

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA**

**MARINA JUNGES**

**VIABILIDADE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO E PRATA NA  
DESINFESTAÇÃO DE EXPLANTES VISANDO À MICROPROPAGAÇÃO DE  
PLANTAS**

**São Gabriel**

**2015**

**MARINA JUNGES**

**VIABILIDADE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO E PRATA NA  
DESINFESTAÇÃO DE EXPLANTES VISANDO À MICROPROPAGAÇÃO DE  
PLANTAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Biotecnologia da Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA, Campus São Gabriel, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia

Orientador: Dr. Valdir Marcos Stefenon

Coorientador: Paulo Roberto Diniz da Silva

**São Gabriel**

**2015**

**MARINA JUNGES**

**VIABILIDADE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO E PRATA NA  
DESINFESTAÇÃO DE EXPLANTES VISANDO À MICROPROPAGAÇÃO DE  
PLANTAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Biotecnologia da Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA, Campus São Gabriel, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia.

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em 02 de fevereiro de 2015:

Banca examinadora:

---

Prof. Dr. Valdir Marcos Stefenon  
Orientador  
(UNIPAMPA)

---

Prof. Ma. Cristiane Barbosa D'Oliveira  
(UNIPAMPA)

---

Paulo Roberto Diniz da Silva  
(UNIPAMPA)

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais Anildo e Teresinha, meus irmãos Marcelo e Mariéla, por todo amor, apoio e confiança. Sou eternamente grata!

Ao Profº Dr. Valdir Marcos Stefenon pela orientação, ajuda, apoio e dedicação e principalmente pelas inúmeras oportunidades dadas, proporcionando enorme amadurecimento pessoal e profissional;

Aos meus colegas do Núcleo de Cultura Vegetal pelo apoio e amizade; principalmente ao Paulo Roberto Diniz da Silva pela disponibilidade, paciência e principalmente a todos ensinamentos adquiridos;

Aos professores do curso de Biotecnologia, pela contribuição, dentro de suas áreas, para a minha formação acadêmica.

Às agencias de fomento CNPq e FAPERGS pelas bolsas concebidas;

Aos meus amigos pelos momentos de companheirismo, distração, apoio.

A todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente e acreditaram na realização de meus sonhos.

Muito Obrigada a Todos! Sem vocês nada disso seria possível.

*"A ciência permanecerá sempre a satisfação do desejo mais alto da nossa natureza, a curiosidade; fornecerá sempre ao homem o único meio que ele possui de melhorar a própria sorte."*

Ernest Renan

## RESUMO

A obtenção de plantas a partir das técnicas de micropropagação vem se tornando uma realidade para a maioria das espécies conhecidas, ao qual se define pelo cultivo de células, tecidos ou órgãos vegetais em um meio nutritivo e de sua manutenção em um ambiente asséptico e controlado. Há desinfestação do material a ser cultivado é de suma importância, existe uma variedade de métodos de desinfestação já conhecidos, porém nem sempre são eficientes, necessitando novas alternativas, assim como a Nanotecnologia que é uma tecnologia extremamente inovadora e apresenta propriedades funcionais únicas quando comparada ao metal em escala macroscópica. Está comprovado que nanopartículas de ouro (AuNPs) e prata (AgNPs) possuem um caráter antimicrobiano, podendo ser uma fonte alternativa na desinfestação de explantes. Contudo, essa técnica jamais foi testada na micropropagação de plantas. O presente trabalho objetivou testar a viabilidade do uso de AgNPs e AuNPs na desinfestação de explantes na micropropagação de espécies vegetais arbóreas. As nanopartículas foram preparadas pelo método de Turkevich, e caracterizadas utilizando UV-visível, Microscopia Eletrônica de Varredura e Microscopia de Força Atômica. A sensibilidade de bactérias e fungos associados a plantas foi avaliada, seguida de confirmação pelo ensaio de viabilidade celular. Cinco tratamentos foram testados na desinfestação de explantes de *Eugenia uniflora* L: T1 (Controle); T2 ( AuNPs – 1 h); T3 (AgNPs – 1 h); T4 (AuNPs – 30 min); T5 (AgNPs – 30 min). Os resultados demonstram que bactérias *Agrobacterium rhizogenes* são sensíveis à nanopartículas de prata, seguido de confirmação pelo ensaio de viabilidade celular. Em relação à sensibilidade ao fungo *Fusarium* sp, nanopartículas não apresentaram resultados satisfatórios. A desinfestação de explantes de *E. uniflora* L. evidenciou o potencial antimicrobiano de nanopartículas de prata, com índice de 40% na eliminação de fungos e bactérias; nanopartículas de ouro apresentaram redução de 26,67% na taxa de contaminação. Este estudo demonstra pela primeira vez a possível utilização de AgNPs e AuNPs como métodos para desinfestação de explantes vegetais. Porém há necessidade de maior aprofundamento no estudo para padronizar tempo e concentração do uso de nanopartículas como agente desinfestante e averiguar possíveis efeitos de sua utilização em células vegetais.

Palavras-chave: Nanopartículas de ouro; Nanopartículas de prata; Desinfestação de explantes;  
*Eugenia uniflora* L.; *Fusarium* sp; *Agrobacterium rhizogenes*.

## ABSTRACT

Obtaining plants from micropropagation techniques is becoming a reality for most known species, which is defined by the cultivation of cells, tissues or plant organs in a nutrient medium and maintaining it in an aseptic, controlled environment. There disinfection of the material to be grown is of paramount importance, there is a variety of disinfection methods already known but are not always efficient, requiring new alternatives, as well as Nanotechnology is an extremely innovative technology and has unique functional properties when compared to metal on a macroscopic scale. There is evidence that gold nanoparticles (AuNPs) and silver (AgNPs) have an antimicrobial character, could be an alternative source in the disinfestation of explants. However, this technique has never been tested in plant micropropagation. This study aimed to test the feasibility of using AgNPs and AuNPs in desifestação explants in the micropropagation of woody plant species. The nanoparticles were prepared by Turkevich method, and characterized using UV-visible, Scanning Electron Microscopy and Atomic Force Microscopy. The sensitivity of bacteria and fungi associated with plants was assessed after confirmation by cell viability assay. Five treatments were tested in the disinfestation of explants *Eugenia uniflora* L: T1 (control); T2 (AuNPs - 1 h); T3 (AgNPs - 1 h); T4 (AuNPs - 30 min); T5 (AgNPs - 30 min). The results show that the *Agrobacterium rhizogenes* bacteria are sensitive to silver nanoparticles, followed by confirmation by cell viability assay. With regard to sensitivity to the fungus *Fusarium* sp, nanoparticles do not show satisfactory results. The explants disinfection *E. L. uniflora* showed the antimicrobial activity of silver nanoparticles with 40% rate in the elimination of fungi and bacteria; gold nanoparticles decreased by 26.67% in the contamination rate. This study demonstrates for the first time the possible use of AgNPs and AuNPs as methods for disinfection of plant explants. But there is need for greater depth study to standardize time and concentration of the use of nanoparticles as disinfest agent and investigate possible effects of their use in plant cells.

Keywords: Gold nanoparticles; Silver nanoparticles; Disinfestation explants; *Eugenia uniflora* L.; *Fusarium* sp; *Agrobacterium rhizogenes*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Germinação <i>in vitro</i> de <i>Eugenia uniflora</i> L.....	17
Figura 2 – Contaminação fúngica do gênero <i>Fusarium</i> em explantes de <i>Carya illinoensis</i> (Wangenh.) K. Koch.....	19
Figura 3- Interação de nanopartículas de prata em bactérias.....	21
Figura 4 - Pitanga, fruto da pitangueira ( <i>Eugenia uniflora</i> L.).....	22
Figura 5 – Placa de ensaio de viabilidade celular (TTZ).....	29
Figura 6 – Procedimento de desinfestação dos explantes.....	30
Figura 7 – Solução de Nanopartículas de Prata.....	32
Figura 8 - Espectro de UV- Vis apresentando a banda <i>plasmon</i> característico das nanopartículas de prata da reação.....	33
Figura 9 – Morfologia de nanopartículas de prata obtidas pela microscopia eletrônica de varredura. Tamanho 20 µm e 100 µm, respectivamente.....	33
Figura 10 – Microscopia de força atômica indicando o tamanho dos aglomerados nanopartículas de prata.....	34
Figura 11 – Solução de Nanopartículas de Ouro.....	35
Figura 12 - Espectro de UV- Vis apresentando a banda <i>plasmon</i> da solução de nanopartículas de ouro.....	36
Figura 13 – Morfologia de nanopartículas de ouro obtidas pela microscopia eletrônica de varredura. Tamanho 10 µm e 50 µm, respectivamente.....	37
Figura 14 – Microscopia de força atômica indicando o tamanho das nanopartículas de ouro.....	37
Figura 15 - Teste de difusão no meio MS utilizando cepas de <i>Agrobacterium rhizogenes</i> (K599). Nanopartículas de ouro, nanopartículas de prata e controle, respectivamente.....	38
Figura 16- Avaliação da atividade fúngica das nanopartículas de ouro e prata em <i>Fusarium</i> .....	38
Figura 17 – Gráfico indicando cultivo bacteriano em ensaio de viabilidade celular.....	39
Figura 18 – Gráfico indicando decaimento no crescimento bacteriano com adição de nanopartículas de prata em ensaio de viabilidade celular.....	40
Figura 19 – Gráfico indicando o percentual de contaminação dos explantes de <i>E. uniflora</i> submetidos a diferentes tratamentos.....	41

Figura 20 – Observação dos explantes no 9º após o tratamento com nanopartículas. Controle, nanopartículas de ouro e de prata, respectivamente.....42

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Contaminação bacteriana e/ou fúngica em explantes de <i>E. uniflora</i> no 9º dia após inoculação.....	41
---	----

