



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR**  
**CURSO DE BIOTECNOLOGIA**

**PAULO RAFAEL LIMA DE MEDEIROS**

**EFEITO DE NANOPARTICULAS DE PRATA (AgNPs) NA GERMINAÇÃO E  
CRESCIMENTO DE RAÍZES DE MAXIXE (*Cucumis anguria* L.)**

**FORTALEZA 2018**

PAULO RAFAEL LIMA DE MEDEIROS

EFEITO DE NANOPARTICULAS DE PRATA (AgNPs) NA GERMINAÇÃO E  
CRESCIMENTO DE RAÍZES DE MAXIXE (*Cucumis anguria* L.)

Monografia apresentada ao curso de  
Biotecnologia do departamento de  
Bioquímica e Biologia Molecular da  
Universidade Federal do Ceará, como  
Requisito parcial para obtenção do título  
De Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Emílio de Castro Miguel

PAULO RAFAEL LIMA DE MEDEIROS

Monografia apresentada ao curso de  
Biotecnologia do departamento de  
Bioquímica e Biologia Molecular da  
Universidade Federal do Ceará, como  
Requisito parcial para obtenção do título  
De Bacharel em Biotecnologia.

**EFEITO DE NANOPARTICULAS DE PRATA (AgNPs) NA GERMINAÇÃO E  
CRESCIMENTO DE RAÍZES DE MAXIXE (*Cucumis anguria* L.)**

Aprovada em \_\_ / \_\_ / \_\_\_\_ .

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Emílio de Castro Miguel (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Thaiz Batista Azevedo Rangel Miguel(Doutor)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Aos meus pais: Maria Regina Lima de Medeiros e Paulo Henrique Leonardo de Medeiros, que me concederam a vida e sempre me apoiaram, tanto emocionalmente, quanto financeiramente. Transmitiram valores os quais carrego em minha vida e que foram fundamentais para que chegasse até aqui. À todos os meus familiares, em especial, meu tio Francisco Rodrigues de Araújo Filho, por seus conselhos. À Deus, autor da vida e fonte de esperança nos momentos mais difíceis e obscuros.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus,

Ao meu orientador, professor Emílio de Castro Miguel do laboratório Central Analítica-UFC, com quem trabalhei durante toda a minha iniciação científica. Me deu todo o suporte possível para a realização deste trabalho e teve paciência ao longo desse processo.

Ao professor Odair Pastor Ferreira do Laboratório de Materiais Funcionais Avançados(LAMFA)-UFC, com o qual houve colaboração científica para que este trabalho fosse realizado.

A Sergimar Kennedy Paiva Pinheiro, que teve colaboração fundamental para a execução dos meus experimentos, juntamente com Diego Couceiro de Medeiros.

A meus pais, que deram todo apoio, principalmente emocional, durante toda essa jornada.

“Ainda que eu falasse as línguas dos homens e dos anjos, e não tivesse amor, seria como o metal que soa ou como o sino que tine.

E ainda que tivesse o dom de profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria.

E ainda que distribuísse toda a minha fortuna para sustento dos pobres, e ainda que entregasse o meu corpo para ser queimado, e não tivesse amor, nada disso me aproveitaria.”

1 coríntio 13:1-3

## RESUMO

As nanopartículas têm sido liberadas no meio ambiente, através de produtos usados na Indústria em geral. A liberação desses compostos pode causar riscos aos organismos vivos, como plantas e organismos aquáticos, bem como gerar alterações na cadeia alimentar. Este trabalho avaliou os efeitos das nanopartículas de Prata (AgNPs) em diferentes concentrações: 12,5; 25; 50 e 100 ppm (partes por milhão) na germinação, no crescimento e na estrutura de sementes de maxixe (*Cucumis anguria L.*), visando avaliar os efeitos dos tratamentos submetidos a diferentes concentrações de nanopartículas de prata no seu desenvolvimento. Foi observado que no tratamento com nanopartícula de prata na concentração de 25 ppm houve crescimento significativo das raízes de maxixe em relação ao controle negativo (ácido nítrico). Por outro lado, raízes submetidas ao tratamento de 50 ppm de AgNPs apresentaram o menor crescimento dentre todos os tratamentos. Este estudo mostrou que não há correlação direta entre a concentração de nanopartículas e a inibição do desenvolvimento das sementes. As análises de Microscopia Eletrônica de Varredura mostraram que as sementes tratadas com nanopartículas de prata (AgNPs) que germinaram tardiamente (após o terceiro dia), apresentaram um atrofiamento da sua zona pilífera. O EDS mostrou alta detecção de Ag na semente tratada com 100 ppm de AgNPs, indicando um acúmulo de nanopartícula na superfície da semente. Nos demais tratamentos com nanopartículas, não houve detecção significativa de Ag na superfície da semente, o que demonstra que essas NP foram absorvidas e translocadas dentro da planta ou não foram absorvidas. As sementes tratadas com as concentrações de 50 e 100 ppm apresentaram efeitos negativos em relação ao controle: inibição do crescimento de raízes, baixo percentual de germinação e atrofiamento da zona pilífera, mostrando que AgNPs podem ser tóxicas para o Maxixe(*Cucumis anguria L.*).

**Palavras - chave:** AgNPs, *Cucumis anguria L.*, Fitotoxicidade, Nanotecnologia.

## ABSTRACT

Nanoparticles have been released into the environment by products used in industry, in general. The releasing of these compounds can cause damage to the living beings, like plants and aquatic animals, as well as cause alterations in food chain. This work evaluated the effects of silver nanoparticles (AgNPs) in different concentrations: 12,5; 25; 50 and 100 ppm (parts per million) on germination, growth and structure of maxixe seeds (*Cucumis anguria* L.), aiming to evaluate the effects on treatments under different concentrations of silver nanoparticles in their development. It was observed in the 25 ppm treatment a significant root growth compared to the negative control (nitric acid). On the other hand, roots submitted to the 50 ppm treatment presented the smallest growth among the tests. This study showed that there is no direct correlation between nanoparticles concentration and inhibition of root's growth. Scanning electron microcopy (SEM) analysis showed that the treated seeds with silver nanoparticles (AgNPs) that germinated later (after the third day), presented atrophy of their root hair. EDX showed high detection of Ag in the seed treated with 100 ppm, what indicates an accumulation of nanoparticles on the surface of the seed. In the other treatments with nanoparticles, there weren't a significant detection of Ag on the surface of the seed, what shows that these NPs were absorbed e translocated inside the plant or they weren't absorbed. Seeds treated with the concentrations of 50 and 100 ppm presented negative effects in relation to the control: inhibition of root growth, low rate of germination and atrophy of root hair, showing that AgNPs can be toxic to maxixe species (*Cucumis anguria* L.).

Keywords: AgNPs, *Cucumis anguria* L., Phytotoxicity, Nanotechnology.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

**Figura 1.** Crescimento médio de raízes de *Cucumis anguria* submetidas a diferentes concentrações de AgNPs, no intervalo de 7 dias. Note maior crescimento das raízes no tratamento de 25 ppm.

**Figura 2.** Evolução do crescimento das raízes de sementes de *Cucumis sativus* L. em diferentes concentrações de AgNPs.

**Figura 3.** Imagens de Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do tratamento com 12,5 ppm de AgNPs

**Figura 4.** Imagens de Microscopia eletrônica de varredura (MEV) no tratamento com 25 ppm de AgNPs

**Figura 5.** Imagens de Microscopia eletrônica de varredura (MEV) no tratamento com 50 ppm de AgNPs

**Figura 6.** Imagens de Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do tratamento com 100 ppm de AgNPs

**Figura 7.** Imagens de Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do tratamento com ácido nítrico

**Figura 8.** Imagens de Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do tratamento com água deionizada

**Figura 9.** EDS de semente tratada com 12,5 ppm de AgNPs no 3° dia de coleta

**Figura 10.** EDS de semente tratada com 25 ppm de AgNP no 3° dia de coleta

**Figura 11.** EDS de semente tratada com 50 ppm de AgNP no 3° dia de coleta

**Figura 12.** EDS de semente tratada com 100 ppm de AgNP no 3° dia de coleta.

**Figura 13.** EDS de semente tratada com ácido nítrico no 3° dia de coleta

**Figura 14.** EDS de semente tratada com água deionizada no 3° dia de coleta.

**Figura 15.** EDS de semente tratada com 12,5 ppm de AgNP no 7° dia de coleta

**Figura 16.** EDS de semente tratada com 25 ppm de AgNP no 7° dia de coleta.

**Figura 17.** EDS de semente tratada com 50 ppm de AgNP no 7° dia de coleta.

**Figura 18.** EDS de semente tratada com 100 ppm de AgNP no 7° dia de coleta.

**Figura 19.** EDS de semente tratada com ácido nítrico no 7° dia de coleta.

**Figura 20.** EDS de semente tratada com água deionizada no sétimo dia de coleta.

**Figura 21.** Detecção de sinal de Ag das sementes de todos os tratamentos coletadas no 3° dia de experimento

**Figura 22.** Detecção de sinal de Ag das sementes de todos os tratamentos coletadas no 7° dia de experimento

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Média do índice de germinação (%) no intervalo de 7 dias em diferentes concentrações de AgNPs

**Tabela 2.** Média geral de crescimento de raiz no intervalo de 7 dias (mm) em diferentes concentrações de AgNPs

**Tabela 3.** Médias de peso úmido e seco das sementes(g)

**Tabela 4.** Média de crescimento da raiz (mm) e índice de germinação (%) no intervalo de 7 dias em diferentes concentrações de AgNPs

**Tabela 5.** Tempo médio de germinação e índice de velocidade de germinação no intervalo de 7 dias em diferentes concentrações de AgNPs

## 1. INTRODUÇÃO

O uso de nanopartículas tem crescido nos últimos anos em diversas áreas devido às diversas aplicações possíveis. Há grande interesse na produção de materiais em nanoescala, uma vez que, possuem área superficial, carga e características físico-químicas singulares.

Na área farmacêutica, por exemplo, existe grande interesse pelo desenvolvimento de fármacos mais específicos, os nanofármacos. Essas nanopartículas poliméricas combinam as características de vetores tradicionais de entrega, como lipossomos e conjugados polímero-fármacos, com tamanho e forma adequada para vencer barreiras biológicas, como o pH. Além disso, possuem ligantes capazes de se ancorar em células ou organelas específicas, reduzindo os seus efeitos colaterais (Petros e DeSimone, 2010).

Na área ambiental, as nanopartículas têm sido aplicadas no controle dos efeitos tóxicos de metais pesados, provenientes da indústria química e de petróleo (Zhang et al., 2012), uma vez que a contaminação por metais pesados no solo e água podem causar impactos nocivos às plantas ou serem transferidos na cadeia alimentar, causando impactos que podem atingir o ser humano (Nagajyoti et al., 2012; Monteiro et al., 2012). Um estudo mostrou que a aplicação de nanopartículas de Titânio ( $\text{TiO}_2$ ) reduziu o efeito tóxico de Cádmio ( $\text{Cd}^{2+}$ ) em sementes de arroz (*Oryza sativa L.*). A coexposição das sementes de arroz a NPs de  $\text{TiO}_2$  e ao metal Cádmio ( $\text{Cd}^{2+}$ ) gerou diminuição da captação e distribuição do metal nas raízes e folhas (Ye Ji et al., 2017). Em outro trabalho semelhante, foram aplicadas NPs de Magnetita revestidas com citrato em plantas de milho, com objetivo de reduzir os efeitos tóxicos dos metais pesados Cádmio ( $\text{Cd}^{2+}$ ) e Cromo ( $\text{Cr}^{6+}$ ). Quando a planta foi tratada somente com os metais pesados, foram observados efeitos inibitórios, como a redução do comprimento da raiz. A coexposição das plantas de milho a uma solução contendo estes metais pesados e NPs de Magnetita resultou em menor acumulação de metais pela planta e redução da inibição (López et al., 2016). Porém, em outro estudo com plantas de Ulmus (*Ulmus elongata*) pulverizadas com solução de nanopartículas de  $\text{TiO}_2$ , foi observada uma

redução na taxa fotossintética e no potencial fotoquímico. A  $\text{TiO}_2$  reduziu a fotossíntese em mudas de *U. elongata*, principalmente, por meio de uma regulação não estomática. Também foi observado um aumento de fotossensibilidade. (Gao et al., 2013). Isso evidencia que, para algumas espécies, a própria NP de  $\text{TiO}_2$  causa efeito inibitório.

