementar a germinação de sementes. No entanto, o estabelecimento adequado de uma planta e o uso de sementes de alto vigor e de altas taxas de germinação é imprescindível para o sucesso da cultura, além da necessidade de condições climáticas adequadas e nutrição do solo.

O vigor de sementes é uma característica que expressa a viabilidade germinativa. As perdas são normalmente devido às más condições de armazenamento das sementes, causando deterioração de suas reservas energéticas, que pode resultar em perdas materiais de sementes e com isso sérios prejuízos econômicos (DUCATTI et al., 2022).

As técnicas chamadas de convencionais incluem o uso de substâncias químicas como os hormônios reguladores de crescimento. O rendimento das culturas de um modo geral e a homogeneidade do plantio são aumentados com a aplicação dessas substâncias químicas, que são aplicadas nas sementes antes do cultivo. Apesar de ser uma técnica que demonstra efetividade quanto ao desenvolvimento do plantio, é uma técnica considerada invasiva e prejudicial ao meio ambiente, tornando-se ecologicamente incorreta gerando-se assim uma adversidade para a aplicação dessas substâncias químicas de forma contínua (SARRAF et al., 2020).

Tais contestações têm provocado a busca por tratamentos alternativos de sementes, de modo a não agredirem o meio ambiente, bem como uma alternativa para a redução de custos com esses produtos químicos. O tratamento das sementes com métodos biofísicos, tais como raios gama, laser, feixe de elétrons, micro-ondas, campo magnético, energias de rádio frequência que visam a busca da bioestimulação das sementes traz benefícios importantes para o meio ambiente tendo em vista que diminui a quantidade de produtos tóxicos nas plantas, ou em produtos derivados dessas plantas, o que proporciona uma melhoria na segurança alimentar para os seres humanos e animais (CHEN et al., 2016).

No entanto, as plantas respondem ao campo magnético de diferentes formas e atualmente existem evidências que o tratamento magnético de sementes de plantas, antes da germinação, diminui os custos com o cultivo, pois melhora a taxa de germinação, bem como estimula o melhor desenvolvimento da planta (KATARIA et al., 2015). No entanto, deve-se observar que o campo magnético pode também gerar efeitos negativos à germinação e ao desenvolvimento da planta também, provocando uma inibição na germinação e desenvolvimento em vez de melhorá-los (SILVA et al., 2016).

Em um estudo de pré-tratamento de sementes de rabanete (*Raphanus sativus*) com campo magnético antes da semeadura, Konefał-Janocha et al., (2019) testaram duas intensidades de campo magnético, 8 mT e 20 mT, Após medição dos parâmetros de germinação e de crescimento, os resultados demonstraram que tanto o campo de 8 mT, como o de 20 mT aumentaram da taxa de germinação das sementes, índice de vigor da semente, índice de taxa de germinação e resultaram em maior comprimento das plântulas originadas de sementes expostas ao campo magnético em comparação com seus respectivos controles.

Bhardwaj et al., (2012) realizaram experimentos com sementes de pepino pré-tratadas em campo magnético e observaram mudanças em relação aos parâmetros de germinação estudados, bem como na atividade de enzimas antioxidantes e no acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS). Houve aumento da porcentagem de germinação, da taxa de germinação, do conteúdo de peróxido de hidrogênio e aumento da atividade das enzimas catalase, superóxido dismutase e glutatona redutase nas sementes pré-tratadas em campo magnético, em comparação com as sementes do tratamento controle.

Em relação às mudanças metabólicas em plantas expostas ao campo magnético, algumas alterações foram observadas na atividade de enzimas como catalase, polifenol oxidase e superóxido dismutase em células de plantas. Foi deduzido então que a exposição ao campo magnético reduz o dano oxidativo, além de aumentar a atividade de radicais livres nas plantas. No entanto, diferentemente dos efeitos positivos encontrados em alguns estudos em relação ao estresse oxidativo e à exposição de planta ao campo magnético, outros estudos relatam efeitos extremamente negativos. Dentre os efeitos negativos incluem-se inibição de crescimento celular, aumento do conteúdo de lignina e suberina sobre a parede celular, aumento da concentração de radicais livres, redução da germinação e do crescimento de partes das plantas (SAHEBJAMEI et al., 2007).

O campo magnético é um elemento natural do meio ambiente, mas pode ser considerado um estresse abiótico dependendo de sua intensidade e tempo de exposição. Por outro lado, são poucas as informações metabólicas a respeito desses estímulos nas sementes. Nesta seção da pesquisa foi avaliada a influência de campo magnético sobre a germinação de sementes de *Calotropis procera* pré-tratadas. Foram avaliadas respostas bioquímicas associadas ao estresse oxidativo e os possíveis danos que podem ser provocados com o aumento de ROS.

4.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.2.1 Sementes de *Calotropis procera*

Para o experimento, as sementes de *Calotropis procera* foram coletadas de plantas crescidas na área interna da Universidade Federal do Ceará - UFC, no campus do Pici, situado na cidade de Fortaleza com as seguintes coordenadas geográficas 3°75'29'' ao Sul e 38°57'38'' a Oeste. Após a coleta dos frutos, as sementes foram retiradas manualmente, limpas, e examinadas quanto à integridade, por meio de análise em lupa. As sementes foram selecionadas para compor dois tratamentos. O primeiro representando a exposição ao campo magnético, o segundo, sem exposição, representando o controle.

4.2.2 Tratamento das sementes em campo magnético

O campo magnético para o tratamento das sementes foi gerado por uma bobina de Helmholtz com as seguintes características geométricas em cada anel da bobina: 28 cm de diâmetro interno e 33 cm de diâmetro externo. Os anéis da bobina estavam a uma distância interna de 17,9 cm entre si. As sementes selecionadas para serem do grupo tratado com campo magnético foram colocadas em uma placa de Petri de 19,5 cm de diâmetro, em uma disposição de mesmo sentido do campo magnético.

4.2.3 Germinação das sementes

Após tratamento ou não com campo magnético, as sementes passaram por processo de desinfecção com hipoclorito de sódio e água destilada estéril, realizado em uma câmara de fluxo laminar. Primeiro as sementes ficaram imersas em hipoclorito de sódio (1% de cloro ativo) por 3 minutos, em seguida foram submetidas a 5 ciclos de lavagem com água destilada estéril, com duração de 2 minutos cada ciclo. Após esse procedimento, as sementes foram embebidas em água destilada estéril por 20 minutos, à temperatura ambiente (23 ± 2 °C). A semeadura foi realizada em papel filtro tipo Germitest previamente autoclavado (121 °C, 1.5×10^5 Pa, 30 min) embebido com água destilada estéril e colocado em placas de Petri, mantidas próximos a 100% de umidade para favorecer a germinação. As placas de Petri foram colocadas no interior da Bobina de Helmholtz em sala de cultivo com fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de

escuro, por 5 dias, enquanto as placas contendo as sementes do tratamento controle foram mantidas nas mesmas condições, mas fora da bobina.

4.2.4 Teste da melhor intensidade do campo magnético

A melhor intensidade do campo magnético a ser aplicada na pesquisa foi selecionada de acordo com a classificação de Galland e Pazur (2005), para isso foi realizado uma análise de parâmetros de germinação com diferentes intensidades. Por meio de um teste preliminar foram utilizadas intensidades que se classificavam como campo magnético fraco e campo magnético forte: 0,5 mT, 1 mT e 2 mT.

4.2.5 Massa seca e massa fresca

Após a exposição ao campo magnético, as sementes do grupo controle e do grupo pré-tratado foram pesadas em balança analítica para determinação da massa fresca. Após isso as sementes foram congeladas e liofilizadas para extrair o conteúdo de água e para a determinação da massa seca como descrito por Souza et al., (2017).

4.2.6 Parâmetros de germinação

A porcentagem de germinação foi calculada após 5 dias de semeadura e seguiu o cálculo: $PG=100 \times n/N$. Onde PG é a porcentagem de germinação, n é o número de sementes germinadas e N é o número total de sementes colocadas para germinar.

A taxa de germinação foi calculada mediante a fórmula: $TG=100 \times \sum n_i / \sum D_i N_i$. Onde TG é a taxa de germinação; n_i é o número de sementes germinadas por dia; D_i é o número de dias após o início da germinação; e N_i é o número total de sementes colocadas para germinar a cada repetição. (FLÓREZ et al., 2007; SOLTANI et al., 2006). Foram consideradas como germinadas as sementes que haviam emitido a radícula.

4.2.7 Extrato enzimático

As sementes tratadas e não tratadas em campo magnético foram maceradas durante 10 minutos sob banho de gelo, na presença de tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,0), contendo NaCl 0,15 M, PEG (Polietilenoglicol) 3 % (v/v), PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride) 1 mM,

EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) 2 mM e PVPP (polivinil-polipirrolidona) 1% (m/v), na proporção 1:4 (m/v). Após maceração, o homogeneizado foi centrifugado (13.000 x g, 4 °C, 20 min), o sobrenadante coletado e dialisado exaustivamente contra tampão de extração durante 24 horas, a 4 °C, com um volume do tampão correspondendo a 20 vezes o volume do extrato recuperado após a centrifugação, sendo 4 trocas do tampão realizadas nesse período.

4.2.8 Dosagem de proteínas solúveis totais

A dosagem de proteínas solúveis totais foi determinada segundo a metodologia descrita por Bradford, (1976). A uma alíquota de 0,1 mL do extrato dialisado, 2,5 mL do reagente de Bradford foram adicionados. A mistura passou por agitação em vórtex e foi deixada em repouso por 10 minutos. Após repouso, as leituras de absorvância a 595 nm foram registradas em espectrofotômetro (Novaspec III da Pharmacia). Através de uma curva pré-estabelecida com valores de concentrações conhecidas de albumina sérica bovina (BSA), a quantidade de proteína solúvel na amostra foi determinada. Os valores foram obtidos em triplicata e expressos em miligramas de proteína por mililitro (mgP/mL).

4.2.9 Determinação da atividade da catalase (CAT)

A metodologia empregada para mensurar a atividade da CAT foi descrita por Havir e Mchale (1987) e Peixoto et al. (1999). Em uma alíquota de 0,8mL da solução tampão fosfato de potássio 75 mM (pH 7,0) 0,1 mL do extrato dialisado foi adicionado, sendo essa mistura reacional deixada em banho-maria a 30 °C durante 10 minutos. Após isso, adicionou-se 0,1 mL de peróxido de hidrogênio 112,5 mM à mistura reacional e a atividade da enzima foi medida a 240 nm com base no decréscimo da absorvância em intervalos de 20 segundos até atingir 2 minutos. A unidade de atividade (UA) foi estabelecida como a variação da absorvância por minuto e expressa em unidade de atividade por miligrama de proteína (UA/mgP).

4.2.10 Determinação da atividade da ascorbato peroxidase (APX)

A atividade de APX seguiu a metodologia descrita por PEIXOTO et. al., (1999). Inicialmente, 0,1 mL de extrato dialisado foi adicionado a 0,8 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,0) contendo ascorbato 0,5 mM, e essa mistura deixada em banho-maria a 30 °C por 10 minutos. A atividade de APX se iniciou após a adição de H₂O₂ 2 mM. A leitura foi

realizada em espectrofotômetro a 290 nm, em intervalos de 30 segundos, até atingir 3,5 minutos. A unidade de atividade (UA) foi estabelecida como a variação da absorbância por minuto e expressa em unidade de atividade por miligrama de proteína (UA/mgP).

4.2.11 Determinação da atividade da peroxidase de fenóis (POX)

A metodologia utilizada foi a descrita por Urbanek et al., (1991). Os substratos utilizados foram guaiacol e peróxido de hidrogênio, sendo o produto da reação (3,3'-dimetoxi-4,4'-bifenolquinona), quantificado. Na determinação da atividade, alíquota de 0,8 mL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,2, foi adicionada 0,5 mL de peróxido de hidrogênio 60 mM e 0,5 mL de guaiacol 20 mM. Essa mistura reacional foi deixada em banho-maria a 30 °C durante 10 minutos. A reação foi iniciada com a adição de 0,2 mL do extrato enzimático dialisado e a formação do composto colorido mensurada a cada 20 segundos, até atingir 2 minutos, em 480 nm em espectrofotômetro (Novaspec III da Pharmacia). A unidade de atividade (UA) foi estabelecida como a variação da absorbância por minuto e expressa em unidade de atividade por miligrama de proteína (UA/mgP).

4.2.12 Determinação do teor de peróxido de hidrogênio

O peróxido de hidrogênio foi extraído e quantificado, conforme a metodologia de Gay et al., (1999). Para extração do peróxido de hidrogênio, sementes de *Calotropis procera* após o tratamento foram maceradas na presença de tampão bórax-borato 50 mM (pH 8,4) na proporção 1:5 (m/v). O homogeneizado foi centrifugado (12.000 x g, 4 °C, 20 min) e o sobrenadante coletado. No ensaio, 0,2 mL do sobrenadante foi adicionado a 1 mL da solução alaranjado de xilenol e essa mistura incubada por 30 minutos à temperatura ambiente, na ausência de luz, sendo a absorbância medida a 560 nm. A solução de alaranjado de xilenol foi obtida através da adição de 0,1 mL de solução A com 10 mL da solução B. A solução A foi constituída de sulfato de ferro 25 mM, sulfato de amônio 25 mM, ácido sulfúrico 2,5 M em 10 mL de água ultrapura estéril. A solução B foi composta de alaranjado de xilenol 125 µM, sorbitol 100 mM em 100 mL de água ultrapura estéril. Para o cálculo da concentração de peróxido de hidrogênio uma curva padrão com concentrações conhecidas de peróxido de hidrogênio (0,5 nmol - 4 nmol) foi construída. O teor de peróxido de hidrogênio foi expresso em nmol de H₂O₂ por g de massa fresca (nmol H₂O₂/gMF).

4.2.13 Análise de peroxidação lipídica

Para analisar a peroxidação lipídica, foi aplicada a metodologia de Heath e Packer (1968), que mede o teor de ácido tiobarbitúrico. Uma massa de 200 mg da amostra biológica foi macerada na presença nitrogênio líquido e homogeneizadas em 1 mL de TCA 5% (m/v). Posteriormente o extrato foi centrifugado (12.000 x g, 15 min, 4°C). Em seguida, 500 µL do sobrenadante foram adicionados a 500 µL de uma solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5% (m/v), em TCA 20% (m/v). A reação foi conduzida em banho-maria (95 °C por 1 hora), e interrompida em banho de gelo. Após 30 minutos, foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 532 e 660 nm (formação do complexo MDA-TBA). O conteúdo de peroxidação de lipídeos foi determinado após a subtração entre leituras de absorbância em 532 nm e 600 nm e utilizou-se o coeficiente de extinção molar do malondialdeído (MDA), $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, e o resultado expresso em nmolMDA g⁻¹MF.

4.2.14 Extração e quantificação do DNA genômico

O DNA genômico foi extraído utilizando a metodologia de Doyle e Doyle, (1987). Para isso 0,1 g de sementes foram maceradas na presença de nitrogênio líquido e acrescentado 500 µL de tampão CTAB (Tris-HCl 100 m, pH 8.0; EDTA 20 mM; NaCl 1.4 M; e CTAB 2% p/v) e foi adicionado 0,2% (v/v) de 2-β-mercaptoethanol. A mistura reacional foi incubada por 1 hora e adicionado 500 µL de uma solução de clorofórmio e álcool isoamílico na proporção de 24:1 (v/v). O homogeneizado foi centrifugado (13.000 rpm, 10 min) e a fase aquosa foi transferida para tubos contendo 600 µL de isopropanol e incubada a - 20 °C overnight. Após isso, a mistura foi centrifugada (13.000 rpm, 10 min), o sobrenadante descartado e precipitado foi lavado com álcool 70% e centrifugado (10.000 rpm, 10 min). O precipitado foi ressuspensão com água ultrapura estéril contendo 2 µL de RNase (1.0 mg/mL). O DNA das amostras foi quantificado em NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, MA, USA) a 260 nm e a concentração expressa em (ng/µL).

4.2.15 Ensaio TUNEL fluorométrico

No ensaio do TUNEL fluorométrico, após o tratamento com o campo magnético, sessões transversais de sementes de *Calotropis procera* foram fixadas em lâminas de acordo

com as recomendações do fabricante. Para a visualização dos danos de DNA nas células do tecido, foi incorporado fluoroceína 12-dUTP e seções de tecido vegetal foram coradas com iodeto de propídeo. Foi utilizada a emissão de 520 nm para a visualização de todas as células e a emissão de 647 nm para a detecção do iodeto de propídeo. As imagens fluorescentes foram obtidas utilizando o software Carl Zeiss Laser Scanning Microscope (LSM 710, 20× objective, Carl Zeiss, Jena, Germany, Brazil).

4.2.16 Contagem de células

A contagem das células nas seções dos tecidos das sementes foi baseada na metodologia de Klays et al., (2003) com o uso do software Carl Zeiss Laser Scanning Microscope (LSM 710, 20× objective, Carl Zeiss, Jena, Germany, Brazil) utilizado no microscópio confocal. Para o resultado foi calculada a densidade celular que foi expressa em nº de células/ mm².

4.2.17 Análise estatística

Os experimentos realizados foram completamente randomizados, e realizados em 3 replicatas independentes. Na pesquisa foram analisadas 540 sementes, sendo 270 do grupo tratado com o campo magnético e 270 do grupo não tratado com o campo magnético. Em cada replicata foram utilizadas 90 sementes para o grupo tratado com o campo magnético e 90 do grupo não tratado com o campo magnético. As médias obtidas do grupo tratado com campo magnético foram comparadas com as médias do grupo não tratado. Os dados foram analisados pelo software GraphPad Prism. 5 através do teste t de Student.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Parâmetros de germinação e características das sementes

O efeito do campo magnético, como relatado na revisão de literatura neste trabalho, é dependente da espécie vegetal, da intensidade do campo e do tempo de exposição da planta ao campo. Para análise do tempo de exposição das sementes ao campo, foi realizado um teste simples de germinação, para verificar o tempo de germinação das sementes de *C. procera*. Após esse teste simples de germinação foi observado que a semente de *C. procera* iniciava a germinação no 4º dia após sementeira e tinha um pico de germinação no 6º dia após sementeira. Dessa forma foi definido que o tempo de exposição das sementes de *C. procera* ao campo seria de 5 dias, para observar se haveria efeitos positivos, ou negativos na semente após o tratamento, quanto a germinação.

Para análise do efeito do campo magnético foi necessário realizar uma prospecção da intensidade ótima nas sementes de *C. procera* expostas ao campo magnético. As sementes foram expostas a diferentes intensidades: 0,5 mT, 1,0 mT e 2 mT, antes da sementeira e foram comparadas com as sementes não expostas ao campo (Figura 4).

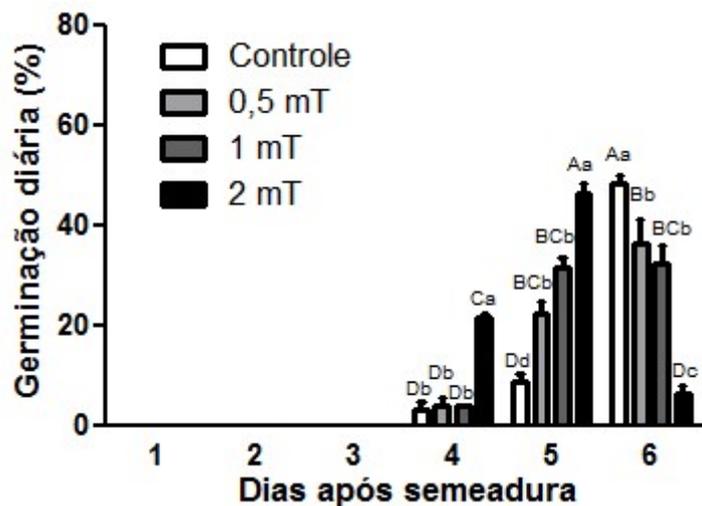


Figura 4. Porcentagem de germinação diária das sementes de *C. procera* expostas ao campo magnético antes da sementeira. Barras brancas representam as sementes do grupo controle, não expostas ao campo magnético; barras cinzas claras representam sementes expostas a um campo de 0,5 mT; barras cinzas escuras representam sementes expostas a um campo de 1 mT; e as barras pretas representam sementes expostas a um campo magnético de 2 mT. Letras minúsculas representam diferenças significativas dentro de um mesmo dia; e letras maiúsculas representam diferenças significativas em todos entre todos os dias.

Durante os 3 primeiros dias após a semeadura, não houve germinação de sementes em nenhum grupo, mas a partir do 4º dia após a semeadura as sementes começaram a germinar em todos os grupos, sendo que o único grupo que apresentou diferença significativa da porcentagem de sementes germinadas neste dia foi o das sementes expostas a 2 mT antes da semeadura com 21,33 % de sementes germinadas do total de sementes. As sementes do grupo controle germinaram 3 %, as do grupo 0,5 mT germinaram 3,66 % e as do grupo 1 mT germinaram 3,66 %, e não apresentaram diferenças significativas entre as médias. No 5º dia após a semeadura foram germinadas do grupo controle 8 % do total de sementes, no grupo 0,5 mT germinaram 22,33 %, no grupo 1 mT germinaram 31,33 % e no grupo 2 mT, 46,33 % das sementes foram germinadas, não foram registradas diferenças significativas entre os grupos 0,5 mT e 1 mT, embora as médias tenham sido diferentes. Já no 6º dia após a semeadura foram germinadas no grupo controle 48,33 % de sementes, 36,33 % no grupo 0,5 mT, 32,33 % no grupo 1 mT e 6,33 % no grupo 2 mT e neste dia também não houve diferença significativa entre os grupos 0,5 mT e 1 mT.

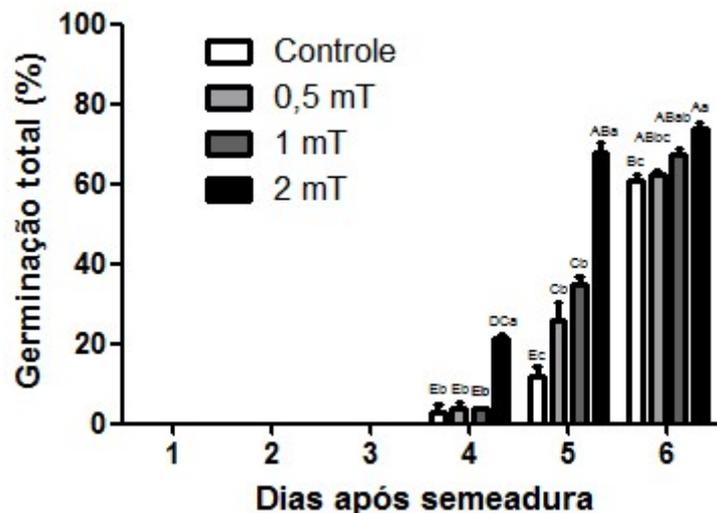


Figura 5. Porcentagem de germinação total por dia das sementes de *C. procerca* expostas a campo magnético antes da semeadura. Barras brancas representam as sementes do grupo controle, não expostas ao campo magnético; barras cinzas claras representam sementes expostas a um campo de 0,5 mT; barras cinzas escuras representam sementes expostas a um campo de 1 mT; e as barras pretas representam sementes expostas a um campo magnético de 2 mT. Letras minúsculas representam diferenças significativas dentro de um mesmo dia; e letras maiúsculas representam diferenças significativas em todos entre todos os dias.

Em relação à porcentagem total das sementes germinadas (Figura 5), até o 4º dia após a semeadura o resultado é o mesmo da germinação diária das sementes. No 5º dia após a semeadura o total de sementes germinadas no grupo controle foi de 11,66 %, no grupo 0,5 mT

o total de sementes germinadas foi de 26 %, no grupo 1 mT o total foi de 35 % e no grupo das sementes expostas a 2 mT o total de sementes germinadas foi de 67,66 %. Neste dia mantiveram-se as diferenças significativas encontradas na porcentagem de germinação diária de sementes, ou seja, não houve diferença significativa entre os grupos 0,5 mT e 1 mT. No 6º dia após a semeadura o total de sementes germinadas no grupo controle foi de 60,66 %, no grupo de 0,5 mT foi de 62,33 %, no grupo de 1 mT foi de 67,33% e no grupo de 2 mT foi de 74 %, não foi verificada diferenças significativas entre os grupos controle, 0,5 mT e 1 mT no 6º dia após semeadura, apenas o grupo de 2 mT em relação ao controle.

Na prospecção da melhor intensidade de campo foi verificado que as sementes de *C. procer*, quando expostas ao campo magnético de 2 mT por 5 dias antes da semeadura, anteciparam o pico de germinação para o 5º dia após a semeadura em relação ao pico de germinação das sementes controles. Dessa forma, para os outros parâmetros de germinação analisados neste trabalho, foi considerado o período de até 5 dias após a semeadura. Além disso, como a intensidade de 2 mT apresentou melhor porcentagem de germinação diária e melhor porcentagem de germinação total, esta intensidade de campo magnético foi selecionada como a melhor para essa espécie e a continuidade dos trabalhos nesta pesquisa foi desenvolvida com o campo magnético de 2 mT. Silva et al., (2016) também desenhou um modelo experimental para o desenvolvimento de pesquisas com campo magnético e uma espécie de planta não testada, os resultados encontrados aqui com essa prospecção seguiu a previsão do seu modelo experimental, com o campo de maior intensidade demonstrando melhores resultados.

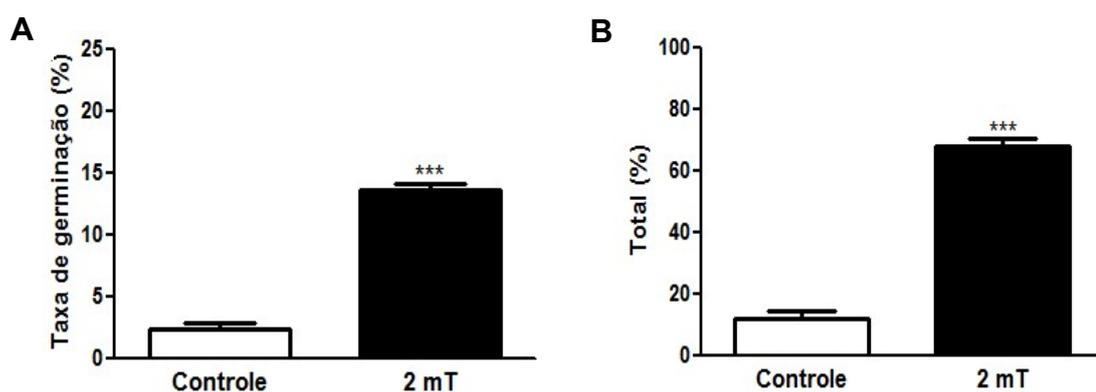


Figura 6. A -Taxa de germinação e B - Porcentagem de germinação total de sementes de *C. procer* expostas ao campo magnético antes da semeadura. Barras brancas representam o grupo controle, sementes não expostas ao campo magnético e barras pretas representam as sementes expostas a um campo magnético de 2 mT. Asteriscos representam diferença significativa entre os grupos como se segue: * para $p < 0,05$; ** para $p < 0,01$; e *** para $p < 0,001$

No período de 5 dias após a semeadura, a taxa de germinação das sementes de *C. procera* foi analisada (Figura 6A). Nesse parâmetro foi verificada diferença significativa entre as médias da taxa de germinação das sementes não expostas ao campo magnético que foi de 2,33 %, enquanto a taxa de germinação das sementes pré-tratadas com campo magnético foi de 13,33 %. A porcentagem de sementes germinadas também foi avaliada no 5º dia após semeadura e foi verificada uma diferença significativa entre o grupo controle e o grupo 2 mT. No grupo das sementes controles foi registrado 11,67 % de sementes germinadas, já no grupo das sementes tratadas com campo magnético foi registrado 67,67 % de sementes germinadas (Figura 6B).

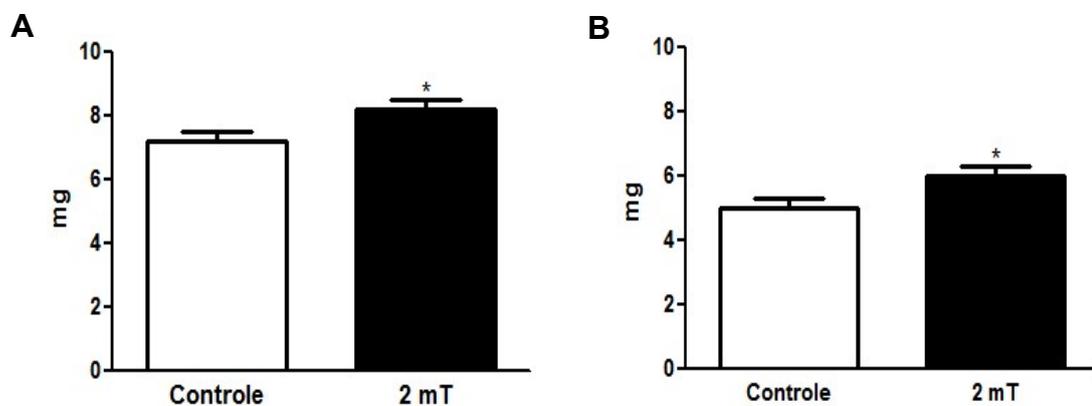


Figura 7. A - Massa fresca e B - Massa seca de sementes de *C. procera* expostas ao campo magnético antes da semeadura. Barras brancas representam as sementes do grupo controle, não expostas ao campo magnético e barras pretas representam sementes expostas a um campo magnético de 2 mT. Asteriscos representam diferença significativa entre os grupos como se segue: * para $p < 0,05$; ** para $p < 0,01$; e *** para $p < 0,001$.