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	17
2.1 Cultura de Tecidos e Micropropagação de Vegetais .....	17
2.1.1 Contaminação .....	18
2.1.2 Desinfestação dos explantes .....	20
2.2 NANOTECNOLOGIA .....	20
2.2.1 Nanopartículas de prata .....	21
2.2.2 Nanopartículas de Ouro.....	22
2.3 <i>Eugenia uniflora</i> L. ....	22
3. JUSTIFICATIVA .....	24
4. OBJETIVOS.....	25
4.1 Objetivo Geral.....	25
4.2 Objetivos Específicos .....	25
5. MATERIAS E MÉTODOS .....	26
5.1 Síntese de Nanopartículas de Prata.....	26
5.2 Síntese de Nanopartículas de Ouro .....	26
5.3 Caracterização de Nanopartículas .....	26
5.3.1 Espectroscopia na região do UV- visível .....	26
5.3.2 Microscopia eletrônica de Varredura (MEV).....	27
5.3.3 Microscopia de força atômica (AFM).....	27
5.4 Teste de sensibilidade de <i>Agrobacterium rhizogenes</i> (cepa K599) .....	28
5.5 Teste de sensibilidade do fungo <i>Fusarium</i> .....	28
5.6 Ensaio de viabilidade celular (TTZ) em <i>agrobacterium rhizogenes</i> (cepa K599) ....	29
5.7 Uso de nanopartículas metálicas como agente desinfestante de explantes de <i>Eugenia uniflora</i> L. ....	30
5.7.1 Coleta do Material.....	30
5.7.2 Desinfestação dos Explantes .....	30
5.7.3 Inoculação dos explantes em meio de Murashige e Skoog (1962) .....	31
5.8 Estatística.....	31
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	31

<b>6.1 Síntese e caracterização de Nanopartículas Metálicas .....</b>	<b>31</b>
<b>6.1.1 Nanopartículas de Prata .....</b>	<b>31</b>
<b>6.1.2 Nanopartículas de Ouro.....</b>	<b>34</b>
<b>6.2 Teste de sensibilidade frente <i>Agrobacterium rhizogenes</i> (cepa K599).....</b>	<b>37</b>
<b>6.3 Teste de sensibilidade do fungo <i>Fusarium</i> .....</b>	<b>38</b>
<b>6.4 Ensaio de viabilidade celular (TTZ) em <i>Agrobacterium rhizogenes</i> (cepa K599) ...</b>	<b>39</b>
<b>6.5 Uso de nanopartículas metálicas como agente desinfestante de explantes de <i>Eugenia uniflora</i> L. ....</b>	<b>40</b>
<b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>43</b>
<b>8. PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>44</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>45</b>



## 1. INTRODUÇÃO

A obtenção de plantas, a partir das técnicas de micropropagação, vem se tornando uma realidade para a maioria das espécies conhecidas, principalmente quando se trata da importância ecológica, econômica e medicinal. Nesse tipo de propagação, podem ser controladas as condições físicas, químicas e biológicas envolvidas no processo de cultivo (ALENCAR, 1999). A micropropagação constitui um modo de se manter sempre disponíveis explantes saudáveis e livres de contaminação para aplicação de técnicas de regeneração por cultura de tecidos e transformação genética, além de ser altamente conveniente para manutenção de coleções de plantas de genótipos diferentes, livres de patógenos (CABRAL et al., 2003). O princípio básico da cultura de tecidos é a totipotencialidade celular, ou seja, qualquer célula no organismo vegetal contém toda a informação genética necessária para a regeneração de uma planta completa (TORRES et al., 1998)

Um fator limitante na micropropagação é a desinfestação dos explantes, tendo em vista que a contaminação por microrganismos continua sendo um dos principais problemas para a aplicação dessa técnica (RIBAS et al., 2003), gerando sérios problemas como perda de material vegetal de interesse, além do risco de proliferação de contaminantes para outros meios saudáveis. A maior incidência de contaminação é de origem bacteriana, embora ácaros e fungos possam ocorrer com maior intensidade (ALENCAR, 1999; ABREU et al., 2002; CARVALHO; SILVA; MEDEIROS, 2006)

Diversos explantes podem ser utilizados para se iniciar a propagação *in vitro* de uma planta, mas ápices caulinares, gemas axilares e meristemas isolados são os explantes mais indicados. O tipo de explante exerce forte influência nas subseqüentes respostas obtidas *in vitro* (ARAÚJO; CARVALHO, 2005).

Várias substâncias com potencial antimicrobiano que podem ser empregados nos procedimentos de desinfestação do explante, dentre os quais as mais utilizadas estão etanol, hipoclorito de sódio e de cálcio, cloreto de mercúrio, cloreto de benzalcônio e peróxido de hidrogênio (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Entretanto deve-se elaborar uma metodologia para o uso destes produtos durante os procedimentos de desinfestação, já que diferentes tecidos de uma mesma espécie podem ter respostas variadas quanto à concentração

e ao tempo de exposição nesses compostos químicos. Porém nem sempre os métodos de desinfestação conhecidos são eficientes, necessitando novas alternativas.

A Nanotecnologia tem sido apontada como uma tecnologia extremamente inovadora, pois dedica-se à criação de materiais, dispositivos e sistemas, através do controle da matéria a uma escala de tamanhos nanométricos realçando a exploração de novas propriedades e fenômenos desenvolvidos a esta escala (1-100 nm). Essas partículas em tamanho diminutos apresentam propriedades funcionais únicas (físicas, químicas e biológicas) não encontradas na escala macro (CHAU et al., 2007). Particularmente, nanopartículas de metais nobres (ouro e prata) vêm recebendo muita atenção devida suas propriedades de potencial antibacteriano e antifúngico. (PEREIRA et al., 2013)

Embora não existam relatos na literatura do uso de nanopartículas de ouro e prata em cultura de células vegetais, elas possivelmente poderão ser estudadas como alternativa de desinfestação de explantes.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Cultura de Tecidos e Micropropagação de Vegetais

A micropropagação é um método de propagação vegetativa amplamente estudado em diversas espécies vegetais, sendo a modalidade dentro da cultura de tecidos que mais se tem difundido e encontrado aplicações práticas comprovadas. Na micropropagação, órgãos e tecidos de plantas são introduzidos *in vitro*, estabelecidos e mantidos em culturas assépticas para regenerar novas plantas (HARTMANN et al., 2002). Os meios nutritivos fornecem substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos cultivados e também participam do controle do padrão de desenvolvimento *in vitro* (CALDAS et al., 1998). Os fragmentos de tecidos vivos, denominados de explantes, são retirados das plantas de interesse e cultivados em um meio nutritivo definido. Os explantes podem ser reduzidos ao tamanho de células individuais, tecidos ou órgãos (SERAFINI, BARROS; AZEVEDO, 2001). O princípio básico da cultura de tecidos é a totipotencialidade celular, ou seja, qualquer célula no organismo vegetal contém toda a informação genética necessária para a regeneração de uma planta completa (Figura 1), (TORRES et al., 1998). Essa técnica pode ser aplicada para o desenvolvimento de cultivares superiores ou como alternativa aos programas de melhoramento. (TORRES et al., 1998)

FIGURA 1 - Germinação *in vitro* de *Eugenia uniflora* L.



Fonte: Marina Junges (2014)

Entre as vantagens de sua utilização, estão as possibilidades de se obter várias plantas a partir de um único explante inicial, independentemente de condições climáticas; redução do tempo e da área necessária à propagação da espécie; melhores condições sanitárias por meio do cultivo de meristemas previamente tratados por termoterapia, para eliminação de doenças; reprodução do genótipo da planta-mãe, geralmente com fidelidade durante a multiplicação e a propagação vegetativa de espécies difíceis de serem propagadas por outros métodos (ERIG e SCHUCH, 2005; CARVALHO; SILVA; MEDEIROS, 2006)

Quando se fala em cultura de tecidos há a necessidade de algumas escolhas cruciais, que podem influenciar na propagação *in vitro*. Entre os fatores externos podemos citar a temperatura, umidade relativa, fotoperíodo, intensidade luminosa; há também fatores intrínsecos ao crescimento e desenvolvimento vegetativo, dependentes das condições nutricionais do meio nutritivo e da aplicação de fitorreguladores. A definição do meio nutritivo adequado à cada espécie, proporcionando concentração de macronutrientes e micronutrientes essenciais, os fitorreguladores e a sua concentração são imprescindíveis para o sucesso da micropropagação ( LEITZKE, 2010)

### **2.1.1 Contaminação**

A contaminação por microrganismos continua sendo um dos principais problemas para a aplicação da técnica de micropropagação podendo chegar, inclusive, a ser um fator limitante para o estabelecimento de cultivo *in vitro* de certos explantes, (RIBAS et al., 2003; SILVA et al., 2014) gerando sérios problemas como perda de material vegetal de interesse, além do risco de proliferação de contaminantes para outros meios sadios. Essa contaminação se deve, principalmente, à presença de microrganismos endossimbiótico, epifíticos, oportunistas ou ainda patogênicos, que podem penetrar nos tecidos ou estarem presentes na superfície do explante, se desenvolvendo no meio de cultura devido a uma desinfestação ineficiente, ou ainda, pela entrada de microrganismos após o estabelecimento do explante devido ao manuseio incorreto durante as subculturas (POLESI, 2011).

Na introdução de explantes em condições *in vitro*, a contaminação é bastante frequente, por eles estarem expostos às condições naturais, que são fontes de microrganismos. A maior incidência de contaminação é de origem bacteriana, embora ácaros e fungos possam ocorrer com maior intensidade (Figura 2) (ALENCAR, 1999). Além dessas contaminações superficiais, é frequente se deparar com contaminações presentes no interior dos tecidos,

conhecida como contaminação endógena. A contaminação por bactérias acontece, geralmente, devido à contaminação endógena dos explantes e plântulas. A contaminação fúngica ocorre em virtude da deficiência na manipulação durante o subcultivo e à presença de esporos no ambiente onde o subcultivo é realizado ou a infestação por ácaros (CARVALHO; SILVA; MEDEIROS, 2006). Apesar da maioria desses microrganismos não ser patogênica, o seu crescimento é acelerado no meio de cultura, a ponto de competirem por nutrientes com os explantes, prejudicando o desenvolvimento destes (XAVIER et al., 2007).

FIGURA 2 – Contaminação com fungos do gênero *Fusarium* em explantes de *Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch



Fonte: Marina Junges (2014)

Plantas que apresentam características agrônômicas superiores são mais utilizadas como fonte de explante em trabalhos de cultura de tecido. A contaminação se dá principalmente de material vegetal oriundos do campo. Na maioria das vezes, estas, já se encontram em fase reprodutiva e o estabelecimento de explantes provenientes de plantas adultas é mais dificultoso devido às altas taxas de contaminação *in vitro* e de oxidação (ALENCAR, 1999). Para contornar esta situação, se deve selecionar explantes com maior grau de juvenilidade em indivíduos adultos.

Após definida a fonte de explante mais adequado aos objetivos a serem alcançados com a micropropagação e que apresente potencial de resposta à propagação *in vitro*, ainda há a necessidade de desinfestações que garantam a assepsia dos propágulos vegetativos a serem introduzidos *in vitro*. (XAVIER et al., 2009).