Nanopartículas de prata (AgNPs) também têm ganhado notoriedade na área agrícola, onde podem ser utilizadas como pesticidas. Quando testadas contra um grupo de fungos (*Macrophomina phaseolina*, *Pythium aphanidermatum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, *Tricoderma harzianum*) mostraram que, na concentração ideal, podem inibir em até 100% o crescimento fúngico em algumas colônias (Mahdizadeh et al., 2015). Isso demonstra uma potencial aplicação como nanofertilizantes, nanopesticidas e nanosensores, aumentando a produtividade das culturas e reduzindo custos através da substituição de fungicidas químicos (Scott e Chen, 2013; Servin et al., 2015).

Algumas nanopartículas também possuem a capacidade de gerar alterações fisiológicas nas plantas, positivamente ou negativamente, dependendo da espécie estudada. Um fator afetado positivamente pelo uso de nanopartículas de prata em algumas espécies de plantas é desempenho fotossintético. O tratamento de sementes de milho com nanopartículas de Hematita e Ferridrita aumentou a taxa de crescimento, biomassa e teor de clorofila do milho, atuando como fonte de ferro, elemento fundamental para a eficiência fotossintética (Pariona et al., 2016).

Porém, em outras espécies de plantas, o efeito é oposto. A exposição de sementes de arroz (*Oryza sativa* L.) a AgNPs com 20 nm de diâmetro mostrou um claro efeito inibitório dose-dependente nessa espécie. AgNPs em todas as concentrações afetaram o crescimento das plântulas de arroz (Thuesombat et al., 2014). Em outro estudo com AgNPs de 10 nm de diâmetro, usando como modelo *Arabidopsis thaliana*, foi observada uma redução no comprimento da raiz, no peso úmido e inibição significativa do alongamento da raiz de uma maneira dependente da dose. AgNPs também diminuíram o teor de clorofila em mudas de *A. thaliana* após 2 semanas de tratamento. A clorofila

é um biomarcador significativo em relação ao crescimento das plantas(Qian et al., 2013)

Uma alternativa para reduzir o efeito tóxico é a formulação de uma mistura de NPs. Uma combinação de NPs de Cobre(nano-CuO) + NPs de Zinco(nanoZnO) ou Cromo(nano-Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) em concentração de 100 mg/L exibiu menores efeitos tóxicos em *Lepidium sativum* em comparação com misturas individuais na mesma concentração. O efeito inibitório de soluções individuais de nano-CuO e nano-ZnO foi de 98,3%, enquanto que o efeito da combinação das duas soluções foi inferior a 84,9%. Além disso, misturas individuais de nanoCuO e nano-Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub> inibiram o crescimento das raízes em 60,2% em relação ao controle. Quando combinadas, inibiram em apenas 25,9%. ( Joško et al., 2017). Isso mostra que, e possível formular uma solução de nanopartículas para determinada finalidade específica onde o uso da NP adequada para especie vegetal, nas concentrações ideais e, caso necessário, misturadas com outras NPs, pode gerar o efeito desejado sem causar efeitos danosos a planta.

A absorção de NPs pela planta ocorre por diferentes rotas. Uma vez absorvidas, elas são translocadas dentro dos tecidos vegetais. Um percentual dessas NPs absorvidas pelas raízes e partes aéreas das plantas é translocado até o xilema (Dietz e Herth, 2011).

Apesar dos resultados positivos obtidos com diferentes nanopartículas e das perspectivas geradas em torno delas, ainda não há conhecimento suficiente dos impactos ambientais inerentes às nanopartículas, nem os efeitos que podem ser gerados por elas nos diferentes organismos (Maynard, 2006).

Portanto, tendo em vista o potencial que as AgNPs possuem como pesticidas, se faz necessário compreender melhor o modo como elas são translocadas, interagem, e afetam as plantas, bem como, os padrões de suscetibilidade das diferentes espécies em relação a essas NPs.

A família *Cucurbitaceae* abrange várias espécies de grande importância econômica. Ela é constituída por cerca de 80 gêneros e mais de 800 espécies, entre quais, melão, melancia, pepino e maxixe(*Cucumis anguria* L.), uma espécie olerícola bastante cultivada nas regiões Norte e Nordeste do Brasil. Seus frutos são pouco calóricos e ricos em de sais minerais. A presença do zinco lhe confere propriedades medicinais na prevenção de problemas na próstata e no controle do colesterol no sangue( da Silva et al., 2008). Por isso, esse estudo contribui para elucidar os efeitos que pesticidas a base de AgNP poderiam causar em plantas de Maxixe(*Cucumis anguria* L.).

## **2. OBJETIVO**

### **2.1 Objetivos gerais**

O objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos da exposição de sementes de Maxixe (*Cucumis Anguria L.*) a diferentes concentrações de nanopartículas de prata (AgNPs).

### **2.2 Objetivos específicos**

- Avaliar as taxas de germinação e de crescimento da raiz após exposição às nanopartículas de prata (AgNPs).
- Verificação dos pesos úmido e seco após os tratamentos.
- Visualizar a estrutura a nível microscópico da coifa e zona pilífera
- Visualizar a composição química.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 AgNPs**

As nanopartículas de prata utilizadas neste estudo foram sintetizadas pelo Laboratório de Materiais Funcionais Avançados (LAMFA)-UFC. Estas nanopartículas possuem diâmetro médio de 10 nm; carga superficial +40 mV e foram estabilizadas com quitosana.

#### **3.2. Teste de germinação e avaliação de crescimento da raiz de maxixe sob diferentes concentrações de nanopartículas de prata (AgNPs)**

Para verificar a capacidade germinativa das sementes de Maxixe - TOP Seed Garden Lote: 052145; Teste:06/17; Validade: 06/19). Foram utilizados AgNPs nas concentrações de 12,5; 25; 50 e 100 ppm. O controle positivo foi a água ultrapura e o negativo, ácido nítrico. Para a preparação das soluções, foi utilizada solução estoque de 600 ppm de AgNPs, que foi diluída até as concentrações. As sementes do maxixe foram imergidas nas soluções por 3 horas em cada tratamento, incluindo controle positivo e controle negativo, para embebição. Foram utilizadas 5 placas (A, B, C, D e E) para cada tratamento, e em todas elas foram inoculadas 10 sementes sobre papel *germ-test*. A verificação da taxa de germinação e medidas de comprimento da raiz principal foram realizadas a cada 24h, por um período de 7 dias, utilizando-se paquímetro digital. Foram consideradas como germinadas as sementes que tinham radícula à partir de 2 mm de comprimento. A reidratação foi feita utilizando um volume de 0,9 mL de água deionizada a cada 48h.

### **3.3. Medição do peso úmido e peso seco**

Após finalizadas as medições do sétimo dia, as plântulas de cada amostra foram pesadas em balança analítica para verificação do peso. Para a medição do peso seco, todas as amostras foram expostas ao ar ambiente do laboratório e após 7 dias tiveram seus pesos medidos, novamente utilizando-se balança de precisão analítica (precisão de 0,1 mg(0,0001 g)).

### **3.4. Microscopia eletrônica de Varredura (MEV)**

Após o período de inoculação e medição dos parâmetros estatísticos, foi realizado processamento para Microscopia eletrônica de varredura (MEV). As amostras foram fixadas em solução contendo glutaraldeído 2,5%, formaldeído 4% e tampão cacodilato de Sódio 0,05 M. Foram realizadas 3 lavagens com o tampão Cacodilato de Sódio 0,05 M. Após essa etapa, foi feita desidratação com etanol em uma série crescente de concentração( etanol 50%, 70%, 90% e 3 trocas com solução de etanol 100%). Cada etapa de desidratação durou 45 minutos. As amostras ficaram armazenadas em geladeira. Ao final, foi realizado um ponto crítico com o aparelho EMS 850. Após a secagem, as amostras foram coladas com fita de carbono em porta-amostra para MEV (stubs) e metalizadas com 20 nm de ouro em um metalizador Quorum modelo Q150R. Posteriormente, as sementes foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura QUANTA FEG 450.

### **3.5. Espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDS)**

Além da Varredura, as amostras foram analisadas quanto a seu conteúdo químico, através de Espectroscopia de energia dispersiva de raios-X(EDS) para que houvesse detecção dos percentuais dos diferentes elementos químicos, principalmente, a prata(Ag), oriunda das nanopartículas.

### **3.6. Plotagem de dados**

Os dados foram plotados no Excel®, gerando-se tabelas com todas as taxas de germinação, comprimento de raiz principal, valores de peso úmido e seco, taxas de velocidade de germinação, tempo médio de germinação e os valores de média e de desvio padrão dentro dos tratamentos. Foi realizado o teste ANOVA para calcular as significâncias(p) em relação ao controle.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Índice de Germinação

As sementes de Maxixe (*Cucumis anguria*), submetidas a diferentes concentrações de nanopartículas de prata (AgNPs), apresentaram resultados distintos entre os tratamentos. A germinação das sementes ocorreu a partir do segundo dia de exposição à AgNPs, na concentração de 25 ppm (Tabelas 1 e 2). Sementes submetidas à concentração de 25 ppm apresentaram maior índice germinativo (Tabela 1), ficando acima do controle positivo (H<sub>2</sub>O). O tratamento com 50 ppm de AgNP foi o que apresentou o menor índice de germinação entre todos os tratamentos. O tratamento com 50 ppm só apresentou aumento no percentual de germinação até o quarto dia, permanecendo em 8% de germinação até o fim do experimento. Isso indica que as AgNPs tiveram forte efeito inibitório nessa concentração.

| Média do índice de germinação (%) no intervalo de 7 dias<br>Em diferentes concentrações de AgNPs |                  |           |          |            |            |             |
|--|------------------|-----------|----------|------------|------------|-------------|
|  | H <sub>2</sub> O | 100 ppm   | 50 ppm   | 25 ppm     | 12,5 ppm   | Ác. Nítrico |
| 1  | 0                | 0,0       | 0,0      | 0,0        | 0,0        | 0,0         |
| 2  | 0                | 0,0       | 0,0      | 10,0±8,37  | 0,0        | 0,0         |
| 3  | 18±19,4          | 8,0±8,37  | 6,0±5,48 | 30,0±17,89 | 16,0±5,48  | 0,0         |
| 4  | 26±15,17         | 10,0±7,07 | 8,0±8,37 | 44,0±11,4  | 24,0±15,17 | 0,0         |
| 5  | 30±20            | 10,0±7,07 | 8,0±8,37 | 46,0±11,4  | 28,0±19,24 | 0,0         |
| 6  | 42±17,89         | 12,0±8,37 | 8,0±8,37 | 52,0±12,,3 | 30,0±25,88 | 0,0         |
| 7  | 42±17,89         | 14,0±8,4  | 8,0±8,37 | 52,0±12,3  | 40,0±29,2  | 0,0         |

**Tabela 1.** Média do índice de germinação (%) no intervalo de 7 dias em diferentes concentrações de AgNPs. A tabela 1 mostra que o tratamento com 25 ppm de AgNPs apresentou o maior percentual de germinação entre todos os tratamentos. O percentual de germinação das sementes tratadas com 50 ppm de AgNPs só cresceu até o 4° dia, depois disso elas mantiveram 8% de germinação até o final do experimento. O percentual de germinação dos

tratamentos com 25 ppm de NPs foi maior em relação ao tratamento com água ultrapura (controle positivo).