Em relação às características das sementes, parâmetros sobre a massa fresca e massa seca foram avaliados. Para isso, sementes quiescentes de *C. procera* foram analisadas após a exposição ao campo magnético pré-semeadura. Foi registrado no grupo controle uma massa fresca das sementes de 7,17 mg, enquanto no grupo das sementes tratadas com o campo foi registrada uma massa fresca de 8,20 mg (Figura 7A), em relação à massa seca, para as sementes do tratamento controle foi registrada uma massa de 5,00 mg, e nas sementes expostas ao campo magnético a massa seca foi de 6,00 mg (Figura 7B).

A taxa de germinação, a porcentagem de germinação, a massa fresca e a massa seca verificadas 5 dias após semeadura demonstraram, portanto, aumento significativo entre o grupo de sementes controles e o grupo de sementes expostas a 2 mT de campo favorecendo o aumento dos parâmetros do grupo das sementes expostas ao campo magnético. Resultados similares também foram encontrados em sementes de maracujá (*Passiflora edulis*) tratadas com campo

magnético pré-semeadura, onde foram verificadas que a exposição de sementes de maracujá de forma isolada estimula a germinação das sementes, a emergência da radícula, bem como melhora índices de vigor das sementes (MENEGATTI et al., 2019).

Os resultados encontrados a partir dos experimentos realizados com *C. procera* também são corroborados pelos resultados encontrados em sementes de tomate, quando expostas a um campo magnético de 12,5 mT, como tratamento pré-semeadura. Após o tratamento, as sementes foram semeadas e deram origem às plântulas com parâmetros mais desenvolvidos, como altura da plântula, massa fresca e massa seca da plântula, diâmetro do caule em relação ao controle. Além disso, essas plântulas originadas de sementes pré-tratadas em campo magnético aumentaram o conteúdo de licopeno em comparação com o controle (EFTHIMIADOU et al., 2014).

4.3.2 Análises bioquímicas

As sementes expostas ao campo magnético de 2 mT antes da semeadura demonstraram que houve influência do campo magnético quanto aos parâmetros de germinação e características das sementes de *C. procera*. Assim tornou-se necessária uma análise do metabolismo das sementes para um melhor entendimento da influência do campo magnético em relação às mudanças nesses parâmetros de germinação.

As espécies reativas de oxigênio estão envolvidas no controle de vários processos biológicos da planta. Entre tais processos estão o controle do processo de crescimento e desenvolvimento da planta (CHENN et al., 2020). Para isso foi investigada atividade das enzimas antioxidantes CAT, POX e APX, bem como foi analisado o conteúdo de peróxido de hidrogênio.

No entanto, as ROS não estão envolvidas apenas no controle de crescimento e desenvolvimento da planta. Esses compostos podem ser tóxicos para a planta, à medida que sua superprodução pode causar danos a outras moléculas importantes para a célula como lipídeos de membrana e DNA (MITTLER, 2018). Dessa forma, nesta pesquisa foi avaliado também o conteúdo de malondialdeído, composto ligado a peroxidação lipídica, para verificação de danos de membrana. Foi verificada também a integridade do DNA por meio do teste fluorométrico TUNEL, onde um dinucleotídeo com fluorosceína é ligado à extremidade degradada de DNA.

Em relação à atividade de peroxidase de fenóis, as sementes expostas ao campo magnético de 2 mT antes da semeadura apresentaram um aumento de 33,31 % quando comparado com as sementes não expostas ao campo (Figura 8A). A atividade da catalase não

demonstrou diferença significativa entre as sementes do grupo tratado com o campo magnético e sementes controle (Figura 8B). Já a atividade da ascorbato peroxidase foi registrada menor no grupo das sementes pré-tratadas com o campo magnético de 2 mT, onde houve uma diminuição de 77,80 % em comparação com o grupo das sementes do tratamento controle (Figura 8C).

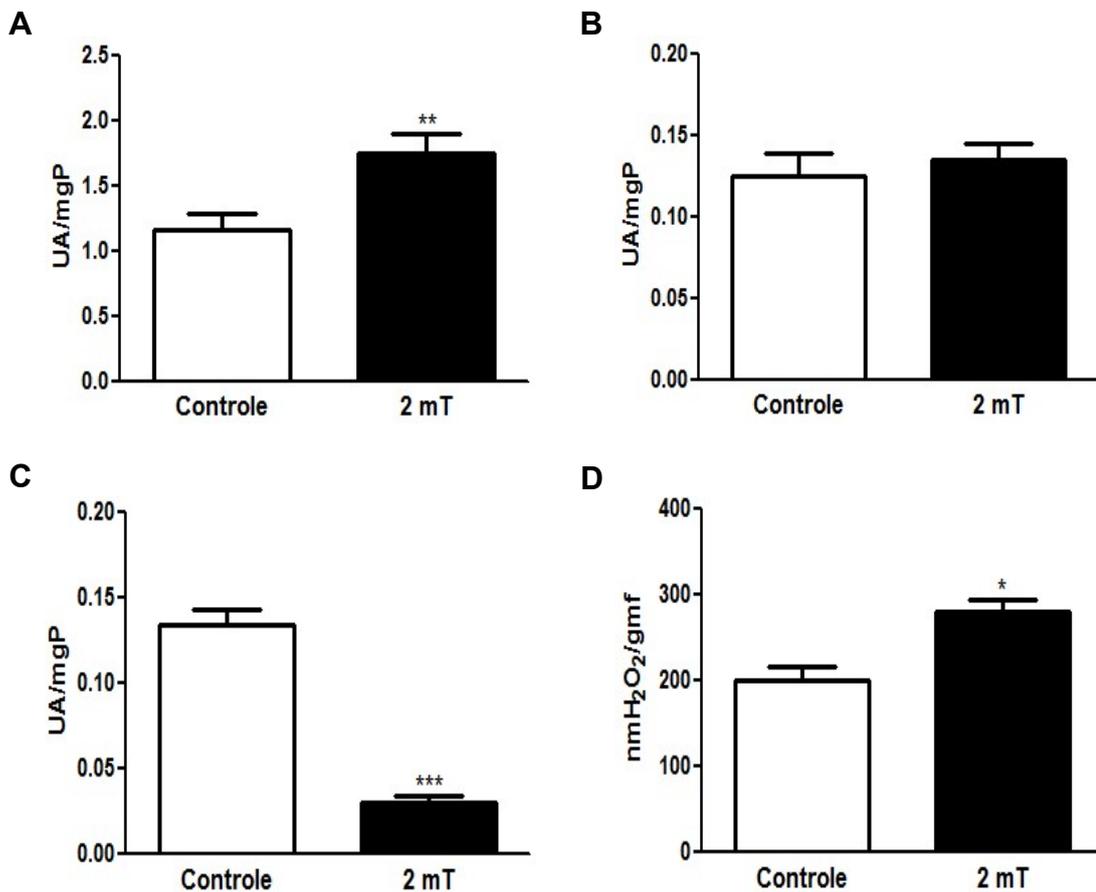


Figura 8. Atividade de enzimas antioxidantes e ROS. **A-** Atividade da peroxidase de fenóis (POX); **B -** Atividade da catalase (CAT); **C-** Atividade da ascorbato peroxidase (APX); e **D -** conteúdo de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Todos os ensaios foram realizados com extratos de sementes de *C. procera* expostas a campo magnético antes da semeadura. Barras brancas representam as sementes do grupo controle, não expostas ao campo magnético e barras pretas representam sementes expostas a um campo magnético de 2 mT. Asteriscos representam diferença significativa entre os grupos como se segue: * para $p < 0,05$; ** para $p < 0,01$; e *** para $p < 0,001$.

Em relação ao conteúdo de peróxido de hidrogênio, as sementes de *C. procera* expostas ao campo de 2 mT apresentaram um conteúdo de peróxido de hidrogênio 28,29 % maior que as sementes pertencentes ao tratamento controle (Figura 8D).

As enzimas antioxidantes POX, CAT e APX estão envolvidas na remoção do peróxido de hidrogênio, evitando a sua toxicidade para a célula (ASADA, 1992). A maior atividade da POX associada com a baixa atividade da APX e um maior conteúdo de peróxido de hidrogênio

encontrado nas sementes expostas ao campo magnético em comparação com as sementes não expostas, são evidências de que as sementes submetidas ao campo magnético estariam passando por um processo de estresse oxidativo.

Um desequilíbrio na atividade de da POX, CAT e APX em associação com o maior conteúdo de peróxido de hidrogênio também foi encontrado em plantas de feijão-caupi infectadas com CPSMV. Nessa pesquisa, 2 genótipos de feijão-caupi suscetíveis ao CPSMV e 2 genótipos resistentes ao CPSMV foram avaliados quanto a enzimas ligadas ao estresse oxidativo, foi encontrado uma alta atividade da POX, uma baixa atividade da APX e um conteúdo maior de peróxido de hidrogênio nos genótipos resistentes ao CPSMV indicando a ocorrência de um estresse oxidativo (BEZERRA, 2016).

Após análise do estresse oxidativo, foi analisado o conteúdo de malondialdeído, uma substância derivada da peroxidação dos lipídios que fazem parte das membranas da célula e que é usada como indicador de dano de membrana, em consequência de estresse oxidativo (DAVEY et al., 2005).

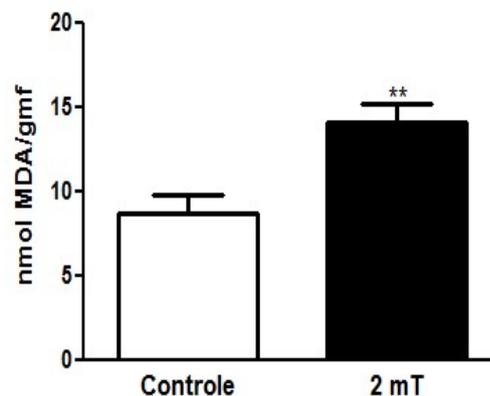


Figura 9. Ensaio de peroxidação lipídica. Barra branca representa as sementes de *Calotropis procera* do grupo controle, não expostas ao campo magnético e barra preta representa as sementes expostas a um campo magnético de 2 mT. Asteriscos representam diferença significativa entre os grupos como se segue: * para $p < 0,05$; ** para $p < 0,01$; e *** para $p < 0,001$.

Nas sementes expostas ao campo magnético foi encontrado um aumento de 38,11 % do conteúdo de malondialdeído em relação às sementes não expostas ao campo magnético (Figura 9). Em adição à análise da peroxidação lipídica, foi avaliado também um possível dano ao DNA, tendo em vista ocorrência de estresse oxidativo.

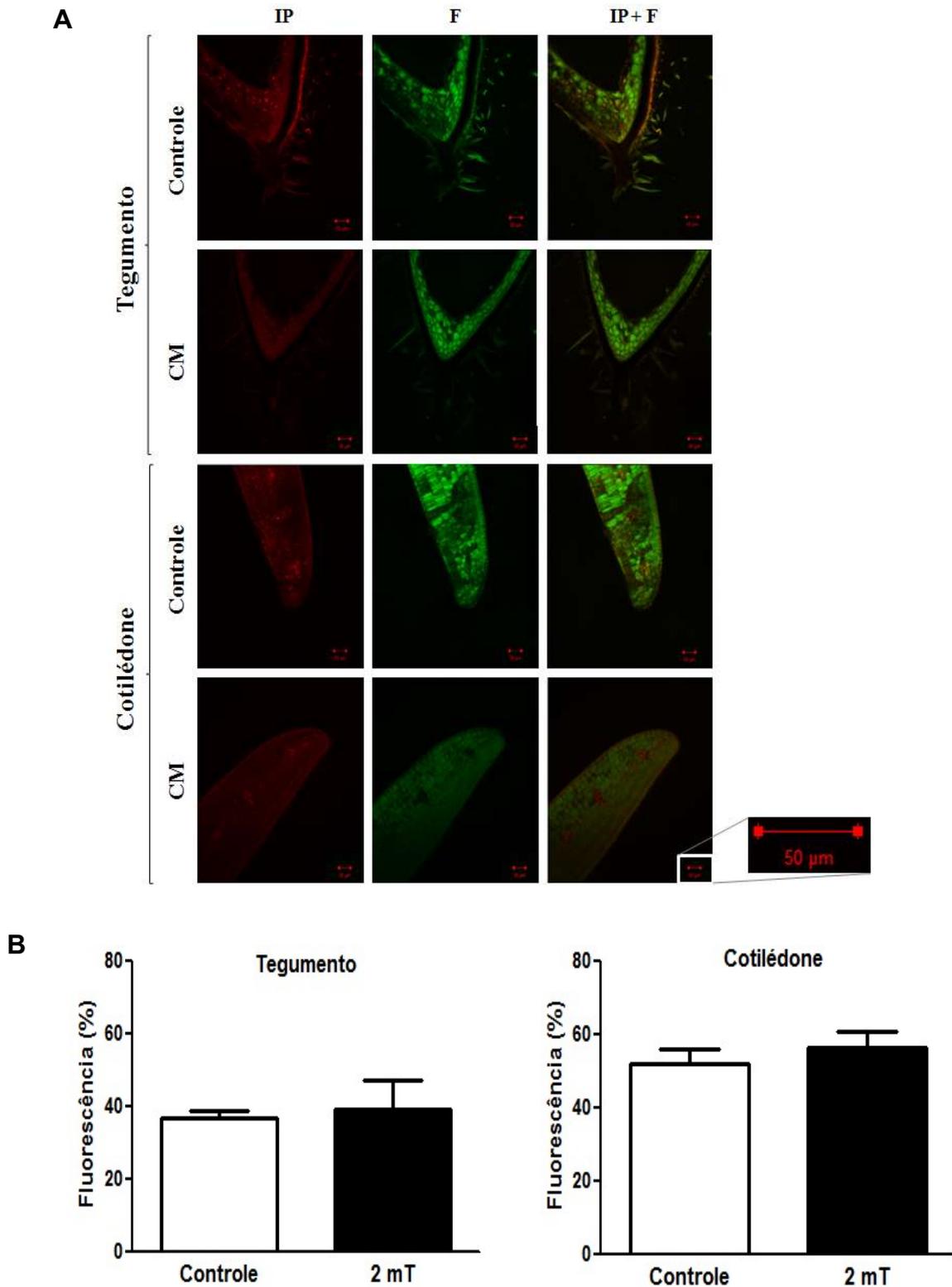


Figura 10. Verificação de integridade de DNA. **A** - Ensaio TUNEL fluorométrico em sementes de *C. procera* não expostas (controle) e expostas ao campo magnético. CM - campo magnético, IP - Iodeto de propídeo, F - Fluoresceína. **B**-Intensidade de fluoresceína em sementes de *C. procera* não expostas (controle) e expostas ao campo magnético. Barra representa as sementes do grupo controle, não expostas a campo magnético, e barra preta representa as sementes expostas a um campo magnético de 2 mT. Asteriscos representam diferença significativa entre os grupos como se segue: * para $p < 0,05$; ** para $p < 0,01$; e *** para $p < 0,001$.

Na análise do dano de DNA, a fluorescência verde indica dano de DNA (SAHTOUT et al., 2001). No entanto, podemos observar que a fluorescência verde ultrapassa a região do núcleo das células, formando um background de fluorescência verde. Qualitativamente não foi possível observar um destaque da fluorescência verde das sementes de *C. procera* expostas ao campo magnético em relação à fluorescência verde emitida nas sementes não expostas (Figura 10A). Ao ser verificada a porcentagem de fluorescência verde nos dois grupos, o grupo tratado com o campo magnético e o grupo não tratado com o campo, também não houve uma diferença significativa entre a fluorescência verde encontrada nos dois grupos comparados, sugerindo que não houve dano ao DNA.

No ensaio do TUNEL o iodeto de propídeo (IP) é utilizado para corar o DNA (NOGUEIRA, 2019) e conseqüentemente todos os tipos de núcleo, núcleos apoptóticos, possíveis núcleos apoptóticos, quanto núcleos de células saudáveis. Na figura 11A foi observada uma maior concentração de núcleos em áreas comuns de tecido dos tegumentos e cotilédones das sementes expostas ao campo magnético e nas seções dos tegumentos e cotilédones das sementes controles. Sendo assim, foi verificada a densidade celular nos tecidos das sementes utilizadas para o ensaio TUNEL, tanto do grupo controle, quanto do grupo tratado com campo magnético, para verificar se haveria uma maior população de células nos tecidos nas sementes tratadas com campo magnético em comparação com as células controles.

Nas sementes de *C. procera* pertencentes ao tratamento controle foi registrada nos tegumentos uma média de densidade celular de 1.166 células/mm², enquanto no cotilédone foi registrada uma média de densidade de 6.233 células/mm². Nas sementes que foram expostas ao campo magnético de 2 mT, em momento pré-semeadura, foi encontrada nos tegumentos uma média de densidade celular de 2.100 células/mm² e nos cotilédones das mesmas sementes foi encontrada uma média de densidade de 8.333 células/mm²(Figura 11B). Houve, portanto, diferença significativa entre a densidade celular nas sementes expostas ao campo magnético e o grupo controle, tanto para os tegumentos quanto para os cotilédones. Entre os tegumentos foi registrado um aumento de 80,10% da densidade celular das sementes de *C. procera* tratadas com campo magnético em relação ao tegumento das sementes do tratamento controle, enquanto nos cotilédones houve um aumento de 33,69% nas sementes expostas ao campo magnético em relação às sementes que não sofreram exposição. Corroborando esses resultados, Răuciu, (2011) também encontrou aumento de atividade mitótica em células meristemáticas da raiz de arroz expostas a campo magnético.

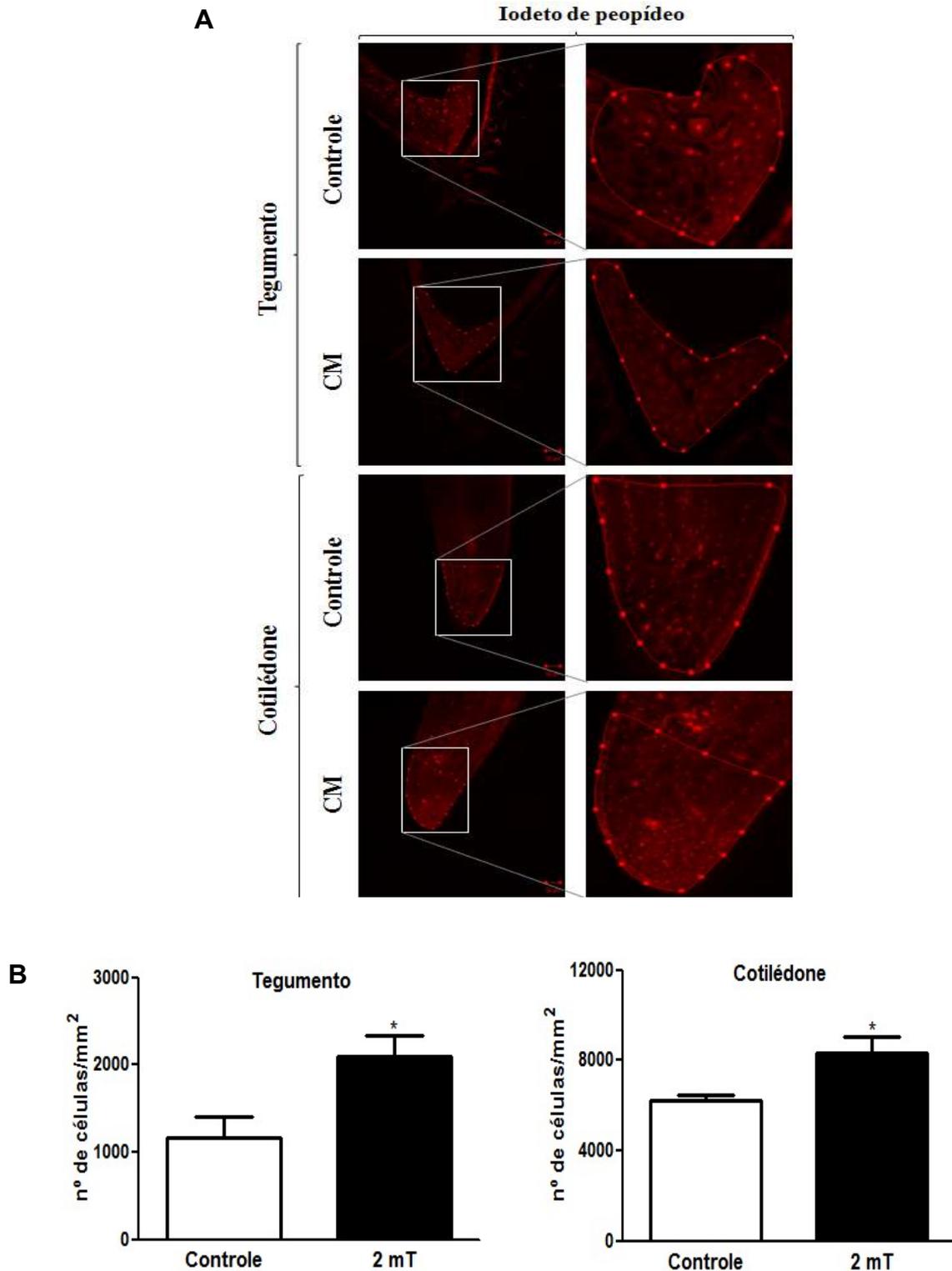


Figura 11. Contagem de células por microscopia confocal. **A** - Ensaio TUNEL fluorométrico em sementes de *C. procera* não expostas (controle) e expostas ao campo magnético coradas com iodeto de propídeo (Barra de escala = 50µm). CM - campo magnético. **B** - Densidade celular nos tecidos de sementes de *C. procera* não expostas (controle) e expostas ao campo magnético. Barras brancas representam as sementes do grupo controle, não expostas ao campo magnético, e barras pretas representam as sementes expostas a um campo magnético de 2 mT. Asteriscos representam diferença significativa entre os grupos como se segue: * para $p < 0,05$; ** para $p < 0,01$; e *** para $p < 0,001$.

Após a verificação das diferentes densidades celulares, o DNA das sementes de *C. procera* tratadas com campo magnético e não tratadas foi extraído e quantificado. Em adição a isso, foi determinada a quantidade de proteínas solúveis extraídas das sementes que passaram pelo tratamento em campo magnético e das sementes não expostas ao campo (Figura 12).

Nas sementes de *C. procera* expostas ao campo magnético de 2 mT, foi encontrada uma concentração de 216,17 ng/ μ L de DNA, enquanto nas sementes do tratamento controle uma concentração de 113,84 ng/ μ L de DNA foi obtida. Houve, portanto, um aumento de 89,89% na quantidade de DNA nas sementes expostas ao campo magnético em comparação com as sementes controles (Figura 12A). Foi observada também uma concentração de proteínas 2,5 vezes maior nas sementes expostas ao campo magnético de 2 mT, uma quantidade de proteínas 2,5 vezes maior, quando comparado à concentração de proteínas das sementes do tratamento controle (Figura 12B). O aumento da quantidade de DNA e da quantidade de proteína é complementar ao aumento da densidade celular, pois essas moléculas são replicadas e produzidas na mitose celular (FRANCIS, 1992)

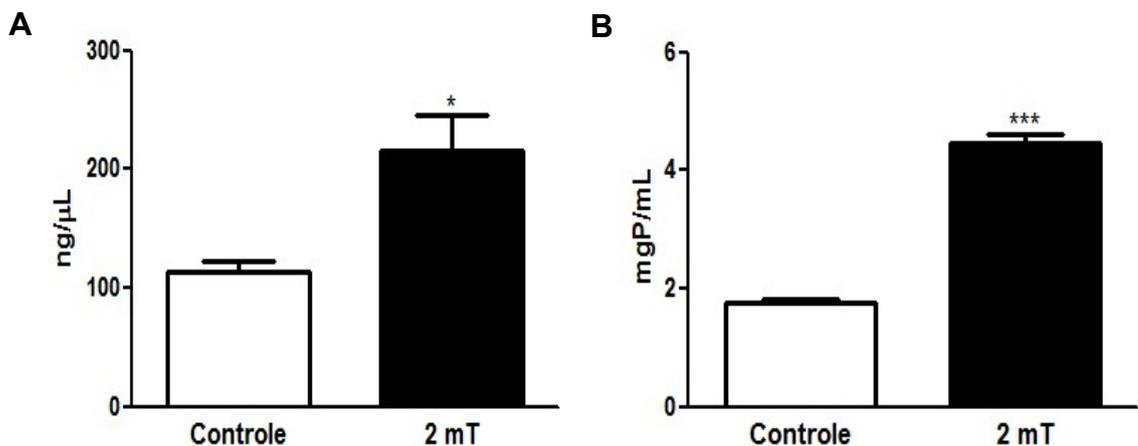


Figura 12. A - Quantidade de DNA genômico; B- Quantidade de proteínas totais solúveis. Toda a quantificação foi realizada com sementes de *C. procera* não expostas (controle) e expostas ao campo magnético. Barras brancas representam as sementes do grupo controle, não expostas ao campo magnético, e barras pretas representam as sementes expostas a um campo magnético de 2 mT. Asteriscos representam diferença significativa entre os grupos como se segue: * para p < 0,05; ** para p < 0,01; e *** para p < 0,001.

O maior conteúdo de malondialdeído (MDA) verificado nas sementes expostas ao campo magnético pré-semeadura em relação às sementes controle, indica que houve uma possível peroxidação lipídica com um consequente dano de membrana, no entanto apenas o conteúdo de MDA, que é medido pela sua reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA) não é suficiente para confirmar um dano de membrana, tendo em vista que o TBA não reage especificamente com o MDA. O TBA também se liga à outras substâncias, como açúcares,

aminoácidos e proteínas. Dessa forma, em função da presença de compostos interferentes, o conteúdo de MDA pode ficar superestimado (FRANÇA et al., 2013). Isso faz com que o estresse oxidativo encontrado por verificação do conteúdo de peróxido de hidrogênio e pelo desequilíbrio das atividades da POX e APX, pode não ser suficiente para causar um dano de membrana significativo.

Apesar de um possível dano de membrana, provocado pelo estresse oxidativo identificado nas sementes de *C. procera* expostas ao campo magnético de 2 mT, a fluorescência verde emitida pela fluoresceína ligada a fragmentos de DNA, não apresentou diferença significativa entre as sementes expostas ao campo magnético e sementes não expostas. Apesar de o campo magnético ser considerado um estresse abiótico (WANG et al., 2006) a intensidade de 2 mT não causou um estresse oxidativo a ponto de danificar o DNA das células das sementes de *C. procera*. Ishisaka et al., (2000) relataram peroxidação lipídica provocada por ROS como resultado da ação de campo magnético sobre organelas celulares, somado a isso Amara et al., (2007) em seus experimentos também relataram a manutenção da integridade de DNA de células após exposição a campo magnético.

O DNA corado com iodeto de propídio, indicou um aumento da quantidade de células nas sementes expostas ao campo magnético em relação às sementes controle. Esse resultado foi confirmado pelo cálculo da densidade celular com o auxílio do software Carl Zeiss Laser Scanning Microscope (LSM 710, 20× objective, Carl Zeiss, Jena, Germany, Brazil). Além disso, a quantificação do DNA genômico e quantificação de proteínas foram consistentes com o resultado da densidade celular, tendo em vista que a densidade celular nas sementes expostas ao campo magnético foi maior que a densidade celular das sementes não expostas.

Embora as ROS possam ser tóxicas para as células das plantas, no entanto podem controlar outros processos, como crescimento e desenvolvimento da planta, morte celular programada, ciclo celular, dentre outros (GILL et al., 2010). O estresse oxidativo apresentado nas sementes expostas ao campo magnético não causou danos significativos ao DNA, mas um possível dano de membrana. Apesar disso a alta densidade celular encontrada e associada ao maior conteúdo de DNA genômico e de proteínas encontradas nessas sementes, indicam que o estresse oxidativo estimulou as células a entrarem em divisão celular em momento pré-semeadura. Este resultado é consonante com o trabalho de Mroczek-Zdyrska et al., (2016), onde foi encontrado uma alta atividade de peroxidase de fenóis e atividade mitótica em feijão (*Phaseolus vulgaris* L) quando foi exposto a um campo magnético.

Os resultados obtidos indicaram que o campo magnético de 2 mT após 5 dias de tratamento pré-semeadura estimulou parâmetros de germinação nas sementes de *C. procera*

quando comparado com as intensidades de 0,5 mT e 1,0 mT, já que demonstrou melhor taxa de germinação e porcentagem total de germinação das sementes, o que causou uma antecipação da germinação das sementes. Após análises bioquímicas, verificou-se que o campo de 2 mT provoca um estresse oxidativo nas sementes de *C. procera*, no entanto o nível de ROS que provoca o estresse não foi tóxico o bastante para danificar moléculas importantes para a vida e induziu a divisão celular. Sendo assim o estresse oxidativo provocado pelo campo magnético no tratamento das sementes de *C. procera* pré-semeadura associado às devidas condições de germinação das sementes, parece contribuir para a antecipação da germinação e o surgimento de melhores índices de germinação das sementes. A influência do campo magnético sobre as sementes quiescentes de *C. procera* pode ser melhor entendida no esquema representativo da figura 13.