### **2.1.2 Desinfestação dos explantes**

O controle para evitar ou reduzir a contaminação *in vitro* deve ser feito desde a desinfestação do material vegetal até a esterilização dos instrumentos e recipientes utilizados na manipulação do explante. Os instrumentos (pinças, bisturis etc.) devem ser submergidos em etanol; flambados e colocados dentro da câmara de fluxo laminar. (CARVALHO; SILVA; MEDEIROS, 2006), Várias substâncias com potencial antimicrobiano que podem ser empregados nos procedimentos de desinfestação do explante, dentre os quais os mais utilizados estão etanol, hipoclorito de sódio e de cálcio, cloreto de mercúrio, cloreto de benzalcônio e peróxido de hidrogênio (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998), além dos habituais detergentes de cozinha ou Tween 20 e a utilização de antibióticos e fungicidas. Entretanto deve-se elaborar uma metodologia para o uso destes produtos durante os procedimentos de desinfestação, já que diferentes tecidos de uma mesma espécie podem ter respostas variadas quanto à concentração e ao tempo de exposição nesses compostos químicos.

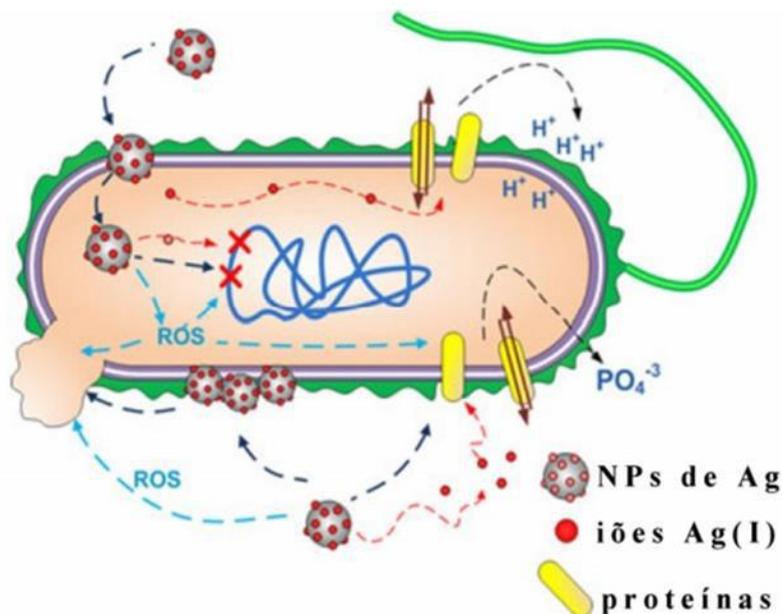
Porém nem sempre os métodos de desinfestação conhecidos são eficientes, necessitando novos métodos.

## **2.2 NANOTECNOLOGIA**

A Nanotecnologia tem sido apontada como uma tecnologia extremamente inovadora, pois dedica-se à criação de materiais, dispositivos e sistemas, através do controle da matéria a uma escala de tamanhos nanométricos realçando a exploração de novas propriedades e fenômenos desenvolvidos a esta escala (1-100 nm). O prefixo “nano” está relacionado a uma escala de medida em que um nanômetro representa um bilionésimo do metro ou um milionésimo do milímetro. Estruturas nessa escala apresentam propriedades funcionais únicas (físicas, químicas e biológicas) não encontradas na escala macro (CHAU et al., 2007). Particularmente, nanopartículas de metais nobres (ouro e prata) vêm recebendo muita atenção devida suas propriedades potencial antimicrobianas e antifúngicas, agindo pela interação de nanopartículas com proteínas compostas de enxofre nas células, bem como com os compostos contendo fósforo como o DNA, ou seja, atuam de forma eficaz na destruição da membrana

celular dos microorganismos patogênicos, inibindo a respiração e danificando o DNA, com isso, matando bactérias e fungos indesejados. (Figura 3). (PEREIRA et al., 2013)

FIGURA 3- Interação de nanopartículas de prata em bactérias.



Fonte: Cesar Franco (2014)

### 2.2.1 Nanopartículas de prata (AgNPs)

O uso de nanopartículas de prata como agente antibacteriano é relativamente novo e sua atividade têm sido estudados em diferentes campos, o potencial antimicrobiano está associado à interação de nanopartículas com proteínas compostas de enxofre nas células, bem como com os compostos contendo fósforo como o DNA, ou seja, atuam de forma eficaz na destruição da membrana celular dos microorganismos patogênicos, inibindo a respiração e danificando o DNA. Além disto, as nanopartículas de prata apresentam propriedades antimicrobianas eficientes, em virtude de sua grande área superficial que proporciona melhor contato com as bactérias (MORONES et al., 2005; SONG et al., 2006). Destacam-se como bons agentes antimicrobianos por apresentar amplo espectro de ação contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos filamentosos, leveduras e vírus. Em relação à toxicidade para as células animais, a prata é o metal que apresenta a menor toxicidade (NETO, et al. 2008; GORUP, 2010).

### **2.2.2 Nanopartículas de Ouro (AuNPs)**

O ouro é um dos metais mais nobres já conhecido e amplamente explorado, muito além da beleza, o metal apresenta diversas finalidades. Na Idade Média, por exemplo, a solução de ouro era famosa por seus poderes curativos, sendo empregada para disenteria, epilepsia e tumores, problemas venéreos e para diagnóstico de sífilis (ASTRUC; DANIEL, 2004). Este em tamanhos nanométricos estão dispersos em meio líquido podendo ser chamados de nanopartículas de ouro ou então ouro coloidal. As nanopartículas de ouro apresentam características muito interessantes nessa escala diminuta, são estáveis, possuem propriedades magnéticas, óticas e eletrônicas únicas quando comparada ao metal em escala macroscópica; essas características são possíveis graças ao formato, tamanho e afinidade com cadeias carbônicas ligadas a diferentes radicais. Atualmente estudos de nanopartículas de ouro são amplamente explorados, principalmente no que se refere sua aplicação na biomedicina e catalise. (GALVAGNO; PARRAVANO, 1978; HARUTA, 1997; KANG; MACKKEY, 2010)

### **2.3 *Eugenia uniflora* L.**

*Eugenia uniflora* L. é uma espécie arbórea pertencente à família Myrtaceae. Espécie nativa da América Central e Sul; no Brasil pode ser encontrada em diversas regiões devido sua adaptabilidade as mais distintas condições de clima e solo, como ao longo dos rios em matas ciliares, no litoral formações florestais e nas florestas semidecíduais (MARGIS et al., 2002; SALGUEIRO et al., 2004; SILVA et al., 2014).

A Pitangueira carece de valor como uma espécie de madeira, mas é largamente empregada na medicina popular, nos cosméticos, indústrias farmacêuticas e também os frutos consumidos de forma *in natura* ou sendo processados pela indústria. (SILVA et al., 2014). O fruto da pitangueira (Figura 4) é popularmente conhecido como pitanga, consiste em uma baga globosa, sulcada e brilhante, com cálice persistente. Uma pitangueira pode produzir de 2,5 à 3,0 kg de frutos/árvore/ano.

FIGURA 4 - Pitanga, fruto da pitangueira (*Eugenia uniflora* L.)



Fonte: Mahogany (2014)

### 3. JUSTIFICATIVA

A contaminação por microrganismos é um dos principais problemas para a aplicação da técnica de micropropagação, principalmente de espécies lenhosas, podendo chegar, inclusive, a ser um fator limitante para o estabelecimento de cultivo *in vitro* de certos explantes (RIBAS et al., 2003). Várias substâncias com potencial antimicrobiano podem ser empregados nos procedimentos de desinfestação do explante, porém nem sempre os métodos de desinfestação conhecidos são eficientes. A necessidade de novas metodologias de desinfestação é de suma importância levando em consideração que diferentes tecidos e diferentes espécies podem ter respostas variadas quanto à concentração e ao tempo de exposição nesses compostos químicos. As nanopartículas metálicas destacam-se pelo seu alto potencial de agente antimicrobiano, podendo ser uma possível solução para problemas de contaminação *in vitro* oriundas de fungos e bactérias, entretanto o seu uso com potencial desinfestante nessa área ainda não foi explorado, aumentando assim o interesse no estudo das nanopartículas como agente desinfestante de explantes.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo Geral

Analisar a viabilidade do uso de nanopartículas de prata e de ouro como alternativa na desinfestação de explantes para micropropagação de *Eugenia uniflora* L.

### 4.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar e caracterizar nanopartículas de prata e de ouro.
- Avaliar o potencial bactericida de nanopartículas de prata e ouro em *Agrobacterium rhizogenes*.
- Testar a utilidade de nanopartículas metálicas no controle de fungos do gênero *Fusarium*.
- Utilizar nanopartículas de prata e ouro na desinfestação de gemas de *Eugenia uniflora* L. visando à cultura *in vitro* desta espécie.

## **5. MATERIAS E MÉTODOS**

A pesquisa foi conduzida no Laboratório do Centro Interdisciplinar de Pesquisas em Biotecnologia II, localizado na Universidade Federal do Pampa, Campus São Gabriel.

### **5.1 Síntese de Nanopartículas de Prata**

Para síntese de AgNPs foi utilizado o método de redução de citrato empregando nitrato de prata e citrato de sódio originalmente proposto por Turkevich (1951). Para confecção foi utilizada solução de 16 mg de nitrato de prata em 300 mL de água deionizada (ultrapura), na temperatura de 80°C, sob agitação constante. A solução foi levada à ebulição e acrescida aos poucos de solução de 0,2 g de citrato de sódio em 100 mL de água deionizada. A ebulição ocorreu em até 25 minutos, sempre sob agitação. A solução então foi deixada em repouso para esfriar a temperatura ambiente. Coloração amarelada indicou a redução da prata e a formação de nanopartículas.

### **5.2 Síntese de Nanopartículas de Ouro**

Para confecção de nanopartículas de ouro foi adotado o método de redução química, considerado o mais simples e barato originalmente proposto por Turkevich (1951). Na síntese foi utilizado 100 ml de solução de ácido tetracloroáurico, mantido em chapa de aquecimento sob agitação até atingir 90°C, posteriormente acrescido de 1ml da solução de citrato de sódio e mantido à 90°C durante aproximadamente meia hora. A coloração avermelhada indicou a presença de nanopartículas na solução.