#### 4.2. Crescimento médio das raízes

As sementes que apresentaram as maiores médias de crescimento foram as tratadas com 25 ppm de AgNP (tabela 2), apresentando média de crescimento de  $17,36(\pm 9,46)$ , após os 7 dias de experimento. Resultado semelhante foi observado em estudo com nanopartículas de magnetita ( $Fe_3O_4$ -NPs), onde ocorreu aumento no percentual de germinação e o alongamento da raiz em sementes de *Quercus macdougalii* (Pariona et al., 2017). Essa maior média de crescimento de sementes expostas a 25 ppm de AgNPs pode ser atribuída a uma resposta biológica geralmente favorável a exposições de toxinas e outros causadores de estresse em baixas concentrações (Barrena et al., 2009). O menor comprimento médio das raízes ocorreu no tratamento com 50 ppm (Tabela 2).

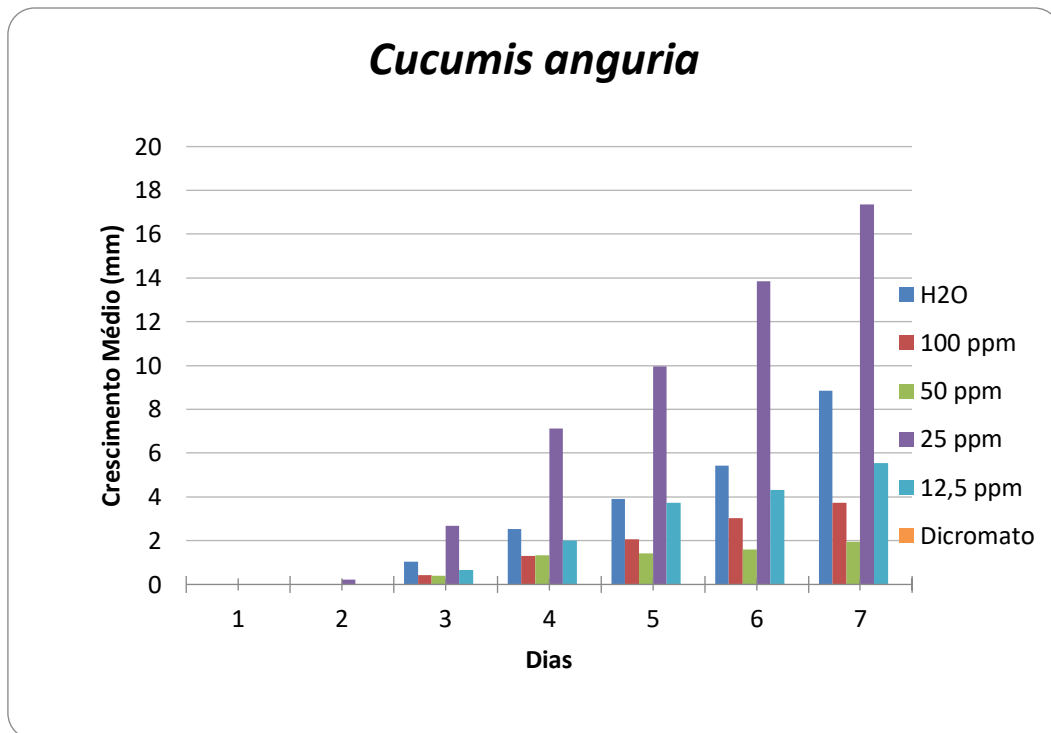
| Média geral de crescimento de raiz no intervalo de 7 dias (mm) |                  |            |           |            |            |               |
|--|------------------|------------|-----------|------------|------------|---------------|
| Em diferentes concentrações de AgNPs                           |                  |            |           |            |            |               |
|  | H <sub>2</sub> O | 100 ppm    | 50 ppm    | 25 ppm     | 12,5 ppm   | Ácido Nítrico |
| 1  | 0                | 0          | 0         | 0          | 0          | 0             |
| 2  | 0                | 0          | 0         | 0,22±0,23  | 0          | 0             |
| 3  | 1,044±2,50       | 0,42±0,46  | 0,4±0,46  | 2,68±1,61  | 0,674±0,12 | 0             |
| 4  | 2,544±6,64       | 1,316±4,81 | 1,33±0,46 | 7,12±3,18  | 2,01±0,62  | 0             |
| 5  | 3,892±7,31       | 2,07±1,82  | 1,41±1,53 | 9,97±4,97  | 3,74±1,37  | 0             |
| 6  | 5,436±11,93      | 3,028±2,64 | 1,61±2,82 | 13,85±7,22 | 4,31±2,33  | 0             |
| 7  | 8,86±9,56        | 3,72±3,07  | 1,94±1,94 | 17,36±9,46 | 5,54±2,90  | 0             |

**Tabela 2.** Média geral de crescimento de raiz no intervalo de 7 dias (mm) em diferentes concentrações de AgNPs. A tabela 1 mostra que só houve germinação à partir do 2° dia de tratamento. É interessante notar que no 2° dia de experimento, apenas as sementes tratadas com 25 ppm de AgNPs apresentaram crescimento de

raiz. Outro dado interessante é que ao 7º dia (último dia de experimento), as sementes tratadas com 25 ppm de AgNPs apresentaram um crescimento positivo de raiz em relação à água deionizada, sendo o maior crescimento dentre todos os tratamentos.

O resultado obtido no tratamento com 25 ppm de AgNP, onde o crescimento das raízes foi favorecido, também foi observado em outro estudo, onde a aplicação de AgNP em baixas concentrações em sementes de ervilha favoreceu o crescimento das raízes (Barabanov et al., 2018). Esse crescimento está relacionado com as peroxidases, enzimas que aumentam sua atividade mediante o estresse sofrido pela planta e que promovem o seu alongamento através da geração de radicais livres ou pela regulação local da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Passardi et al., 2004).

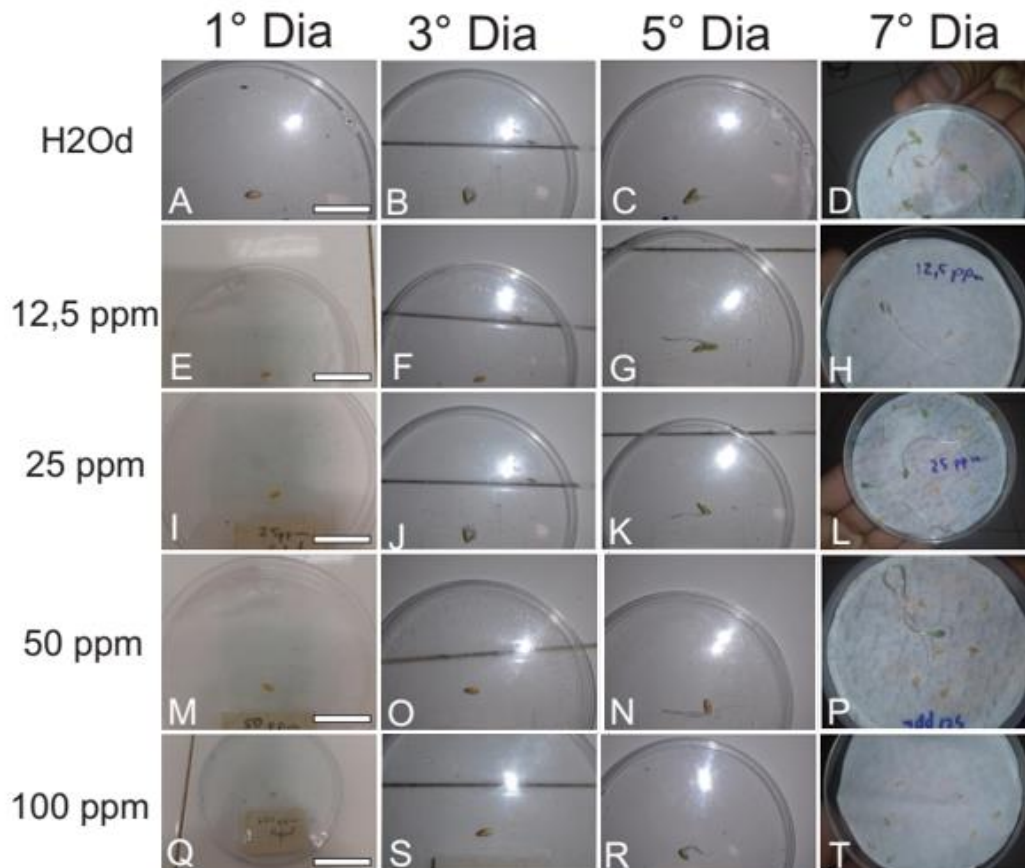
O efeito das nanopartículas no desenvolvimento das raízes pode, em alguns casos, ter relação com as concentrações de NPs utilizada, como observado por Yang et al (2017) em estudo com sementes de *Arabidopsis thaliana* tratadas com nanopartículas de Óxido de Cerio(CeO<sub>2</sub>). Porém, os efeitos da aplicação de AgNPs no Maxixe(*Cucumis anguria* L.) não demonstraram uma correlação direta entre concentração de AgNP e inibição do crescimento de raízes no Maxixe(*Cucumis anguria* L.), uma vez que, a menor média de crescimento de raiz observada ocorreu na concentração de 50 ppm(1,94 mm), valor menor que o apresentado no tratamento com 100 ppm(3,72 mm) (tabela 2).



**Figura 1.** Crescimento médio de raízes de *Cucumis anguria* submetidas a diferentes concentrações de AgNPs, no intervalo de 7 dias. Note maior crescimento das raízes no tratamento de 25 ppm.

No ultimo dia de experimento é possível notar que raízes expostas a concentração de 25 ppm de AgNPs apresentaram efeito positivo em seu crescimento em relação ao controle (Figura 3), apresentando diferença significativa ( $P < 0,05$ ). As demais concentrações de AgNPs (50, 100 ppm) apresentaram efeito negativo em relação ao controle, no entanto, estatisticamente não apresentaram diferença significativa (Figura 3). Resultado semelhante foi observado em estudo com semente de arroz (*Oryza sativa* L.), onde em altas concentrações de AgNPs houve forte inibição do crescimento da raiz (Thuesombat et al., 2014). As sementes submetidas à concentração de 12,5 ppm de AgNPs não apresentaram efeito positivo em seu crescimento, como o observado no tratamento com 25 ppm, uma vez que, a concentração utilizada não foi suficiente para promover o estresse necessário ao crescimento, como observado por Giorgetti et al (2010).

Raízes de *Cucumis anguria* submetidas à diferentes concentrações de nanopartículas de prata (AgNPs)



**Figura 2. Evolução do crescimento das raízes de sementes de *Cucumis sativus* L. em diferentes concentrações de AgNPs.** Essa figura mostra imagens retiradas de sementes em diferentes dias e tratamentos ao longo do experimento. No sétimo dia, uma placa inteira de cada tratamento foi fotografada e, como apresentado nas tabelas estatísticas, pode-se observar nas imagens que as placas com maior número de sementes germinadas foram as dos tratamentos com água deionizada (controle positivo) e 25 ppm de AgNPs. O tratamento com de ácido nítrico (controle negativo) só foi fotografado no sétimo dia, pois nenhuma semente germinou em nenhuma das placas ao longo do experimento. Nas placas com sementes de *Cucumis anguria* tratadas com HNO<sub>3</sub>. Como esperado, não houve germinação.