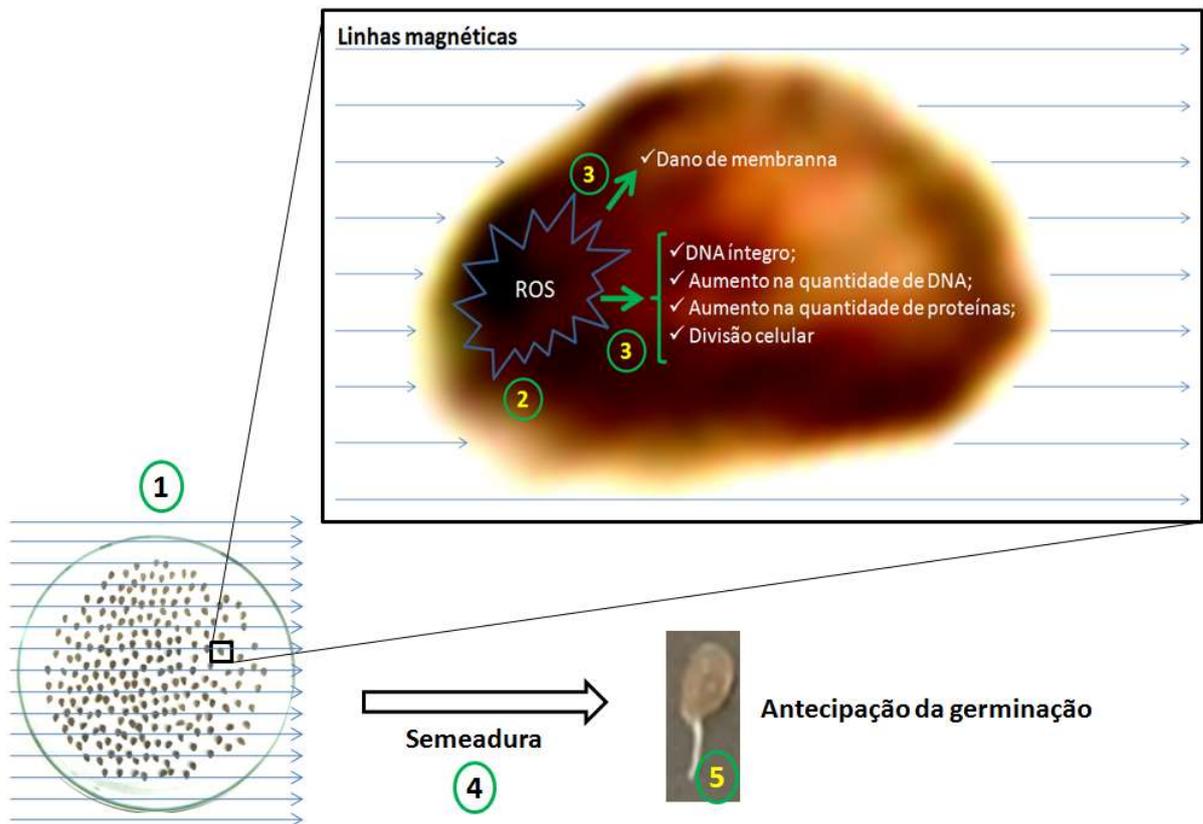


Figura 13. Representação esquemática de mudanças metabólicas em sementes de *Calotropis procera* após tratamento em campo magnético pré-semeadura. **1** - As sementes são expostas ao campo magnético antes da semeadura; **2**- O campo magnético causa acúmulo de ROS na semente de *C. procera*; **3**- O acúmulo de ROS provoca danos à membrana celular, mas aumenta o processo de divisão celular; **4**- Semeadura de sementes de *C. procera* pré-tratadas em campo magnético; **5** - Antecipação da germinação da semente.

**5 CAPÍTULO II: ANÁLISE PROTEÔMICA PARCIAL COMPARATIVA EM
SEMENTES DE *CALOTROPIS PROCERA* SEMEADAS SOB AÇÃO DE CAMPO
MAGNÉTICO**

5.1 INTRODUÇÃO

Como foi apresentado no capítulo anterior desta pesquisa, o campo magnético como um pré-tratamento antecipou o tempo germinativo das sementes de *Calotropis procera*. Além disso, foi observado um estresse oxidativo nas sementes que foi associado ao registro dos melhores parâmetros de germinação encontrados. Alguns trabalhos com campo magnético e plantas registram parâmetros de crescimento e desenvolvimento de plantas, no entanto, poucos trabalhos estudam as reações metabólicas, como o caso das pesquisas da tabela 1.

Tabela 1-Efeitos provocados por exposição ao campo magnético em plantas.

Espécie	Órgão/Tecido	Efeito do Campo Magnético
<i>Mormodica charantia</i>	Sementes	- Aumento da porcentagem de germinação; - Aumento do vigor da semente; - Aumento do índice de emergência (IQBAL et al., 2016)
<i>Zea mays</i> L. e <i>Glycine max</i> L	Sementes e raiz	- Aumento da porcentagem de germinação; - Aumento no comprimento da raiz; - Alta atividade de protease e α -amilase (KATARIA et al., 2017)
<i>Triticum ssp.</i>	Semente	- Aumento do crescimento da plântula; - Aumento no rendimento de frutos e outros parâmetros de rendimento (HUSSAIN et al., 2020)
<i>Heliantus annuus</i> L.	Sementes	- Aumentou a concentração de vitamina E; - Estimulou parâmetros de crescimento das plântulas originadas de sementes tratadas com campo magnético. (BUKHARI et al., 2021)
<i>Hordeum vulgare</i> L.	Sementes	- Aumento da germinação; - Mudanças no conteúdo de Ca, Mg, Fe, B) (ERCAN et al., 2022)

Fonte: Autor da tese

Radhakrishnan et al., (2012) expuseram sementes de soja (*Glycine max* L.) 5 horas por dia ao longo de 20 dias e também registrou aumento em parâmetros de crescimento e desenvolvimento, como altura da plântula com origem em sementes pré-tratadas com campo magnético de 1,5 mT. Nesse estudo também foram verificadas mudanças no aumento do conteúdo de proteínas e mudanças no perfil proteico. Atividades de enzimas como β - amilase, fosfatase ácida e polifenol oxidase estavam aumentadas, enquanto α - amilase e proteases reduziram suas atividades.

Sementes de soja também foram avaliadas sob exposição ao campo magnético de 250 mT, por 3 minutos e 12 minutos (DZIERGOWSKA et al., 2021). Os autores relataram que a germinação das sementes de soja em exposição a campo magnético proporcionou melhor desenvolvimento de plântulas.

Em outra perspectiva de estudo, Shabrangy et al., (2021) verificaram o efeito do campo magnético de 7 mT em sementes de cevada. Nesse estudo as sementes foram expostas ao campo magnético por 5 dias por diferentes tempos de exposição, e foram verificados parâmetros como taxa de germinação, biomassa, comprimento da raiz e da parte aérea da plântula produzida pelas sementes expostas. Os resultados demonstraram que o campo magnético afetou positivamente as sementes aumentando todos os parâmetros analisados, além disso, foi realizado um estudo proteômico nos tecidos da raiz e parte aérea dessas plântulas, sendo registradas mudanças no conteúdo do proteoma dessas plântulas: 38 proteínas na parte aérea e 15 proteínas da raiz mostraram mudanças significativas sob ação do campo magnético.

Considerando o conjunto de observações iniciais, as quais demonstraram que a aplicação de campo magnético teria um efeito intensidade-dependente, sobre a velocidade de germinação de sementes de *Calotropis procera*, foram então investigados, diferentes parâmetros bioquímicos nos materiais amostrais, na tentativa de melhor interpretar a ação do campo magnético, em nível metabólico. Para tal, foi igualmente realizada uma análise proteômica diferencial. Os dados e interpretações destes são apresentados nesta seção.

Foram investigadas as sementes de *Calotropis procera* em processo de germinação expostas ao campo magnético e também sementes não expostas ao campo magnético (controle) e sementes pré-tratadas com campo magnético em processo de germinação. Foram conferidos também, parâmetros de crescimento, atividade de enzimas antioxidantes e conteúdo do peróxido de hidrogênio. Adicionado a isso foi realizado o estudo do proteoma dessas sementes em processo de germinação, visando melhor entendimento do efeito do campo magnético sobre plantas.

5.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

5.2.1 *Material biológico*

As sementes de *Calotropis procera* utilizadas nos experimentos deste capítulo foram coletadas e selecionadas conforme item 5.1 deste trabalho. No entanto, sementes não expostas ao campo magnético foram selecionadas para germinação durante a exposição ao campo magnético.

5.2.2 *Exposição ao campo magnético durante a germinação das sementes*

As sementes que constituíram o grupo controle e grupo pré-tratado com campo magnético seguiram a mesma metodologia do item 5.2 do capítulo anterior. Após o pré-tratamento ou não com campo magnético, as sementes passaram por processo de desinfecção realizado em câmara de fluxo laminar. Este processo consistiu em imersão das sementes em solução de hipoclorito de sódio (1 % de cloro ativo) seguida de 5 ciclos de lavagem em água destilada estéril. As sementes foram então embebidas em água destilada estéril por 20 minutos e colocadas em papel filtro dentro da placa de Petri, conforme já mencionado também no item 5.2. As placas de Petri contendo as sementes em processo de germinação foram colocadas em sala de cultivo com fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro, por 5 dias e somente um grupo de sementes foi colocado para germinar sob exposição contínua de campo magnético de 2 mT com características descritas, conforme especificações contidas também no item 5.2 desta pesquisa. Neste grupo, as sementes foram colocadas em uma disposição de mesmo sentido do campo magnético dentro da placa de Petri. Após os 5 dias de exposição as sementes germinadas foram coletadas, para realização das análises.

5.2.3 *Parâmetros de análise*

A porcentagem de germinação e a taxa de germinação foram calculadas de acordo com os métodos descritos no item 5.6 deste trabalho. A massa fresca e a massa seca foram determinadas conforme o item 5.5 também deste trabalho. O comprimento da raiz foi medido 5 dias após a semeadura.

5.2.4 Extrato enzimático

A obtenção do extrato enzimático das sementes de *Calotropis procera* semeadas foi realizada de acordo com o método mencionado no Item 5.7.

5.2.5 Dosagem de proteínas totais solúveis

A quantificação das proteínas totais solúveis foi realizada pelo método de Bradford, (1976), de acordo com a metodologia já descrita no item 5.8 deste trabalho.

5.2.6 Atividade das enzimas antioxidantes

As atividades da POX, CAT e APX foram realizadas nesta seção da pesquisa e foram determinadas segundo as metodologias aplicadas nos itens 5.9, 5.10 e 5.11, como relatadas anteriormente.

5.2.7 Conteúdo de peróxido de hidrogênio

A quantificação do peróxido de hidrogênio contido no material biológico seguiu a metodologia descrita por Gay et al., (1999) como relatada no item 5.12 deste trabalho.

5.2.8 Análise da peroxidação lipídica

Para determinar a peroxidação lipídica das sementes semeadas, foi seguido o método de Heath e Packer, (1968) já descrito no item 5.13.

5.2.9 Extrato proteico

Para o extrato proteico a amostra foi processada de acordo com Shen, (2002) adaptado por Mesquita, (2012). As sementes em processo de germinação foram maceradas na presença de nitrogênio líquido e depois adicionado tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,0), contendo NaCl 0,15 M, PEG 3 % (v/v), PMSF 1 mM, EDTA 2 mM e PVPP 1 % (m/v), na proporção 1:4 (m/v) e macerados durante 10 minutos, sob banho de gelo. Após maceração, o homogeneizado foi centrifugado (13.000 x g, 4 °C, 20 min). O sobrenadante foi coletado e adicionado uma

solução de acetona contendo TCA 10% (m/v). A amostra foi mantida *overnitgh* a -20 °C. Após isso, a amostra foi centrifugada (6.000 g 10 min a 4 °C) e o sobrenadante descartado. O precipitado foi lavado 4 vezes com 5 mL de acetona, a 4 °C, e centrifugado (6.000 x g por 5 min a 4 °C), lavado 1 vez com etanol 80 % e centrifugado (6.000 x g, 5 min a 4 °C), lavado com 1 mL de etanol e centrifugado (10.000 x g por 3 min). A amostra foi deixada para secar em modo SpeedVac por 30 min, sendo armazenada a - 30 °C.

5.2.10 Eletroforese em uma dimensional

As proteínas foram ressuspensas em 500 µL de tampão de extração contendo (ureia 7 M + tiourea 2 M + CHAPS 2 % (m/v) + IPG *Buffer* 2 % (v/v) + DTT 0,3 % (m/v) com auxílio de um agitador, por 30 min. Em seguida, as amostras foram submetidas à sonicação em equipamento Ecel Alpha 3L Plus por 5 minutos, seguida de centrifugação (10.000 x g por 10 min) por três vezes e o sobrenadante coletado. Após isso foi realizada a quantificação das proteínas totais solúveis.

Para verificação do perfil proteico foi realizada eletroforese unidimensional segundo a metodologia de Laemmli, (1970), adaptada para o uso de géis de separação em placas. As amostras proteicas foram adicionadas de tampão de amostra, contendo 1 % de dodecil sulfato de sódio (SDS), 10 % de glicerol, azul de bromofenol 0,02 % na ausência de 2 -mercaptoetanol. Os marcadores de massa molecular utilizados foram: fosforilase B (97,0 kDa), albumina sérica bovina (66,0 kDa), ovalbumina (45,0 kDa), anidrase carbônica (30,0 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e alfa-lactalbumina (14,4 kDa). Os géis utilizados apresentavam as dimensões 8 x 7,5 x 0,1 cm. As eletroforeses foram realizadas em gel de poliacrilamida 12,5 %. Os géis de aplicação continham 5 % de poliacrilamida, em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8, e SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) 1 %. Os géis de separação foram feitos com tampão Tris-HCl 3 M, pH 8,8, e SDS 1 %. A polimerização foi conseguida pela adição de TEMED e persulfato de amônio (PSA) 10 %. As corridas foram realizadas sob as condições de 20 mA por placa e 140 V, por um período médio de 2 horas, a 25 °C. Após as corridas, os géis foram corados com uma solução de metanol, ácido acético e água destilada (4:1:5; v/v/v) contendo o corante Coomassie Brilhante Blue R-250 (PhastGel Blue R) e revelados com uma solução contendo os mesmos componentes, porém, sem o corante.

5.2.11 Análise de espectrometria de massas

De início, as proteínas do extrato proteico foram ressuspensas em uma solução 8 M de ureia e 2 M de tiureia. Após isso 100 µg de proteínas foram reduzidas em 10 mM de DTT e depois alquiladas com 40 mM de iodoacetamida, em temperatura ambiente na ausência de luz. A digestão ocorreu com a adição de tripsina na concentração de 0,2 µg/µL sendo a amostra mantida *overnight*, sob agitação, em aparelho thermomixer (35 °C, 900 rpm). As amostras foram limpas em Spincolumn C18 e resina poros R2 e então analisadas em um cromatógrafo Easy 1000 nano LC (Thermoscientific) conectado a um espectrômetro de massas Q exactive Plus (Thermoscientific). A coluna (Homamede, resina: Reprosil Gold C18, esfera: 3 µm de diâmetro, poro: 200 Å, diâmetro da coluna: 75 µm, e altura da coluna 25 cm) foi equilibrada com a solução A: acetonitrila 5 % (v/v) e ácido fórmico 0.1 % (v/v). Para o gradiente foi utilizada a solução B: acetonitrila 5 % (v/v) e ácido fórmico 0.1 % (v/v) como se segue: 5 %-45 % de B em 50 min, 45 %-95 % de B em 5 min, e por fim 9 % de B em 5 min. O tipo de análise no espectrômetro de massas foi *Data Dependent Acquisition* (DDA) e o escaneamento completo dos espectros de massas (MS) foi obtido no *orbtrap* (faixa m/z: 375 a 2000 m/z, tempo de ativação: 100 ms). Os íons selecionados para obtenção do espectro de massas foi um máximo de 20 de acordo com o sinal de intensidade. A fragmentação em célula HCD foi feita com sinal de carga de 200.000 em um tempo de ativação de 50 ms, sendo o tempo de exclusão do íon de 45 s e a tolerância do fragmento de massas de 0,02 Da.

5.2.12 Identificação das proteínas

A identificação das proteínas foi realizada com a submissão dos dados brutos dos MS ao Proteome discoverer 2.1 software. Assim, um conjunto de parâmetros foi utilizado, como: precursor de tolerância de massa - 10 ppm; tolerância de fragmento de massa - 0,02 Da; quantificação - intensidade do sinal; dinâmica de modificação - oxidação da metionina e acetilação do N-terminal; modificação fixa - carbamidometilação na cisteína; nível FDR de peptídeo e nível FDR de proteínas - 1 %.

5.2.13 Análises de bioinformática

Com os dados das sequências peptídicas da amostra de *Calotropis procera* encontradas e identificadas por espectrometria de massas, foi acessado o banco de dados Uniprot e

analisadas as sequências encontradas após espectrometria de massas contra sequências de diferentes espécies de plantas da família Apocynaceae: *Calotropis procera*, *Orthanthera albida*, *Vincetoxicum mongolicum*, *Catharanthus roseus*, *Asclepias syriaca*. O banco de dados Uniprot foi utilizado para validação das proteínas identificadas. De acordo também com o Proteome discoverer 2.1 software foi possível a identificação de contaminantes comuns que foram removidos manualmente do proteoma identificado antes da comparação com o controle.

5.2.14 Rede de interação proteína-proteína

Através de análises de bioinformática, a rede de interação proteína-proteína foi construída pela utilização de uma plataforma pública para análises de enriquecimento funcional denominada de STRING versão 11.5 (<https://string-db.org>). A lista de proteínas encontradas após análises de espectrometria de massas foi submetida ao banco de dados do STRING da espécie *Arabidopsis thaliana*. Com base nas características das proteínas encontradas o banco de dados do STRING construiu a rede de interação proteína-proteína.

5.2.15 Análise estatística

Todo o experimento foi completamente randomizado e em triplicata temporalmente independente. Foram formados 3 grupos experimentais de sementes em processo de germinação: o grupo controle, formado por sementes semeadas que não foram expostas a nenhum campo magnético; o grupo pré-tratado, formado por sementes semeadas que foram pré-tratadas com campo magnético por 5 dias de exposição; e o grupo campo magnético, formado por sementes semeadas sob exposição ao campo magnético. Ao todo foram utilizadas 810 sementes de *C. procera* na pesquisa. Cada replicata consistiu em 270 sementes, sendo utilizadas 90 sementes por grupo. As médias dos grupos tratados com campo magnético foram comparadas com as sementes controle. Os dados foram analisados com o auxílio do software GraphPad Prism 5 através do teste de Tukey, com $p < 0,05$.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Parâmetros fisiológicos

Após os resultados do capítulo anterior com sementes pré-tratadas com campo magnético, neste capítulo os parâmetros de germinação abrangerão um terceiro grupo: sementes germinando sob ação de um campo magnético de 2 mT. Nesta seção foi analisado nos diferentes grupos experimentais: a porcentagem de germinação total em 5 dias após a semeadura, a taxa de germinação das sementes nos 5 dias após a semeadura, o comprimento da raiz, bem como massa fresca e massa seca.

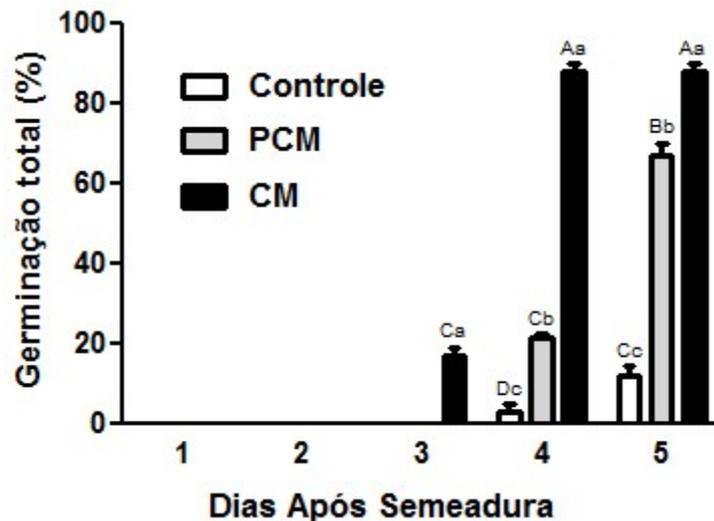


Figura 14. Porcentagem de germinação total por dia das sementes de *C. procera* expostas ao campo magnético de 2 mT. Controle - sementes não expostas ao campo magnético; PCM - sementes expostas ao campo magnético antes da semeadura; CM - sementes expostas ao campo magnético durante a semeadura. Letras minúsculas representam diferenças significativas dentro de um mesmo dia; e letras maiúsculas representam diferenças significativas entre todos os dias para $p < 0,05$.

Nenhuma semente semeada germinou até o 2º dia. No entanto, diferentemente dos outros grupos, as sementes que foram semeadas, sob ação de campo magnético, iniciaram a germinação 3 dias após semeadura, 16,67 % do total de sementes semeadas. No 4º dia após semeadura, 88 % das sementes semeadas em campo magnético já haviam germinado, 21,33 % das sementes pré-tratadas haviam germinado e 3 % das sementes controles haviam germinado. No 5º dia após a semeadura, não houve mais germinação das sementes semeadas em campo, permanecendo um total 88 % de sementes germinadas do total de sementes semeadas, mas o

grupo pré-tratado havia germinado 67 % do total de sementes semeadas, enquanto nas sementes controles 11,67 % das sementes germinaram do total de sementes semeadas (Figura 14).

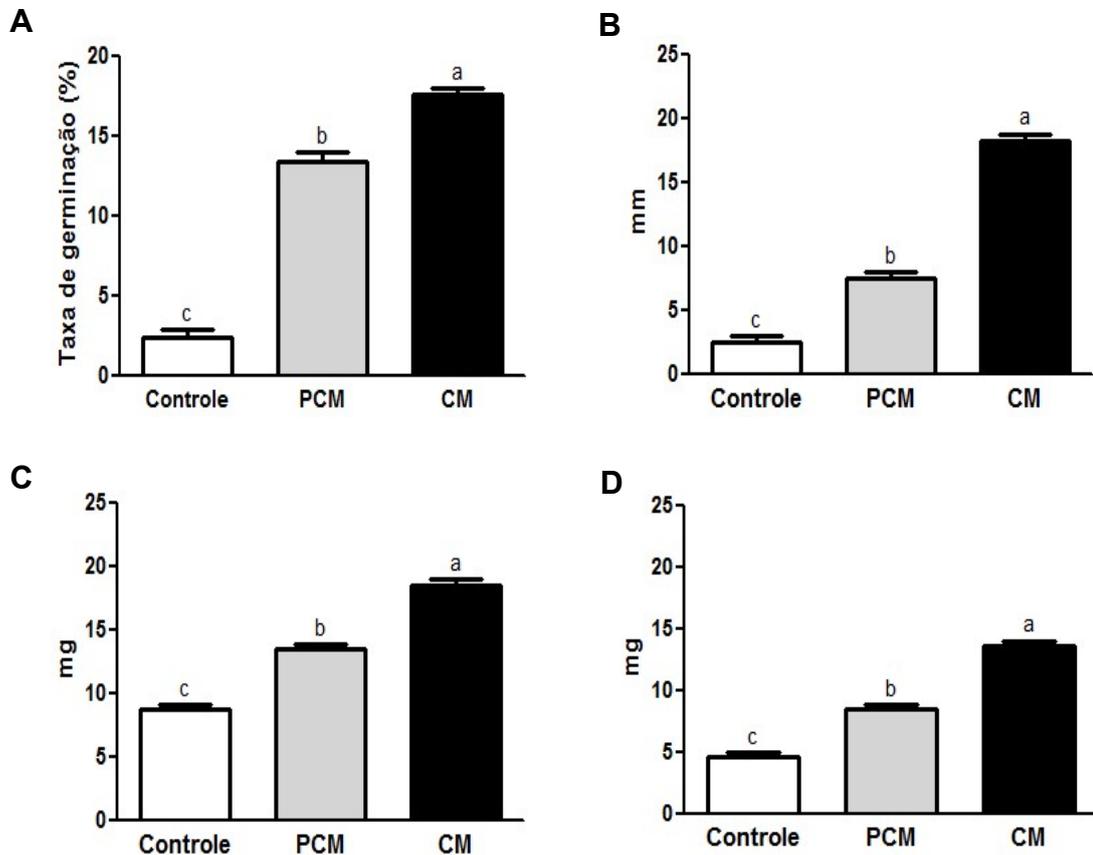


Figura 15. Parâmetros de germinação de sementes de *C. proceras* expostas ao campo magnético de 2 mT, 5 dias após semeadura. **A** - Taxa de germinação; **B** - Comprimento da raiz; **C** - Massa fresca; **D** - Massa seca. Controle - sementes não expostas ao campo magnético; PCM - sementes expostas ao campo magnético por 5 dias antes da semeadura; CM - sementes expostas ao campo magnético durante a semeadura. Letras diferentes reapresentam diferenças significativas entre os grupos para $p < 0,05$.

A taxa de germinação (17,60 %) foi maior nas sementes germinando em campo magnético (CM), seguida das sementes pré-tratadas em campo (PCM) em que a taxa de germinação foi de 13,40 %. Já a taxa de germinação das sementes não expostas ao campo magnético foi de 2,33 % (Figura 15A). O comprimento da raiz também foi 7,28 vezes maior nas sementes CM, em relação ao controle. O comprimento das raízes provenientes das sementes PCM, foi 2,96 vezes maior que as raízes no tratamento controle (Figura 15B). Em relação a massa fresca as sementes CM apresentaram uma massa 2,13 vezes maior que a massa do controle, enquanto as sementes PCM apresentaram uma massa 1,54 vezes maior que a massa das sementes não expostas ao campo magnético (Figura 15C). A massa seca seguiu a mesma tendência da massa fresca. As sementes CM apresentaram uma massa 3,03 vezes maior que a

massa das sementes do tratamento controle, enquanto a massa seca das sementes PCM apresentou uma massa 1,85 vezes maior que a massa seca das sementes controle (Figura 15D).

Todos os parâmetros estudados durante a semeadura das sementes foram maiores nas sementes semeadas expostas ao campo magnético (CM) seguidos pelos parâmetros das sementes semeadas pré-tratadas em campo magnético (PCM) em relação as sementes do tratamento controle.

Uma pesquisa realizada com sementes de feijão e trigo corrobora os resultados encontrados nas sementes de *C. procera* neste capítulo. Na pesquisa citada, foi investigado o efeito de intensidades de campo magnético diferente, 4 e 7 mT, com diferentes pressões osmóticas preparadas com sacarose ou sal em sementes de feijão e trigo. Nessa pesquisa foi registrado, que independentemente da pressão osmótica gerada, ambas as intensidades de campo promoveram a aceleração da germinação e o crescimento inicial das plântulas. Além disso foi observado um aumento no acúmulo de biomassa na raiz e parte aérea das plântulas (CAKMAK et al., 2010)

Em um experimento com exposição de sementes de *Celosea argentea* a campo magnético, Yang et al., (2021) relataram aumento da produção de biomassa, aumento da massa seca, bem como o aumento do conteúdo de clorofila e aumento da atividade de enzimas antioxidantes.

5.3.2 Enzimas antioxidantes

As atividades das enzimas relacionadas ao estresse oxidativo, como POX, CAT e APX foram avaliadas e o conteúdo de peróxido de hidrogênio foi determinado nas seguintes amostras: controle, CM e PCM.

A atividade da peroxidase de fenóis (POX) não apresentou diferença significativa entre as sementes semeadas (Figura 16A), embora as maiores médias de atividade tenham sido registradas nas sementes semeadas que foram tratadas com o campo magnético.

Em relação à catalase (CAT) as sementes semeadas do grupo PCM demonstraram uma redução da atividade da ordem de 57,62 % menor quando comparadas ao controle, enquanto as sementes do grupo CM também apresentaram uma redução de 76,18 % na atividade da CAT, em relação ao controle (Figura 16B).

A atividade da enzima ascorbato peroxidase (APX) apresentou-se similar à atividade da peroxidase, não sendo registrada diferença significativa entre os grupos de sementes semeadas (Figura 16C).