### **5.3 Caracterização de Nanopartículas**

#### **5.3.1 Espectroscopia na região do UV- visível**

A Espectroscopia UV-Vis corresponde à análise da absorção de luz por uma amostra, ao qual a luz UV numa faixa de comprimentos de ondas é passada pela amostra e a quantidade de luz absorvida pela amostra é medida por espectrofotômetro. O método foi

empregado para investigar interação com os compostos e formação de nanopartículas. (CASANOVA, 2010) Foi utilizado o espectrofotômetro modelo Cary 60 UV-Vis. A amostra da solução de nanopartículas foi disposta em uma cubeta no interior de espectrofotômetro; utilizou-se água como branco para leitura; o pico comprimento de onda para nanopartículas entre 400 à 600 nm indica a síntese de nanopartículas na solução.

### **5.3.2 Microscopia eletrônica de Varredura (MEV)**

A microscopia de varredura um tipo de microscópio eletrônico apropriado para produzir imagens de alta resolução da superfície de uma amostra. Devido à maneira com que as imagens são criadas, imagens da microscopia eletrônica de varredura apresentam uma aparência tridimensional, resultado direto da grande profundidade de campo; característica ao qual são úteis para avaliar a estrutura superficial de uma dada amostra. O princípio baseia-se na utilização de um feixe de elétrons no lugar de fótons utilizados em um microscópio óptico convencional, o que permite solucionar o problema de resolução relacionado com a fonte de luz branca. Pode fornecer rapidamente informações sobre a morfologia e identificação de elementos químicos de uma amostra sólida (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007).

A análise de microscopia eletrônica de varredura foi realizada no Centro de Microscopia Eletrônica e Microanálise da Universidade Luterana (ULBRA), com a colaboração do mestrando Jefferson Nunes Radaeski. Para observações, foram confeccionadas três lâminas, sendo micropipetadas com 20µL de solução base (AgNPs ou AuNPs). Estas foram secas em estufa, à 60°C durante 24 horas. Posteriormente foram metalizadas com carbono, no equipamento Oerlikon Balzers e 0,1 mbar de pressão, em argônio. As observações foram realizadas em 15,0Kv.

### **5.3.3 Microscopia de força atômica (AFM)**

A microscopia de força atômica pode ser utilizada para desvendar características morfológicas dos materiais em escala manométrica, é possível detectar características como relevo, rigidez do material e rugosidade da superfície, entre outras. Na técnica uma agulha chamada ponta de prova faz a varredura da superfície do material a ser analisado; quando a agulha passa pela amostra, o conjunto sofre uma pequena deformação em função da força entre os átomos da ponta da agulha e os átomos da amostra (forças de atração e repulsão em

contato com a superfície). Essa deformação então pode ser medida com um sensor óptico que equipa o microscópio e os dados da magnitude da deformação são utilizados pelo computador para construir uma imagem tridimensional da superfície da amostra. (BINNING, 1986)

A análise de microscopia de força atômica foi realizada no Laboratório de Microscopia de Sonda - UNIPAMPA, campus Bagé em colaboração com professor Dr. André Gündel. Duas lâminas de mica ultra lisa de 4 centímetros quadrados foram micropipetadas com 10 µL para cada solução (AgNPs ou AuNPs), sendo depositadas em áreas demarcadas. Estas foram secas em estufa a 60°C durante 24 horas e observadas no microscópio de força atômica.

#### **5.4 Teste de sensibilidade de *Agrobacterium rhizogenes* (cepa K599)**

Para avaliar o efeito de nanopartículas metálicas em bactérias associadas a plantas foi utilizado como modelo a *Agrobacterium rhizogenes*, uma bactéria gram negativa fitopatogênica conhecida e amplamente estudada por provocar a doença conhecida como “hairy root”; a cepa K599 confere resistência ao antibiótico sulfato de estreptomicina destaca-se pelo fácil manuseio e cultivo em laboratório.

Para avaliação da atividade antimicrobiana das nanopartículas de prata e de ouro frente à bactéria *Agrobacterium rhizogenes* (cepa K599), foi feita aplicação do inóculo bacteriano com aproximadamente 1 a  $2 \times 10^8$  UFC/mL. Foram dispostos 10 discos (9mm) de papel filtro sobre 10 placas de petri contendo meio MS (MURASHIGE e SKOOG; 1962), posteriormente as placas foram divididas em 2 grupos onde foi pipetada 20 µL da solução de AgNPs em 5 placas e o mesmo procedimento para placas restantes para utilização de AuNPs. Para controle utilizou-se água. Os diâmetros dos halos de inibição do crescimento bacteriano ao redor de cada disco foram mensurados após 24 horas em milímetros com auxílio de um paquímetro digital Mitutoyo. (VALÁSKOVÁ et al., 2010).

#### **5.5 Teste de sensibilidade do fungo *Fusarium***

*Fusarium* é um grande gênero de fungos; a maioria das espécies é composta por fungos de solo com distribuição cosmopolita e ativo na decomposição de substratos celulósicos das plantas, sendo que alguns isolados são parasitas de vegetais e causam grandes

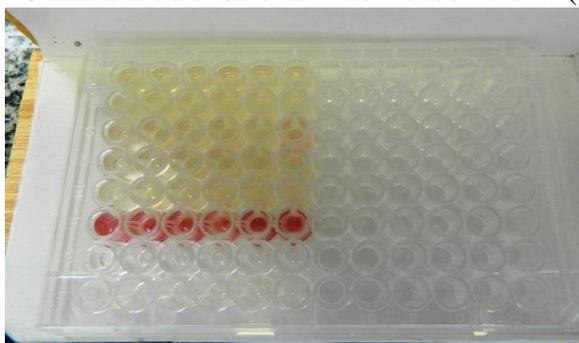
danos em plantas de importância econômica (DESJARDINS et al., 2000). É um dos grandes responsáveis pela maioria das contaminações em estabelecimento *in vitro* de explantes; sendo assim *Fusarium* foi escolhido para testar o possível efeito de nanopartículas de ouro e de prata como agente desinfestante quando exposto ao fungo em potencial.

Para avaliação de nanopartículas como agente desinfestante foi utilizado um total de 12 placas de petri contendo meio MS (MUSRASHIGE E SKOOG, 1962). A inoculação de esporos do fungo *Fusarium* em co-cultivo foi feita com auxílio de uma alça de Drigalski. Posteriormente placas foram divididas em quatro tratamentos totalizando três placas para cada tratamento: T1(Controle negativo - Água); T2(Controle positivo 20 $\mu$ L de fungicida Derosal Plus<sup>®</sup>); T3 (20 $\mu$ L de AgNPs); T4 (20 $\mu$ L de AuNPs). Em cada uma das placas foram dispostos 8 discos (9mm) de papel filtro com 20  $\mu$ L da solução correspondente aos tratamentos citados a cima. Foi avaliado a sensibilidade do fungo exposto ao agente desinfestante, observando seu crescimento durante 4 dias.

### 5.6 Ensaio de viabilidade celular (TTZ) em *Agrobacterium rhizogenes* (cepa K599)

Primeiramente foi plaqueado em placa de 96 poços estéreis meio MS contendo *Agrobacterium rhizogenes* e mantido em estufa do tipo B.O.D à 25°C por 4 horas. Foi retirado o meio de cultura dos poços e adicionado 100  $\mu$ l de meio sem MS e colocado novamente na estufa. Em capela de fluxo laminar, foi retirado o meio de cultura e adicionado as nanopartículas de prata aos poços. Foi mantida em estufa por um período de 24 horas para crescimento. Após esse período adicionado 50 $\mu$ l da solução de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (1% ) em cada poço e reservado por 4 horas. Posteriormente feito à leitura no leitor de placas EnSpire<sup>®</sup> Multimode Plate Reader. (Figura 5)

FIGURA 5 – Placa de ensaio de viabilidade celular (TTZ)



Fonte: Paulo Roberto Diniz da Silva (2014)

## 5.7 Uso de nanopartículas metálicas como agente desinfestante de explantes de *Eugenia uniflora* L.

### 5.7.1 Coleta do Material

Foram coletados um total de 75 gemas apicais de 1 matriz de *Eugenia uniflora* L. no campus da Unipampa, localizado na cidade de São Gabriel/RS (30°20'15.3" S, 53°18'25.1" O). As gemas foram acondicionadas em caixa de isopor e conduzidas ao Laboratório do Centro Interdisciplinar de Pesquisas em Biotecnologia II.

### 5.7.2 Desinfestação dos Explantes

Para desinfestação dos explantes (Figura 6) foi feita lavagem das gemas em água corrente, seguido de imersão em solução Tween 20  $\mu\text{L.L}^{-1}$  por 10 minutos. Os explantes foram transferidos para câmara de fluxo laminar em ambiente de assepsia e submetidas a desinfestação prévia com álcool 70% (1 minuto) e solução de hipoclorito de sódio 1,25% (15 minutos), seguido de 3 lavagens com água destilada autoclavada. Posteriormente submetidos a diferentes tratamentos. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado e constituído de cinco tratamentos e três repetições, sendo cada repetição representada por 5 explantes. T1 (Controle); T2 (AuNPs – 1 hora); T3 (AgNPs – 1 hora); T4 (AuNPs – 30 minutos); T5 (AgNPs – 30 minutos);

FIGURA 6 – Procedimento de desinfestação dos explantes



Fonte: Marina Junges (2014)

### **5.7.3 Inoculação dos explantes em meio de Murashige e Skoog (1962)**

O meio utilizado nesta etapa foi o MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com sacarose a  $30 \text{ g.L}^{-1}$  e o solidificante ágar a  $7 \text{ g.L}^{-1}$ , com pH ajustado para 5,7 conforme SILVA et al. (2014). Autoclavagem por 20 minutos à  $121^\circ\text{C}$  e 1.2 atm. O meio foi vertido em 75 tubos de ensaio (10x1,3cm). Foi feita inoculação das gemas correspondente aos 5 tratamentos; os tubos de ensaio foram vedados com papel alumino e lacrados com papel filme. Posteriormente transferidos para a câmara de crescimento do tipo B.O.D em temperatura constante de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  sob fotoperíodo de 16 horas luz.

### **5.8 Análise Estatística**

Os resultados foram submetidos a análises estatísticas para avaliar a significância em cada experimento. Foi utilizado o Qui-quadrado para avaliar quantitativamente a relação entre o resultado da desinfestação por nanopartículas e a distribuição esperada para o fenômeno. Ou seja, ele nos diz com quanta certeza os valores observados podem ser aceitos como regidos pela teoria em questão. Para ensaio da viabilidade celular o teste utilizado foi o coeficiente de regressão linear, em relação aos valores observados. O  $R^2$  varia entre 0 e 1, indicando, em percentagem, o quanto o modelo consegue explicar os valores observados.