### 4.3. Peso Úmido e Seco

A biomassa das raízes foi avaliada utilizando como parâmetro os pesos úmido e seco. O maior peso úmido médio foi observado em raízes exposta a concentração de 25 ppm. Em contrapartida, o menor peso úmido médio foi observado nos tratamentos com concentração de 50 ppm de AgNPs (Tabela 3). Após secarem, as sementes não apresentaram diferenças significativas em seus pesos secos. O controle negativo(ácido nítrico) apresentou o menor peso úmido, mostrando que a inibição da germinação e crescimento das raízes está relacionada com redução da absorção de água pelas sementes. O segundo menor peso úmido foi observado no tratamento com 50 ppm(0,136g).

| Médias de peso úmido e seco das sementes (g) |              |              |
|--|--------------|--------------|
| Tratamento                                   | Média PU (g) | Média PS (g) |
| Ácido Nítrico                                | 0,097±0,017  | 0,062±0,005  |
| H2Od   | 0,222±0,106  | 0,059±0,007  |
| 100 ppm                                      | 0,172±0,039  | 0,055±0,006  |
| 50 ppm                                       | 0,136±0,027  | 0,063±0,004  |
| 25 ppm                                       | 0,262±0,042  | 0,059±0,006  |
| 12,5 ppm                                     | 0,163±0,039  | 0,062±0,008  |

**Tabela 3. Médias de peso úmido e seco das sementes(g)** As sementes do tratamento com 25 ppm de NPs apresentaram a maior média de peso úmido(PU) dentre todos os tratamentos, seguido do tratamento com água deionizada. Após a secagem, as sementes não apresentaram diferenças significativas em seus pesos úmidos.

#### 4.4. Significância em relação ao controle positivo

| Média de crescimento da raiz (mm) e índice de germinação (%) no intervalo de 7 dias em diferentes concentrações de AgNPs |                   |                                      |                           |                                      |
|--|-------------------|--------------------------------------|---------------------------|--------------------------------------|
| Tratamento   | G(%) após 7 dias* | Significância em relação ao controle | Crescimento da raiz (mm)* | Significância em relação ao controle |
| H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>  | 42± 16,4          | -                                    | 8,67± 9,56                | -                                    |
| 100 ppm  | 14 ± 8,4          | p = 0,03                             | 3,72 ± 3,07               | p=0,13                               |
| 50 ppm   | 8 ± 8,37          | p = 0,02                             | 1,94 ± 1,94               | p=0,06                               |
| 25 ppm   | 52± 12,3          | p = 0,15                             | 17,36 ± 9,46              | p=0,086                              |
| 12,5 ppm   | 40 ± 29,2         | p= 0,30                              | 5,54 ± 2,9                | p=0,3                                |

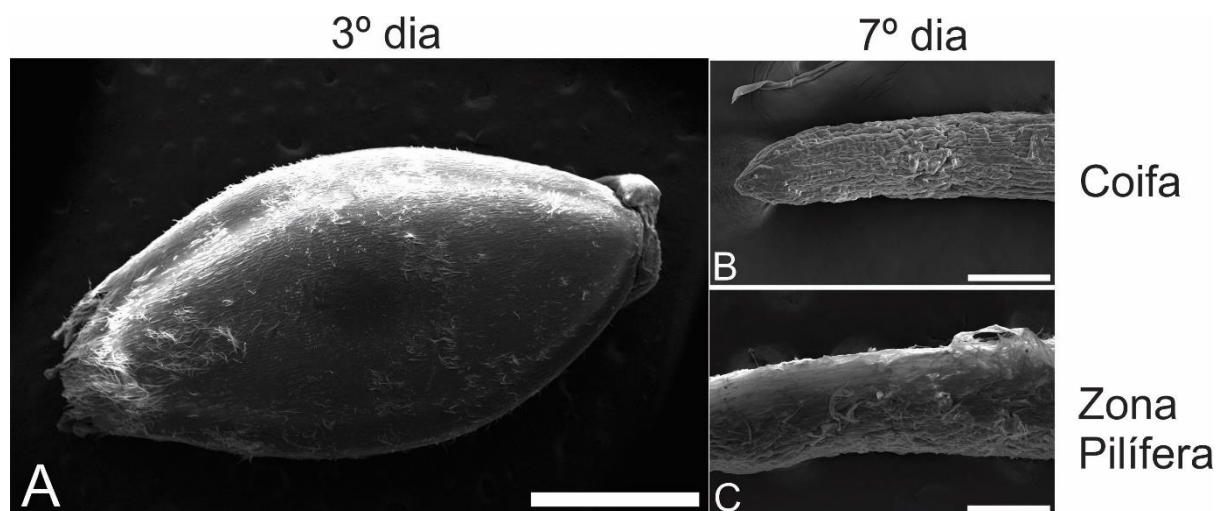
**Tabela 4. Média de crescimento da raiz (mm) e índice de germinação (%) no intervalo de 7 dias em diferentes concentrações de AgNPs.** Quando comparado o índice de germinação, os tratamentos com 50 e 100 ppm de NPs apresentaram valores de significância(p) menores que 0,05( $p_{50\text{ppm}} = 0,02$ ;  $p_{100\text{ppm}} = 0,03$ ), indicando que houve diferença significativa em relação ao controle positivo(H<sub>2</sub>O). Porém, quando comparadas as medias de crescimento, nenhum valor de significância(p) foi maior que 0,05, não havendo diferença significativa em relação ao controle positivo.

#### 4.5. Tempo médio de germinação(TMG) e Índice de velocidade de germinação(IVG)

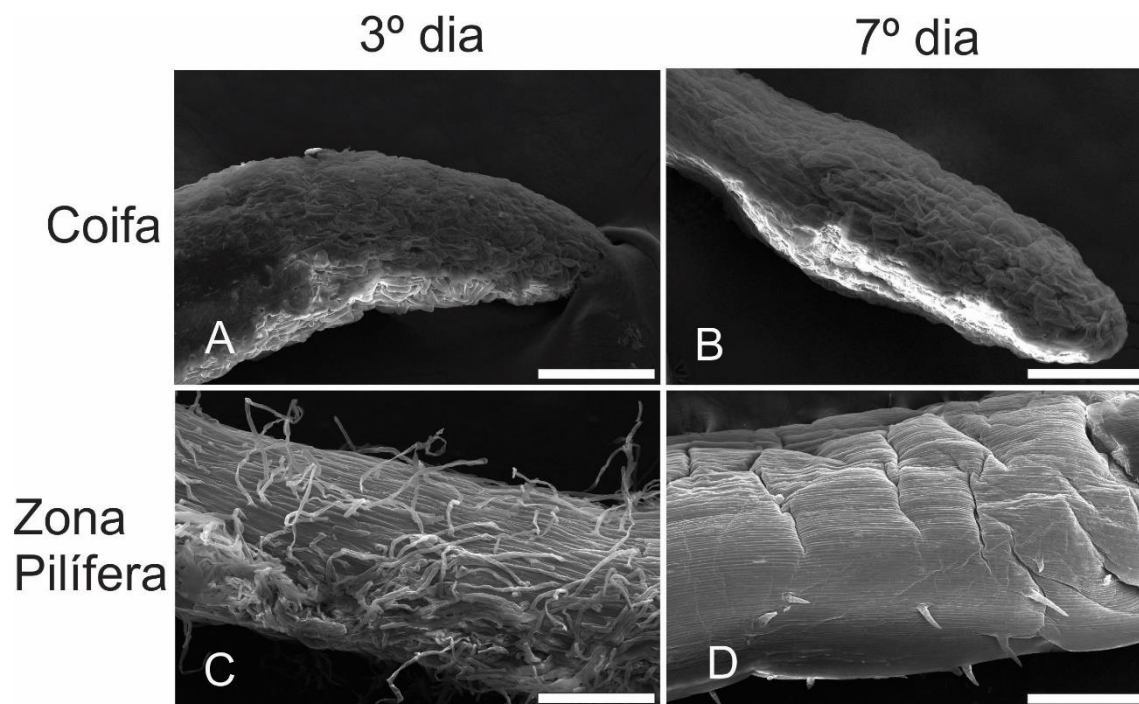
| Tempo médio de germinação (TMG) e índice de velocidade de germinação (IVG) no intervalo de 7 dias em diferentes concentrações de AgNPs |            |       |
|--|------------|-------|
| Tratamento   | TMG (dias) | IVG   |
| H2O  | 5,13       | 0,658 |
| 100 ppm  | 5,19       | 0,23  |
| 50 ppm   | 5,11       | 0,166 |
| 25 ppm   | 5,102      | 0,97  |
| 12,5 ppm   | 5,26       | 0,598 |

**Tabela 5. Tempo médio de germinação e índice de velocidade de germinação no intervalo de 7 dias em diferentes concentrações de AgNPs.** A tabela mostra que não houve diferença significativa entre os tratamentos em relação ao Tempo Médio de Germinação(TMG). Porém, quando comparados os Índices de Velocidade de Germinação(IVG), nota-se que , as sementes do tratamento com 25 ppm de AgNP apresentaram uma velocidade de germinação superior à todos os demais tratamentos(IVG=0,97). O segundo maior índice de velocidade encontrado foi o do tratamento com água deionizada(IVG=0,658).

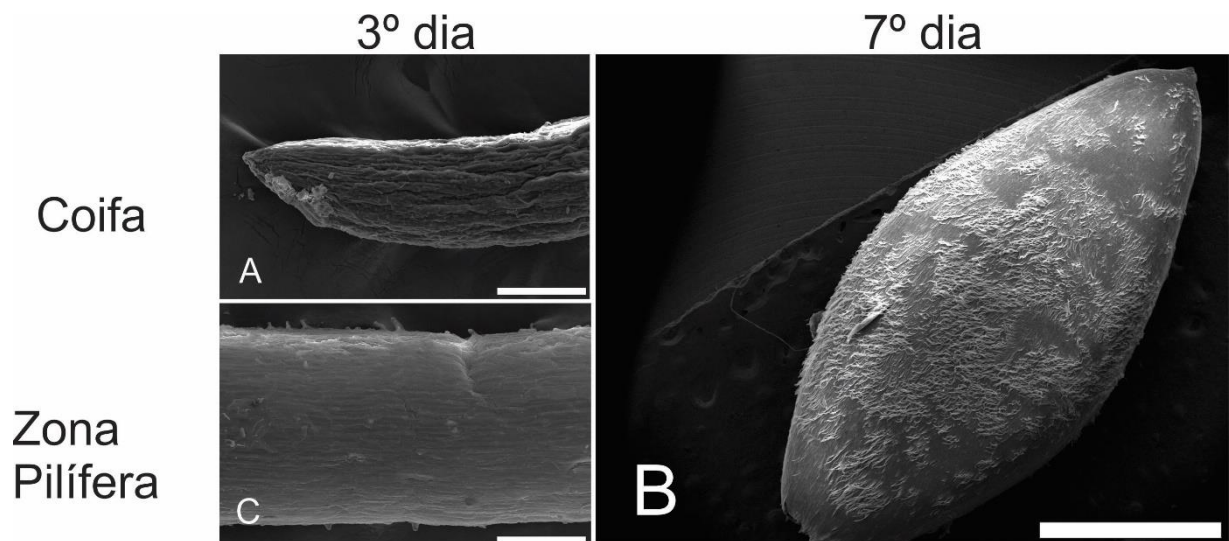
#### 4.6 Microscopia Eletrônica de Varredura(MEV)



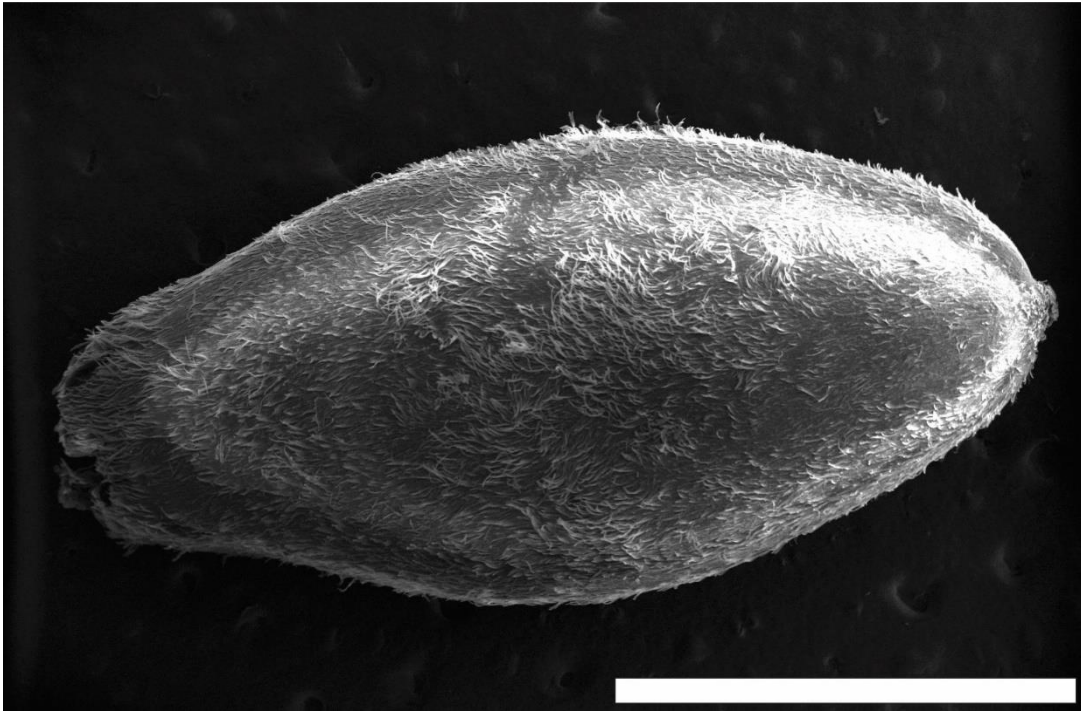
**Figura 3.** Imagens de Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do tratamento com 12,5 ppm de AgNPs. Na Imagem A, é possível notar que as sementes coletadas no 3º dia de tratamento não germinaram, já nas sementes coletadas no 7º dia, houve germinação, porém, a zona pilífera não se desenvolveu. Barras: Coifa – 200  $\mu$ m. Zona Pilífera – 500  $\mu$ m.