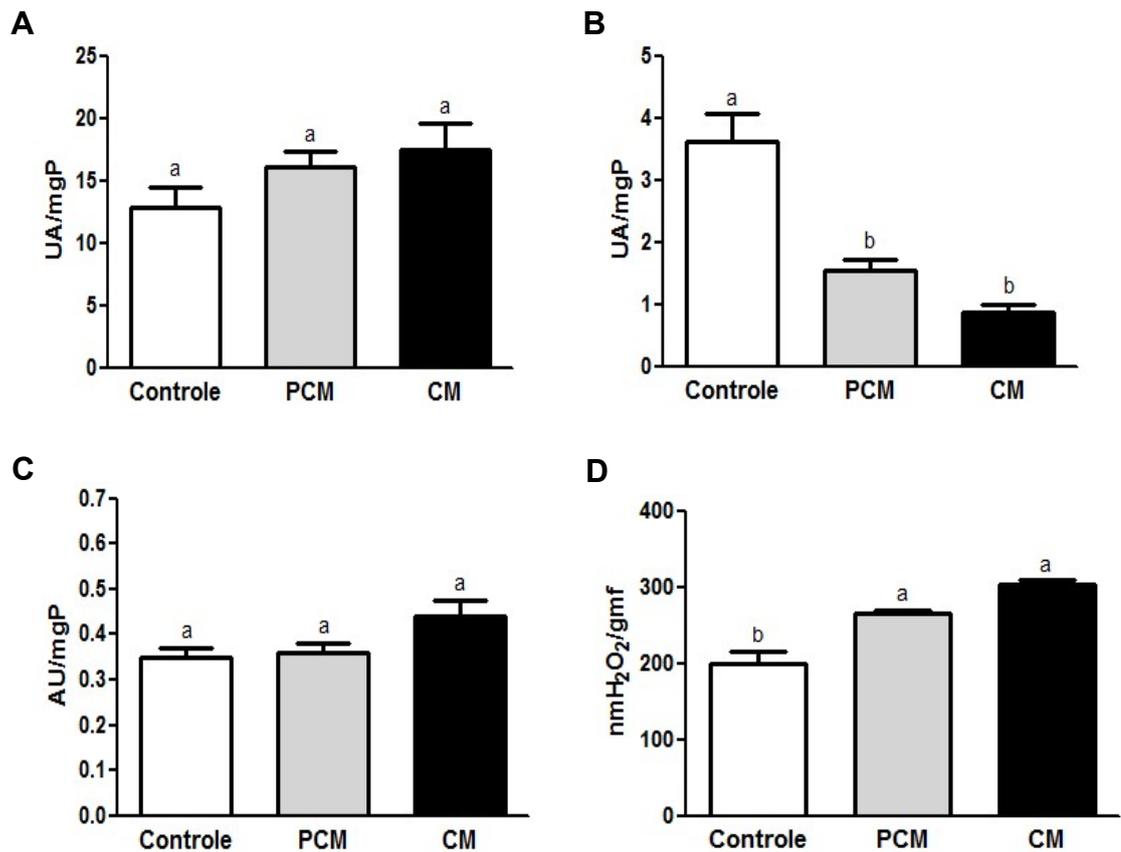


Figura 16. Atividade de enzimas antioxidantes e ROS. **A** - Atividade da peroxidase de fenóis (POX); **B** - Atividade da catalase (CAT); **C** - Atividade da ascorbato peroxidase (APX); e **D** - conteúdo de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Todos os ensaios foram realizados com extratos de sementes de *C. procer* expostas a campo magnético durante a sementeira. Controle - sementes semeadas não expostas a campo magnético; PCM - sementes semeadas pré-tratadas em campo magnético; CM - sementes semeadas expostas a campo magnético. Letras diferentes representam diferenças significativas entre os grupos para $p < 0,05$.

O conteúdo de peróxido de hidrogênio foi 24,83 % maior no grupo das sementes PCM em comparação com as sementes do grupo controle, enquanto nas sementes do grupo CM foi registrado um aumento de 34,18 % no conteúdo de peróxido de hidrogênio em comparação com as sementes do grupo controle (Figura 16D).

Embora não tenham sido observadas diferenças significativas nas atividades da POX e da APX, os resultados registrados na atividade da CAT e do conteúdo de peróxido de hidrogênio são complementares, tendo em vista que a CAT atua na degradação de peróxido de hidrogênio (ANDERSON, 2002). Sendo assim, uma atividade reduzida da CAT nos grupos das sementes PCM e CM permitem sugerir um acúmulo de peróxido de hidrogênio e ocorrência de estresse oxidativo (BEZERRA, 2016).

Esse desequilíbrio na atividade das enzimas antioxidantes e o acúmulo de peróxido que foram registrados em sementes quiescentes de *C. procer* corroboram os resultados

encontrados em sementes semeadas. Pois, embora seja um constituinte da natureza, o campo magnético é considerado um estresse abiótico, já que proporciona o surgimento de um estresse oxidativo (SHARMA et al., 2019).

Em um estudo com sementes de alface onde foram medidos parâmetros de germinação, a atividade da peroxidase aumentou quando as sementes foram submetidas à exposição em campo magnético, e o conteúdo de peróxido de hidrogênio também foi maior nessas sementes expostas ao campo magnético, provocando um estresse oxidativo (MOUSAVIZADEH et al., 2013), o que contribui para a corroboração dos resultados encontrados.

5.3.3 Análise proteômica de sementes de *C. procera* semeadas tratadas em CM

5.3.3.1 Análise do perfil proteico

As diferenças observadas nos parâmetros de germinação e o registro de acúmulo de peróxido de hidrogênio são características que demonstram que é necessário um aprofundamento na pesquisa, para entender melhor o efeito do campo magnético sobre as sementes de *C. procera*. Visando esse aprofundamento e o entendimento dessas mudanças ocorridas nas sementes que permitem associar a antecipação da germinação ao acúmulo de ROS, foi realizada uma análise do proteoma das sementes semeada pré-tratadas em campo magnético e semeadas em campo magnético.

Antes da análise no espectrômetro de massas foi realizada uma extração de proteínas com método de precipitação de proteínas com o auxílio do ácido tricloacético (TCA) em acetona. Esse método permitiu uma melhor concentração de proteínas (GRANIER, 1988) e conseqüentemente uma melhor análise das sementes.

Após a extração foi verificado o perfil proteico das sementes semeadas nos diferentes tipos de tratamento: não expostas ao campo magnético (controle), PCM (pré-tratadas em campo magnético) e CM (sementes semeadas em exposição ao campo magnético). Para isso foi realizada uma eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS PAGE) em condições nativas (Figura 17). A extração foi realizada em triplicata e o perfil proteico também foi detectado em triplicata para verificação do padrão de bandas em gel de poliacrilamida.

Cada grupo amostral (controle, PCM e CM) demonstrou uma identidade padrão de perfil proteico, evidenciando-se algumas diferenças no padrão de bandas entre os grupos de sementes estudados.

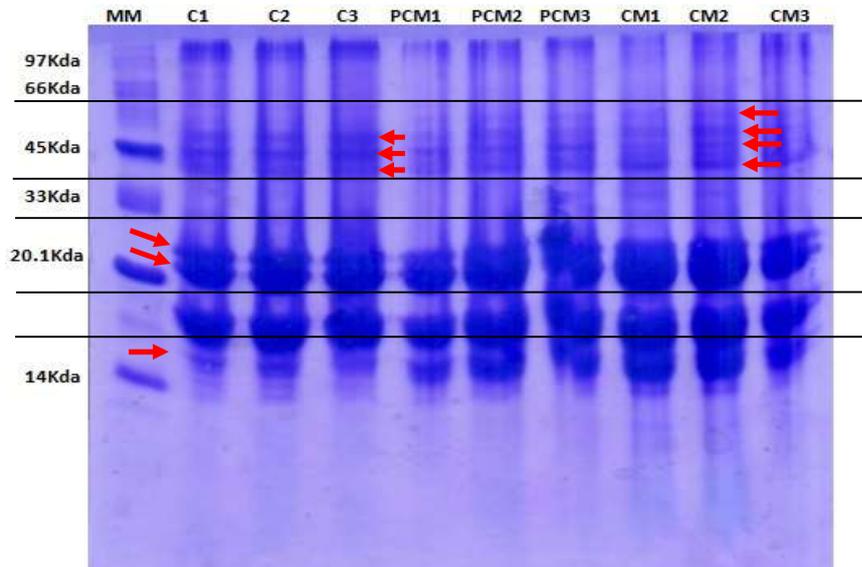


Figura 17. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS PAGE) de extratos proteicos de sementes de *C. procera*. **MM** - marcador molecular; **C1, C2 e C3** (controle) - sementes semeadas não expostas a campo magnético; **PCM1, PCM2 e PCM3** - sementes semeadas pré-tratadas em campo magnético de 2 mT; **CM1, CM2 e CM3** - sementes semeadas expostas ao campo magnético de 2 mT; Setas vermelhas apontam regiões com diferenças entre as bandas dos grupos analisados.

Observando o marcador molecular de massas de proteínas usado como referência, na região próxima a 45 kDa, o grupo controle demonstrou um padrão de 3 bandas mais espessas, enquanto nos grupos PCM e CM essas mesmas 3 bandas foram menos espessas que o padrão do grupo controle. Além disso, nessa mesma região há o surgimento de uma banda a mais nos grupos PCM e CM. Na região próxima a 20 kDa, 2 bandas são comuns a todos os grupos, no entanto essas bandas de proteínas que surgiram no grupo CM aparentam ser mais espessas que nos outros grupos de sementes. Na região acima de 14 kDa apontada pela seta vermelha, as bandas observadas nos grupos PCM e CM são mais espessas que as mesmas bandas observadas no grupo controle.

A mudança de perfil proteico identificada é corroborada em um estudo de Radhakrishnan et al. (2012) com sementes de soja (*Glycine max* L.) pré-tratadas com campo magnético de 1,5 mT. Além do perfil proteico foram verificadas mudanças nas atividades de enzimas como β - amilase, fosfatase ácida, polifenol oxidase, α - amilase e proteases.

Após análise de perfil proteico das sementes semeadas nos diferentes grupos desta pesquisa, procedeu-se a análise do proteoma das sementes por espectrometria de massas, onde por análise de bioinformática ocorreu identificação das proteínas contidas nos diversos grupos de sementes em estudo. Posteriormente foi realizada a classificação das proteínas e formação de uma rede de interação proteína-proteína.

O perfil do proteoma das sementes semeadas de *Calotropis procera* pré-tratadas em campo magnético (PCM) e das sementes semeadas durante a exposição ao campo magnético (CM), quando comparados às sementes do grupo controle, revelou 73 proteínas que foram diferencialmente acumuladas, sendo que 50 das proteínas identificadas foram encontradas nas sementes do grupo PCM, enquanto 62 proteínas identificadas foram encontradas no grupo CM. Do total de proteínas identificadas no grupo PCM, 13 proteínas foram registradas exclusivas desse grupo e 25 foram registradas como exclusivas do grupo CM. Quando comparados os grupos PCM e CM, 11 proteínas são comuns a esses dois grupos (Figura 18).

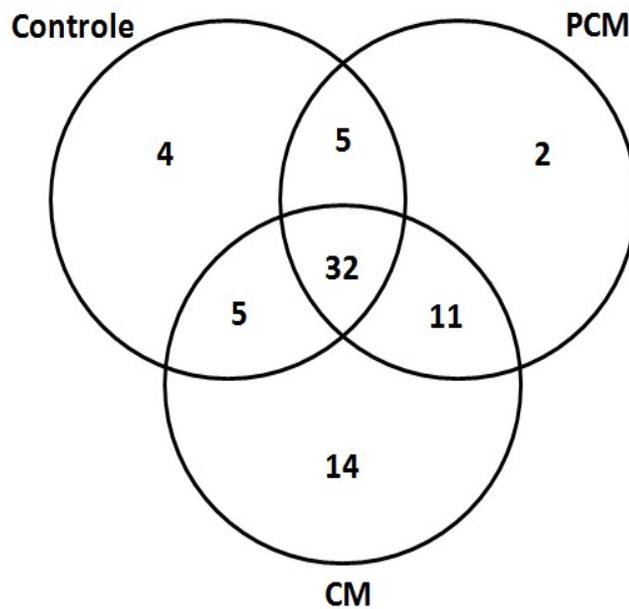


Figura 18. Distribuição em Diagrama de Venn das proteínas diferencialmente acumuladas em sementes semeadas de *Calotropis procera*. Controle - sementes semeadas não expostas a campo magnético; PCM - sementes semeadas pré-tratadas em campo magnético; CM – sementes semeadas expostas a campo magnético.

As anotações para o *Gene Ontológico* (GO) foram classificadas por função biológica distribuídas em 10 categorias: Homeostase Redox da Célula (12 %) do total de proteínas, Metabolismo de Proteínas (24 %), Metabolismo de Lipídeos (4 %), Estrutura (3 %), Ligação de Nucleotídeos (5 %), Transporte (10 %), Defesa contra Estresse (12 %), Energia (15 %), Fotossíntese (11 %) e Metabolismo de Carboidrato (4 %) (Figura 19).

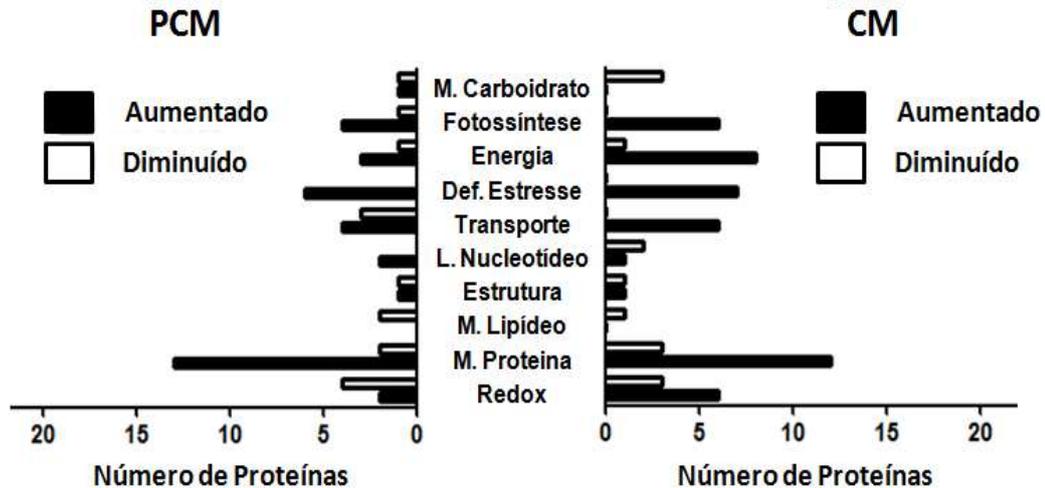


Figura 19. Proteínas diferencialmente acumuladas em sementes semeadas de *Calotropis procera* de acordo com a função biológica. Controle - sementes semeadas não expostas a campo magnético; PCM – sementes semeadas pré-tratadas em campo magnético; CM – sementes semeadas expostas a campo magnético.

As proteínas identificadas e diferencialmente acumuladas nas sementes semeadas de *Calotropis procera* foram organizadas de acordo com a função por elas desempenhadas no sistema biológico (Tabela 2). Para isso foi realizada uma análise de bioinformática no UniProt Knowledgebase SwissProt database de acordo com o número de acesso para a classificação das proteínas.

Entre as proteínas identificadas diferencialmente acumuladas nas sementes semeadas de *C. procera*, dos diferentes grupos estudados neste capítulo da pesquisa, foram selecionadas algumas proteínas ou grupos de proteínas, para discussão baseada na literatura científica que relaciona as proteínas encontradas a estudos anteriores que envolvem resposta da planta a campo magnético ou a algum estresse abiótico responsável pelo surgimento de proteínas também encontradas no estudo do proteoma analisado.

Resultados similares aos encontrados nesta seção foram relatados em uma pesquisa com cultura de tecidos de *Arabidopsis thaliana* e expostos a campo magnético. Os resultados demonstraram mudanças no perfil de proteínas, no entanto, o campo magnético não proporcionou um largo aumento no número de proteínas diferentes (HERRANZ et al., 2013).

Tabela 2 – Sumário das proteínas diferencialmente encontradas em sementes de *Calotropis procera* semeadas após tratamento em campo magnético (PCM) e sementes semeadas em exposição a campo magnético (CM) em relação às sementes semeadas do grupo controle.

Função	No.	Accesso ^a	Proteínas	PCM (Razão) ^b	CM (Razão) ^b
Homeostase Redox	1	A0A067YF90	10-hydroxygeraniol oxidoreductase	-	Exclusiva
	2	A0A0K0YH44	NADH dehydrogenase subunit 7	0,81	0,73
	3	A0A3G1SU21	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 1	-	Exclusiva
	4	Q0VYC8	Peroxidase	0,54	2,18
	5	A0A5B9R3D8	Phenylacetaldehyde reductase	Exclusiva	Exclusiva
	6	M4Q7Z1	Putative ACC oxidase 4 (Fragment)	-	Exclusiva
	7	A0A1B1FHP8	Putative ADH	Exclusiva	Exclusiva
	8	D6NKI1	Putative progesterone 5-beta-reductase	0,42	0,20
	9	A0A6H0CDT4	Superoxide dismutase	0,82	0,57
Metabolismo de Proteínas	10	P33444	40S ribosomal protein S3a	0,43	0,95
	11	Q6H8J2	40S ribosomal protein S9	1,43	2,65
	12	P35007	Adenosylhomocysteinase	2	13,13
	13	A0A1R7T284	Calreticulin	Exclusiva	Exclusiva
	14	A0A172Q2I0	Chaperonin 60 subunit beta 2	4,81	16,88
	15	A0A6M6A5X1	CPCpC (Fragment)	Exclusiva	Exclusiva
	16	A0A0P0CJ61	Cullin1	P	-
	17	G0YZN9	Elongation factor 1-alpha (Fragment)	0,72	0,14
	18	A9QA20	Elongation factor-1 alpha (Fragment)	1,63	0,37
	19	P35016	Endoplasmin homolog	3,75	3,97
	20	D6QSY0	Ketol-acid reductoisomerase	2,91	5,0
	21	Q39613	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	Exclusiva	Exclusiva
	22	M9QMC9	Procerain B (Fragment)	Exclusiva	Exclusiva
	23	Q96551	S-adenosylmethionine synthase 1	-	Exclusiva
	24	Q96553	S-adenosylmethionine synthase 3	-	Exclusiva
	25	A0A0P0CFU9	SKP1-like protein	P	19,05

Continua

Continuação

Função	No.	Accesso	Proteínas	PCM (Razão)	CM (Razão)
Metabolismo de Lipídeos	26	A9QA19	Ubiquitin (Fragment)	1,2	-
	27	F5CLC4	Acetoacetyl-CoA thiolase	-	-
	28	A0A482EA25	Acetyl-coenzyme A carboxylase carboxyl transferase subunit beta, chloroplastic	0,25	0,41
Estrutura	29	A0A0C5DKP2	Cytochrome b5	0,94	-
	30	A0A172Q2B1	Actin	0,56	0,96
Ligação de Nucleotídeos	31	A9QA18	Tubulin (Fragment)	1,29	2,12
	32	Q42699	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase	2,82	2,18
	33	A0A2S1UBT8	DNA-directed RNA polymerase subunit beta	-	0,35
Transporte	34	A0A1X9JL75	Maturase K	P	-
	35	A0A1W6FXX4	Methyltransferase	-	0,35
	36	O23778	ADP-ribosylation factor 1	2,10	3,03
	37	Q3LRX1	Calmodulin 2	Exclusiva	Exclusiva
	38	Q3LRX2	Calmodulin	Exclusiva	-
	39	A0A481X5B4	Mitochondrial protein YMF19	0,28	2,04
	40	A0A1W6BRZ5	Plasma membrane intrinsic protein 2	0,66	2,31
	41	A0A1W6BRX4	Plasma membrane intrinsic protein	2,15	3,80
	42	A0A1W6BRX6	Tonoplast intrinsic protein 1	0,78	2,66
	Defesa contra Estresse	43	A0A1B1FMB6	Allene-oxide cyclase	Exclusiva
44		K9JGF9	Annexin	Exclusiva	Exclusiva
45		J9PDJ0	Chitinase 134	4,82	1,41
46		A0A1W6FXW7	Delta(24)-sterol reductase	-	-
47		A0A191S3F7	Mitogen-activated protein kinase	-	P
48		A0A067XG70	Osmotin: antifungal laticifer protein	Exclusiva	Exclusiva
49		A0A068CA80	Putative universal stress protein	P	-
50		A0A0K2G611	Thaumatococcus-like protein (Fragment)	-	Exclusiva
51		S5YEB0	UspA-like protein	5,64	6,92
Energia		52	D3WCB8	ATP synthase CF0 A subunit	-

Continua

Continuação

Função	No.	Accesso	Proteínas	PCM (Razão)	CM (Razão)
	53	A0A0D5CQW6	ATP synthase protein MI25	-	Exclusiva
	54	U5XK26	ATP synthase subunit alpha	0,7	0,7
	55	A0A2S1UCK9	ATP synthase subunit alpha, chloroplastic	-	-
	56	A0A2S1UDR0	ATP synthase subunit beta, chloroplastic	2,03	3,39
	57	A0A2S1UBA1	ATP synthase subunit c, chloroplastic	Exclusiva	Exclusiva
	58	A0A6M3RB16	Cytochrome b	-	Exclusiva
	59	U5XK37	Cytochrome c oxidase subunit 2	1,27	3,27
	60	U5XL01	Cytochrome c oxidase subunit 3	-	Exclusiva
	61	A0A6M3RFU4	NADH dehydrogenase subunit 9	-	Exclusiva
	62	A0A482E9W2	Protein Ycf2 OS	-	-
Fotossíntese	63	B4XU19	Isopentenyl-diphosphate Delta-isomerase	-	Exclusiva
	64	Q84RZ8	Isopentenyl-diphosphate Delta-isomerase	1,30	-
	65	G8CUP6	Malate dehydrogenase	58,06	48,39
	66	A0A0A0RTN7	Photosystem I iron-sulfur center	Exclusiva	Exclusiva
	67	A0A059P2C0	Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A2	-	Exclusiva
	68	A0A125RJI9	Photosystem II CP47 reaction center protein	-	Exclusiva
	69	B7P0D3	Ribulose biphosphate carboxylase large chain (Fragment)	Exclusiva	-
	70	A0A482EA11	Ribulose biphosphate carboxylase large chain	0,93	2,78
Metabolis. de Carboidrato	71	F1AHC9	Fructose-bisphosphate aldolase	1,18	0,72
	72	A0A2LOW543	Glyceraldehyde 3-phosphate (Fragment)	-	0,41
	73	A0A0N9Q6U5	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (Fragment)	0,69	0,77

P. Presente

-. Ausente

^a. Acesso. Proteínas identificadas de acordo com UniProt Knowledgebase SwissProt database.

^b. Razão. Abundância relative de proteínas encontradas em PCM e CM em relação ao grupo controle.

Conclusão

5.3.3.1.1 Proteínas relacionadas ao metabolismo de proteínas

As proteínas deste grupo se destacaram neste estudo, compondo 24 % do total de proteínas encontradas. Destas 71 % estavam aumentadas em abundância no grupo CM e 65 % foram aumentadas em abundância no grupo PCM.

Proteínas como 40S ribosomal protein S9, envolvida na tradução citoplasmática, Chaperonin 60 subunit beta 2, Calreticulin, Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, envolvidas no dobramento de proteínas para a estrutura tridimensional, assim como Adenosylhomocysteinase e Ketol-acid reductoisomerase enzimas envolvida na síntese de aminoácidos foram encontradas em ambos os grupos PCM e CM aumentados em abundância.

Em um estudo proteômico com feijão-caupi suscetível à infecção com CPSMV (*cowpea severe mosaic virus*) foi verificado que um dos sintomas provocado pela infecção viral foi a redução do crescimento da planta, nesse estudo foi verificado que a infecção viral inibiu a síntese protéica por diminuir em abundância o número de proteínas relacionadas a biosíntese de proteína, o que corrobora os resultados aqui encontrados nos grupos de sementes PCM e CM, já que o metabolismo de proteínas está relacionado ao crescimento e desenvolvimento da planta que são estimulados aqui pela influência do campo magnético (PAIVA, 2016).

5.3.3.1.2 Proteínas relacionadas à produção de energia e fotossíntese

O segundo grupo de proteínas que se destacou foi o das proteínas envolvidas com o metabolismo energético, onde foram encontradas 15 % do total de proteínas diferencialmente acumuladas. Dessas proteínas, 64 % estavam aumentadas em abundância no grupo de sementes CM, enquanto 27 % estavam aumentadas em abundância no grupo de sementes PCM. Proteínas como subunidades da ATP sintase e subunidades de citocromos localizadas no cloroplasto foram as mais encontradas. Além disso, estavam aumentadas em abundância tanto no grupo CM, quanto no grupo PCM.

O quinto grupo de proteínas encontrado diferencialmente em abundância foi do das proteínas relacionadas com a fotossíntese, correspondendo a 11 %. Dessas, 50 % foram encontradas aumentadas nos grupos PCM e CM. Proteínas como Isopentenyl-diphosphate Delta-isomerase, envolvidas na síntese de clorofila, Malate dehydrogenase, envolvida no ciclo do ácido tricarboxílico, e proteínas dos fotossistemas I e II foram encontradas em abundância nos grupos de sementes CM e PCM.

As subunidades da ATP sintase encontradas estão localizadas no cloroplasto o que liga o grupo de proteínas do metabolismo energético com o grupo de proteínas relacionadas à fotossíntese. Esses grupos de proteínas encontrados em abundância se correlacionam à medida que as sementes se encontram em estado de germinação avançado, próximo ao estágio de plântula.

Em sementes de soja (*Glycine max* L.) pré-tratadas com campo magnético também houve aumento da velocidade de germinação, aumento na massa seca e massa fresca das sementes além do aumento da eficiência fotossintética das plântulas originadas dessas sementes pré-tratadas com campo magnético (SHINE et al., 2011). Tais resultados são corroborados pelos estudos do proteoma analisados nos grupos de sementes de *C. procera* semeadas e tratadas em campo magnético, pois são encontradas mudanças metabólicas diferenciais em abundância de proteínas relacionados a estágios avançados de desenvolvimento da planta.

5.3.3.1.3 Proteínas relacionadas à homeostase redox e à defesa contra estresse

O terceiro e quarto grupo de proteínas encontradas diferencialmente em abundância registraram 24 %, do total, sendo 12 % do grupo de homeostase redox e 12 % do grupo de proteínas de defesa contra estresse.

Em relação às proteínas envolvidas na homeostase redox o grupo de sementes PCM apresentou uma redução de 44 % em abundância na maioria das proteínas diferencialmente encontradas, enquanto 67 % do grupo das sementes CM foram aumentadas em abundância. O desequilíbrio verificado no grupo dessas proteínas proporciona o surgimento do estresse oxidativo responsável inclusive pela expressão de proteínas de defesa

No grupo de proteínas de defesa contra estresse a maioria foi aumentada em abundância 56 % no grupo de sementes PCM e 56 % no grupo de sementes CM. Proteínas como anexina, envolvida em resposta a estresse abiótico, osmotina antifúngica, envolvida na defesa da planta, quitinase, envolvida na defesa da planta contra fungos, e a UspA-like protein, envolvida na defesa da planta contra estresse biótico e abiótico foram encontradas aumentadas em abundância em ambos os grupos PCM e CM.

Essa correlação, entre o grupo de proteínas relacionadas à homeostase redox com o grupo das proteínas relacionadas à defesa contra estresse, é complementar, uma vez que o grupo das homeostases redox pode acionar processos de sinalização e conseqüentemente podem provocar surgimento de proteínas relacionadas à defesa da planta contra estresse.

O campo magnético, apesar de fazer parte do ambiente natural, é considerado um estresse abiótico. Esse conceito é corroborado pelas alterações encontradas nas proteínas envolvidas com a homeostase redox e as proteínas aumentadas em abundância ou exclusivas relacionadas com a defesa da planta contra estresse. Hozayn et al., (2018) revelaram em seu experimento que sementes de cevada (*Hordeum vulgare*) submetidas a campo magnético em pré-semeadura melhoravam sua germinação, apesar de estarem sob diversos níveis de estresse salino. A análise realizada no proteoma do grupo de sementes PCM e CM parece explicar tal resultado encontrado nas sementes de cevada, visto que as proteínas encontradas envolvidas na homeostase redox e na defesa da planta contra estresse foram encontradas.

5.3.3.1.4 Proteínas relacionadas ao transporte

As proteínas envolvidas no transporte de moléculas foi o sexto grupo de proteínas diferencialmente abundante que se destacou nos grupos de sementes PCM e CM, correspondendo a 10 % do total de proteínas. Destas a maioria foi aumentada em abundância no grupo de sementes PCM (57 %) já no grupo de sementes CM, 86 % das proteínas envolvidas no transporte de moléculas foram encontradas aumentadas em abundância.

Proteínas como Fator 1 de ADP-ribosilação, envolvidas no transporte de proteínas, calmodulina, responsável pelo controle dos canais de cálcio e sinalização, e proteínas intrínsecas da membrana plasmática, que realizam atividades de canal, foram encontradas aumentadas em abundância nos grupos PCM e CM, o que é consistente com as proteínas encontradas diferencialmente acumuladas no grupo de proteínas das homeostase redox e proteínas de defesa contra estresse, já que esses grupos de proteínas necessitam de proteínas de canais para desempenhar suas funções biológicas.

As proteínas de transporte também foram relacionadas às respostas contra estresse abiótico como mecanismo de sinalização em análise do proteoma de *Kandelia candel* (WANG et al., 2014).

5.3.3.1.5 Proteínas relacionadas a outras funções

As proteínas envolvidas com o metabolismo de carboidrato representaram 4 % do total de proteínas diferencialmente acumuladas no proteoma dos grupos de sementes de *C. procera* analisados. A maioria dessas proteínas das sementes do grupo PCM (67 %) foram reduzidas em abundância, enquanto todas do grupo de sementes CM foram reduzidas em abundância.

As proteínas relacionadas ao metabolismo de lipídeos também representaram 4 % do total de proteínas encontrado no proteoma dos grupos controle, PCM e CM, e todas as proteínas do grupo de sementes PCM e CM foram reduzidas em abundância. Tais resultados encontrados tanto no grupo das proteínas do metabolismo de carboidrato quanto às proteínas do grupo de metabolismo de lipídeos são consistentes com o resultados encontrados no grupo de proteínas relacionadas à fotossíntese e ao resultado encontrado no parâmetro de germinação (comprimento da raiz), pois indicam que os grupos de sementes PCM e CM estão com o desenvolvimento mais avançado que as sementes que não foram tratadas com campo magnético, já que as proteínas relacionadas ao metabolismo das substâncias de reserva, carboidrato e lipídeos, estão reduzidas (HE et al., 2015).