## **6. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

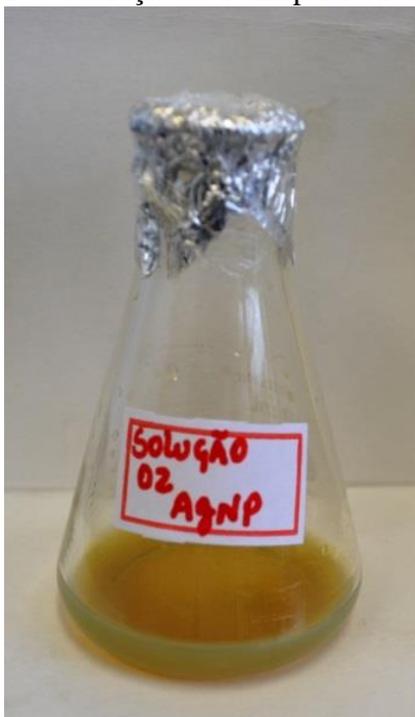
### **6.1 Síntese e caracterização de Nanopartículas Metálicas**

#### **6.1.1 Nanopartículas de Prata**

No presente trabalho, para avaliação da formação de nanopartículas de prata pelo método de redução utilizou-se à coloração amarela (Figura 7) como parâmetro de referência. A coloração amarela observada na prata coloidal é resultado da absorção da radiação

eletromagnética em ressonância com os *plasmons* da superfície. As nanopartículas apresentam elétrons superficiais, denominados *plasmons*, eles estão distribuídos em estruturas de bandas com energias distintas. O aumento no tamanho das nanopartículas faz com que a cor amarela da solução padrão passa para laranja, posteriormente violeta até atingir a coloração da prata em escala macroscópica (GORUP, 2010).

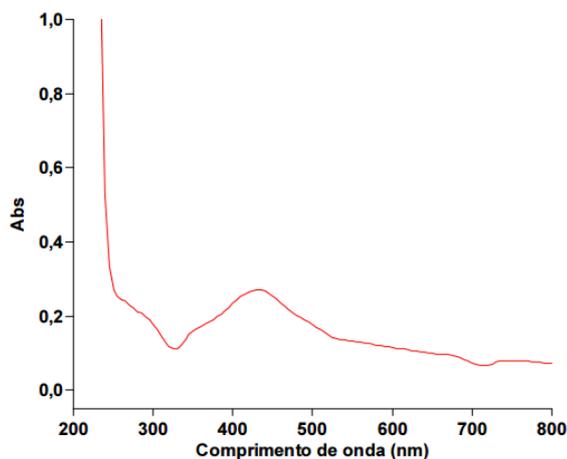
FIGURA 7 – Solução de Nanopartículas de Prata



Fonte: Marina Junges (2014)

A confirmação da ocorrência da reação e a presença de nanopartículas de prata foi caracterizada pela espectroscopia de uv-vis com pico de absorção entre de 400 à 500nm, como indicado na figura 8. Segundo a literatura, para nanopartículas de prata é possível obter *plasmons* cujos máximos podem variar de 400 até 670nm (MARZÁN, 2004).

FIGURA 8 - Espectro de UV-Vis apresentando a banda *plasmon* característico das nanopartículas de prata da reação.

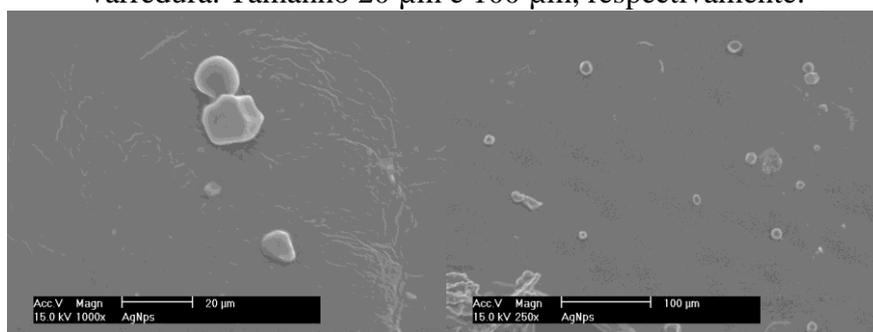


Fonte: Marina Junges (2014)

A medida de espectroscopia no UV-Vis se baseia no fenômeno ressonância da banda plasmônica, observado em nanopartículas metálicas. Neste caso, uma onda eletromagnética (EM) incide sobre uma nanopartícula metálica ocasionando a oscilação em ressonância da nuvem eletrônica da nanopartícula, transformando a energia das ondas EM em energia térmica (NETO, 2008; NOGUEZ, 2007), importantes fatores das nanopartículas que influenciam diretamente no efeito de ressonância plasmônica de superfície como a densidade eletrônica do material, massa efetiva, formato e tamanho bem como sua função dielétrica.

Além da espectrometria de UV-vis, as nanopartículas também foram caracterizadas em microscopia eletrônica de varredura. A figura 9 mostra a morfologia das nanopartículas de prata obtida por microscopia eletrônica de varredura. Por meio da micrografia da figura observa-se a formação de aglomerados de partículas globulares.

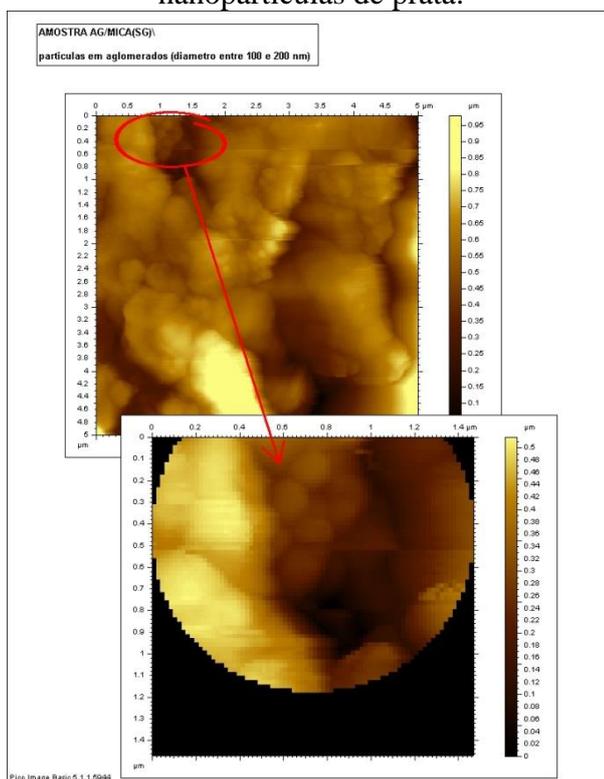
FIGURA 9 – Morfologia de nanopartículas de prata obtidas pela microscopia eletrônica de varredura. Tamanho 20  $\mu\text{m}$  e 100  $\mu\text{m}$ , respectivamente.



Fonte: Jefferson Nunes Radaeski (2014)

A microscopia de força atômica indicou nos aglomerados de nanopartículas um tamanho médio entre 100 e 200 nanômetros (Figura 10). Os aglomerados foram formados devido à queda da estabilidade após longo período da síntese.

FIGURA 10 – Microscopia de força atômica indicando o tamanho dos aglomerados nanopartículas de prata.



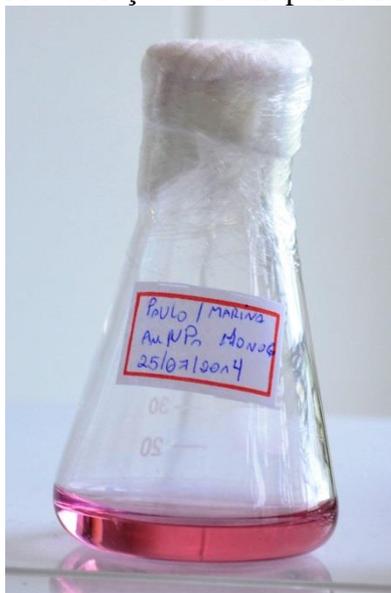
Fonte: André Gündel (2014)

### 6.1.2 Nanopartículas de Ouro

A utilização do citrato como agente redutor na síntese e estabilização de nanopartículas de ouro mostrou-se uma boa metodologia, sendo de simples preparação e eficiente na síntese e estabilização. Há uma grande variedade de métodos e variações para síntese de nanopartículas de ouro; destaca-se métodos de síntese por laser de femtosegundos, condensação de vapor de ouro, redução eletroquímica, quando comparado com esses métodos à redução química, sobressai no caráter de economia e simplicidade.

Tendo por base a coloração da solução obtida (FIGURA 11), as nanopartículas de ouro sintetizadas apresentaram dimensões superiores a 10 nm. As nanopartículas de ouro apresentam elétrons superficiais, denominados *plasmons*, eles estão distribuídos em estruturas de bandas com energias distintas. Desse modo a energia de transição eletrônica, ou seja, a cor das nanopartículas depende da densidade de estados eletrônicos e do tamanho das nanopartículas. Estas, com dimensões entre 2 e 10 nm, apresentam intensa coloração vermelha, devido a transições entre as bandas eletrônicas que acomodam os elétrons superficiais. Entretanto, em tamanhos maiores as nanopartículas passam a exibir uma coloração tendendo ao violeta, devido ao aumento na densidade de estados eletrônicos e consequente diminuição da energia de transição entre as bandas (TOMA, 2005).

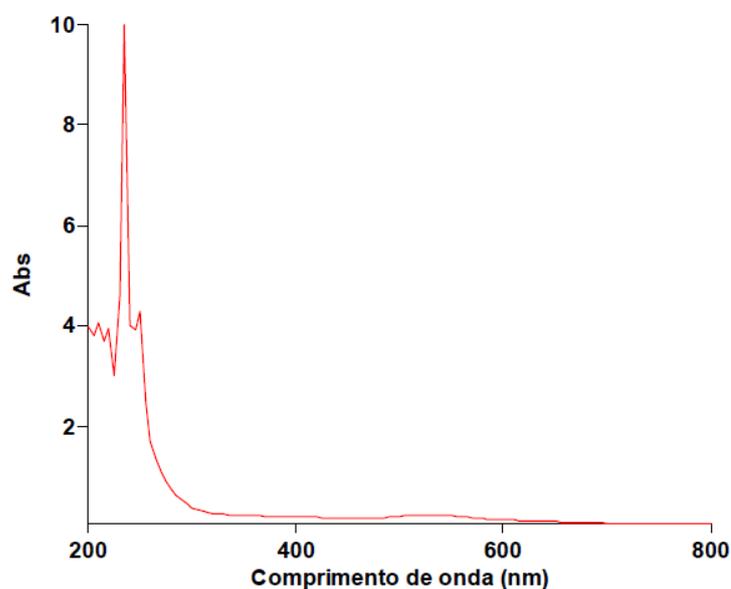
FIGURA 11 – Solução de Nanopartículas de Ouro.