**Figura 4.** Imagens de Microscopia eletrônica de varredura (MEV) no tratamento com 25 ppm de AgNPs. Nas sementes coletadas no 3° dia de tratamento houve desenvolvimento da coifa e zona pilífera (A e C). Destaca-se o alto desenvolvimento da zona pilífera no 3° dia (C). Nas sementes coletadas no 7° dia de tratamento não houve alteração em relação à coifa, porém, na zona pilífera, foi observado uma pequena quantidade de pelos. Barras: Coifa – 200  $\mu\text{m}$ . Zona Pilífera – 500  $\mu\text{m}$ .

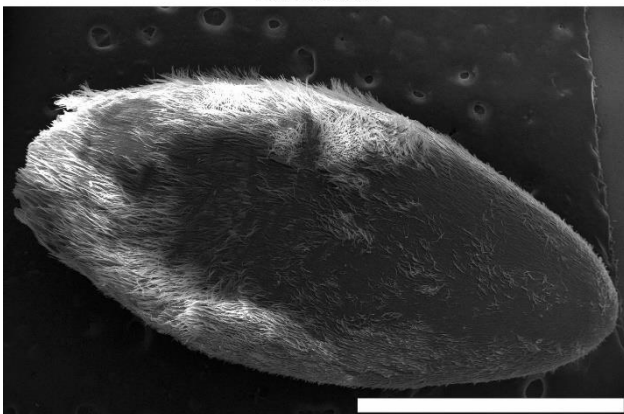


**Figura 5.** Imagens de Microscopia eletrônica de varredura (MEV) no tratamento com 50 ppm de AgNPs. Nas sementes coletadas no 3° dia de tratamento houve desenvolvimento da coifa e zona pilífera (A e C). Destaca-se o baixo desenvolvimento da zona pilífera no 3° dia (C). Nas sementes coletadas no 7° dia de tratamento não germinaram. Barras: Coifa – 200  $\mu\text{m}$ . Zona Pilífera – 500  $\mu\text{m}$ .

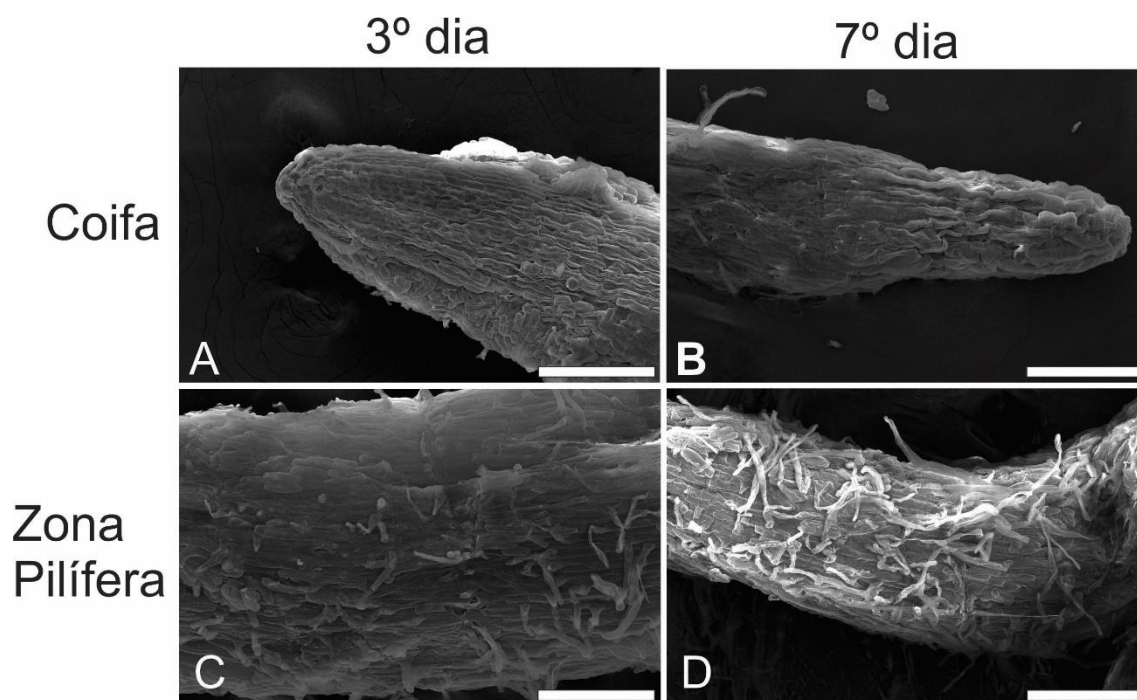


**Figura 6.** Imagens de Microscopia eletrônica de varredura(MEV) do tratamento com 100 ppm de AgNPs. As sementes coletadas da placa do tratamento com 100 ppm de AgNPs não germinaram. Barras: Coifa – 200  $\mu\text{m}$ . Zona Pilífera – 500  $\mu\text{m}$ .

Semente



**Figura 7.** Imagens de Microscopia eletrônica de varredura(MEV) do tratamento com ácido nítrico. As sementes coletadas da placa do tratamento com ácido nítrico (controle negativo) não germinaram. Barras: Coifa – 200  $\mu\text{m}$ . Zona Pilífera – 500  $\mu\text{m}$ .



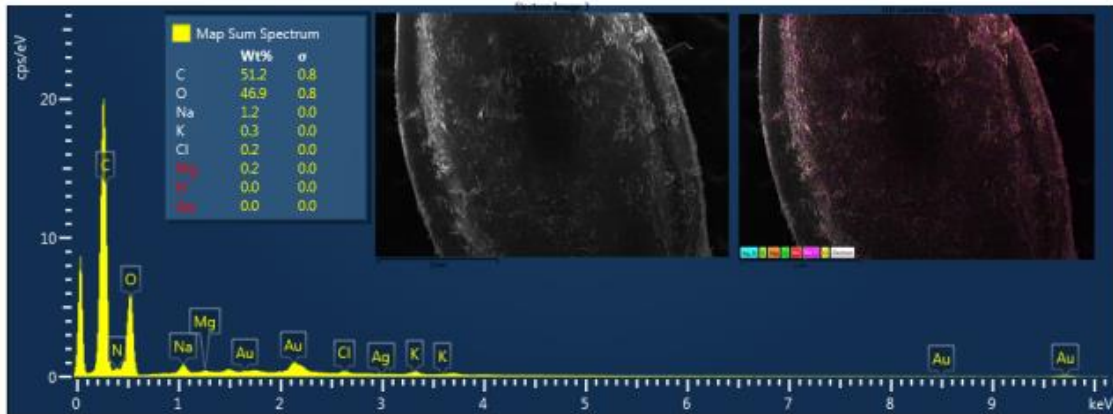
**Figura 8.** Imagens de Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do tratamento com água ultrapura (controle positivo), nas imagens A e C, é possível notar que tanto a coifa quanto a zona pilífera das sementes coletadas no 3° dia se desenvolveram. Nas imagens B e D, nota-se que a coifa e zona pilífera das sementes coletadas no 7° dia tiveram desenvolvimento maior que o apresentado nas do 3° dia. Barras: Coifa – 200 µm. Zona Pilífera – 500 µm.

Imagens de microscopia eletrônica de varredura realizadas em raízes de Maxixe mostraram pouca variância entre os tratamentos. Nota-se que na concentração de 25 ppm houve maior desenvolvimento da zona pilífera (Figura 5), seguido pelo controle negativo (H<sub>2</sub>O) (Figura 9). Em relação à concentração de 12,5 e 50 ppm ocorreu pouco desenvolvimento da zona pilífera (Figura 4, 6), fato atribuído a baixa absorção de H<sub>2</sub>O, como podemos observar na Tabela 3, onde mostra que os tratamentos 12,5 e 50 ppm apresentaram os menores pesos úmidos. A Figura 7, referente ao tratamento 100 ppm, mostra uma semente não germinada de uma placa separada exclusivamente para coleta de material para Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Porém, nas outras 5 placas do tratamento 100 ppm (separadas para medições da estatística de crescimento) houve

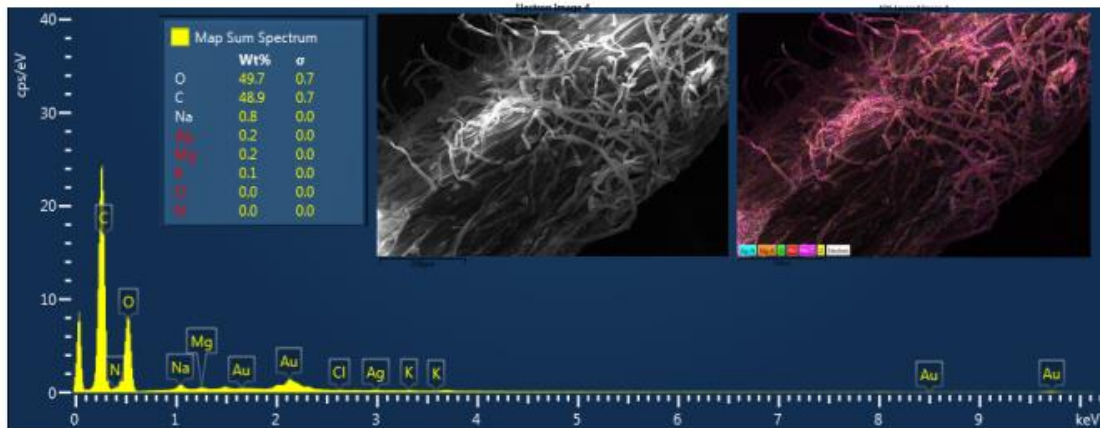
germinação (Tabela 2). O fato de haver baixa taxa de germinação das sementes coletadas no 7º dia pode ser resultado do alto acúmulo de AgNPs, inibindo a produção de fitoferritina. Sabe-se que a fitoferritina é de grande importância na germinação de sementes. Durante este processo, a fitoferritina é degradada e libera ferro, promove a geração de íons hidroxila que destrói a camada de proteína da semente (Zhang et al., 2013). Além disso, a absorção de íons de prata ( $\text{Ag}^+$ ) causa interrupção de moléculas de ATP, impedindo a replicação do DNA bem como a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Marambio-Jones et al., 2010).