As proteínas relacionadas ao metabolismo de DNA/RNA representam 5 % do total de proteínas diferencialmente abundantes encontradas nas sementes do grupo PCM e grupo CM. Dessas a maioria (75 %) foram reduzidas em abundância em ambos os grupos de sementes semeadas PCM e CM. Apenas uma proteína foi aumentada em abundância, a proteína 5-ethyltetrahydropteroyltriglutamatehomocysteine methyltransferase, que participa na formação de metionina, o que corrobora as proteínas encontradas no grupo de proteínas envolvidas com o metabolismo de proteínas, já que proteínas envolvidas na biossíntese de metionina também foram aumentadas em abundância (SHERMAN et al., 1985).

Em relação às proteínas relacionadas com a função estrutural foram encontradas 3 % do total de proteínas diferencialmente acumuladas. Dessas, metade foi encontrada aumentada em abundância nos grupos de sementes semeadas PCM e CM. A proteína tubulina, envolvida na formação do citoesqueleto celular e na divisão celular, foi encontrada aumentada em abundância tanto no grupo de sementes semeadas PCM, quanto no grupo de sementes semeadas CM. Esse resultado está consonante com os resultados encontrados no capítulo anterior, onde as sementes pré-tratadas em campo magnético antes da semeadura estimularam a divisão celular (CHENN et al., 2010).

A diversidade de proteínas aumentadas em abundância verificadas neste capítulo e as reduzidas em abundância estão consistentes com o perfil proteico revelado no gel de eletroforese apresentado na Figura 17. Além disso, estão em consonância com todos os resultados verificados nos parâmetros de germinação, onde as proteínas identificadas no proteoma das sementes semeadas e tratadas com campo magnético, tanto no grupo PCM, quanto no grupo CM em relação às sementes semeadas do grupo controle, são proteínas relacionadas aos estágios avançados do crescimento e do desenvolvimento da planta, transição do estágio de semente para plântula.

5.3.3.2 Análise da rede de interação de proteína

Após análises das proteínas encontradas por espectrometria de massas, foi realizada a busca das interações conhecidas e preditas para as proteínas diferencialmente acumuladas identificadas no proteoma das sementes semeadas que foram expostas ao campo magnético pré-semeadura (PCM) e nos grupos das sementes semeadas em exposição ao campo magnético (CM).

A rede representada foi baseada em evidências científicas em que as associações mais fortes são representadas por linhas ou arestas mais grossas, as proteínas são representadas por nós. Esta análise também mostrou a existência de um mapa complexo de interações relativas entre as proteínas dos grupos PCM e CM em relação ao grupo controle (UHRIG, 2006).

A rede de interação das proteínas encontradas no proteoma das sementes semeadas do grupo controle revelou 31 interações. As sementes semeadas do grupo pré-tratado em campo magnético (PCM) revelaram 29 interações de proteínas, entre conhecidas e preditas entre as mesmas. Já no grupo das sementes semeadas em exposição ao campo magnético (CM) foram reveladas 42 interações diferentes entre as proteínas identificadas deste grupo. Essas interações entre cada proteína, além de serem baseadas em evidências científicas são baseadas sob forma de interação direta ou indireta entre as proteínas da rede formada. Isso sugere a existência de ligação funcional entre as proteínas encontradas no proteoma dos grupos de sementes estudados. Além disso, tanto no grupo de sementes PCM, quanto no grupo de sementes CM foi detectada claramente uma mudança gradativa na interação de proteínas e a existência de complexos de proteínas associadas ao metabolismo de proteínas, à fotossíntese, à produção de energia, à homeostase redox e ao transporte, representados por círculos de acordo com a Figura 20. Os nomes e símbolos das proteínas encontradas nesta rede de interação deste estudo estão na Tabela 1 do apêndice A. Esta análise de bioinformática através da plataforma STRING forneceu informações sobre as propriedades físicas e funcionais, além das interações conhecidas e preditas dos genes e seus produtos correspondentes.

Esta rede de interação biológica encontrada forneceu informações sobre a importância dessas proteínas para o crescimento e desenvolvimento da planta. Os nós com maior número de conectividades caracterizam pontos centrais para verificação da influência do campo magnético nas sementes semeadas de *C. procerá*, pois se relacionam com os objetivos de formação da rede (PAIVA, 2016).

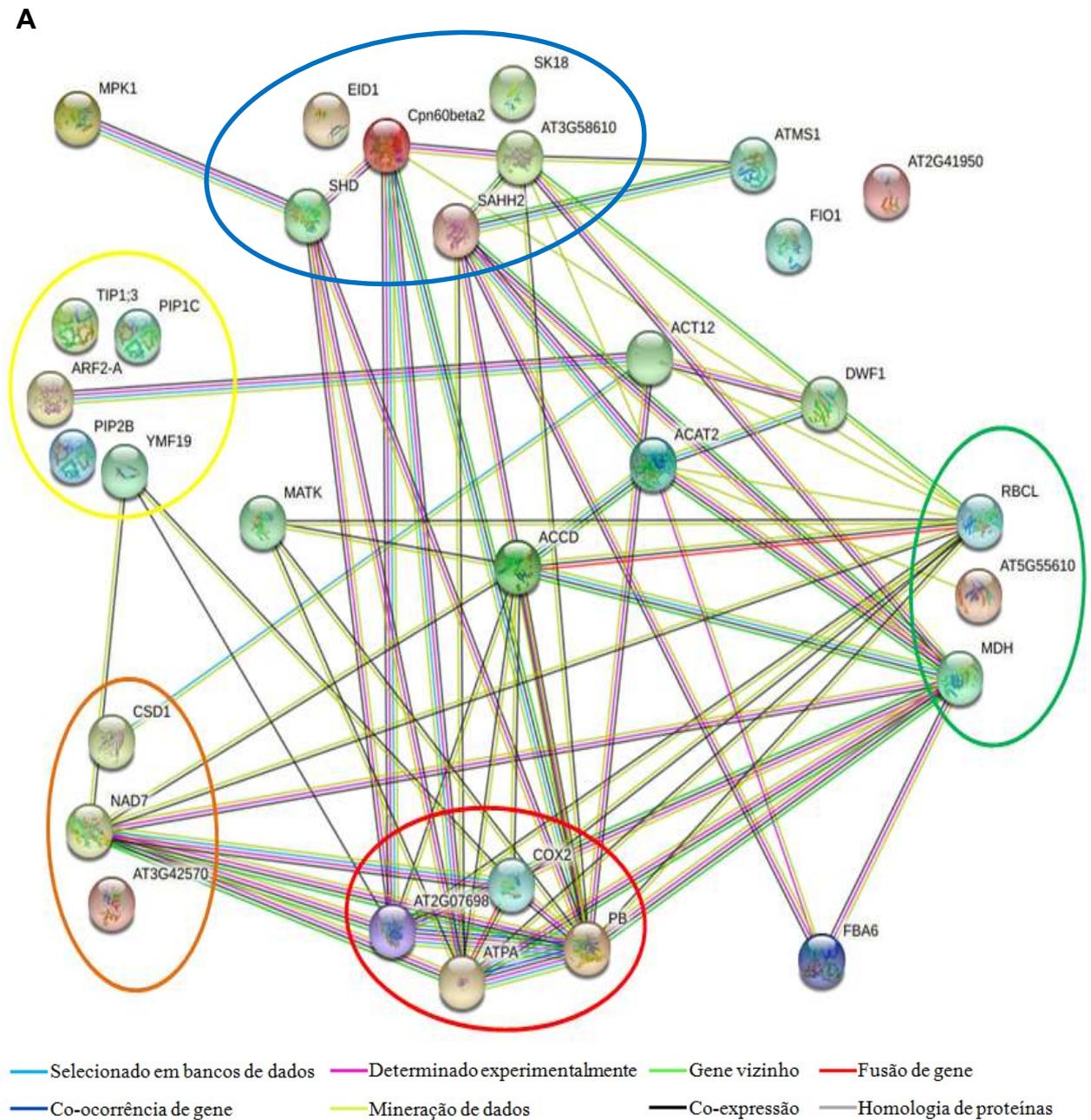


Figura 20. Provável rede de interação de proteínas diferencialmente acumuladas em sementes semeadas de *C. procera* após análise de bioinformática na plataforma STRING. **A** - Controle: sementes semeadas não expostas ao campo magnético; **B** - PCM: sementes semeadas pré-tratadas em campo magnético; **C** - CM: sementes semeadas expostas a campo magnético. Cada nó representa uma proteína e as linhas mais espessas representam fortes associações entre as proteínas. As relações entre os códigos e o nome das proteínas da rede de interação são mencionadas na Tabela 1 do apêndice A. O grupo de proteínas associadas com o metabolismo de proteínas, transporte, energia, fotossíntese, homeostase redox são representadas pelos círculos azul, amarelo, vermelho, verde e laranja, respectivamente. (Continua)

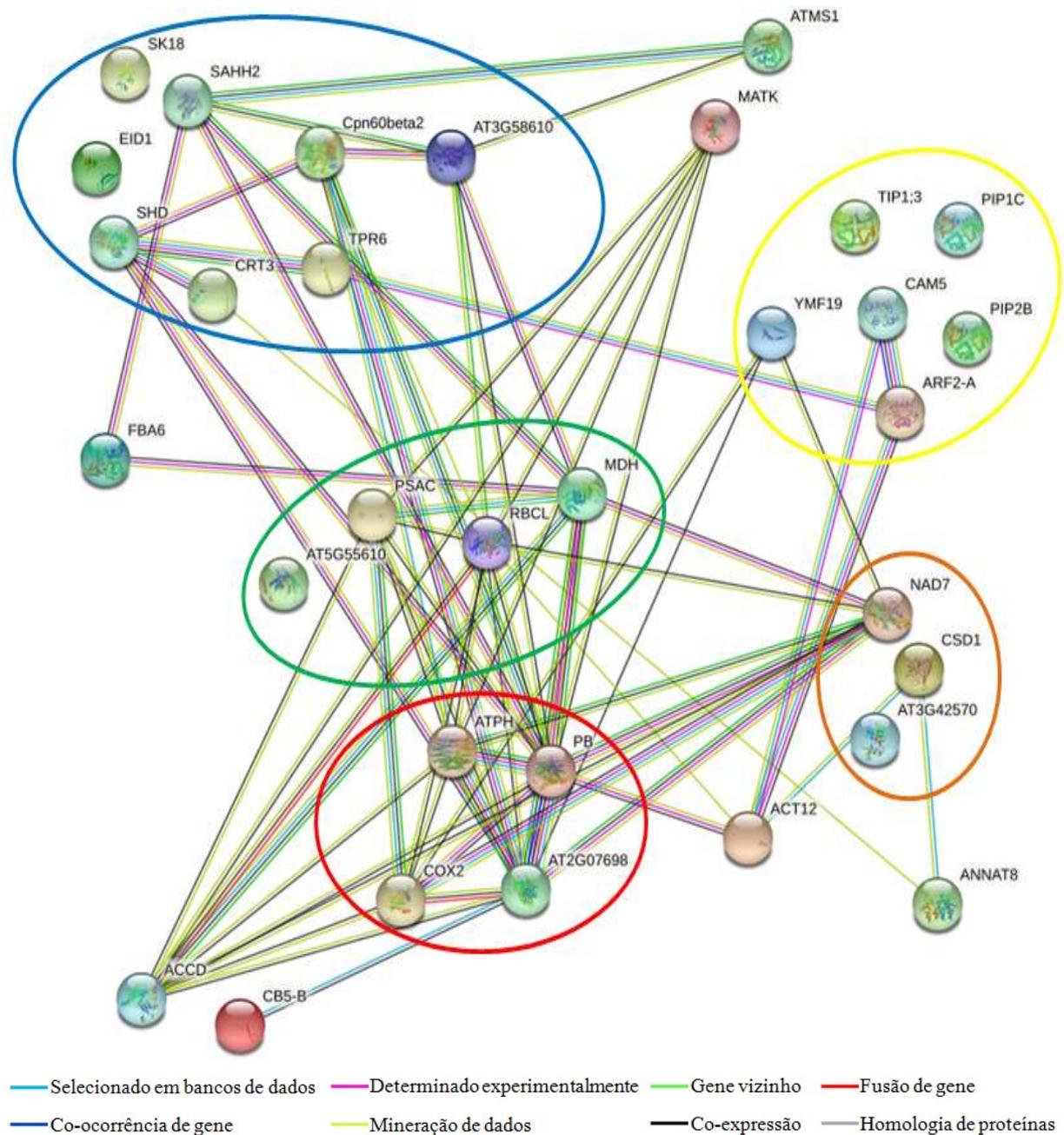
B

Figura 20. Provável rede de interação de proteínas diferencialmente acumuladas em sementes semeadas de *C. prosera* após análise de bioinformática na plataforma STRING. **A** - Controle: sementes semeadas não expostas ao campo magnético; **B** - PCM: sementes semeadas pré-tratadas em campo magnético; **C** - CM: sementes semeadas expostas a campo magnético. Cada nó representa uma proteína e as linhas mais espessas representam fortes associações entre as proteínas. As relações entre os códigos e o nome das proteínas da rede de interação são mencionadas na Tabela 1 do apêndice A. O grupo de proteínas associadas com o metabolismo de proteínas, transporte, energia, fotossíntese, homeostase redox são representadas pelos círculos azul, amarelo, vermelho, verde e laranja, respectivamente. (Continua)

C

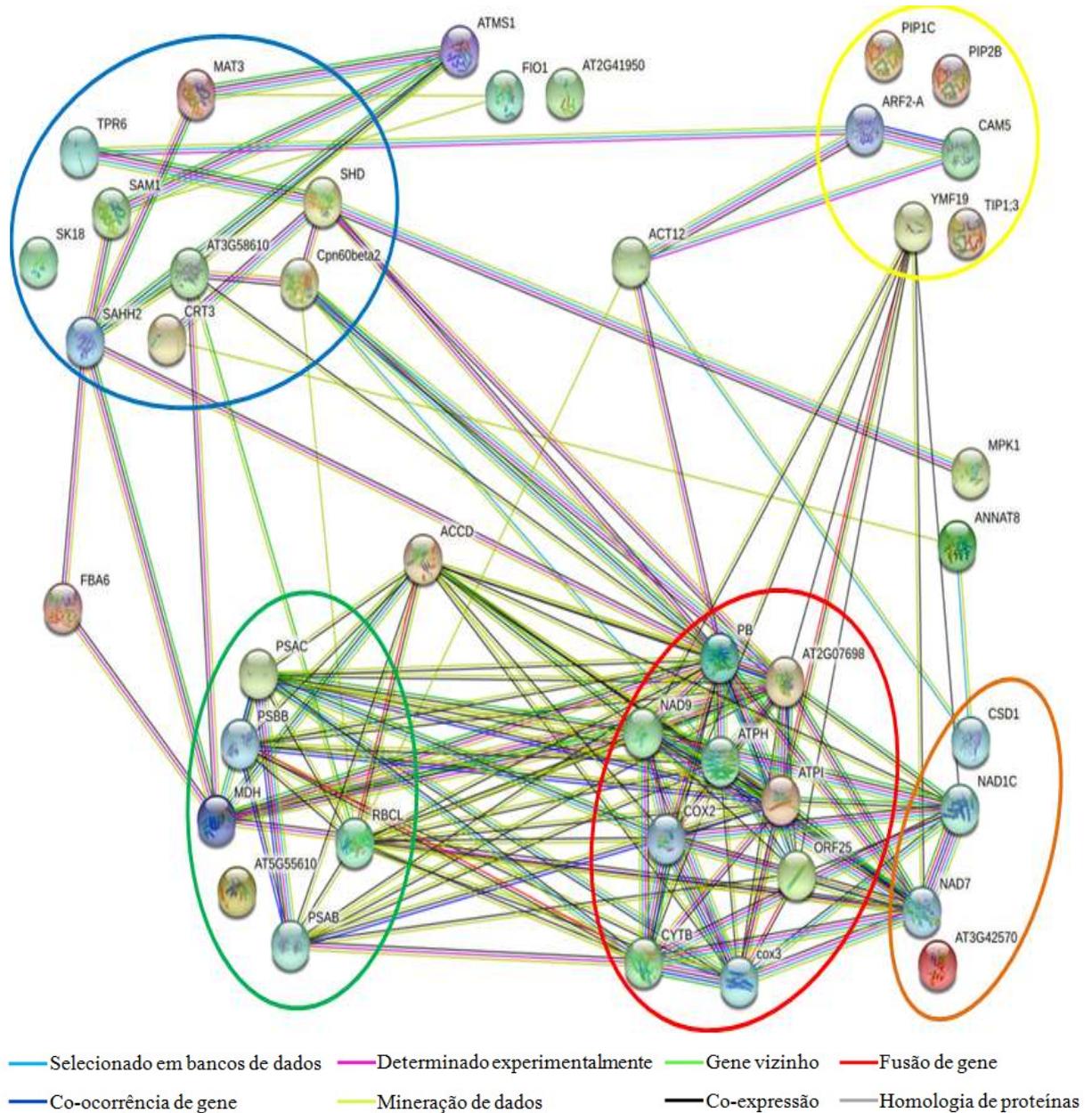


Figura 20. Provável rede de interação de proteínas diferencialmente acumuladas em sementes semeadas de *C. procera* após análise de bioinformática na plataforma STRING. **A** - Controle: sementes semeadas não expostas ao campo magnético; **B** - PCM: sementes semeadas pré-tratadas em campo magnético; **C** - CM: sementes semeadas expostas a campo magnético. Cada nó representa uma proteína e as linhas mais espessas representam fortes associações entre as proteínas. As relações entre os códigos e o nome das proteínas da rede de interação são mencionadas na Tabela 1 do apêndice A. O grupo de proteínas associadas com o metabolismo de proteínas, transporte, energia, fotossíntese, homeostase redox são representadas pelos círculos azul, amarelo, vermelho, verde e laranja, respectivamente. (Conclusão)

Análises proteômicas realizadas em legumes sob estresse abiótico também demonstraram diferentes relações existentes entre as proteínas dos diferentes grupos: metabolismo de proteína, fotossíntese, defesa contra estresse, como as que foram encontradas no presente trabalho (JAN et al., 2021). Além disso, os resultados encontrados sobre as sementes semeadas tratadas com campo magnético estão em consonância com os dados apresentados por Sarraf et al., (2020), onde o tratamento com campo magnético em sementes também antecipou a germinação das sementes em relação às sementes do tratamento controle, bem como melhorou parâmetros de crescimento e desenvolvimento da planta. Adicionado a isso foi verificada também mudança no perfil proteico das plantas originadas de sementes expostas ao campo magnético em momentos pré-semeadura.

Os parâmetros de germinação das sementes semeadas, pré-tratadas em campo magnético (PCM), e das sementes semeadas em campo magnético (CM) aumentaram em comparação ao grupo controle. Além disso, os parâmetros de germinação das sementes semeadas do grupo CM aumentaram em relação às sementes do grupo PCM, indicando que a semeadura em campo magnético influenciou no processo de germinação, melhorando os parâmetros do grupo CM em relação aos demais grupos. Foi registrado também uma redução na atividade da CAT e um maior conteúdo de peróxido de hidrogênio tanto no grupo PCM, quanto no grupo CM o que indica a ocorrência de um estresse oxidativo nas sementes desses grupos.

Ao ser analisado o proteoma das sementes do grupo controle, PCM e CM foram registradas mudanças principalmente nas proteínas diferencialmente acumuladas relacionadas ao metabolismo de proteína, à homeostase redox, à fotossíntese, à defesa contra estresse e ao transporte. Essa análise revelou uma relação entre a aceleração da germinação das sementes de *C. procera*, registrada nos parâmetros de germinação dos grupos de sementes PCM e CM, e o metabolismo das sementes semeadas dos grupos tratados com campo magnético, PCM e CM.

Foram registradas mudanças no grupo de proteínas com diferentes funções indicando que as sementes semeadas e tratadas com campo magnético estavam mais próximas do estágio de plântula que as sementes do grupo controle. Somado a isso, proteínas relacionadas com a defesa da planta contra estresses bióticos e abióticos surgiram como exclusivas nos proteomas analisados indicando que além de acelerar o crescimento e desenvolvimento da planta o campo magnético pode preparar a planta para responder melhor a um desses tipos de estresses. A relação do campo magnético e sementes de *Calotropis procera* descobertas estão esquematizadas na Figura 21, para melhor entendimento.

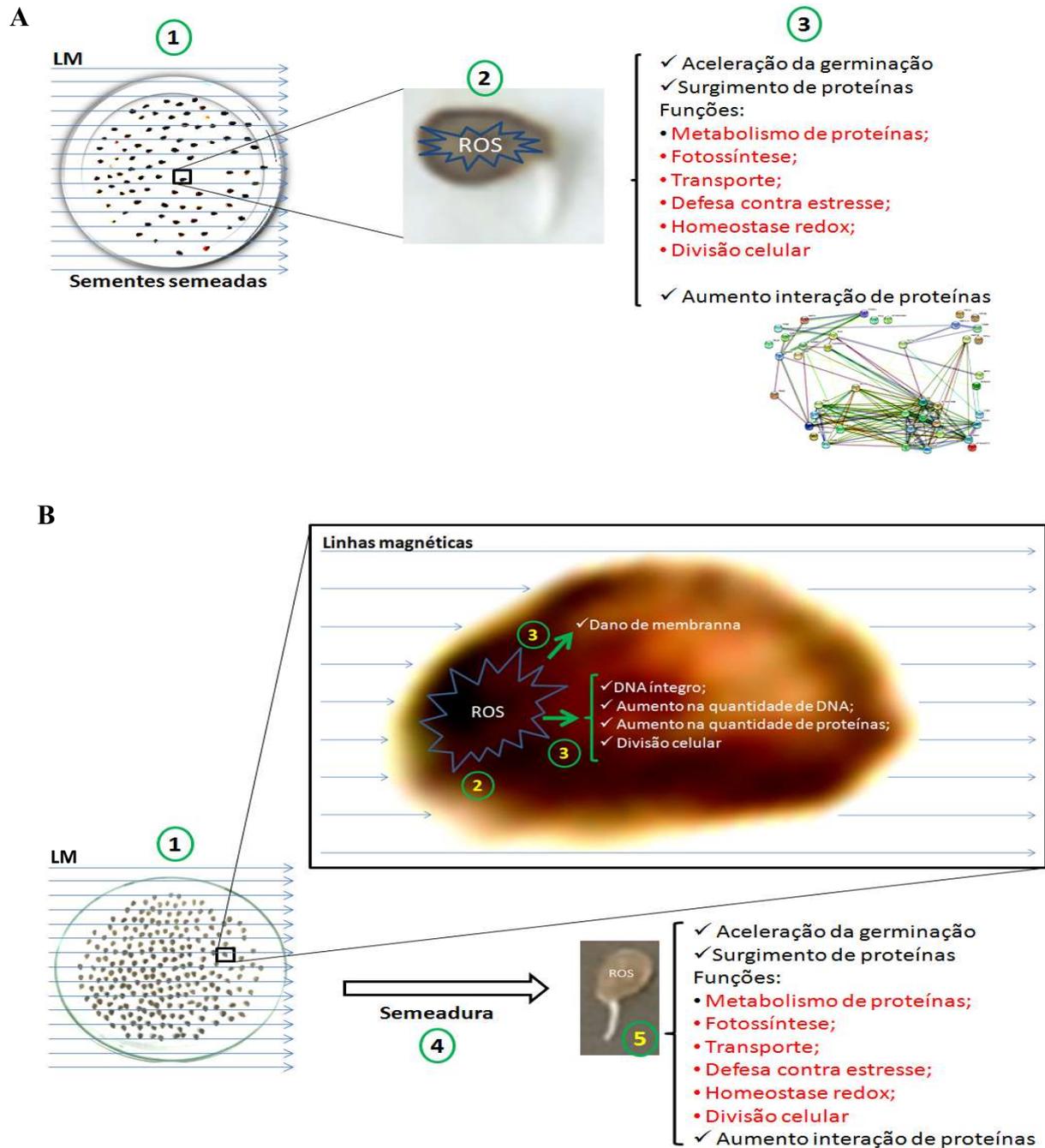


Figura 21. Representação esquemática de mudanças metabólicas em sementes de *Calotropis procera* semeadas em campo magnético (CM) e semeadas após tratamento em campo magnético pré-semeadura (PCM). **A** - Sucessões de eventos em CM: **1**- As sementes são semeadas em campo magnético; **2** - O campo magnético causa acúmulo de ROS na semente de *C. procera*; **3**- O acúmulo de ROS estimula mudanças metabólicas e desenvolvimento da planta. **B** - Sucessões de eventos em PCM: **1** - As sementes são expostas ao campo magnético antes da semeadura; **2**- O campo magnético causa acúmulo de ROS na semente de *C. procera*; **3**- O acúmulo de ROS provoca danos à membrana celular, mas aumenta o processo de divisão celular; **4**- Semeadura sementes de *C. procera* pré-tratadas em campo magnético; **5** - O acúmulo de ROS estimula mudanças metabólicas e desenvolvimento da planta. **LM** - Linha Magnética.

6 CAPÍTULO III: EFEITO DE CAMPO MAGNÉTICO SOBRE PLÂNTULAS E CALOS DE *CALOTROPIS PROCERA IN VITRO*

6.1 INTRODUÇÃO

A maioria das pesquisas envolvendo campo magnético e planta é realizada com sementes de plantas de importância agrônômica. Dessa forma as análises realizadas são, na maior parte, em plântulas originadas a partir de sementes pré-tratadas com campo magnético. Outros estudos envolvendo plantas e campo magnético realizados com sementes envolveram a exposição durante a semeadura, diferentemente do tratamento de sementes em campo magnético em momentos pré-semeadura.

Bukhari et al., (2021) registraram que plântulas de girassol (*Helianthus annuus* L.) quando submetidas ao campo magnético de 50 mT e 80 mT apresentaram melhora na germinação de sementes, aumento do rendimento da cultura, bem como aumento de atividade antioxidante, verificadas na extração do óleo das sementes.

Segundo Belyavskaya, (2004) plântulas de ervilha (*Pisum sativum* L.) foram submetidas a um campo magnético de 1 nT e foi verificado um aumento de 41 % na duração do ciclo celular. Em plântulas de linho (*Linum usitatissimum* L.) esse aumento foi de 30 %, enquanto em plântulas de lentilha (*Lens culinaris*) esse aumento na duração do ciclo celular foi de 33 %, o que retardou o crescimento dessas plântulas.

Sementes de grão de bico (*Cicer arietinum* L.) foram tratadas com um campo magnético de 100 mT para avaliação do efeito do tratamento magnético no cultivo dessas sementes em condições de estresse salino. Os resultados desse trabalho registraram uma maior taxa de germinação nas sementes pré-tratadas em campo magnético e um aumento de parâmetro de crescimento nas plântulas originadas das sementes pré-tratadas em campo magnético. Foram aumentados o comprimento das raízes, o comprimento da parte aérea, e índices de vigor das plântulas sob diferentes concentrações de sal. Além disso foi registrada também uma maior dinâmica de absorção de água, o que foi sugerido pelo estudo como uma forma de hidratação das enzimas das sementes fornecendo assim uma alta taxa de germinação (THOMAS et al., 2013).

Dhiman et al., (2018) realizaram uma pesquisa com plântulas de *Arabidopsis thaliana* para a verificação da expressão gênica, nessas plantas submetidas a um campo magnético próximo de zero e um campo magnético de 188 μ T. Essa pesquisa testou a resposta da planta à luz azul e à luz vermelha. Nessa pesquisa foi verificada a recepção dos estímulos magnéticos pela planta. Diferentemente das outras pesquisas, foi analisado nesse estudo, que os genes do criptocromo e do fitocromo têm participação na recepção dos estímulos magnéticos, mas não

são únicos. Esse estudo concluiu também que a mudança de direção do campo magnético afeta a quantidade de proteínas de ligação com a clorofila a e b.

Assim como os trabalhos relatando a exposição de plântulas ao campo magnético são também escassos os relatos sobre a exposição de calos a campo magnético. Os calos são formados a partir de métodos de cultura *in vitro* de células e de tecidos vegetais. Esses métodos têm sua base no conceito de totipotência e são ferramentas muito eficientes utilizadas para a preservação e propagação de genótipos com germoplasma superior, bem como ser uma ferramenta que pode proporcionar um aumento na variabilidade genética (FEHÉR, 2019). Dessa forma um calo é um tecido transitório formado por células desdiferenciadas, ou seja, células diferenciadas que retornaram a condição de células indiferenciadas, ou ainda, os calos são o resultado de uma reprogramação celular, devido a essa característica essas células são capazes de expressar uma profunda variedade de genes (IKEUCHI et al., 2018).

Sytnik et al., (1984) ao induzirem calos de *Haplopappus gracilis*, em duas linhagens diferentes, os submeteu à exposição ao campo magnético próximo a zero e registrou um decréscimo na produção de biomassa de calos cultivados das duas linhagens.

Em um estudo com melão amargo (*Mormodica charantia* L.) foi realizada a indução de calos de tecido proliferativo selecionado. O trabalho em questão teve o objetivo de investigar a influência do campo magnético em diferentes intensidades. Foi registrada uma influência positiva da exposição dos calos ao campo magnético. Tal exposição proporcionou o aumento de biomassa, um aumento da divisão celular, um aumento de crescimento, bem como um aumento do conteúdo de polifenóis (ALINA et al., 2018).

Nos capítulos anteriores deste trabalho foram abordadas a exposição de sementes a campo magnético e registradas várias mudanças nos parâmetros de germinação. Além disso, a partir de análises bioquímicas foram identificadas que podem ser relacionadas às mudanças registradas nos parâmetros de crescimento. Nesta seção será abordada a influência do campo magnético de 2 mT sobre um estágio diferente de *Calotropis procera*. Além disso, será abordada a influência desse mesmo campo sobre calos provenientes de hipocótilo de *C. procera*. Para isso foram levantadas análises de parâmetros de crescimento de plântulas e calos, bem como análises de acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) e possíveis danos ocasionados à membrana e ao DNA por provocado um acúmulo de ROS. Além disso, foi levantado também o conteúdo de pigmentos fotossintéticos, além do conteúdo de lignina em calos.