Fonte: Marina Junges (2014)

No UV-Vis a banda *plasmon* característica de nanopartículas de ouro apresenta-se entre 500 à 600 nanômetros, entretanto, dependendo do tamanho médio das partículas o máximo de absorção da banda *plasmon* pode ocorrer em toda região do espectro visível. (MARZÁN, 2004). No presente estudo foi detectada uma banda bem divergente da esperada (FIGURA 12). A discrepância se deve à solução apresentar aglomeração de nanopartículas, não sendo possível à leitura nos comprimentos de onda padrão de nanopartículas.

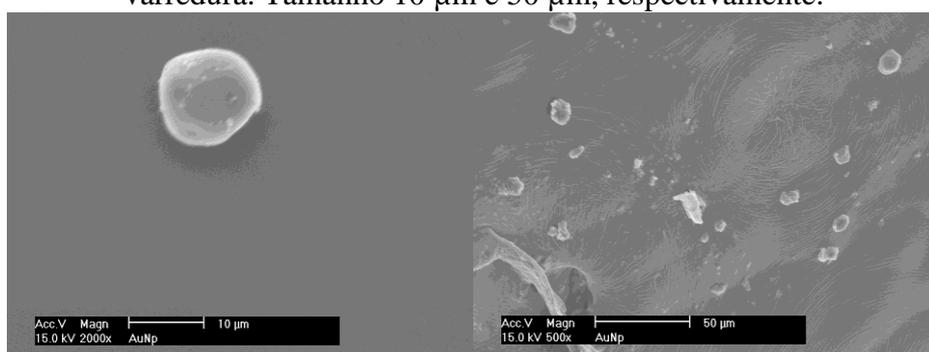
FIGURA 12 - Espectro de UV- Vis apresentando a banda *plasmon* da solução de nanopartículas de ouro.



Fonte: Marina Junges (2014)

A caracterização de nanopartículas por microscopia eletrônica de varredura apresentado figura 13 abaixo mostra a morfologia do ouro coloidal, nota-se nanopartículas predominantemente esféricas com dimensões próximas a 10  $\mu\text{m}$ .

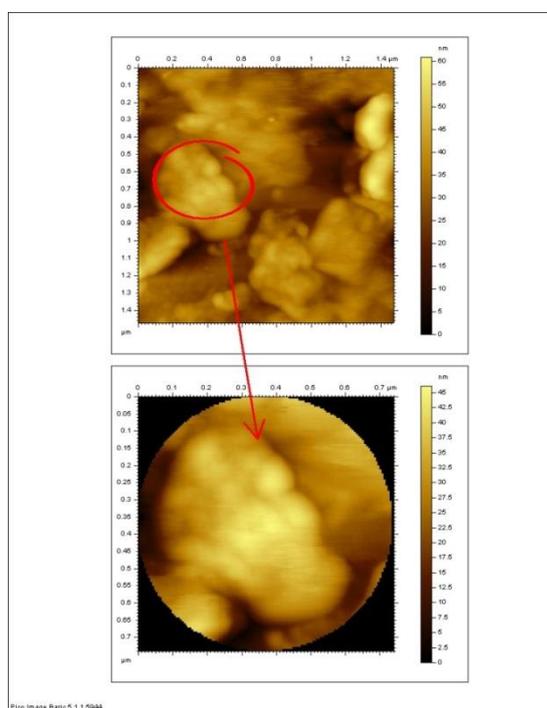
FIGURA 13 – Morfologia de nanopartículas de ouro obtidas pela microscopia eletrônica de varredura. Tamanho 10  $\mu\text{m}$  e 50  $\mu\text{m}$ , respectivamente.



Fonte: Jefferson Nunes Radaeski (2014)

A microscopia de força atômica indicou nos aglomerados de nanopartículas um tamanho médio de 100 nanômetros (Figura 14). O processo de aglomeração descreve a tendência para as partículas menores fundir-se umas as outras até que uma partícula grande seja formada, apresentando dimensões que podem exceder os limites nanométricos.

FIGURA 14 – Microscopia de força atômica indicando o tamanho das nanopartículas de ouro.

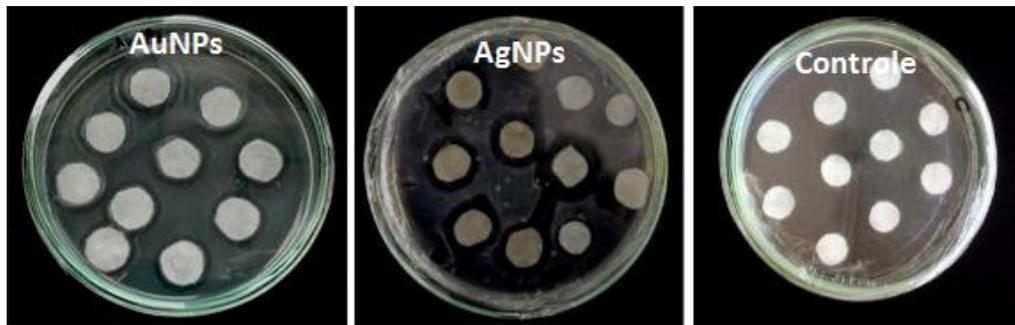


Fonte: André Gündel (2014)

## 6.2 Teste de sensibilidade frente *Agrobacterium rhizogenes* (cepa K599)

A avaliação da atividade antibacteriana de nanopartículas de prata contra cepas de *Agrobacterium rhizogenes* (cepa k599), foi realizada baseado no antibiograma qualitativo. A figura 15 mostra formação do halo de inibição, comprovando que nanopartículas de prata tem efeito sobre bactérias fitopatogênicas, obtendo um diâmetro médio de 2,88mm. O mesmo efeito não foi observado no tratamento com nanopartículas de ouro onde os halos de inibição não apresentaram tamanho considerável, divergindo do esperado. O resultado nos indica que nanopartículas apresentam potencial de agente desinfestante podendo ser utilizado como alternativa para desinfestação de explantes. Supõe-se que as bactérias não apresentaram sensibilidade ao tratamento de nanopartículas de ouro, pela solução utilizada possivelmente apresentar aglomerados de nanopartículas superando a escala nanométrica.

FIGURA 15 - Teste de difusão no meio MS utilizando cepas de *Agrobacterium rhizogenes* (K599). Nanopartículas de ouro, nanopartículas de prata e controle, respectivamente.

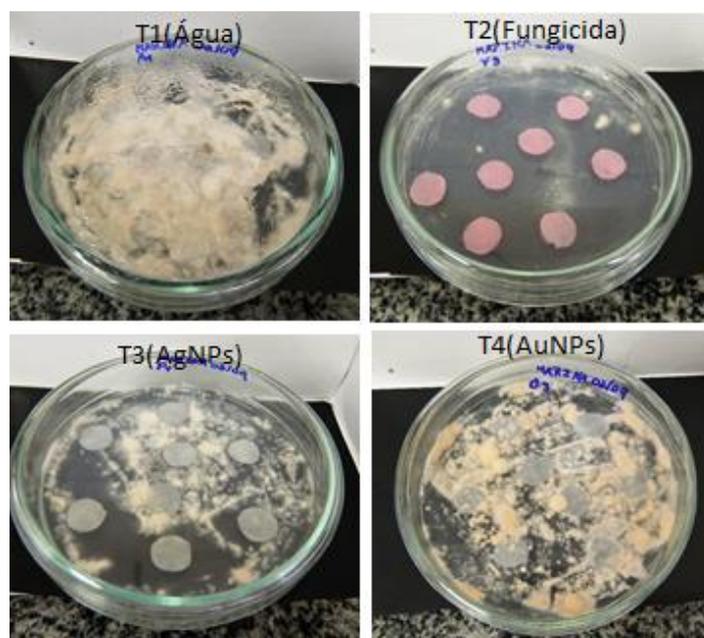


Fonte: Marina Junges (2014)

### 6.3 Teste de sensibilidade do fungo *Fusarium*

A figura 16 mostra a sensibilidade do fungo do gênero *Fusarium* submetido ao terceiro dia de tratamentos com nanopartículas de prata e ouro, demonstrando que nanopartículas não são eficientes no controle de crescimento do fungo quando comparadas ao controle positivo (fungicida). Em comparação com nanopartículas de ouro e prata, as nanopartículas de ouro foram as que menos apresentaram controle de crescimento do *Fusarium*, embora o fungo não demonstre sensibilidade a nenhum dos tratamentos estabelecidos.

FIGURA 16- Avaliação da atividade fúngica das nanopartículas de ouro e prata em *Fusarium*.



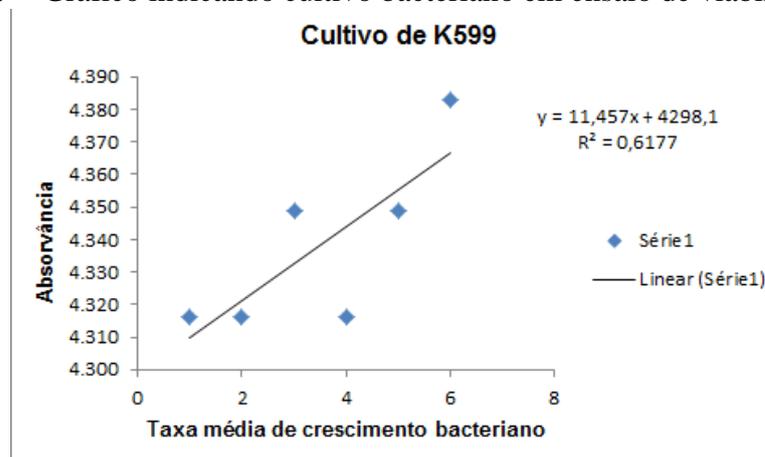
Fonte: Marina Junges (2014)

Muitas espécies do gênero *Fusarium* quando exposto a uma solução de ouro ou prata, reduz rapidamente estes dois metais, produzindo nanopartículas de ouro e prata, altamente estáveis (SOUZA, 2006), como é o caso do fungo *Fusarium oxysporum*. Um estudo recente de Ishida et al. (2014), indica a produção de nanopartículas de prata pelo fungo *Fusarium oxysporum* e análise da atividade antifúngica contra leveduras patogênicas. Isso explica os resultados obtidos no presente trabalho.