## 4.7. Espectroscopia por energia dispersiva de raios-X(EDS)

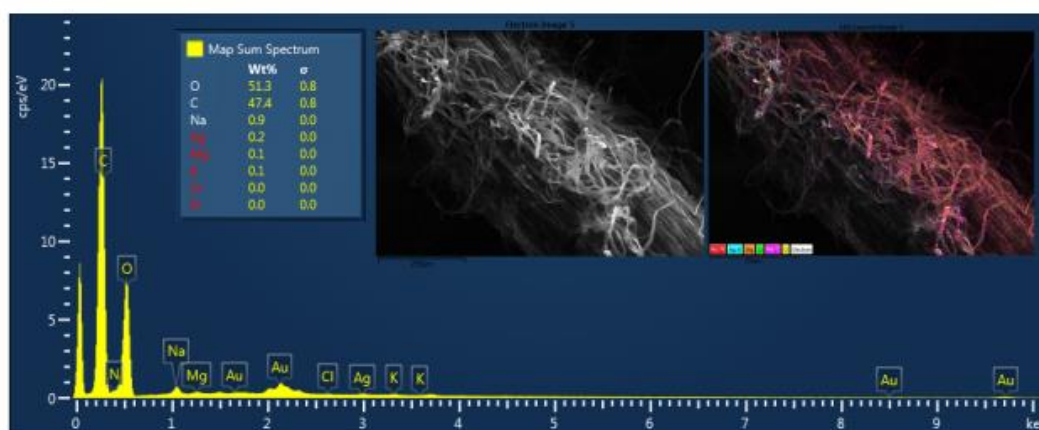
### 4.7.1 Percentuais de Ag na superfície das sementes



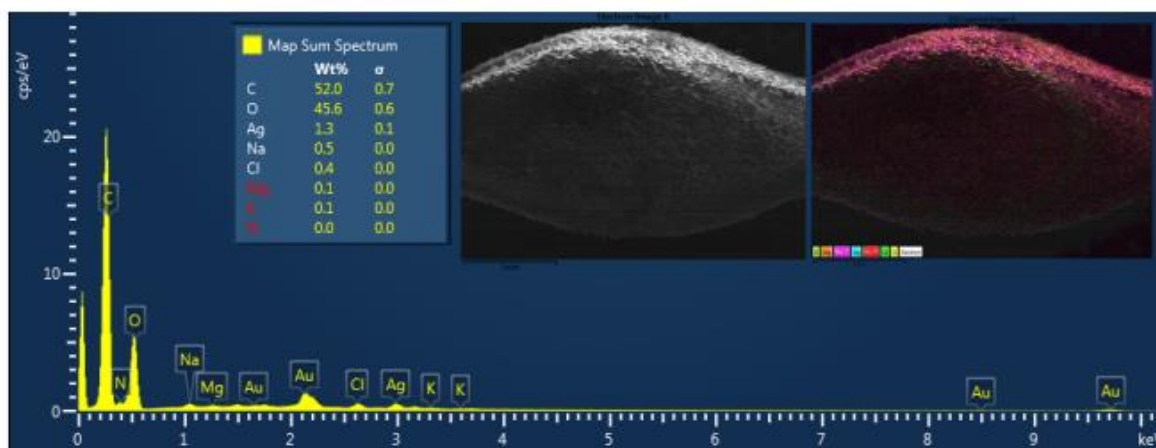
**Figura 9.** EDS de semente tratada com 12,5 ppm de AgNPs no 3° dia de coleta. A microanálise da semente não registrou presença de Ag na superfície da semente (Wt% = 0%)



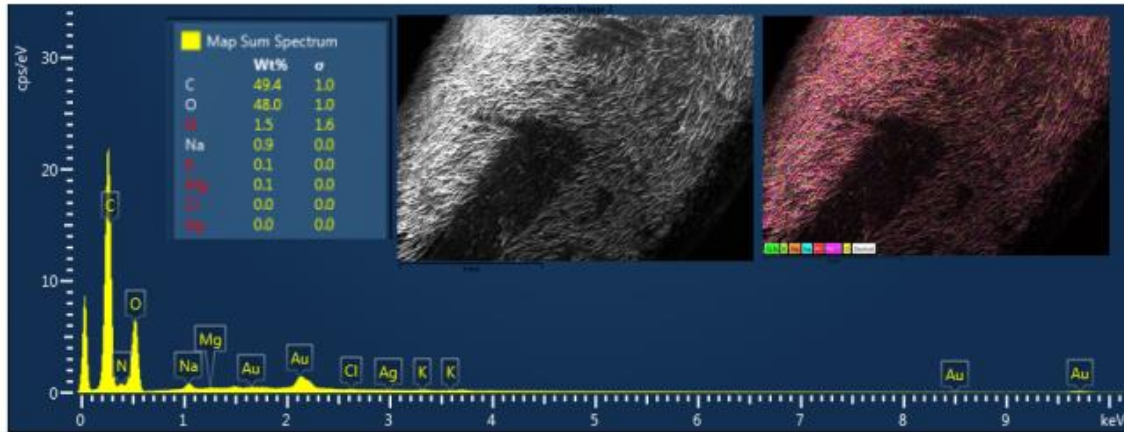
**Figura 10.** EDS de semente tratada com 25 ppm de AgNP no 3° dia de coleta. A microanálise da semente mostra que foi detectada a presença de Ag (Wt%=0,2%).



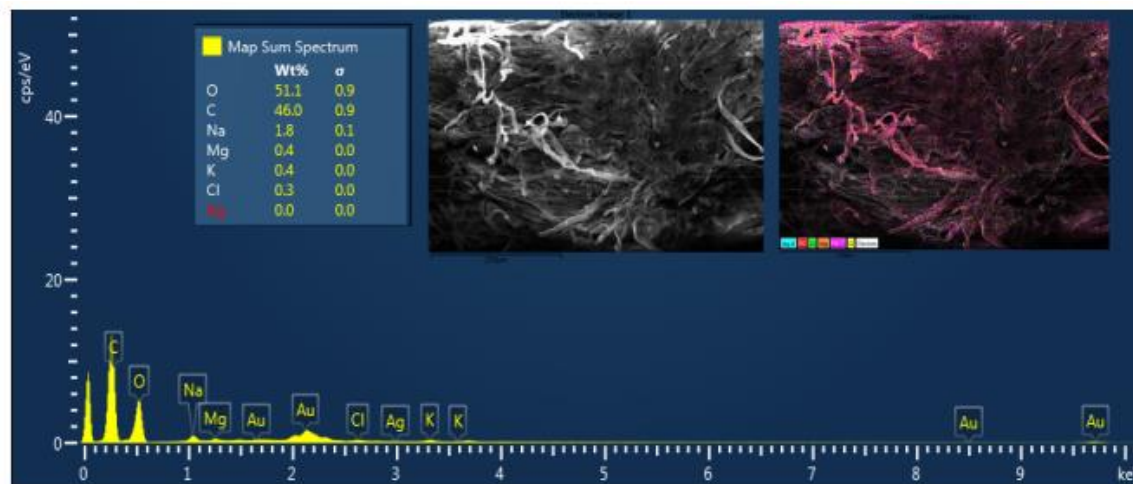
**Figura 11.** EDS de semente tratada com 50 ppm de AgNP no 3° dia de coleta. A microanálise das sementes detectou uma presença de Ag(Wt% = 0,2 %). O percentual de prata observada foi idêntico ao observado nas sementes tratadas com 25 ppm de NP, coletadas no 3° dia.



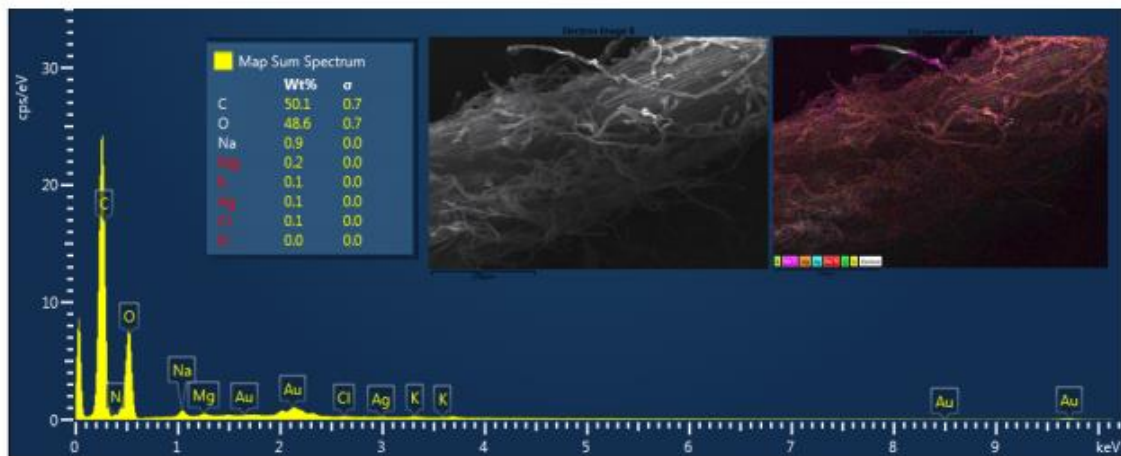
**Figura 12.** EDS de semente tratada com 100 ppm de AgNP no 3° dia de coleta. A microanálise das sementes tratadas com 100 ppm de NP detectou um acúmulo de NP na superfície da semente e uma alta quantidade de Ag(Wt% = 1,3%).



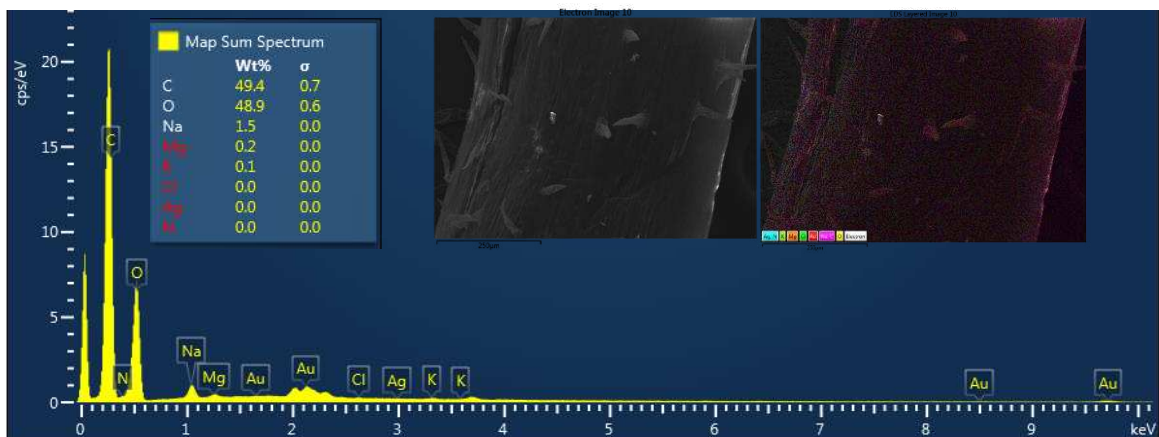
**Figura 13.** EDS de semente tratada com ácido nítrico no 3° dia de coleta. A microanálise das sementes mostra que não foi detectada a presença de Ag, como esperado.



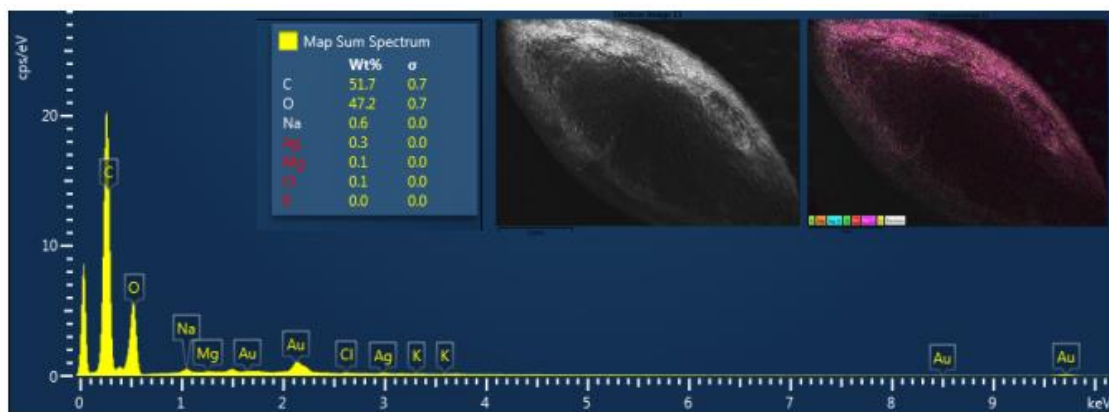
**Figura 14.** EDS de semente tratada com água ultrapura no 3° dia de coleta. A microanálise mostra que não houve detecção de prata, como esperado. Outro dado interessante é que a microanálise mostrou um percentual de Na, Mg, K e Cl superior à todos os outros tratamentos.