6.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

6.2.1 *Material biológico*

As plântulas e calos utilizados para os experimentos deste capítulo foram originadas a partir de sementes de *Calotropis procera* sem exposição ao campo magnético, coletadas e selecionadas conforme item 5.1 deste trabalho.

6.2.1.1 *Plântulas de Calotropis procera*

Sementes de *Calotropis procera* foram desinfectadas, conforme item 5.3 já descrito neste trabalho. Posteriormente as sementes foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) 1/2 força, 2 % de sacarose e 0,7 % de ágar pH 5,8. Os tubos com as sementes semeadas foram colocados em sala de cultivo com fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro. Todo o procedimento antes de colocar os tubos na sala de cultivo foi realizado em câmara de fluxo laminar. Após abertura dos cotilédones, aproximadamente 23 dias após semeadura, as plântulas foram submetidas ao tratamento com campo magnético.

6.2.1.2 *Indução de calos de Calotropis procera*

Plântulas de *Calotropis procera* foram obtidas a partir de sementes não cultivadas *in vitro*, de acordo com o processo citado no item anterior 11.1.1. Após as plântulas abrirem os cotilédones, segmentos de hipocótilo foram cultivados em meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) 1/2 força, 2 % de sacarose e 0,7 % de ágar (TEIXEIRA et al., 2011) pH 5,8, suplementado com reguladores de crescimento: ácido naftaleno acético (ANA) 3 μ M e cinetina (CIN) 4,6 μ M (SURI e RAMAWAT 1995). O inóculo dos explantes foi realizado em placas de Petri contendo 25 mL de meio MS suplementado com 3 μ M de ANA e 4,6 μ M de CIN, em câmara de fluxo laminar. As placas de Petri contendo os explantes foram transferidas para sala de cultivo com fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro, para o desenvolvimento dos calos. Após 28 dias os calos foram subcultivados em meio MS com o mesmo método citado acima e após 28 dias foram submetidos a tratamento com campo magnético.

6.2.2 Aplicação do campo magnético

6.2.2.1 Aplicação do campo magnético em plântulas de *C. procera*

Após 23 dias as plântulas de *Calotropis procera* com cotilédones abertos foram divididas em grupo controle, sem exposição ao campo magnético, e grupo tratado com o campo magnético, plântulas expostas a campo magnético. As plântulas deste grupo foram colocadas sob campo magnético de 2 mT em uma bobina de Helmholtz, por 5 dias de forma contínua, conforme descrito no item 5.2. Após o tratamento com o campo magnético, foram analisados parâmetros de crescimento e realizados ensaios bioquímicos.

6.2.2.2 Aplicação do campo magnético nas culturas de calos

Após 28 dias de subcultivo, similarmente ao item anterior, 11.2.1, os calos subcultivados em placas de Petri contendo meio MS suplementado com 3 μM de ANA e 4,6 μM de CIN foram divididos em grupo controle, sem exposição a campo magnético, e grupo tratado com o campo magnético, calos expostos por cinco dias ao campo magnético de 2 mT. Após aplicação do tratamento os calos foram coletados e submetidos às análises de parâmetros de crescimento e ensaios bioquímicos.

6.2.3 Parâmetros de crescimento

6.2.3.1 Parâmetros de crescimento das plântulas

Após os cinco dias de exposição de plântulas de *Calotropis procera* ao campo magnético de 2 mT, foram realizadas a aferição de parâmetros de crescimento como: massa fresca e massa seca (metodologia descrita neste trabalho no item 5.5); comprimento da raiz; comprimento do hipocótilo e comprimento médio das plântulas. Todos esses parâmetros seguiram a metodologia descrita por Balouchi e Modarres, (2009).

6.2.3.2 Parâmetros de crescimento dos calos

Todos os parâmetros descritos foram avaliados após 5 dias de exposição de calos de *Calotropis procera* ao campo magnético de 2 mT. A determinação de massa fresca e massa seca seguiram a metodologia descrita no item 5.5 deste trabalho.

A taxa de crescimento relativo dos calos foi determinada segundo a fórmula: $TCR=100 \times (M_f - M_0)/M_0$. Onde TCR é a taxa e crescimento relativo; M_f é a massa fresca no final de experimento; e M_0 é a massa fresca no início do experimento (SOUZA et al., 2017).

O teor de umidade seguiu a seguinte fórmula: $TU=100 \times (M_f - M_s) / M_f$. Onde TU é o teor de umidade; M_f é a massa fresca dos calos e M_s a massa seca dos calos (LOKHANDE et al., 2010).

6.2.4 Extrato enzimático

Para a obtenção do extrato enzimático seguiu-se o método mencionado no Item 5.7 desta pesquisa.

6.2.5 Dosagem de proteínas totais solúveis

A quantificação das proteínas totais solúveis foi realizada pelo método de Bradford, (1976) de acordo com a metodologia já descrita no item 5.8 deste trabalho.

6.2.6 Atividade das enzimas antioxidantes

As atividades das enzimas antioxidantes POX, CAT e APX foram determinadas nesta seção da pesquisa, segundo as metodologias aplicadas nos itens 5.9, 5.10 e 5.11, como relatado anteriormente.

6.2.7 Conteúdo de peróxido de hidrogênio

A extração e quantificação do peróxido de hidrogênio contido no material biológico desta pesquisa seguiu a metodologia descrita por Gay et al., (1999) como relatada no item 5.12 deste trabalho.

6.2.8 Análise da peroxidação lipídica

Para determinar a peroxidação lipídica foi seguido o método de Heath e Packer (1968) já descrito no item 5.13.

6.2.9 Ensaio TUNEL fluorométrico

Para a análise da degradação do DNA das plântulas e calos foi realizado o ensaio fluorométrico de TUNEL (TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling), como descrito no item 5.15 desta pesquisa.

6.2.10 Quantificação de clorofila e lignina

A quantificação de clorofila e lignina nas amostras foi realizada de acordo com o método de Donaldson, (2020) com modificações. Para isso foi utilizada a intensidade de fluorescência emitida pelas moléculas e captadas pelo microscópio confocal através do software Carl Zeiss Laser Scanning Microscope (LSM 710, 20× objective, Carl Zeiss, Jena, Germany, Brazil), utilizado no microscópio confocal. Para a molécula de clorofila a emissão da fluorescência ocorreu na cor vermelha em um intervalo de 720 a 730 nm. Para a molécula de lignina a emissão da fluorescência ocorreu na luz azul a 488 nm.

6.2.11 Pigmentos fotossintéticos

A extração dos pigmentos fotossintéticos foi realizada, conforme a metodologia de Welburn, (1994), com modificações. Foram colocadas 50 mg de amostra em tubos de ensaio com 2 mL de solução de dimetilsulfóxido (DMSO), saturado com carbonato de cálcio (CaCO₃) por um período de 24 horas sob ausência de luz. Após esse período a solução foi coletada e centrifugada (10.000 rpm, 10 min, 25 °C). A solução com os pigmentos fotossintéticos foi então lida no espectrofotômetro a 480 nm, 649 nm e 665 nm.

6.2.12 Análise estatística

A pesquisa foi completamente randomizada, e realizada em 3 replicatas temporalmente independentes. Em relação às plântulas foram analisadas 180 plântulas, sendo 90 do grupo

tratado com o campo magnético (2 mT) e 90 do grupo controle. Em cada replicata foram utilizadas 30 plântulas para o grupo tratado com o campo magnético e 30 do grupo não tratado com o campo magnético. Para os calos foram analisados 270 calos, sendo 135 do grupo tratado com o campo magnético e 135 do grupo não tratado com campo magnético. Em cada replicata foram utilizados 45 calos para o grupo tratado com o campo magnético e 45 para o grupo controle. Tanto para as plântulas quanto para os calos, as médias obtidas do grupo tratado com campo magnético foram comparadas com as médias do grupo não tratado. Os dados foram analisados pelo software GraphPad Prism.5 através do teste t de Student.

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.3.1 Parâmetros de crescimento

Após o estudo de *C. procera* na fase de sementes, a outra parte dessa pesquisa foi conduzida com plântulas cultivadas *in vitro*. Para isso, após 23 dias de cultivo as plântulas foram utilizadas para a medição alguns parâmetros de crescimento, como: comprimento de hipocótilo, comprimento da raiz, massa fresca e massa seca das plântulas.

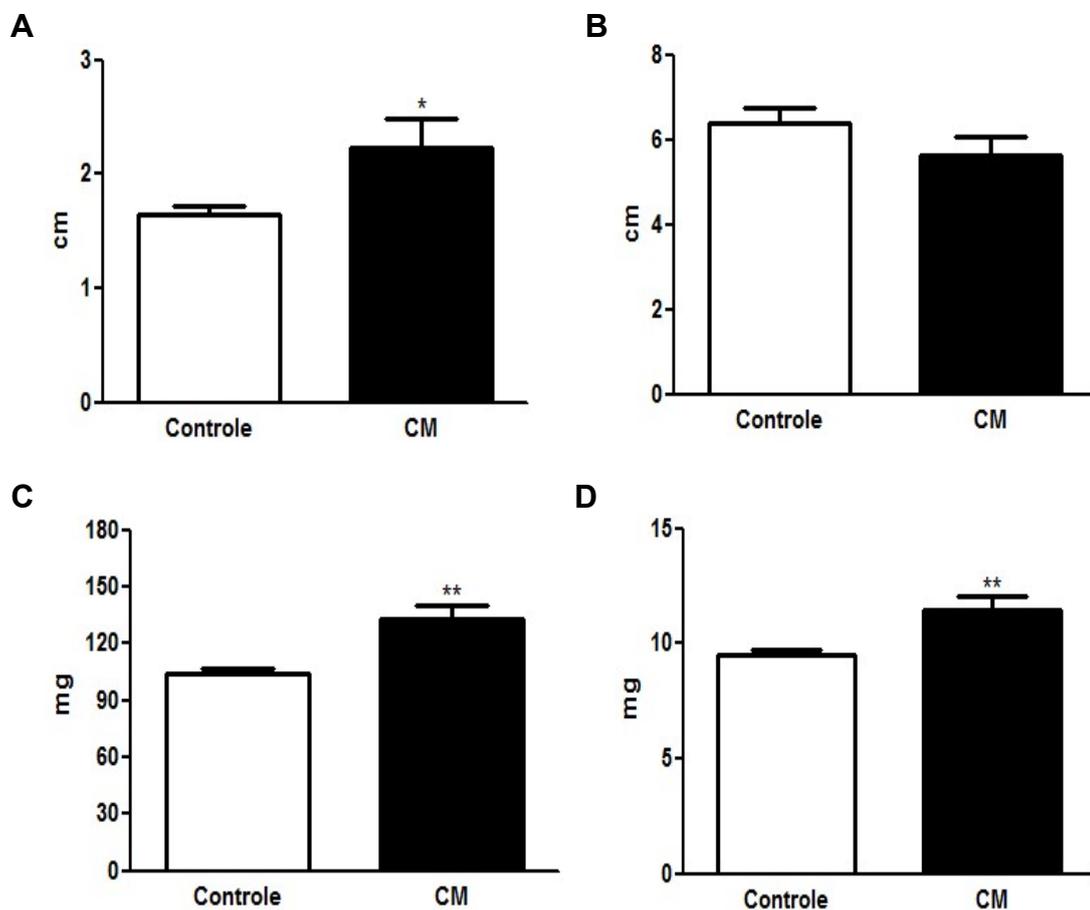


Figura 22. Parâmetros de crescimento. **A** - Comprimento do hipocótilo; **B** - Comprimento da raiz; **C** - Massa fresca; e **D** - Massa seca. Controle - Plântulas de *C. procera* não expostas ao campo magnético; CM - Plântulas de *C. procera* expostas ao campo magnético. Asteriscos representam diferença significativa entre os grupos como se segue: * para $p < 0,05$; ** para $p < 0,01$; e *** para $p < 0,001$.

As plântulas expostas ao campo magnético apresentaram um comprimento de hipocótilo 26 % maior que o hipocótilo das plântulas do grupo controle (Figura 22A). Em relação ao comprimento da raiz, as plântulas expostas ao campo magnético demonstraram um aumento de

11,88 % em comparação com as raízes das plântulas do controle (Figura 22B). A massa fresca das plântulas expostas ao campo magnético aumentou 21,69 % em relação a massa fresca das plântulas controle (Figura 22C). A massa seca das plântulas tratadas com campo magnético aumentou 16,81% em relação a massa seca das plântulas não expostas ao campo magnético (Figura 22D).

Parâmetros semelhantes também foram registrados em plântulas de lentilha (*Lens culinaris* L) expostas a campo magnético, que apresentaram aumento de parâmetros de crescimento e aumento de biomassa (SHABRANGI et al., 2009).

Além das plântulas, foram realizadas medições de parâmetros de crescimento em calos cultivados a partir de hipocótilo de plântulas de *C. procera* em meio MS contendo ANA e cinetina. Para os calos foram medidos os seguintes parâmetros de crescimento: massa fresca, massa seca, conteúdo de água e taxa de crescimento relativo.

Tabela 3 - Parâmetros de crescimento em calos de *Calotropis procera* expostos ao campo magnético

Grupo	Massa Fresca	Massa Seca	TCR	CA (%)
Controle	115.0 ± 11.18	26.73 ± 1.148	3.243 ± 0.3399	71.51 ± 2.173
CM	152.6 ± 8.80*	31.40 ± 1.275**	4.387 ± 0.2679*	78.32 ± 1.142**

Controle - Calos de *C. procera* não expostos ao campo magnético;

CM - Calos de *C. procera* expostos ao campo magnético;

TCR - Taxa de Crescimento Relativa;

CA - Conteúdo de Água;

Asteriscos representam diferença significativa entre os grupos como se segue: * para $p < 0,05$; ** para $p < 0,01$; e *** para $p < 0,001$.

Os calos expostos ao campo magnético apresentaram uma massa fresca 32,70 % maior que os calos não expostos. Em relação à massa seca os calos expostos ao campo demonstraram um aumento de 17,47 % em comparação com os calos do tratamento controle. A taxa de crescimento relativa dos calos submetidos a campo magnético foi 35,28 % maior que a taxa de crescimento relativa dos calos não submetidos ao campo. Em relação ao conteúdo de água foi registrado um aumento de 9,52 % nos calos expostos ao campo em comparação aos calos não expostos.

Consonante com os resultados desta seção, a cultura de tecidos com a planta *Phalaenopsis* Gallant Beau ‘George Vazquez’ sob campo magnético também aumentou a massa fresca e massa seca (TANAKA et al., 2010).

6.3.2 Enzimas antioxidantes

Nos capítulos anteriores, foi verificado que os melhores parâmetros de germinação nas sementes expostas ao campo magnético estariam associados com o estresse oxidativo. Nesta seção também foram realizadas análises na atividade das enzimas antioxidantes. Após análise dos parâmetros de crescimento, foi verificada a análise das enzimas antioxidantes, como POX, CAT e APX, bem como a determinação conteúdo de peróxido de hidrogênio nas plântulas de *C. procera* e nos calos cultivados a partir de plântulas de *C. procera* que foram submetidos à exposição em campo magnético de 2 mT.

Nas plântulas de *C. procera* expostas ao campo magnético foi registrada uma redução de 27,98 % da atividade da POX em relação às plântulas não expostas ao campo (Figura 23A). Já as outras enzimas antioxidantes, CAT e APX, avaliadas nas plântulas de *C. procera* expostas ao campo magnético, não apresentaram diferenças significativas em comparação com as plântulas do tratamento controle (Figuras 23 C e E). O conteúdo de peróxido de hidrogênio foi aumentado 41,46 % nas plântulas expostas ao campo magnético em relação às plântulas do controle (Figura 23G).

Nos calos expostos ao campo magnético foi registrado um aumento da atividade da POX de 86,81 % em relação aos calos do tratamento controle (Figura 23B). Na atividade da CAT foi registrada uma redução de 71,57% nos calos tratados com campo magnético em comparação com os calos não tratados (Figura 23D). A atividade da APX aumentou 42,24% nos calos expostos ao campo magnético quando comparada com a atividade da APX nos calos do tratamento controle (Figura 23F). O conteúdo de peróxido de hidrogênio foi aumentado 43,33% nos calos expostos ao campo magnético em relação aos calos não expostos ao campo (Figura 23H).

Em consonância com os resultados do capítulo anterior, as sementes de *Calotropis procera*, quando tratadas em campo magnético também demonstraram mudanças na atividade das enzimas antioxidantes, bem como no conteúdo de peróxido de hidrogênio. Nesta seção, as plântulas e calos também demonstraram tais comportamentos. Os resultados dos parâmetros de crescimento associados com a atividade das enzimas antioxidantes e o conteúdo de peróxido de hidrogênio encontrados nas plântulas e nos calos estão coerentes com as funções das ROS na planta, pois acionam vias cruciais com um papel de molécula de sinalização, como o peróxido de hidrogênio, e promove o crescimento da planta (MEDINA et al., 2021)

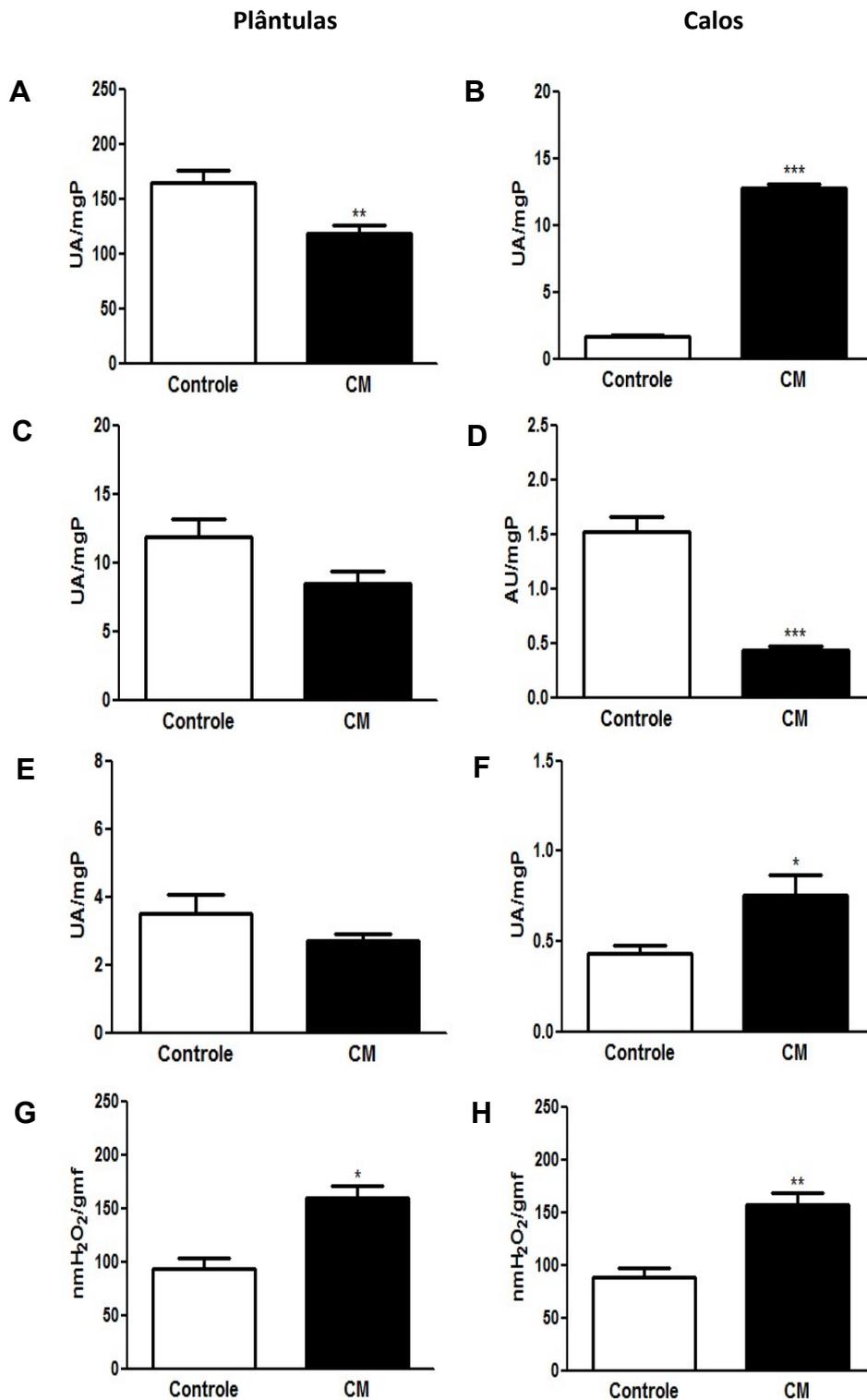


Figura 23. Atividade de enzimas antioxidantes e ROS. **A e B** - Atividade da peroxidase de fenóis (POX); **C e D** - Atividade da catalase (CAT); **E e F** - Atividade da ascorbato peroxidase (APX); e **G e H** - conteúdo de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Controle - plântulas e calos não expostos ao campo magnético; CM - plântulas e calosexpostos ao campo magnético. Letras diferentes reaperentam diferenças significativas entre os grupos para $p < 0,05$.

Shabranghi et al., (2009) em lentilha (*Lens culinaris* L) exposta a campo magnético, também encontrou um desequilíbrio na atividade de enzimas antioxidantes relacionadas com o aumento de parâmetro de crescimento da planta.

Após obtenção dos resultados de acúmulo de ROS nas plântulas e calos expostos ao campo magnético em relação aos seus respectivos controles, foram realizadas análises de um possível dano de membrana e um possível dano ao DNA nas amostras tratadas com campo magnético.

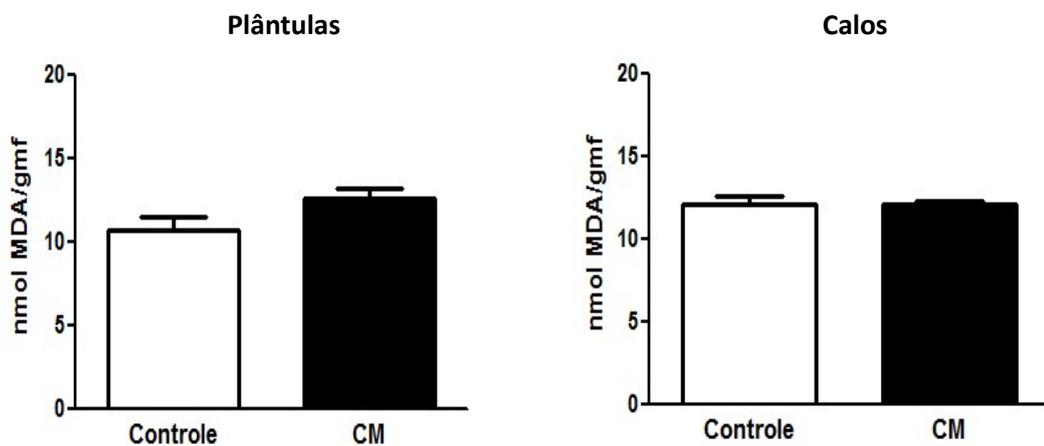


Figura 24. Ensaio de peroxidação lipídica. Barra branca representa as amostras do grupo controle, não expostas ao campo magnético e barra preta representa as amostras expostas a um campo magnético de 2 mT. Asteriscos representam diferença significativa entre os grupos como se segue: * para $p < 0,05$; ** para $p < 0,01$; e *** para $p < 0,001$.

O dano de membrana nas amostras foi verificado pela análise do conteúdo de malondialdeído (FRANÇA et al., 2013). As plântulas de *C. procera* expostas ao campo magnético não demonstraram diferenças significativas no conteúdo de malondialdeído em comparação com as plântulas não expostas ao campo magnético. Os calos expostos ao campo magnético, também não registraram diferenças significativas no conteúdo de malondialdeído, quando comparados aos calos do controle (Figura 24).

Para a verificação do dano de DNA foi realizada a análise por meio do teste de TUNEL (HEATWOLE, 1999). No entanto, como não foi verificado dano de membrana, apenas as amostras de plântulas expostas ao campo magnético foram analisadas para dar consistência ou não ao resultado do dano de membrana. Para isso foram realizados teste de TUNEL com a raiz, caule e folha das plântulas de *C. procera* expostas e não expostas ao campo de 2 mT.

O teste de TUNEL revelou que não houve diferenças significativas na intensidade de fluorescência da fluorosceína em qualquer parte das plântulas expostas ao campo magnético

em relação às plântulas do tratamento controle. Sendo assim não foi registrado dano ao conteúdo de DNA dessas amostras, corroborando o resultado encontrado na análise de dano de membrana.

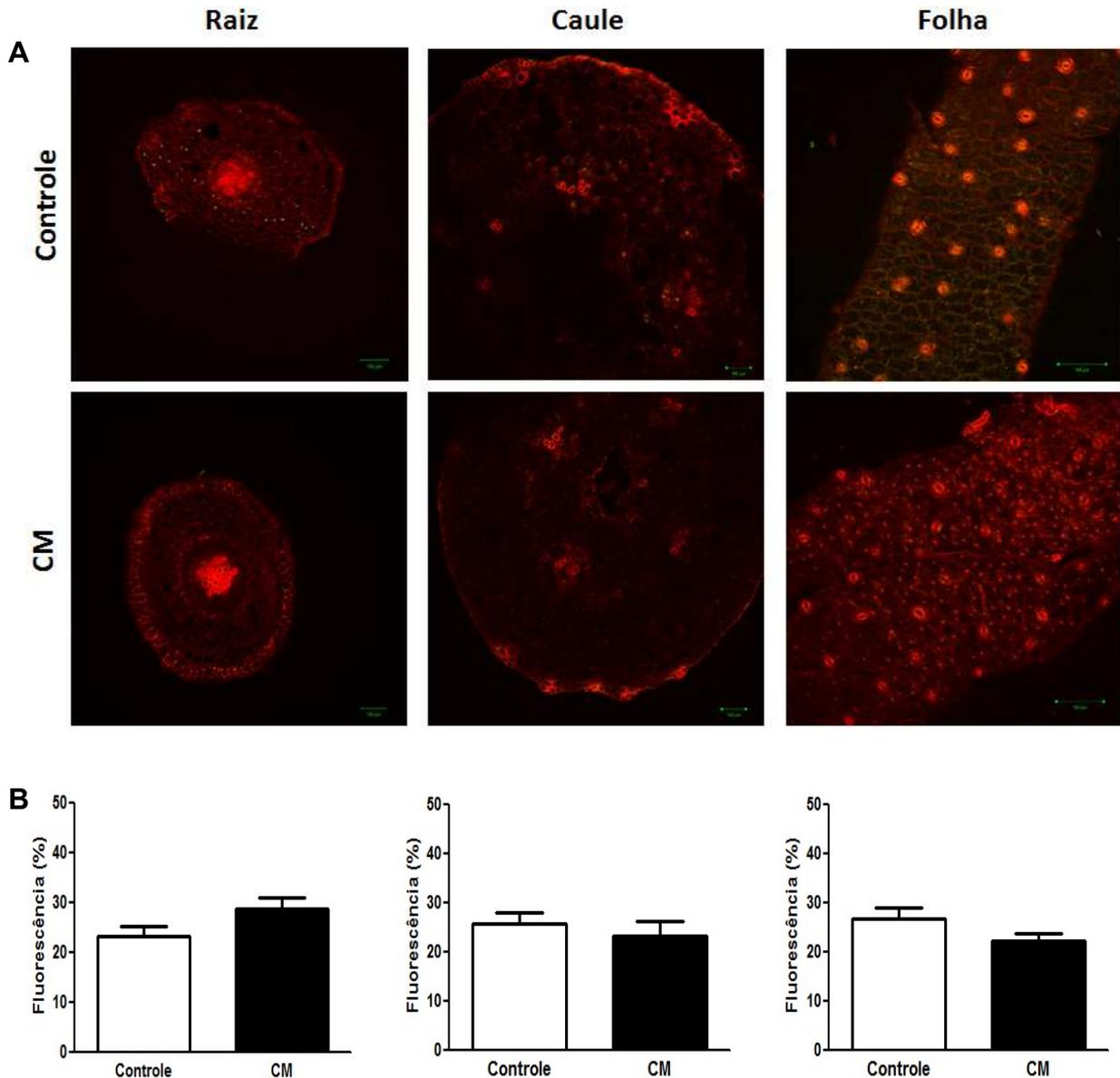


Figura 25. Verificação de integridade de DNA. **A.** Ensaio TUNEL fluorométrico em diferentes partes da plântula de *C. procera* (Barra de escala = 100 μ m). Controle - plântulas não expostas ao campo magnético; CM - plântulas expostas a campo magnético. **B** - Intensidade de fluoresceína correspondente a parte da plântula de *C. procera* do ensaio TUNEL. Barra branca representa as plântulas do grupo controle; barra preta representa as plântulas expostas ao campo magnético de 2 mT. Asteriscos representam diferença significativa entre os grupos como se segue: * para $p < 0,05$; ** para $p < 0,01$; e *** para $p < 0,001$.

Em estudo com organelas celulares, Ishisaka et al., (2000) mostraram que o campo magnético induziu a peroxidação lipídica na célula. No entanto, em um experimento com

células humanas, Amara et al., (2007) não identificaram dano ao DNA após exposição a um campo magnético de 250 mT, corroborando os resultados encontrados nas células dos tecidos da plântula de *C. procera*.