#### 6.4 Ensaio de viabilidade celular (TTZ) em *Agrobacterium rhizogenes* (cepa K599)

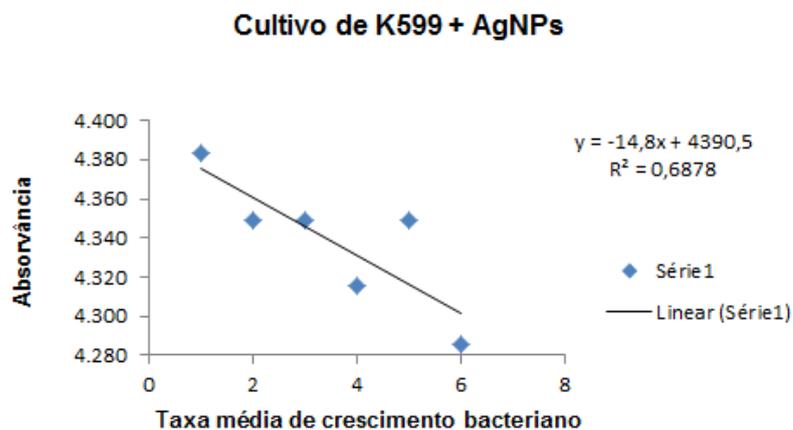
O estudo da viabilidade celular em *Agrobacterium rhizogenes* indica um grande decaimento na taxa de crescimento bacteriano com adição de nanopartículas de prata ( Figura 18) em relação ao controle (Figura 17), do qual obteve o coeficiente de regressão linear  $R^2=0,6177$  para controle e  $R^2=0,6878$  no tratamento com nanopartículas. Esse resultado é obtido através da solução de tetrazólio, ao qual se difunde através das células ocorrendo à reação de redução, resultando na formação de um composto vermelho, indicando haver atividade respiratória nas mitocôndrias e conseqüentemente viabilidade celular (NETO et al. 1988). O teste baseia-se na atividade das enzimas desidrogenases que reduz o sal de tetrazólio nos tecidos vivos, onde íons de hidrogênio são transferidos para o referido sal que atua como receptor e Hidrogênio (DELOUCHE et al., 1976). Com a adição de nanopartículas de prata houve um decaimento na absorção o que indica redução da atividade respiratória nas mitocôndrias e por conseqüência morte das bactérias. O teste ressaltou o potencial uso de nanopartículas de prata como agente bactericida.

FIGURA 17 – Gráfico indicando cultivo bacteriano em ensaio de viabilidade celular.



Fonte: Marina Junges (2014)

FIGURA 18 – Gráfico indicando decaimento no crescimento bacteriano com adição de nanopartículas de prata em ensaio de viabilidade celular.

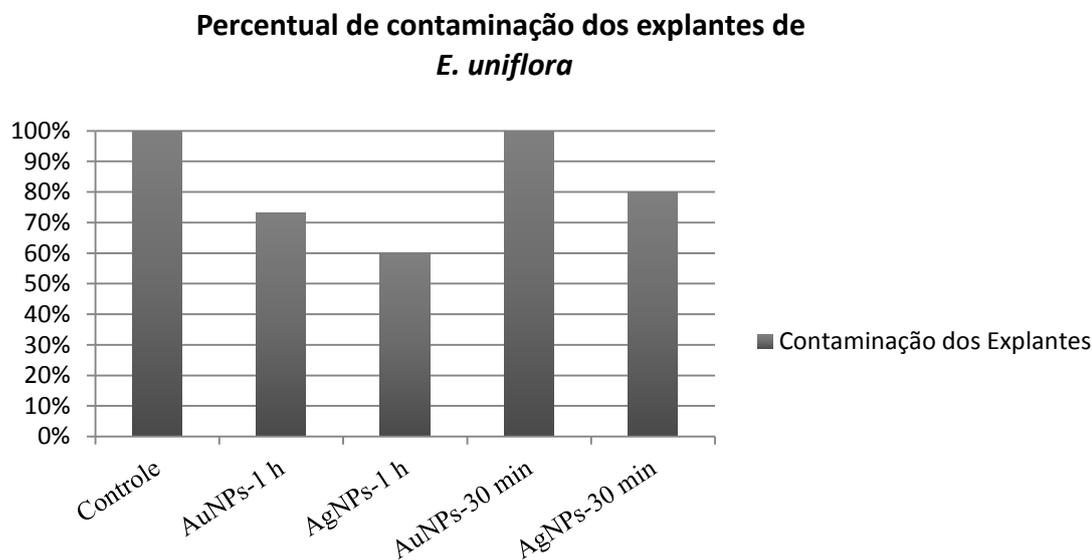


Fonte: Marina Junges (2014)

### 6.5 Uso de nanopartículas metálicas como agente desinfestante de explantes de *Eugenia uniflora* L.

O figura 19 demonstra o efeito de nanopartículas metálicas como alternativa para desinfestação em explantes de *Eugenia uniflora* L. oriundos do campo. A taxa de contaminação foi avaliada no 9º dia após a inoculação dos explantes, como demonstra no gráfico é possível evidenciar que tanto as nanopartículas de ouro como as de pratas tem efeito sobre bactérias e fungos associados às plantas, houve redução no número de contaminação quando comparadas ao controle que foi submetido apenas a desinfestação prévia, tendo destaque para o tratamento com nanopartículas de prata (1hora) que apresentou uma redução de 40% no número de explantes contaminados.

FIGURA 19 – Gráfico indicando o percentual de contaminação dos explantes de *E. uniflora* submetidos a diferentes tratamentos



Fonte: Marina Junges (2014)

A maior incidência de contaminação como mostra a tabela 1 é de origem bacteriana, possivelmente ocasionada por bactérias endógenas, mais frequentes em explantes derivados de plantas coletadas no campo. Resultado similar foi reportado para *E. uniflora* por Silva et al. (2014). O efeito das nanopartículas sobre os explantes não foi satisfatório pra eliminar completamente fungos e bactérias.

TABELA 1 – Contaminação bacteriana e/ou fúngica em explantes de *E. uniflora* no 9º dia após inoculação.

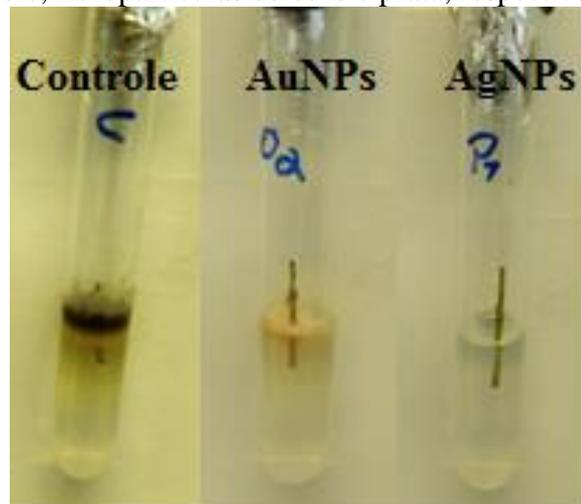
Tratamento	Bactérias	Fungos	Bactérias+Fungos	Total
Controle	12	0	3	15
AuNPs-1 h	8	2	1	11
AgNPs-1 h	3	5	1	9
AuNPs-30 min	12	2	1	15
AgNPs-30 min	8	3	1	12

Fonte: Marina Junges (2014)

As análises do Qui-quadrado para contaminação bacteriana mostram  $\chi^2 = 0,94824$  e  $\chi^2 = 0,08711$  para AgNPs – 1 hora e AuNPs- 1 hora, respectivamente, demonstrando que a diminuição na contaminação de origem bacteriana foi estatisticamente significativa ( $\chi^2 < 3,84$ ).

A figura 20 enfatiza os resultados discutidos anteriormente; explantes tratados com nanopartículas de prata apresentaram uma significativa diminuição na contaminação, ao qual na imagem é comparado com o controle apresentando fungos e bactérias e nanopartículas de ouro apresentando contaminação bacteriana.

FIGURA 20 – Observação dos explantes no 9º após o tratamento com nanopartículas. Controle, nanopartículas de ouro e prata, respectivamente.



Fonte: Marina Junges (2014)

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo demonstra a utilização de nanopartículas de ouro e prata de forma inédita em métodos de desinfestação de explantes para utilização na micropropagação de plantas. A síntese das nanopartículas pelo método de redução do citrato apresentou bons resultados; na caracterização de nanopartículas, ambas apresentaram formatos globulares e dimensão aproximada de 100 nanômetros. A aglomeração dessas nanopartículas ocorreu após um longo período de síntese onde a solução perdeu a estabilidade.

Em teste de sensibilidade ficou evidenciado que nanopartículas de prata apresentam maior potencial bactericida em *Agrobacterium rhizogenes* quando comparadas ao ouro coloidal. O resultado da eficiência pode ser confirmado com o ensaio de viabilidade celular.

Para o controle de fungos do gênero *Fusarium* o resultado foi divergente do esperado, motivo ao qual pode estar associado ao fato que muitos fungos desse gênero serem capazes de sintetizar nanopartículas.

Explantes tratados com nanopartículas de prata obtiveram uma significativa diminuição na taxa de contaminação, embora o efeito das nanopartículas sobre os explantes não foi satisfatório pra eliminar completamente os microrganismos, principalmente bactérias.

Para concluir, o estudo apesar de inédito obteve resultados satisfatórios destacando a utilização de nanopartículas de prata com resultados superiores. Porém não se pode descartar a utilização de nanopartículas de ouro, uma vez que ela pode ser utilizada como porta de entrada para levar moléculas de interesse biotecnológico para o interior das células.

## **8. PERSPECTIVAS FUTURAS**

- Padronizar tempo e concentração de nanopartículas de prata e ouro para utilização como agente desinfestante em explantes de espécies lenhosas;
- Testar a viabilidade celular a fim de verificar que nanopartículas de prata e ouro não afetaram as células vegetais:

Dano às mitocôndrias, utilizando o equipamento EnSpire® Multimode Plate Reader; dano ao DNA, através de Eletroforese em gel de Agarose; eficiência fotossintética, utilizando o equipamento Milton Roy Spectronic Genesys 2.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, L.A.; SANTOS, L. F.; SOUZA, G.A.B.; MENDES, R.A. **O uso de benomil em cultura de tecidos**. Brasília: Encontro de talento Estudantil da Embrapa recursos genéticos e Biotecnologia, 2002.