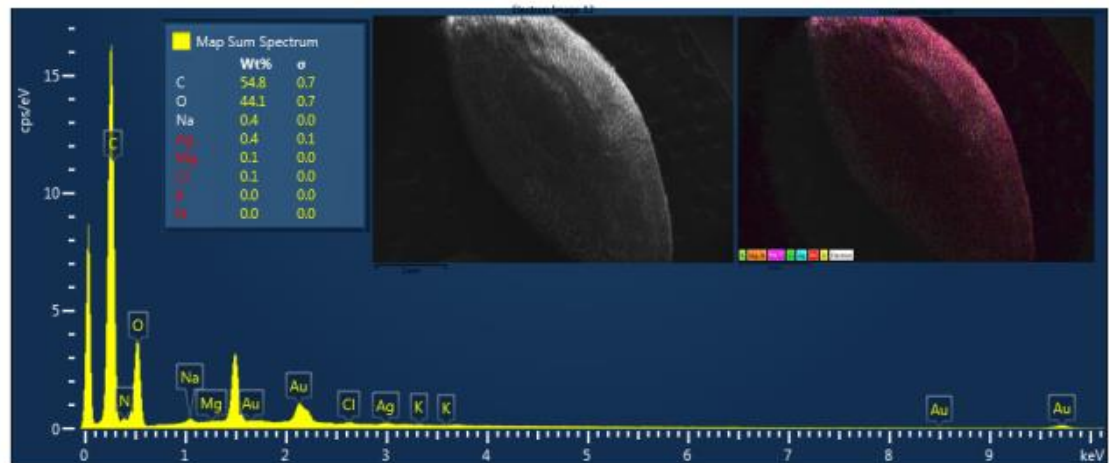
**Figura 15.** EDS de semente tratada com 12,5 ppm de AgNP no 7° dia de coleta. A microanálise apontou um leve aumento no percentual de Ag(Wt% = 0,1%), em relação ao mesmo tratamento no 3° dia de coleta.



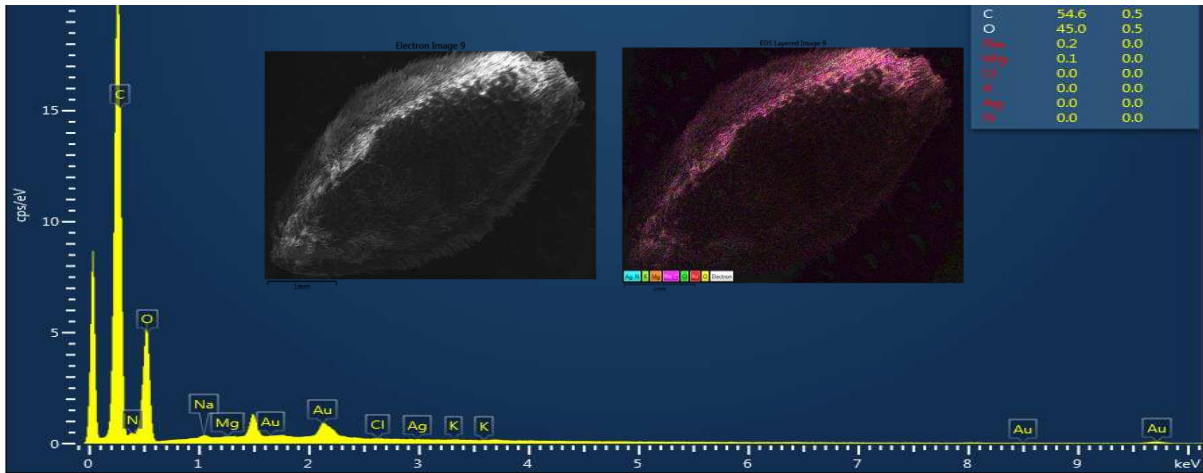
**Figura 16.** EDS de semente tratada com 25 ppm de AgNP no 7° dia de coleta. Nas sementes tratadas com 25 ppm coletadas no 7° dia, não foi detectada a presença de prata(Ag).



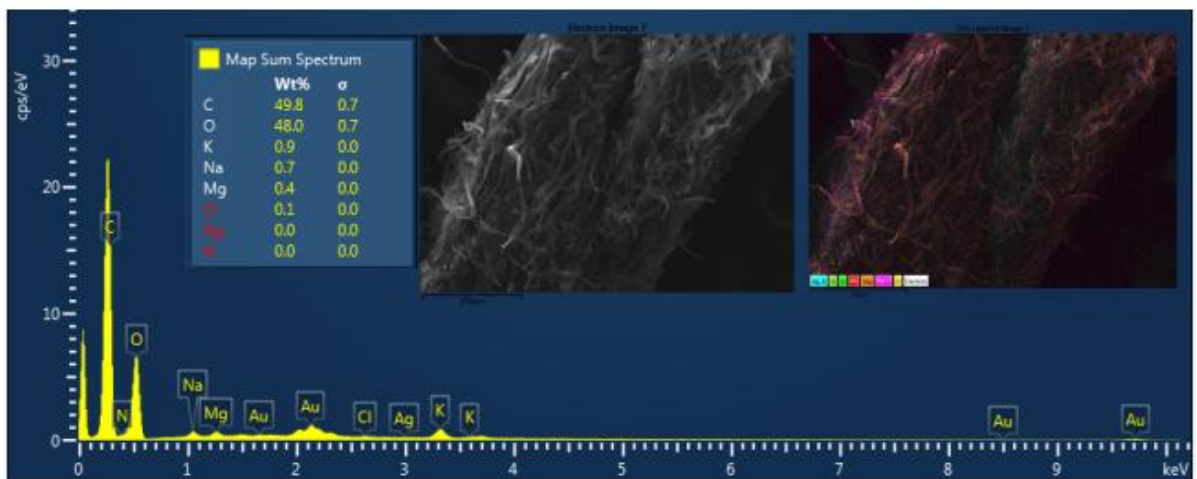
**Figura 17.** EDS de semente tratada com 50 ppm de AgNP no 7° dia de coleta. Foi detectada presença de Ag(Wt% = 0,3%). O percentual detectado no tratamento com 25 ppm de AgNP no 7° dia de coleta foi superior ao encontrado no mesmo tratamento no 3° dia de coleta(Wt% = 0,2%)



**Figura 18.** EDS de semente tratada com 100 ppm de AgNP no 7° dia de coleta. Foi detectada a presença de Ag (Wt% = 0,4%), inferior ao percentual encontrado no mesmo tratamento no 3° dia de coleta(1,3%).



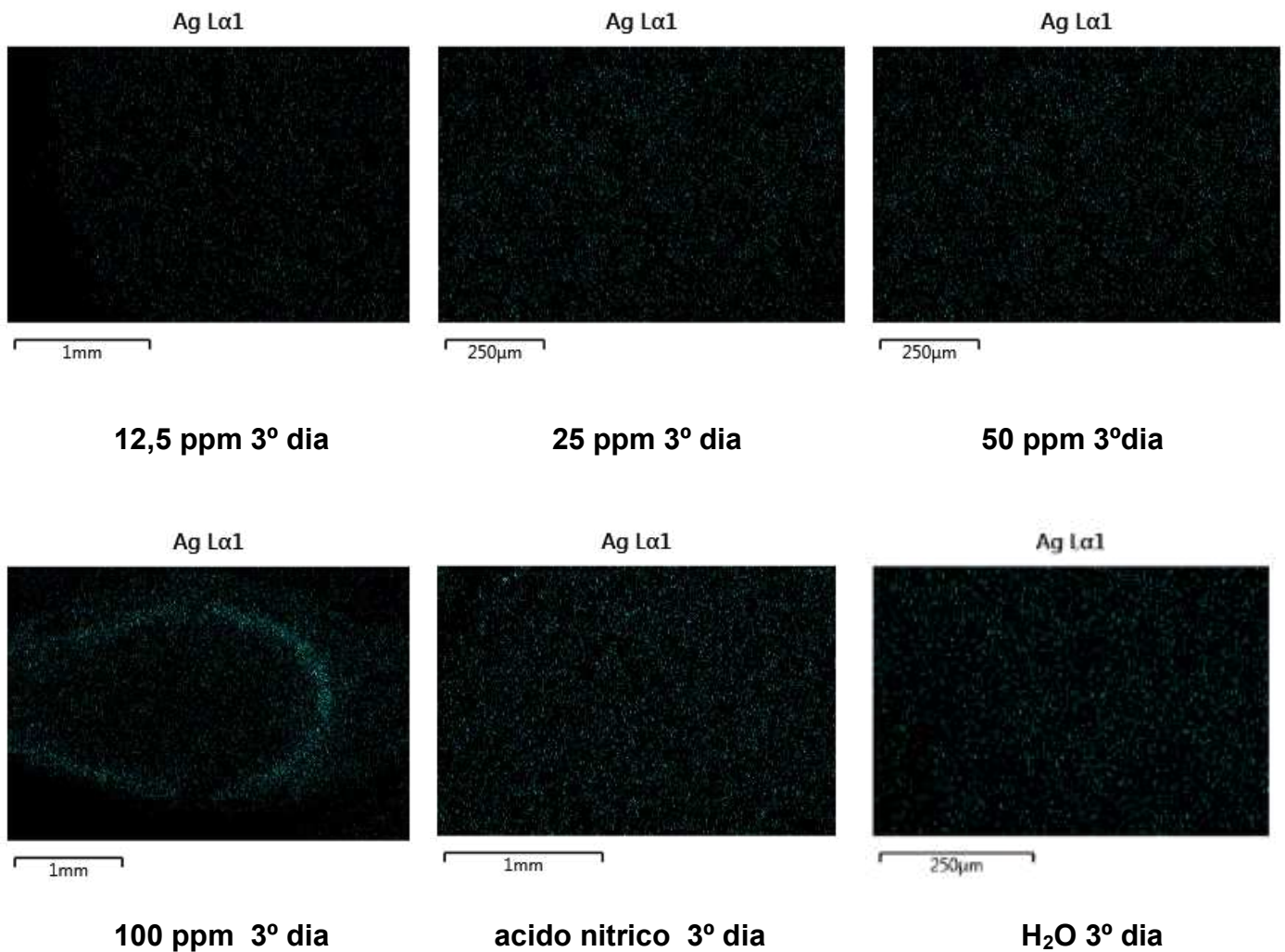
**Figura 19.** EDS de semente tratada com ácido nítrico no 7º dia de coleta. Não houve detecção de Ag, como era esperado.



**Figura 20.** EDS de semente tratada com água ultrapura no sétimo dia de coleta. Não houve detecção de Ag. Nota-se que, na semente tratada com água, coletada no 7º dia, o percentual de sódio(Na) foi menor do que nos tratamentos com 12,5 e 25 ppm de AgNP, também coletadas no sétimo dia.