6.3.3 Pigmentos fotossintéticos

Além da análise de um possível estresse oxidativo e seus possíveis danos, foi verificado também o conteúdo de pigmentos fotossintéticos em plântulas de *Calotropis procera* expostas ao campo magnético de 2 mT, tais como o conteúdo de clorofila a, de clorofila b, o conteúdo de clorofila total e o conteúdo de carotenoides. Esses pigmentos foram analisados em três partes da plântula: raiz, caule e folha.

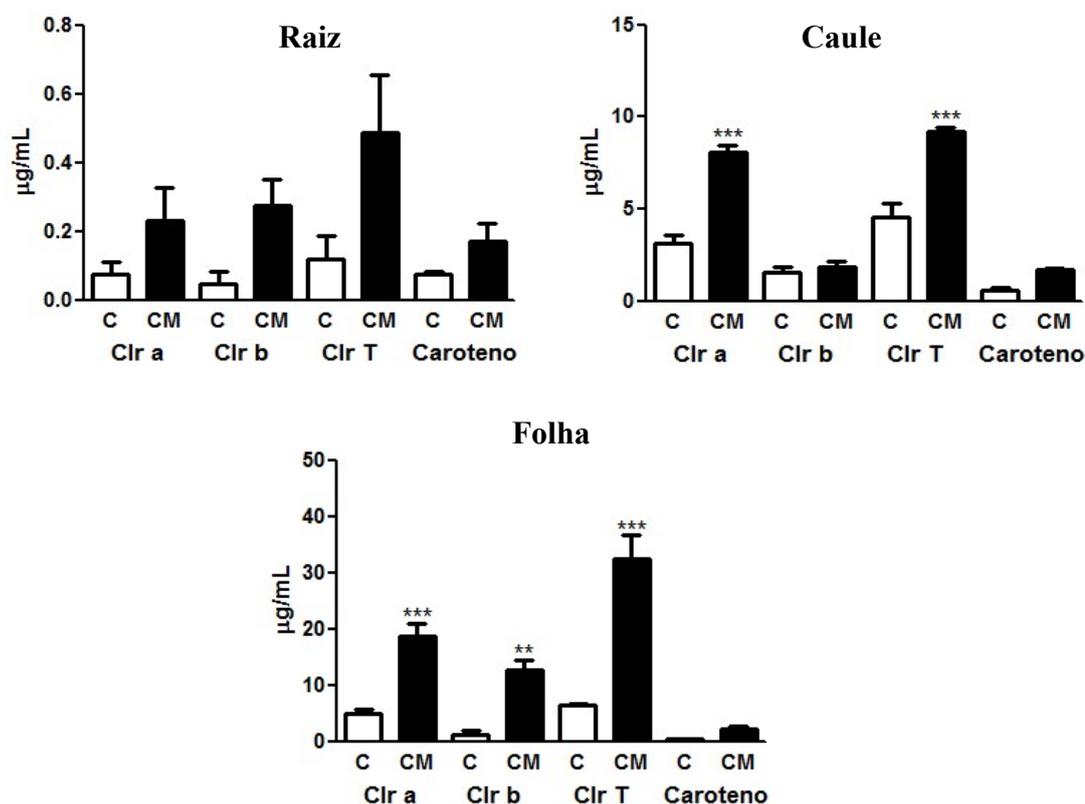


Figura 26. Pigmentos fotossintéticos em diferentes partes da plântula de *C. procera*. C (Plântula controle) e CM (Plântula exposta ao campo magnético). Clr a (Clorofila a), Clr b (Clorofila b), Clr T (Clorofila Total) e Caroteno (Carotenoides). Asteriscos representam diferença significativa entre os grupos como se segue: * para $p < 0,05$; ** para $p < 0,01$; e *** para $p < 0,001$.

Nas raízes não foram registradas diferenças significativas entre os pigmentos extraídos nas plântulas expostas ao campo magnético em comparação com as raízes das plântulas não

expostas. No caule das plântulas expostas ao campo magnético foi registrado um aumento de 61,43 % no conteúdo de clorofila *a* e 50,43 % no conteúdo de clorofila total, não sendo registradas diferenças significativas na clorofila *b* e no conteúdo de carotenoides em relação às plântulas controle. Nas folhas das plântulas expostas ao campo magnético houve aumento de 73,57 % no conteúdo de clorofila *a*. O conteúdo de clorofila *b* também foi aumentado em 89,87 % em relação às plântulas controles e o conteúdo de clorofila total aumentou 80,60 %. Apenas o conteúdo de carotenoides não demonstrou diferença significativa, quando comparado com as folhas das plântulas controle (Figura 26).

Similarmente às análises realizadas com as plântulas, foi verificada as atividades das enzimas antioxidantes, o conteúdo de peróxido de hidrogênio e o dano de membrana nas amostras de calos. Foi investigado também o conteúdo de compostos autofluorescentes, como a clorofila total, nos calos expostos ao campo magnético. Para essa análise, foi utilizada a microscopia confocal. Além disso, o conteúdo de lignina também foi quantificado pela sua autofluorescência emitida dos calos expostos ao campo magnético.

Nos calos expostos ao campo magnético, o conteúdo de clorofila total foi encontrado em uma intensidade de fluorescência aumentada de 63,79 % em relação à intensidade de fluorescência da clorofila emitida pelos calos não expostos ao campo magnético (Figura 27A e B). Em relação ao conteúdo de lignina, a intensidade de fluorescência emitida por esse composto foi reduzida 49,41 % nos calos expostos ao campo magnético, quando comparado aos calos do tratamento controle (Figura 27A e B).

O conteúdo de pigmentos fotossintéticos encontrado nas plântulas e nos calos expostos ao campo magnético adicionado ao menor conteúdo de lignina (REITZ et al., 2021) apresentado pelos calos expostos ao campo magnético estão consonantes com os resultados encontrados nos parâmetros de crescimento da seção 13.1 deste capítulo, pois fornecem bases para um melhor crescimento da plântula, bem como uma alta taxa de crescimento de calos.

Corroborando os resultados desta pesquisa, Baghel et al., (2018) realizaram um estudo para avaliar o efeito de um campo magnético estático em soja submetida ao estresse hídrico de muita água e pouca água. Os efeitos adversos dos estresses foram encontrados em atributos fisiológicos. No entanto, os resultados encontrados indicaram que as plântulas oriundas de sementes tratadas com campo magnético aumentaram os pigmentos fotossintéticos, melhoraram a eficiência do fotossistema II e consequentemente da fotossíntese.

Em outro estudo que corrobora os resultados encontrados, Kataria et al., (2020) registraram um aumento da eficiência do fotossistema II, bem como um aumento de massa

específica e um baixo conteúdo de malondialdeído em plantas de soja que foram originadas de sementes pré-tratadas em campo magnético.

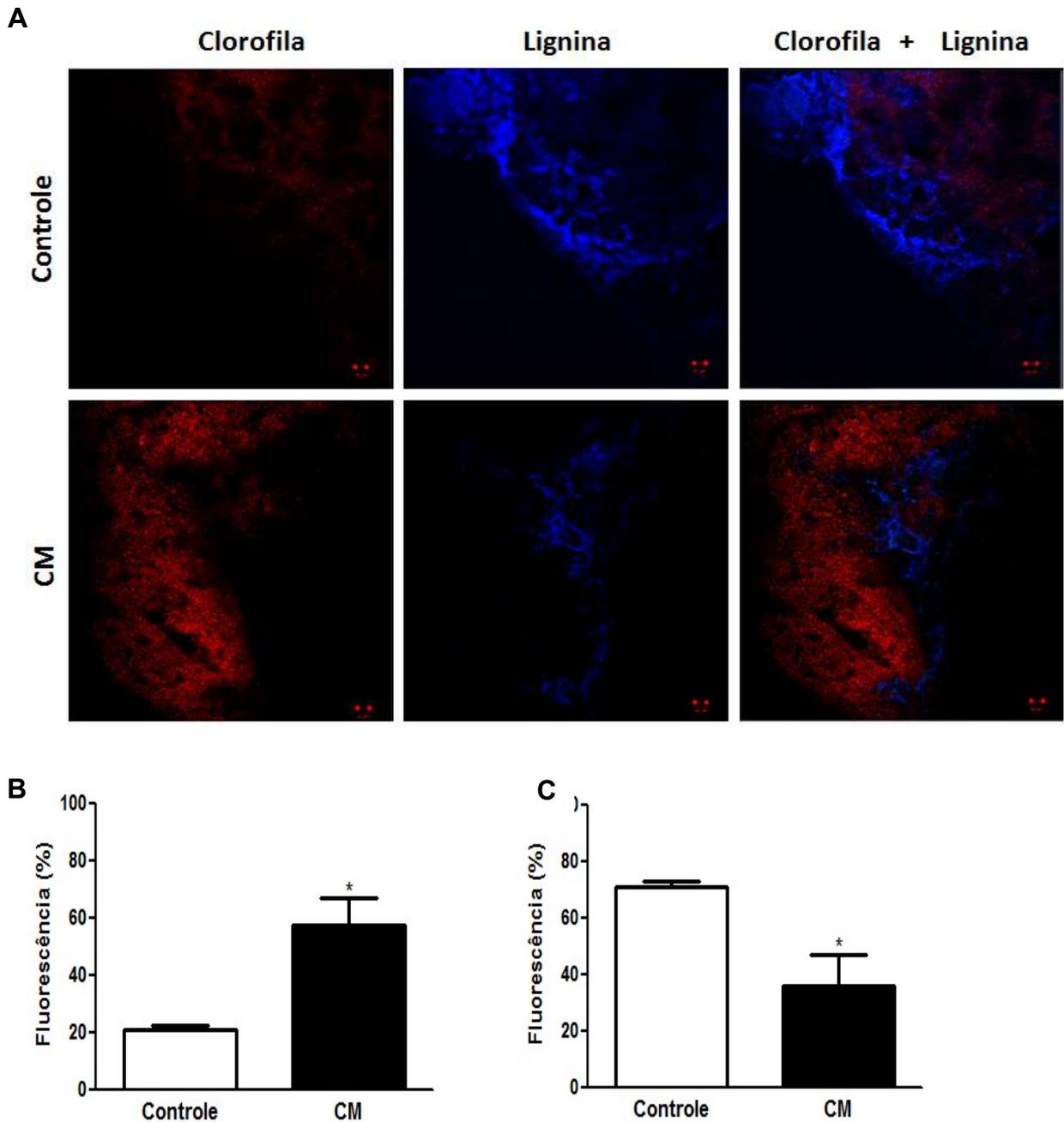


Figura 27. Conteúdo de clorofila e lignina. **A** - Imagem da autofluorescência da clorofila e lignina em calos de *C. procera* por microscopia confocal (Barra de escala = 50 μ m); Clorofila - Fluorescência vermelha; Lignina - Fluorescência azul; **B** - Intensidade da fluorescência da clorofila; **C** - Intensidade da fluorescência da lignina. C (Calos controle) e CM (Calos expostos a campo magnético). Barra branca representa os calos do grupo controle; barra preta representa os calos expostos ao campo magnético de 2 mT. Asteriscos representam diferença significativa entre os grupos como se segue: * para $p < 0,05$; ** para $p < 0,01$; e *** para $p < 0,001$.

Dados os resultados encontrados neste capítulo do trabalho, verificou-se que o campo magnético de 2 mT influenciou tanto no crescimento das plântulas, quanto no crescimento dos calos. Tais parâmetros de crescimento estão associados à ocorrência de acúmulo de ROS, visto que ROS desempenham muitas funções na planta, entre elas a de promoção de crescimento. Concomitante a isso observou-se que a exposição da plântula e do calo de *C. procera* ao campo magnético aumentou o conteúdo de pigmentos fotossintéticos o que se correlaciona ao aumento verificado nos parâmetros de crescimento, já que um maior conteúdo de clorofila melhora a eficiência fotossintética e fornece bases para o crescimento observado nas plântulas e nos calos expostos ao campo magnético. Tudo isso pode ser melhor observado na representação da Figura 28.

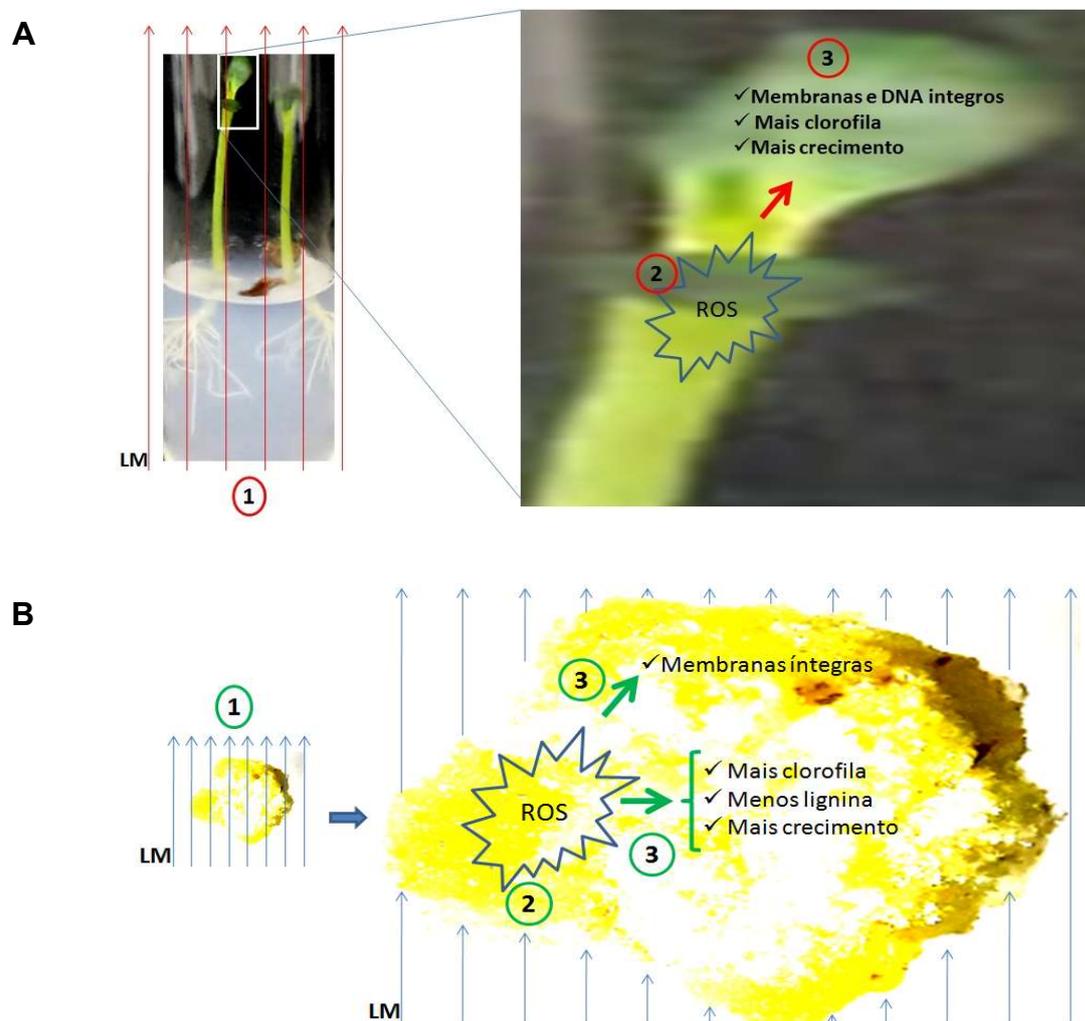


Figura 28. Representação esquemática de mudanças metabólicas em plântulas e calos de *Calotropis procera* expostos a campo magnético. Sucessões de eventos em (A) plântulas e (B) calos: **1**- As plântulas e calos são expostos ao campo magnético; **2** - O campo magnético causa acúmulo de ROS nas plântulas e calos de *C. procera*; **3** - O acúmulo de ROS estimula mudanças metabólicas e de crescimento da planta. LM (Linha Magnética).

7 CONCLUSÃO

A influência do campo magnético foi verificada em *Calotropis procera* nos estágios de semente, plântula e no cultivo *in vitro* de calos. O efeito da exposição ao campo magnético foi avaliado a partir da análise de parâmetros de germinação de sementes e parâmetros de crescimento de plântulas e calos. Em adição a isso foram levantadas respostas metabólicas nos diferentes estágios de *C. procera* analisados, como atividade de enzimas antioxidantes, acúmulo de ROS, danos de membrana e dano ao DNA, verificação de densidade celular, quantidade de DNA, bem como análise proteômica, análises de pigmentos fotossintéticos e análise de conteúdo de lignina por microscopia confocal. Este trabalho concluiu que o campo magnético afeta positivamente a germinação das sementes, bem como o crescimento de plântulas e calos de *C. procera*. Além disso, a exposição ao campo magnético provoca mudanças na homeostase redox em todos os estágios da planta analisados. No entanto, essa mudança não provoca danos de membrana, com exceção do estágio de sementes, mas não provoca danos no DNA, indicando que esse acúmulo de ROS esteja ligado ao processo de divisão celular e ao crescimento de *C. procera* nos seus diferentes estágios. A exposição de plântulas e calos ao campo magnético influenciou no conteúdo de clorofila em ambos e o conteúdo de lignina em calos, o que indica uma associação da eficiência fotossintética com os efeitos positivos verificados nos parâmetros de crescimento.

8 PERSPECTIVAS FUTURAS

8.1 Sementes

Dados os resultados encontrados nas sementes de *C. procera*, apesar de promissores para o uso de campo magnético no seu cultivo, é necessário um aprofundamento de estudo no que diz respeito às sementes tratadas em campo magnético, visto que foram realizadas pesquisas com a planta somente na fase de semente, sendo necessário que se levante e observe dados da planta oriunda de sementes tratadas com campo magnético.

8.2 Plântulas

A exposição de plântulas de *C. procera* ao campo magnético foi promissora no entendimento dessa interação em uma pesquisa inicial como foi mostrado. No entanto é necessário avançar no aprofundamento desse levantamento científico. Além da escassez de informação sobre a exposição de plântulas ao campo magnético, estudos do conjunto de metabólitos secundários presentes nas plântulas de *C. procera*, especialmente nas folhas, é de fundamental importância para um ponto de partida de uma próxima pesquisa, tendo em vista o surgimento de um maior conteúdo de pigmentos fotossintético nesses órgãos presentes nas plântulas de *C. procera*.

8.3 Calos

Os calos originados a partir dos segmentos de hipocótilo de *C. procera*, também demonstraram resultados muito satisfatórios para melhor entendimento do efeito do campo magnético em células vegetais. Assim como a exposição de plântulas ao campo magnético, as informações de células cultivadas com calos expostas ao campo magnético são escassas. No entanto, por se tratarem de tecido desdiferenciados e totipotentes, análises de seu transcriptoma e de seu proteoma são necessárias como pontos de partida para pesquisas futuras.

REFERÊNCIAS

- ABDOLMALEKI, Parviz; GHANATI, Faezeh; SAHEBJAMEI, Hassan; SARVESTANI, Amir Sabet. Peroxidase activity, lignification and promotion of cell death in tobacco cells exposed to static magnetic field. **Environmentalist**, [s.l.], v. 27, p. 435-440, 2007.
- AGUILAR, Claudia Hernández; DOMINGUEZ-PACHECO, Arturo; CARBALLO, Aquiles Carballo; CRUZ-OREA, Alfredo; IVANOV, Rumen; BONILLA, Jose Luiz López; MONTAÑEZ, Justo Pastor Valcarcel. Alternating magnetic field irradiation effects on the three genotype maize seed field performance. **Acta Agrophysica**, Zacatenco, v. 14, n. 1, p. 7-17, 2009.
- AHMED, Umsalama A. M.; ZUHUA, Shi; BASHIER, Nabil H. H.; MUAFI, Kamal; HONGPING, Hao; YULING, Guo. Evaluation of insecticidal potentialities of aqueous extracts from *Calotropis procera* ait. against *Henosepilachna elaterii* Rossi. **Journal of Applied Science**, Hangzhou, v. 6, n. 1, p. 2466-2470, 2006.
- AKSYONOV, S. I.; GRUNINA, T. Y.; GORYACHEV, S. N. On the mechanism of stimulation and inhibition of wheat seed germination by low-frequency magnetic field. **Biophysics**, [s.l.], v. 52, p. 233-236, 2007.
- ALINA, Simina; PAVEL, S.; ERSILIA, Alexa; DORICA, Botau. The influence of electromagnetic field on bitter melon callus (*Momordica charantia* L.). **Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology**, Timisoara, v. 22, n. 1, p. 130-135, 2018.
- ALVAREZ, A. F. R.; FRANCO-MEJIA, E.; PINEDO-JARAMILLO, C. R. Study and analysis of magnetic field homogeneity of square and circular Helmholtz coil pairs: A Taylor series approximation. In: VI ANDEAN REGION INTERNATIONAL CONFERENCE, 11, 2012, Cuenca, **Anais [VI ANDEAN REGION INTERNATIONAL CONFERENCE]**. Cuenca: IEEE, 2012. p. 77-80.
- ANDERSON, Jeffrey A. Catalase activity, hydrogen peroxide content and thermotolerance of pepper leaves. **Scientia Horticulturae**, Stillwater, v. 95, n. 4, p. 277-284, 2002.
- AMARA, Salem; DOUKI, Thery; RAVANAT, Jean-Luc; GARREL, Catherine; GUIRAUD, Pascale; FAVIER, Alain; SAKLY, Mohsen; RHOUMA, Khémais Ben; ABDELMELEK, Hafedh. Influence of a static magnetic field (250 mT) on the antioxidant response and DNA integrity in THP1 cells. **Physics in Medicine and Biology**, Grenoble, v. 52, p. 889-898, 2007.
- ASADA, Kozi. Ascorbate peroxidase a hydrogen peroxide scavenging enzyme in plants. **Physiologia Plantarum**, [s.l.], v. 85, n. 2, p. 235-241, 1992.
- AUDUS, L. J. Magnetotropism: A new plant growth response. **Nature**. London, v. 185, p. 132-134, 1960.
- BAGHEL, Lokesh; KATARIA, Sunita; GURUPRASAD, Kadur. Effect of static magnetic field pretreatment on growth, photosynthetic performance and yield of soybean under water stress. **Photosynthetica**, Indore, v. 56, p. 718-730, 2018.

BALOUCHI, Hamidreza; MODARRES SANAVY, Seyed Ali Mohammad. Electromagnetic field impact on annual medics and dodder seed germination. **International Agrophysics**, Yasouj, v. 23, p. 111-115, 2009.

BELYAVSKAYA, N. A. Biological effects due to weak magnetic field on plants. **Advances in Space Research**, [s.l.], v. 34, p. 1566-1574, 2004

BEZERRA, Emanuel Alves. **Respostas bioquímicas comparativas de genótipos suscetíveis e resistentes de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L) Walp] desafiados com o vírus do mosaico severo do caupi (CPSMV)**, CE. 2016. 91 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.

BHARDWAJ, Jyotsna; ANAND, Anjali; NAGARAJAN, Shantha. Biochemical and biophysical changes associated with magnetopriming in germinating cucumber seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 57, p. 67-73, 2012.

BOWRON, Daniel T.; BOOTH, Jonathan; BARROW, Nathan S.; SUTTON, Patricia; JOHNSON, Simon Richard. Using neutrons, X-rays and nuclear magnetism to determine the role of transition metal oxide inclusions on both glass structure and stability in automotive glass enamels. **Physical Chemistry Chemical Physics**, Didcot, v. 20, p. 13734-13746, 2018.

BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities for proteins utilizing the principle for protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Athens, v. 72, p. 248-254, 1976.

BUKHARI, Shazia Anwer; TANVEER, Muhammad; MUSTAFA, Ghulam; ZIA-UD-DEN, Nighat. Magnetic field stimulation effect on germination and antioxidant activities of presown hybrid seeds of sunflower and its seedlings. **Journal of Food Quality**, Faisalabad, v. 2021, p. 9, 2021.

CAKMAK, Turgay; DUMLUPINAR, Rahmi; ERDAL, Serkan. Acceleration of germination and early growth of wheat and bean seedlings grown under various magnetic field and osmotic conditions. **Bioelectromagnetics**, Erzurum, v. 31, p. 120-129, 2010

CALDEIRA, Rui Pedro Rodrigues. **Controlling superparamagnetic particles with dynamic magnetic fields generated by a Helmholtz coil system**. Lisboa. 2010. 96f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Física) - Departamento de Física, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2010.

CALLAGHAN, Edmund E.; MASLEN, Stephen H. **The magnetic field of a finite solenoid**. Cleveland, National Aeronautics and Space Administration, 1960.

CARBONELL, Maria Vitoria; MARTINEZ, Elvira; FLOREZ, Mercedes; MAQUEDA, R.; PINTOR-LÓPEZ, A.; AMAYA, Jasmin. Magnetic field treatments improve germination and seedling growth in *Festuca arundinaceae* Scrib. and *Lolium perenne* L. **Seed Science and Technology**, Madrid, v. 36, p. 31-37, 2008.

CARBONELL, Maria Vitoria; FLOREZ, Mercedes; MARTINEZ, Elvira; MAQUEDA, R.; AMAYA, Jasmin. Study of stationary magnetic fields on initial growth of pea (*Pisum sativum* L.) seeds. **Seed Science and Technology**, Madrid, v. 39, p. 673-679, 2011.

CELESTINO, C.; PICAZO, M. L.; TORIBIO, Mariano. Influence of chronic exposure to an electromagnetic field on germination and early growth of *Quercus suber* seeds preliminary study. **Electro- and Magnetobiology**, [s.l.], v. 19, p. 115-120, 2000.

CHEN, Sixue; HARMON, Alice C. Advances in plant proteomics. **Proteomics**, [s.l.], v. 6, p. 5504-5516, 2006.

CHEN, Na; XU, Yunyuan; WANG, Xin.; DU, Cheng; DU, Jizhou; YUAN, Ming; XU, Zihong; CHONG, Kang. OsRAN2, essential for mitosis, enhances cold tolerance in rice by promoting export of intranuclear tubulin and maintaining cell division under cold stress. **Plant, Cell and Environment**, [s.l.], v. 34, p. 52-64, 2011.

CHEN, Hua Han; CHANG, Hung Chia; CHEN, Yu Kuo; HUNG, Chien Lun; LIN, Su Yi; CHEN, Yi Sheng. An improved process for high nutrition of germinated brown rice production: Low-pressure plasma. **Food Chemistry**, Makung, v. 191, p. 120-127, 2016.

CHEN, Qihong; YANG, Guiwen. Signal function studies of ROS, especially RBOH-dependent ROS, in plant growth, development and environmental stress. **Journal of Plant Growth Regulation**, [s.l.], v. 39, p. 157-171, 2020.

DAVEY, M. W.; STALS, E.; PANIS, B.; KEULEMANS, J.; SWENNEN, R. High throughput determination of malondialdehyde in plant tissues. **Analytical biochemistry**, Leuven, v. 347, p. 201-207, 2005

DAVIES, Mark S. Effects of 60 Hz electromagnetic fields on early growth in three plant species and a replication of previous results. **Bioelectromagnetics**, [s.l.], v. 17, p. 154-161, 1996.

DELAN, W; NA, J.; HAIYAN, Y.; MENG, Q.; GUANGYANG, X. Teaching Discussion on Microscopic Mechanism of Diamagnetic Substance and Diamagnetism. *In*: 8TH INTERNATIONAL CONFERENCE ON EDUCATION AND MANAGEMENT (ICEM), 75., 2018, Zhautong, Anais [8TH INTERNATIONAL CONFERENCE ON EDUCATION AND MANAGEMENT (ICEM)]. Zhautong: **Advances in Economics, Business and Management Research**, 2018. p. 438-441

DE MICCO, Veronica; ARONNE, Giovanna; JOSELEAU, Jean-Paul; RUEL, Katia. Xylem development and cell wall changes of soybean seedlings grown in space. **Annals of Botany**, Portici, v. 101, p. 661-669, 2008.

DHIMAN, Sunil K.; GALLAND, Paul. Effects of weak static magnetic fields on the gene expression of seedlings of *Arabidopsis thaliana*. **Journal of plant physiology**, Marburg, v. 231, p. 9-18, 2018.

DONALDSON, Lloyd. Autofluorescence in plants. **Molecules**, Rotorua, v. 25, p. 2393, 2020.

DOYLE, Jeff J.; DOYLE, Jane L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, Ithaca, v. 19, p. 11-15, 1987.

DUCATTI, Karina Renostro; BATISTA, Thiago Barbosa; HIRAI, Welinton Yoshio; LUCCAS, Daiani Ajala; MORENO, Leticia de Aguila; GUIMARÃES, Cristiane Carvalho;

BASSEL, George W.; DA SILVA, Edvaldo Aparecido Amaral. Transcripts Expressed during Germination *Sensu Stricto* Are Associated with Vigor in Soybean Seeds. **Plants**, Botucatu, v. 11, p. 1310, 2022.

DZIERGOWSKA, Katarzyna; LEWANDOWSKA, Sylwia; MECH, Rafal; POL, Michal; DETYNA, Jerzy; MICHALAK, Izabela. Soybean Germination Response to Algae Extract and a Static Magnetic Field Treatment. **Applied Sciences**, Wroclaw, v. 11, p. 8597, 2021.

EFTHIMIADOU, Aspasia; KATSENIOS, Nikolaos; KARKANIS, Anestis; PAPASTYLIANOU, Panayiota; TRIANTAFYLLIDIS, Vassilios; TRAVLOS, Ilias; BILALIS, Dimitrios J. Effects of presowing pulsed electro-magnetic treatment of tomato seed on growth, yield, and lycopene content. **The Scientific World Journal**, Nicosia, v. 2014, p. 1-6, 2014.