ARAÚJO, L.H.A.; CARVALHO, J.M.F.C. **Técnicas de cultivo in vitro**. Paraíba: UFPB. Centro de Ciências Agrárias, 2005.

ALENCAR, A. P. **Estabelecimento do cultivo in vitro do umbuzeiro (*Spondias tuberosa Arr.*)**. Recife: Dissertação – Universidade Federal Rural de Pernambuco, 1999.

ASTRUC, D.; DANIEL, M. C. **Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology**. Chemistry Review, 2004.

BINNING, G.; QUATE, C.F; GERBER, C. **Atomic Force microscopy**. Physical Review Letters, Vol. 56 1986.

CABRAL, G.B.; PIRES, M.V.V.; LACERDA, A.L.; CARNEIRO, V.T. C. **Introdução in vitro, micropropagação e conservação de plantas de *Brachiaria sp.*** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003.

CARVALHO, J. M. F.; SILVA, M. M. A.; MEDEIROS, M. J. L. **Fatores Inerentes À Micropropagação**. Campina Grande: PB, 2006.

CHAU, C. F.; WU, S. H.; YEN, G. C. **The development of regulations for food nanotechnology**. Amsterdam: Trends in Food Science & Technology, v. 18, n. 5, 2007.

CARVALHO, J. M. F. C.; SILVA, M. M. A.; MEDEIROS, M. J. L. **Fatores Inerentes à Micropropagação**. Campina Grande: EMBRAPA, 2006.

CASANOVA, M. C. R. **Síntese, Caracterização e estudo da estabilidade de nanopartículas metálicas estabilizadas com polieletrólitos e tióis**. São Carlos: USP, 2010.

DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. **Microscopia eletrônica de varredura: Aplicações e preparação de amostras**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007.

DELOUCHE, J. C.; STILL, T. W.; RASPET, M.; LINHEARD, M. **O teste de tetrazólio para viabilidade de sementes.** Brasília: AGIPLAN, 1976.

DESJARDINS, A.E.; MANANDHAR, G.; PLATTINER, R.D.; MARAGOS, C.M.; SHRESTHA, K.; MCCORMICK, S.P. **Occurrence of Fusarium species and mycotoxins in nepalese maize and wheat and the effect of traditional processing methods on mycotoxin levels.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000.

ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W. **Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural.** Disponível em: < <http://www.cnph.embrapa.br/laborato/biocel/abctp26.htm>>. Acesso em: 20 novembro, 2014.

FRANCO, C. Figura: **Interação de nanopartículas de prata em bactérias.** Disponível em: <http://pt.slideshare.net/cesarfrancomecom/suor-odor-prata-transpirando-inovao-anti-transpirante-anti-odor>. Acesso em : Dezembro, 2014.

GORUP, L. F; **Nanopartículas coloidais de ouro e prata e sua funcionalização com dibutil-dicalcogenetos.** São Carlos: Dissertação de mestrado, UFSCar, 2010.

GALVAGNO, S.; PARRAVANO, G. **Chemical reactivity of supported gold IV reduction nitric oxide by hydrogen.** J. Catal, 1978

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: ABCTP/EMBRAPA, CNPH, 1998.

ISHIDA, K.; CIPRIANO, T. F.; ROCHA, G. M.; WEISSMÜLLER, G.; GOMES F.; MIRANDA K.; ROZENTAL S. **Silver nanoparticle production by the fungus Fusarium oxysporum: nanoparticle characterisation and analysis of antifungal activity against pathogenic yeasts.** , Rio de Janeiro: Mem Inst Oswaldo Cruz, Vol. 109(2), 2014.

JI, X.; SONG, X.; LI, J.; BAI, Y.; YANG, W.; PENG, X. **Size Control of Gold Nanocrystals in Citrate Reduction: The Third Role of Citrate.** J. A. Chem, 2007

KANG, B.; MACKEY, M. A.; **Nuclear Targeting of Gold Nanoparticles in Cancer Cells Induces DNA Damage, Causing Cytokinesis Arrest and Apoptosis.** J. AM. CHEM. SOC, 2010.

KENNETH J. **Nanoescale Materials in Chemistry**, Copyright: Jhon Wiley & Sons, Inc, 2001.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES, F. T.; GENEVE, R. L. **Plant Propagation: Principles and Practices**. New Jersey: Prentice Hall, 2002.

HARUTA, M. **Size and Support Dependency in the Catalysis of Gold**. *Catalysis Today*, 1997.

LEITZKE, L. N.; DAMIANI, C. R.; SCHUCH, M. W. **Influencia do meio de cultura, tipo e concentração de citocininas na multiplicação in vitro de amoreira-preta e framboeseira**. Lavras: *Ciencia e Agrotecnologia*, V.34, n.2, 2010.

LIM, J.H.; Lee, J.S. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng.Aspects**, 2008.

MAHOGANY . Foto: pitanga Disponível em: <http://www.mahogany.com.br/blog/saiba-mais-sobre-os-beneficios-da-pitanga>. Acesso: 02/01/2015. 2014.

MARZÁN, M. L. **Nanometals: formation and color**. *Materials Today*, 2004.

MELO JR., M. A.; SANTOS, L. S. S.; GONÇALVES M. C.; NOGUEIRA, A. F. **Preparação de nanopartículas de prata e ouro: um método simples para a introdução da nanociência em laboratório de ensino**. São Paulo: *Química Nova*. V.35, 2012.

MORONES, J. R.; ELECHIGUERRA, J. L.; CAMACHO, A.; HOLT, K.; KOURI, J. B.; RAMIREZ, J. T.; YACAMAN, M. J. **The bactericidal effect of silver Nanoparticles**. *Nanotechnology*, 2005.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. **Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures**. Copenhagen: *Physiologia Plantarum*, 1962.

NETO, E. A. B.; RIBEIRO, C.; ZUCOLOTTO, V. **Síntese de Nanopartículas de Prata para Aplicação na Sanitização de Embalagens**. São Carlos : Comunicado técnico. Embrapa, 2008.

NETO, J. B. F; PEREIRA, L. A. G.; COSTA, N. P. ; KRZYANOWSKI, F. C.; HENNING, A. A. **Metodologia do teste de tetrazólio em sementes de soja** . Londrina: EMPRAPA, 1988.

NOGUEZ, C. **Surface Plasmons on Metal Nanoparticles: The Influence of Shape and Physical Environment**. Washington : *Journal of Physical Chemistry. C*, v. 111, 2007.

PAIVA, H. N.; GOMES, J. M. **Propagação vegetativa de espécies florestais**. Viçosa, MG: UFV, 1995.

PEREIRA, A. A.; ARAÚJO, E. A.; RIBEIRO, L.; PASSOS, F. R.; BOTREL, D. A.; BERNARDES, P. C.; JÚNIOR, J. F. Q. F.; ANDRADE, N. J. **Otimização da produção de nanopartículas de prata utilizando nova síntese e avaliação da sua ação sanitizante**. Uberlândia: Biosci. J., Uberlândia, 2013

RIBAS, L. L. F.; ZANETTE, F.; KULCHETSCKI, L.; GUERRA, M.P. **Estabelecimento de culturas assépticas de *Aspidosperma polineurom***. Ciência Florestal, Santa Maria, v.13, n.1, 2003.

POLESIL, N. P. E. **Microrganismos endofíticos e a cultura de tecidos vegetais: quebrando paradigmas**. Porto Alegre: Revista Brasileira de Biociências v. 9, n. 4, 2011.

SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. **Biotecnologia: princípios e aplicações**. Guaíba: Biotecnologia na agricultura, Agropecuaria, 2001.

SILEIKAITE, A.; PROSYCEVAS, I.; PUSO, J.; JURAITIS, A.; GUOBIENE, A. **Materials Science**. Medziagotyra, v.12, n.4, 2006.

SILVA, P. R. D.; RISPOLI, R. G.; MINOZZO M.M.; JOBIM, L. H.; JUNGES, M.; STEFENON, V. M. **A regenerative route for *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) through in vitro germination and micropropagation**. România: Annals of Forest, 2014

SONG, Y.; ZHANG, T.; YASNG W.; ALBIN, S. **Correlating Plasmon Resonance Spectra with Three-Dimensional Morphology of Single Silver Nanoparticles**. J. Phys, Chem , 2008.

SOUZA, G. I. M. H.; ESPÓSITO, E.; MARCATO, P.; DURAN, N. **Utilização de nanopartículas de prata biosintetizadas por *Fusarium oxysporum* para impregnação de tecido têxtil e recuperação destas nanopartículas em efluentes por *Chromobacterium violaceum***. Florianópolis: Anais da 58ª Reunião Anual da SBPC, 2006.

TOMA, H. E.; BONIFÁCIO L. S.; ANAISSI F. J. **Da cor à cor inexistente: uma reflexão sobre espectros eletrônicos e efeitos cromáticos**. Quarapuava: Química Nova. V.28, 2005.

TORRES, A. C, CALDAS, L. S.; BUZZO, J. A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: Embrapa v.1. e 2, 1998.

TURKEVICH, J.; STEVENSON, P. C.; HILLIER, J. **A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold.** Discuss Faraday Soc., 1951

VALÁSKOVÁ, M.; HUNDÁKOVÁ, M.; KUTLÁKOVÁ, K.M.; SEIDLEROVÁ, J.; CAPKOVÁ, P.; PAZDZIORA, E.; MATEJOVÁ, K.; HERMÁNEK, M.; KLEMM, V.; RAFAJA, D. **Preparation and characterization of antibacterial silver/vermiculites and silver/montmorillonites.** Geochimica et Cosmochimica Acta, 2010.

VILAIN, C.; GOETTMANN, F.; MOORES, A.; LE FLOCH, P.; SANCHEZ, C. **Study of metal nanoparticles stabilised by mixed ligand shell: a striking blue shift of the surface plasmon band evidencing the formation of Janus nanoparticles.** J. Mater. Chem, 2007

XAVIER, A.; OTONI, W. C.; PENCHEL, R. M. **Micropropagação e enxertia *in vitro* de espécies florestais.** Viçosa: Biotecnologia florestal, 2007.

XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R. L. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas.** Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2009.