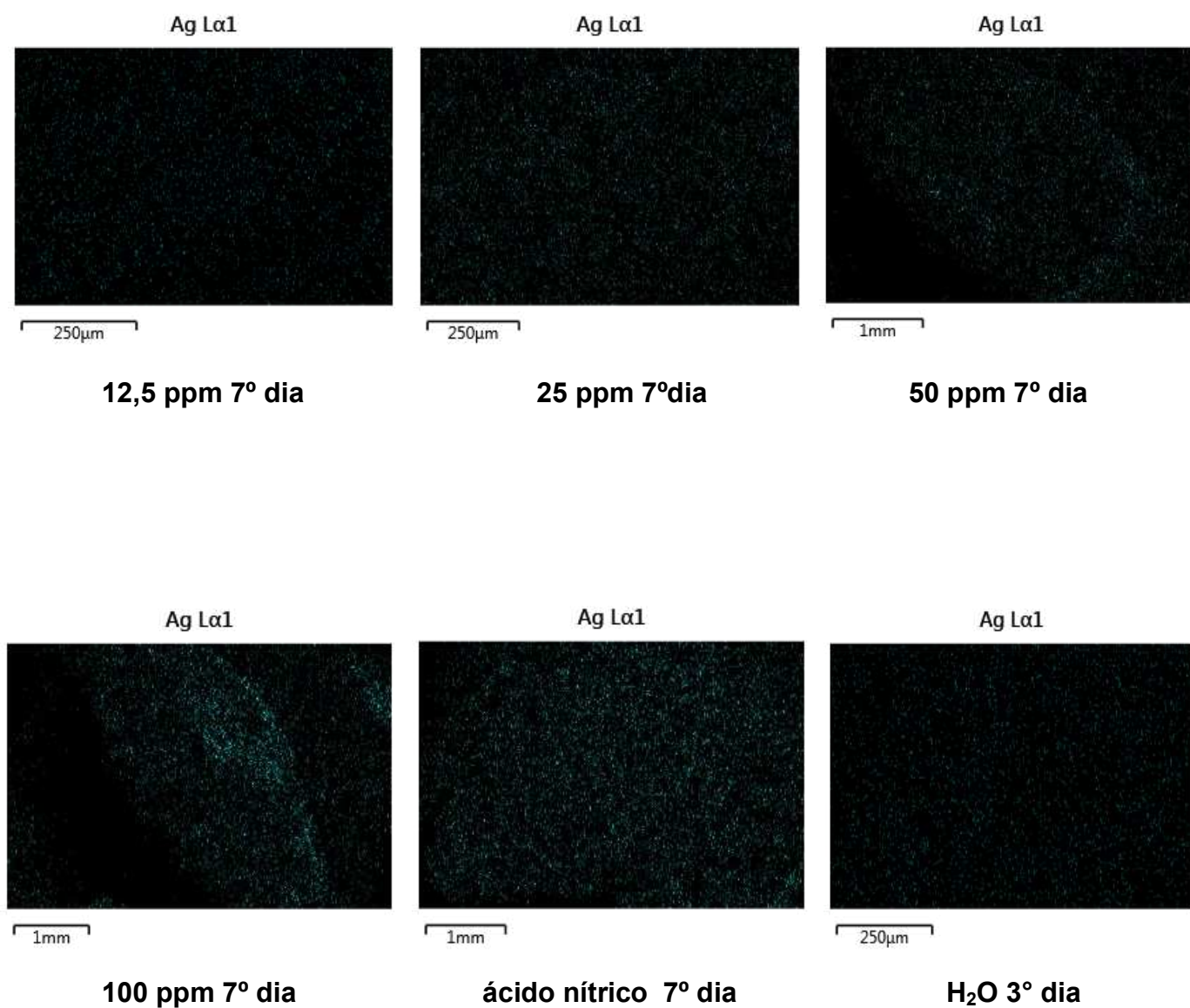
#### 4.7.2 Detecção de Ag na superfície:

3º dia de tratamento



**Figura 21. Detecção de sinal de Ag das sementes de todos os tratamento coletadas no 3º dia de experimento.** Nota-se uma forte detecção de prata na superfície das sementes do tratamento com 100 ppm de AgNP. Nos demais tratamentos não houve detecção de sinal de Ag.

## 7º dia de tratamento



**Figura 22. Detecção de sinal de Ag das sementes de todos os tratamento coletadas no 7º dia de experimento. Nota-se que o sinal de Ag detectado no 7 dia permaneceu alto no tratamento com 25 ppm, porém, inferior ao apresentado no 3 dia, indicando uma possível absorção de Ag após o 3 dia de experimento.**

A Espectroscopia por energia dispersiva de raios-X(EDS) em raízes de *Cucumis anguria* revelou a presença de carbono e oxigênio como componentes majoritários, fato atribuído ao material biológico. A quantificação de prata ficou abaixo do esperado, visto que esta pode ser atribuído a migração da nanopartículas de prata (AgNPs) para tecidos mais internos (Larue et al., 2014). O percentual de prata (%) quantificado nas raízes foi diretamente proporcional a concentração de AgNPs. Ao longo do experimento, houve redução na quantidade de prata detectada nas sementes por EDS. Nas sementes do tratamento 100 ppm, por exemplo, foi observado valor de 1,3 no terceiro dia (Figura 13) e 0,4 no sétimo dia do experimento (Figura 19). Como esperado, os controles positivo ( $\text{HNO}_3$ ) e negativo ( $\text{H}_2\text{O}$ ) não apresentaram nenhum traço de prata nas raízes (Figura 20, 21).

## 5. CONCLUSÃO

Os experimentos realizados demonstraram que o índice de germinação e crescimento das raízes foi afetado pela exposição às nanopartículas. As sementes do tratamento com 50 ppm apresentaram maior inibição da germinação e crescimento dentre todos os tratamentos, mostrando não haver uma correlação direta entre concentração de AgNPs e inibição. O tratamento com 25 ppm resultou em um estímulo a germinação e crescimento de raízes, bem como, da zona pilífera, por um mecanismo desconhecido até o momento. Os pesos úmidos apresentaram diferença entre os tratamentos. O tratamento com 25 ppm apresentou o maior peso úmido, mostrando que o ganho de biomassa foi favorecido nessa concentração de AgNPs. Em relação ao peso seco, não houve diferença significativa entre os tratamentos. O tempo médio de germinação(TMG) também foi praticamente o mesmo para todos, mas o índice de velocidade de germinação(IVG) foi diferente. As sementes tratadas com 25 ppm apresentaram a maior velocidade de germinação. A análise por varredura(MEV) mostrou que as sementes que germinaram tardiamente(após o 3° dia) apresentaram atrofiamento da zona pilífera, provavelmente, devido à inibição causada pela nanopartícula. O EDS mostrou que não houve detecção de Ag na superfície das sementes, exceto no tratamento com 100 ppm(3° dia), mostrando que há, possivelmente, uma absorção e translocação de AgNP para outras partes da planta.

## REFERÊNCIAS

- Barabanov, P. V., Gerasimov, A. V., Blinov, A. V., Kravtsov, A. A., & Kravtsov, V. A. (2018). Influence of nanosilver on the efficiency of *Pisum sativum* crops germination. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 147(September 2017), 715–719.
- Barrena, R., Casals, E., Colón, J., Font, X., Sánchez, A., & Puntès, V. (2009). Evaluation of the ecotoxicity of model nanoparticles. *Chemosphere*, 75(7), 850–57.
- Dietz, K. J., & Herth, S. (2011). Plant nanotoxicology. ***Trends in plant science***, 16(11), 582-589.
- Disponível <<http://www.sbpnet.org.br/livro/61ra/resumos/resumos/6676.htm>>.
- Gao, J., Xu, G., Qian, H., Liu, P., Zhao, P., & Hu, Y. (2013). Effects of nano-TiO<sub>2</sub> on photosynthetic characteristics of *Ulmus elongata* seedlings. ***Environmental pollution***, 176, 63-70.
- Giorgetti, L., Castiglione, M. R., Bernabini, M., & Geri, C. (2010). Nanoparticles effects on growth and differentiation in cell culture of carrot (*Daucus carota* L.). ***Agrochimica***, 55(1), 45–53.
- Iannone, M. F., Groppa, M. D., de Sousa, M. E., Fernández van Raap, M. B., & Benavides, M. P. (2016). Impact of magnetite iron oxide nanoparticles on wheat (*Triticum aestivum* L.) development: Evaluation of oxidative damage. ***Environmental and Experimental Botany***, 131, 77–88.
- Joško, I., Oleszczuk, P., & Skwarek, E. (2017). Toxicity of combined mixtures of nanoparticles to plants. ***Journal of hazardous materials***, 331, 200-209.
- Ji, Y., Zhou, Y., Ma, C., Feng, Y., Hao, Y., Rui, Y., ... & Xing, B. (2017). Jointed toxicity of TiO<sub>2</sub> NPs and Cd to rice seedlings: NPs alleviated Cd toxicity and Cd promoted NPs uptake. ***Plant Physiology and Biochemistry***, 110, 82-93.
- Lalau, C. M. (2014). Cristina Moreira Lalau avaliação da toxicidade naopartículas de óxido de cobre através de macrófitas da espécie *Landoltia punctata*, 114.

Larue, C., Castillo-Michel, H., Sobanska, S., Cécillon, L., Bureau, S., Barthès, V., ... Sarret, G. (2014). Foliar exposure of the crop *Lactuca sativa* to silver nanoparticles: Evidence for internalization and changes in Ag speciation. **Journal of Hazardous Materials**, 264, 98–106.

Lee, W.-M., A, Y.-J., Yoon, H., & Kweon, H.-S. (2008) toxicity and bioavailability of copper nanoparticles to terrestrial plants mung bean(*Phaseolus radiatus*) and wheat(*Triticum aestivum*): plant agar test for water-insoluble nanoparticles. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 27(9), 1915–1921.

López-Luna, J., Silva-Silva, M. J., Martínez-Vargas, S., Mijangos-Ricardez, O. F., González-Chávez, M. C., Solís-Domínguez, F. A., & Cuevas-Díaz, M. C. (2016). Magnetite nanoparticle (NP) uptake by wheat plants and its effect on cadmium and chromium toxicological behavior. **Science of the Total Environment**, 565, 941-950.

Mahdizadeh, V., Safaie, N., & Khelghatibana, F. (2015). Evaluation of antifungal activity of silver nanoparticles against some phytopathogenic fungi and *Trichoderma harzianum*. **Journal of Crop Protection**, 4(3), 291-300.

Marambio-Jones, C., & Hoek, E. M. V. (2010). A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. **Journal of Nanoparticle Research**, 12(5), 1531–1551

Maynard, A. D., Aitken, R. J., Butz, T., Colvin, V., Donaldson, K., Oberdörster, G.,... & Tinkle, S. S. (2006). Safe handling of nanotechnology. **Nature**, 444(7117), 267.

Passardi, F., Penel, C., & Dunand, C. (2004). Performing the paradoxical: How plant peroxidases modify the cell wall. **Trends in Plant Science**, 9(11), 534–540

Petros, R. A., & DeSimone, J. M. (2010). Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. **Nature reviews Drug discovery**, 9(8), 615.

Scott, N., & Chen, H. (2013). Nanoscale science and engineering for agriculture and food systems. **Industrial Biotechnology**, 9(1), 17-18.

Thuesombat, P., Hannongbua, S., Akasit, S., & Chadchawan, S. (2014). Effect of silver nanoparticles on rice (*Oryza sativa* L. cv. KDML 105) seed germination and seedling growth. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 104(1), 302–309.

Yang, X., Pan, H., Wang, P., & Zhao, F. J. (2017). Particle-specific toxicity and bioavailability of cerium oxide (CeO<sub>2</sub>) nanoparticles to *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Hazardous Materials**, 322, 292–300.

Ji, Y., Zhou, Y., Ma, C., Feng, Y., Hao, Y., Rui, Y., ... & Xing, B. (2017). Jointed toxicity of TiO<sub>2</sub> NPs and Cd to rice seedlings: NPs alleviated Cd toxicity and Cd promoted NPs uptake. *Plant Physiology and Biochemistry*, 110, 82-93.

Zhang, T., Liao, X., Yang, R., Xu, C., & Zhao, G. (2013). Different effects of iron uptake and release by phytoferritin on starch granules. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 61(34), 8215–8223.