ERCAN, Ismail; TOMBULOGLU, Huseyin; ALQAHTANI, Noha; ALOTAIBI, Bayan; BAMHREZ, Muruj; ALSHUMRANI, Raghdah; OZCELIK, Sezen; KAYED, Tarek Said. Magnetic field effects on the magnetic properties, germination, chlorophyll fluorescence, and nutrient content of barley (*Hordeum vulgare* L.). **Plant Physiology and Biochemistry**, Dammam, v. 170, p. 36-48, 2022.

FÉHER, Attila. Callus, dedifferentiation, totipotency, somatic embryogenesis: what these terms mean in the era of molecular plant biology?. **Frontiers in plant science**, Szeged, v. 10, p. 536, 2019.

FEIZI, Hassan; SAHABI, Houssein; MOGHADDAM, Parviz Rezvani; SHAHTAHMASSEBI, Nasser; GALLEHGIR, Omran; AMIRMORADI, Shahram. Impact of intensity and exposure duration of magnetic field on seed germination of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). **Notulae Scientia Biologicae**, Mashhad, v. 4, p. 116-120, 2012.

FLOREZ, Mercedes; CARBONELL, Maria Vitoria; MARTINEZ, Elvira. Exposure of maize seeds to stationary magnetic fields: Effects on germination and early growth. **Environmental and Experimental Botany**, Madrid, v. 59, p. 68-75, 2007.

FLOREZ, Mercedes; MARTINEZ, Elvira; CARBONELL, Maria Vitoria; ÁLVAREZ, J.; CAMPOS, A. Germination and initial growth of triticale seeds under stationary magnetic treatment. **Journal of Advances in Agriculture**, Madrid, v. 2, p. 72-79, 2014.

FRANCIS, Dennis. The cell cycle in plant development. **New Phytologist**, Cardiff, v. 122, p. 1-20, 1992.

FRANÇA, Bruna Karoline; ALVES, Maria Rosa; SOUTO, Fernanda Maria; TIZIANE, Larissa; BOAVENTURA, Raquel Freire; GUIMARÃES, Adriana; ALVES JR, Antonio. Lipid peroxidation and obesity: Methods to measure the oxidative stress of the obese patient's plasma. **GE Journal Português de Gastreenterologia**. São Cristóvão, v. 20, p. 99-206, 2013.

GALITSKI, Victor; JUZELIUNAS, Gediminas; SPIELMAN, Ian B. Artificial gauge fields with ultracold atoms. **Physics Today**, College Park, v. 72, p. 39, 2019.

- GALLAND, Paul; PAZUR, Alexander. Magnetoreception in plants. **Journal of Plant Research**, [s.l.], v. 118, p. 371-389, 2005.
- GAY, Craig; COLLINS, James; GEBICKI, Janusz M. Hydroperoxide assay with the ferric-xylenol orange complex. **Analytical Biochemistry**, Sydney, v. 273, p. 149-155. 1999.
- GILL, Sarvajeet Singh; TUTEJA, Narendra. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 48, p. 909-30, 2010.
- GRANIER, Fabienne. Extraction of plant proteins for two-dimensional electrophoresis. **Electrophoresis**, [s.l.], v. 9, p. 712-718, 1988.
- GUTTZEIT, Herwig O. Biological effect of ELF-EMF enhanced stress response; new insights and new questions. **Electro Magnetobiology**, [s.l.], v. 20, p. 15-26, 2001.
- HASAN, G. T.; ALI, Kamil J.; AHMED, M. A. Investigation the influence of magnetic field emitted by high voltage transmission lines on plant growth. **European Journal of Scientific Research**, [s.l.], v. 56, p. 272-278, 2011.
- HAVIR, Evelyn A.; MCHALE, Neil A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, New Haven, v. 84, p. 450-455, 1987.
- HE, Miao; ZHU, Chong; DONG, Kun; ZHANG, Ting; CHENG, Zhiwei; LI, Jiarui; YAN, Yueming. Comparative proteome analysis of embryo and endosperm reveals central differential expression proteins involved in wheat seed germination. **BMC Plant Biology**, Beijing, v. 15, p. 1-17, 2015.
- HEATH, Robert L.; PACKER, Lester. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Berkeley, v.125, p. 189-198. 1968.
- HEATWOLE, Virginia M. TUNEL assay for apoptotic cells. **Immunocytochemical Methods and Protocols**, [s.l.], v.145, p. 141-148, 1999.
- HERRANZ, Raul; MANZANO, Ana I.; VAN LOON, Jack J,W.A.; CHRISTIANEN, Peter C.M.; MEDINA, F. Javier. Proteomic signature of Arabidopsis cell cultures exposed to magnetically induced hyper-and microgravity environments. **Astrobiology**, [s.l.], v. 13, p. 217-224, 2013.
- HOZAYN, M.; EL-MAHDY, Amal A.; ZALAMA, M.T. Magneto-priming for improving germination, seedling attributes and field performance of barley (*Hordeum vulgare* L.) under salinity stress. **Middle East Journal of Agriculture Research**, Giza, v. 7, p. 1006-1022, 2018.
- HUSSAIN, Mian Sabir; DASTGEER, Ghulam; AFZAL, Amir Muhammad; HUSSAIN, Shahbaz; KANWAR, Rana Rashid. Eco-friendly magnetic field treatment to enhance wheat yield and seed germination growth. **Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management**, Seoul, v. 14, p. 100299, 2020.

IKEUCHI, Momoko; SHIBATA, Michitaro; RYMEN, Bart; IWASE, Akira; BÂGMAN, Anne-Maarit; WATT, Lewis; COLEMAN, Duncan; FAVERO, David S.; TAKAHASHI, Tatsuya; AHNERT, Sebastian E.; BRADY, Siobhan M.; SUGIMOTO, Keiko. A gene regulatory network for cellular reprogramming in plant regeneration. **Plant and Cell Physiology**, [s.l.], v. 59, p. 770–782, 2018.

IQBAL, Munawar; HAQ, Zia ul; MALIK, Amna; AYOUB, Ch Muhammad; JAMIL, Yasir; NISAR, Jan. Pre-sowing seed magnetic field stimulation: A good option to enhance bitter melon germination, seedling growth and yield characteristics. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, Peshawar, v. 5, p. 10-37, 2016.

ISHISAKA, Rumi.; KANNO, Tomoko; INAI, Yoko; NAKAHARA, Hiroko; AKIYAMA, Jitsuo; YOSHIOKA, Tamotsu; UTSUMI, Kozo. Effects of magnetic fields on the various functions of subcellular organelles and cells. **Pathophysiology**, Kurashiki, v. 7, p. 149-152, 2000.

JAN, Rahmatullah; ASAF, Sajad; NUMAM, Muhammad; LUBNA, Lubna; KIM, Kyung-Min. Plant secondary metabolite biosynthesis and transcriptional regulation in response to biotic and abiotic stress conditions. **Agronomy**, Daegu, v. 11, p. 968, 2021.

KATARIA, Sunita; BAGHEL, Lakesh; GURUPRASAD, K.N. Acceleration of germination and early growth characteristics of soybean and maize after pre-treatment of seeds with static magnetic field. **International Journal of Tropical Agriculture**, Indore, v. 33, p. 985-992, 2015.

KATARIA, Sunita; BAGHEL, Lakesh; GURUPRASAD, K.N. Pre-treatment of seeds with static magnetic field improves germination and early growth characteristics under salt stress in maize and soybean. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, Indore, v. 10, p. 83-90, 2017.

KATARIA, Sunita; RASTOGI, Anshu; BELE, Ankita; JAIN, Meeta. Role of nitric oxide and reactive oxygen species in static magnetic field pre-treatment induced tolerance to ambient UV-B stress in soybean. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, [s.l.], v. 26, p. 931-945, 2020.

KATO, Ryoichi. Effects of a magnetic field on the growth of primary roots of *Zea mays*. **Plant and Cell Physiology**, [s.l.], v. 29, p. 1215-1219, 1988.

KISSMANN, K.G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. 798. ed: BASF Brasileira S.A, 1999.

KLAYS, Christina M.C.; BÜHREN, Jens; KOHNEN, Thomas. Comparison of Endothelial Cell Count Using Confocal and Contact Specular Microscopy. **Ophthalmologica**, [s.l.], v. 217, p. 99-103, 2003.

KOBAYASHI, Masanori; SODA, Naoya; MIYO, Takuya; UEDA, Yoshiro. Effects of combined DC and AC magnetic fields on germination of hornwort seeds. **Bioelectromagnetics**, [s.l.], v. 25, p. 552-559, 2004.

KONEFAŁ-JANOCHA, Malgorzata; BANAS-ZABCZYK, Agnieszka; BESTER, Mariusz; BOCAK, Damian; BUDZIK, Sylwia; GÓRNY, Szymon; LARSEN, Stuart; MAJCHROWSKI, Klaudiusz; CHOLEWA, Marian. The Effect of Stationary and Variable Electromagnetic Fields on the Germination and Early Growth of Radish (*Raphanus sativus*). **Polish Journal Environmental Studies**, Rzeszow, v. 28, p. 709-715, 2019.

KUMAR, V. L.; PADHY, B. M.; SEHGAL, R.; ROY, S. Antioxidant and protective effect of latex of *Calotropis procera* against alloxan induced diabetes in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, New Delhi, v. 102, p. 470-473, 2005.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. **Nature**, [s.l.], v. 227, p. 680-685, 1970.

LOKHANDE, Vinayak; NIKAM, T. D.; PENNA, Suprasanna. Biochemical, physiological and growth changes in response to salinity in callus cultures of *Sesuvium portulacastrum* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 102, 17-25. 2010.

MAHMOOD, Maziah; BEE, Ooi Bee; MOHAMED, Mahmud Tengku Muda; SUBRAMANIAM Sreeramanan. Effects of electromagnetic field on the nitrogen, protein and chlorophyll content and peroxidase enzyme activity in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) leaves. **Emirates Journal of Food Agriculture**, Selangor, v. 25, p. 471-482, 2013.

MARTÍNEZ, Elvira; CARBONELL, Maria Victoria; FLÓREZ, Mercedes; AMAYA, Jasmin; MAQUEDA, R. Germination of tomato seeds (*Lycopersicon esculentum* L.) under magnetic field. **International Agrophysics**, Madrid, v. 23, p. 45-49, 2009.

MARTINS, Roberto de Andrade. An Educational Blend of Pseudohistory and History of Science and Its Application in the Study of the Discovery of Electromagnetism. *In*: Prestes, M.; Silva, C., Switzerland: Teaching Science with Context, 2018. p. 277-292.

MEDINA, Emily; KIM, Su Hwa; YUN, Miriam; CHOI, Won-Gyu. Recapitulation of the function and role of ROS generated in response to heat stress in plants. **Plants**. [s.l.], v. 10, p. 371, 2021.

MEENA, Ajay Kumar; YADAV, Ajay; RAO, M.M. Ayurvedic uses and pharmacological activities of *Calotropis procera* Linn. **Asian Journal of Traditional Medicines**, Patiala, v. 6, p. 45-53, 2011.

MELO, M. M.; VAZ, F. A.; GONÇALVES, L. C.; SATURNINO, H. M. Estudo fitoquímico da *Calotropis procera* Ait., sua utilização na alimentação de caprinos: efeitos clínicos e bioquímicos séricos. **Revista Brasileira de Saúde Produção Animal**, Belo Horizonte, v.2, p. 15-20, 2001.

MENEGATTI, Renata Diane; DE OLIVEIRA, Luana Oliveira; DA COSTA, Ádria Vanessa Lira; BRAGA, Eugenia Jacira Bolacel; BIANCHI, Valmor João. Magnetic field and gibberelic acid as pre-germination treatments of passion fruit seeds. **Ciência Agrícola Rio Largo**, Capão do Leão, v. 17, p. 15-22, 2019.

MESQUITA, Rosilene Oliveira. Eletroforese bidimensional & análise de imagens pelo software imagemaster. Ed. Universidade Federal de Viçosa, 2012.

MITTLER, Ron. ROS are good. **Trends in plant science**, Denton, v. 22, p. 11-19, 2017.

MOUSAVIZADEH, Seyyed Javad; SEDAGHATHOOR, Shahram; RAHIMI, Abdolrahman; MOHAMMADI, Haydeh. Germination parameters and peroxidase activity of lettuce seed under stationary magnetic field. **International Journal of Biosciences**, Rasht, v. 3, p. 199-207, 2013.

MROCZEK-ZDYRSKA, M.; TRYNIECKI, Ł.; KORNARZYŃSKI, K.; PIETRUSZEWSKI, S.; GAGO'S, M. Influence of magnetic field stimulation on the growth and biochemical parameters in *Phaseolus vulgaris* L. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Science**, Lublin, v. 9, p. 548–551, 2016.

MURASHIGE, Toshio; SKOOG, Folke. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, [s.l.], v. 15, p. 473-497, 1962.

NAMBA, K.; SASAO, A.; HIBUSAWA, S. Effect of magnetic field on germination and plant growth. **Acta Horticulturae**, [s.l.], v. 399, p. 143-148, 1995.

NELSON, Isaac; OGDEN, Taylor; KHATEEB, Shadi Al; GRASER, Jake; SPARKS, Taylor D.; ABBOTT, Jake; NALEWAY, Steven E. Freeze-Casting of Surface-Magnetized Iron (II, III) Oxide Particles in a Uniform Static Magnetic Field Generated by a Helmholtz Coil. **Advanced Engineering Materials**, [s.l.], v. 21, 2019.

NIKANE, Neo E.; MARKUS, Elisha Didam; SEDIBE, Moosa Mahmood. The Effects of Magnetic Fields on Plants Growth: A Comprehensive Review. **International Journal of Food Engineering**, Bloemfontein, v. 5, p. 1, 2019.

NOGUEIRA, Lavouisier Franklin Brito. **Avaliação da atividade antibacteriana e sinérgica da curcumina com oxacilina e vancomicina frente a cepas de *Staphylococcus aureus* sensíveis e resistentes a metilicina (MRSA), e análise do seu mecanismo de ação**. CE. 2019. 61 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Médica) – Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019.

PAIVA, Ana L. S.; OLIVEIRA, José Tadeu Abreu; SOUSA, Gustavo Antonio; VASCONCELOS, Ilka Maria. Label-free Proteomic Reveals that Cowpea Severe Mosaic Virus Transiently Suppresses the Host Leaf Protein Accumulation During the Compatible Interaction with Cowpea (*Vigna unguiculata* [L] Walp). **Journal of Proteome Research**, Fortaleza, v. 15, p. 4208–4220, 2016.

PAKHOMOV, Alexander; ANASHINA, Anna; HEYERS, Dominik; KOBYLKO, Dmitry; MOURITSEN, Henrik; CHERNETSOV, Nikita. Magnetic map navigation in a migratory songbird requires trigeminal input. **Scientific Reports/Nature**, [s.l.], v. 8, p. 11975, 2018.

PARIHAR, Gaurav; BALEKAR, Neelam. *Calotropis procera*: A phytochemical and pharmacological review. **Thai Journal of Pharmaceutical Sciences**, Indore, v. 40, p. 3, 2016.

PEIXOTO, Paulo Henrique Pereira; CAMBRAIA, José; SANT'ANA, Renato; MOSQUIM, Paulo Roberto; MOREIRA, Maurilio Aalves. Aluminum effects on lipid peroxidation and on

the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Viçosa, v. 11, p. 137-143, 1999.

PERWEZ, Alam; MOHAMMAD, Ali. Phytochemical investigation of *Calotropis procera* roots. **Indian Journal of Chemistry**, [s.l.], v. 48B, p. 443-446, 2009.

PHIRKE, P. S.; PATIL, M. N.; UMBARKAR, S. P.; DUDHE, Y. H. The application of magnetic treatment to seeds: methods and responses. **Seed Science and Technology**. [s.l.], v. 24, p. 365-373, 1996.

PITTMAN, U. J. Effects of magnetic seed treatment on yields of barley, wheat and oats on Southern Alberta. **Canadian Journal of Plant Science**, Lethbridge, v. 57, p. 37-45, 1977.

QUAZI, Shoaib; MATHUR, Kumkum; ARORA, Sandeep. *Calotropis procera*: an overview of its phytochemistry and Pharmacology. **Indian Journal of Drugs**, Jodhpur, v. 1, p. 63-69, 2013.

RADHAKRISHNAN, Ramalingam; KUMARI, Bollipo Diana Ranjitha. Pulsed magnetic field: a contemporary approach offers to enhance plant growth and yield of soybean. **Plant Physiology and Biochemistry**, Tiruchirappalli, v. 51, p. 139-144, 2012.

MATHUR, Rajani; GUPTA, Suresh K. Anti-tumor studies with extracts of *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. root employing Hep2 cells and their possible mechanism of action. **Indian Journal of Experimental Biology**, [s.l.], v. 47, p. 343-348, 2009.

RAMOS, Márcio Viana; DEMARCO, Diego; SOUZA, Isabel Cristina da Costa; FREITAS, Cleverson Diniz Teixeira. Laticifers, Latex, and Their Role in Plant Defense. **Trends in Plant Science**. Fortaleza, v. 24, p. 553-567, 2019.

RĂCUCIU, Mihaela. 50 Hz frequency magnetic field effects on mitotic activity in the maize root. **Romanian Journal of Biophysics**, Sibiu, v. 21, p. 53-62, 2011.

REITZ, Nicholas F.; MITCHAM, Elizabeth J. Lignification of tomato (*Solanum lycopersicum*) pericarp tissue during blossom-end rot development. **Scientia Horticulturae**, Davis, v. 276, p. 109759, 2021.

REZAIIASL, A.; GHASEMNEZHAD, A.; SHAHABI, S. Study the response of cucumber plant to different magnetic fields. **Journal of Advanced Laboratory Research in Biology**, Gorgan, v. 3, p. 42-4, 2012.

ROBERT, René. Bobina de Helholtz. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, Curitiba, v. 25, p. 40-44, 2003.

SAHEBJAMEI, Hassan; ABDOLMALEKI, Parviz; GHANATI, Faezeh. Effects of magnetic field on the antioxidant enzyme activities of suspension cultured tobacco cells. **Bioelectromagnetics**, Tehran, v. 28, p. 42-47, 2007.

SAHTOUT, Abeer H.; HASSAN, M. D.; SHARIFF, M. DNA fragmentation, an indicator of apoptosis, in cultured black tiger shrimp *Penaeus monodon* infected with *white spot syndrome virus* (WSSV). **Diseases of Aquatic Organisms**, Selangor, v. 44, p. 155-159, 2001.

SAINI, Sanjay; FRANKEL, Richard B.; STARK, David D.; FERRUCCI, Joseph T.; Jr. Magnetism: A Primer and Review. **American Journal of Roentgenology**. Boston, v. 150, p. 736-743, 1988.

SARRAF, Mohammad; KATARIA, Sunita; TAIMOURYA, Houda; SANTOS, Lucielen Oliveira; MENEGATTI, Renata Diane; JAIN, Meeta; IHTISHAM, Muhammad; LIU, Shiliang. Magnetic Field (MF) Applications in Plants: An Overview. **Plants**. Chengdu, v. 9, p. 1139, 2020.

SHABRANGI, Azita; MAJD, Ahmad. Effect of magnetic fields on growth and antioxidant systems in agricultural plants. **PIERS Proceedings**, Tehran, v. 2, p. 1142-1147, 2009.

SHABRANGY, Azita; GHATAK, Arindam; ZHANG, Shuang; PRILLER, Alfred; CHATURVEDI, Palak; WECKWERTH, Wolfram. Magnetic Field Induced Changes in the Shoot and Root Proteome of Barley (*Hordeum vulgare* L.). **Frontiers in Plant Science**, Vienna, v. 12, p. 1-18, 2021.

SHARMA, Pallavi; JHA, Ambuj Bhushan; DUBEY, Rama Shanker. Oxidative stress and antioxidative defense system in plants growing under abiotic stresses. *In*: Taylor; Francis; **Handbook of Plant and Crop Stress, Fourth Edition**. Flórida: Editora Pessarakli M, 2019. p. 93-136.

SHEN, Shihua; MATSUBAE, Massami; TAKAO, Toshifumi; TANAKA, Naoki; KOMATSU, Setsuko. A proteomic analysis oh leaf sheaths from rice. **Journal of Biochemistry**. [s.l.], v. 132, p. 613-620, 2002.

SHERMAN, Fred; STEWART, John W.; TSUNASAWA, Susumu. Methionine or not methionine at the beginning of a protein. **Bioessays**, [s.l.], v. 3, p. 27-31, 1985.

SHINE, M.; GURUPRASAD, K.; ANAND, Anjali. Enhancement of germination, growth, and photosynthesis in soybean by pre-treatment of seeds with magnetic field. **Bioelectromagnetics**, [s.l.], v. 32, p. 474-484, 2011.

SILVA, Jaime A. Teixeira; DOBRÁNSZKI, Judit. Magnetic fields: how is plant growth and development impacted?. **Protoplasma**, [s.l.], v. 253, p. 231-248, 2016.

SMITH, Stephen D.; MCLEOD, Bruce R.; LIBOFF, Abraham R. Effects of CR-tuned 60 Hzmagnetic fields on sprouting and early growth of *Raphanus sativus*. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, Lexington, v. 32, p. 67-76, 1993.

SOARES, Paula Matias; LIMA, Silvane R.; MATOS, Samara G.; ANDRADE, Marcelo M.; PATROCÍNIO, Manoel C A.; DE FREITAS, Cleverson D. T.; RAMOS, Márcio V.; CRIDDLE, David N.; CARDI, Bruno A.; CARVALHO, Krishnamurti M.; ASSREUY, Ana Maria S.; VASCONCELOS, Silvânia M.M. Antinociceptive activity of *Calotropis procera* latex in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, Fortaleza, v. 99, p. 125-129, 2005.

SOJA, Gerhard; KUNSCH, B.; GERZABEK, Martin; RELCHENAUER, Thomas; SOJA, A. M.; RIPPAR, G.; BOLHAR-NORDENKAMPF, H. R. Growth and yield of winter wheat

(*Triticum aestivum* L.) and corn (*Zea mays* L.) near a high voltage transmission line. **Bioelectromagnetics**, [s.l.], v. 24, p. 91-102, 2003.

SOLTANI, Forouzandeh; KASHI, Abdolkarim; ARGHAVANI, Masoud. Effect of magnetic field on *Asparagus officinalis* L. seed germination and seedling growth. **Seed Science and Technology**, Tehran, v. 34, p. 349-353, 2006.

SOUZA, Isabel C.C; RAMOS, Márcio V.; COSTA, José H.; FREITAS, Cleverson D.T.; OLIVEIRA, Raquel S.B.; MORENO, Frederico B.; MOREIRA, Renato A.; CARVALO, Cristina P.S. The osmotin of *Calotropis procera* latex is not expressed in laticifer freecultivated callus and under salt stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, Fortaleza, v. 119, p. 312-318, 2017.

SURI, S. S.; RAMAWAT, K. G. *In vitro* hormone regulation of laticifer differentiation in *Calotropis procera*. **Annals of Botany**, Udaipur, v. 75, p. 477-480, 1995.

SYTNIK, K. M.; KORDYM, Elizabeth; NEDUKHA, E.M.; SIDORENKO, P.G.; FOMICHEVA, V.M. **Plant Cell Under Alterations in Geophysical Factors**: Naukova Dumka. Ed. Kiev: Naukova Dumka, 1984.

TANAKA, M.; THANH, Pham Van; SILVA, Jaime A. Teixeira; HAM, Le Huy. Novel magnetic field system: application to micropropagation of horticultural plants. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, Kagawa, v. 24, p. 2160-2163, 2010.

TEIXEIRA, Fabiano M.; RAMOS, Márcio V.; SOARES, Arlete A.; OLIVEIRA, Raquel S. B.; FILHO, Luiz C. P. Almeida; MARINHO FILHO, José; CARVALHO, Cristina P. S. *In vitro* tissue culture of the medicinal shrub *Calotropis procera* to produce pharmacologically active proteins from plant latex. **Process Biochemistry**, Fortaleza, v. 46, p. 1118-1124, 2011.

THOMAS, Sini; ANAND, Anjali; CHINNUSAMY, Viswanathan; DAHUJA, Anil; BASU, Sudipta. Magnetopriming circumvents the effect of salinity stress on germination in chickpea seeds. **Acta Physiologiae Plantarum**, Krakow, v. 35, p. 3401-3411, 2013.

UHRIG, Joachim F. Protein interaction networks in plants. **Planta**, Koln, v. 224, p. 771-781, 2006.

URBANEK, H.; KUZNIAK-GEBAROWSKA, E.; HERKA, K. Elicitation of defense responses in bean leaves by *Botrytis cinerea* polygalacturonase. **Acta Physiologiae Plantarum**, Lodz, v. 13, p. 43-50, 1991.

VANSOUSKII, Sergei Vasil'evich. **Magnetism**. 2.Ed. NewYork: Wiley, 1974.

VASILIEV, Boris V. Gilbert's postulate and some problematic physical theories of the twentieth century. **Journal of Modern Physics**, Dubna, v. 9, p. 2101-2124, 2018.

WANG, Bochu; ZHOU, Jing; WANG, Yichuan; ZHU, Liancai; SILVA, Jaime A. Teixeira. Physical stress and plant growth. In: SILVA, Jaime A. Teixeira (ed) **Floriculture, ornamental and plant biotechnology: advances and topical issues**. Isleworth. Editora: Global Science Books Ltd, 2006, p. 68-85.

WANG, Lingxia; LIU, Xiao; LIANG, Meng; TAN, Fanglin; LIANG, Wenyu; CHEN, Yiyong; LIN, Yongxiang; HUANG, Li; XIN, Jianhong; CHEN, Wei. Proteomic analysis of salt-responsive proteins in the leaves of mangrove *Kandelia candel* during short-term stress. **PloS One**, Fuzhou, v. 9, p, 83141, 2014.

WELLBURN, Alan R. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **Journal of Plant Physiology**, Lancaster, v. 144, p. 307-313, 1994

XU, Chunxiao; WEI, Shufeng; LU, Yan; ZHANG, Yuxia; CHEN, Chuanfang; SONG, Tao. Removal of the local geomagnetic field affects reproductive growth in *Arabidopsis*. **Bioelectromagnetics**, [s.l.], v. 34, p. 437–442, 2013.

YANG, Pan; GAN, Tian; PI, Wan; CAO, Min; CHEN, Dan; LUO, Jie. Effect of using *Celosia argentea* grown from seeds treated with a magnetic field to conduct Cd phytoremediation in drought stress conditions. **Chemosphere**, Wuhan, v. 280, p. 130724, 2021.

**APÊNDICE A – SÍMBOLOS DAS DIFERENTES PROTEÍNAS DA REDE DE INTERAÇÃO PROTEÍNA-PROTEÍNA EM
SEMENTES DE *CALOTROPIS PROCERA* SEMEADAS EM CAMPO MAGNÉTICO (CM) E SEMENTES SEMEADAS APÓS
EXPOSIÇÃO AO CAMPO MAGNÉTICO (PCM)**

Function	Description	Protein code
Redox homeostasis	NADH dehydrogenase subunit 7	NAD7
	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 1	NAD1C
	Peroxidase	AT3G42570
Protein Metabolism	Superoxide dismutase	CSD1
	Adenosylhomocysteinase	SAHH2
	Calreticulin	CRT3
	Chaperonin 60 subunit beta 2	Cpn60beta2
	Cullin1	EID1
	Endoplasmin homolog	SHD
	Ketol-acid reductoisomerase	AT3G58610
	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	TPR6
	S-adenosylmethionine synthase 1	SAM1
	S-adenosylmethionine synthase 3	MAT3
Lipid Metabolism	SKP1-like protein	SK18
	Acetoacetyl-CoA thiolase	ACAT2
	Acetyl-coenzyme A carboxylase carboxyl transferase subunit beta, chloroplastic	ACCD
Structure	Cytochrome b5	CB5-B
	Actin	ACT12
Nucleotide Binding	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine methyltransferase	ATMS1
	DNA-directed RNA polymerase subunit beta	AT2G41950
	Maturase K	MATK
	Methyltransferase	FIO1
Transport	ADP-ribosylation factor 1	ARF2-A
	Calmodulin 2	CAM5
	Calmodulin	CAM5
	Mitochondrial protein YMF19	YMF19

Function	Description	Protein code
Stress Defense	Plasma membrane intrinsic protein 2	PIP2B
	Plasma membrane intrinsic protein	PIP1C
	Tonoplast intrinsic protein 1	TIP1;3
	Annexin	ANNAT8
	Delta(24)-sterol reductase	DWF1
Energy	Mitogen-activated protein kinase	MPK1
	ATP synthase CF0 A subunit	ATPI
	ATP synthase protein MI25	ORF25
	ATP synthase subunit alpha	AT2G07698
	ATP synthase subunit alpha, chloroplastic	ATPA
	ATP synthase subunit beta, chloroplastic	PB
	ATP synthase subunit c, chloroplastic	ATPH
	Cytochrome b	CYTB
	Cytochrome c oxidase subunit 2	COX2
	Cytochrome c oxidase subunit 3	cox3
Photosynthesis	NADH dehydrogenase subunit 9	NAD9
	Isopentenyl-diphosphate Delta-isomerase	AT5G55610
	Malate dehydrogenase	MDH
	Photosystem I iron-sulfur center	PSAC
	Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A2	PSAB
	Photosystem II CP47 reaction center protein	PSBB
	Ribulose biphosphate carboxylase large chain (Fragment)	RBCL
	Ribulose biphosphate carboxylase large chain	RBCL
Carbohydrate Metabolism	Fructose-bisphosphate aldolase	FBA6