

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

GABRIELE SAUTHIER ROMANO DE MELO

EFEITOS DE NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO (TiO<sub>2</sub>) SOBRE O  
CRESCIMENTO E METABOLISMO ANTIOXIDANTE EM PLANTAS DE SOJA  
(*Glycine max* L.)

Maringá  
2018

GABRIELE SAUTHIER ROMANO DE MELO

EFEITOS DE NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO (TiO<sub>2</sub>) SOBRE O  
CRESCIMENTO E METABOLISMO ANTIOXIDANTE EM PLANTAS DE SOJA  
(*Glycine max* L.)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (área de concentração - Biologia Celular e Molecular), da Universidade Estadual de Maringá para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Rogério Marchiosi  
Coorientador: Prof. Dr. Osvaldo Ferrarese-Filho

Maringá  
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

M528e

Melo, Gabriele Sauthier Romano de  
Efeitos de nanopartículas de dióxido de titânio  
(TiO<sub>2</sub>) sobre o crescimento e metabolismo  
antioxidante em plantas de soja (*Glycine max* L.) /  
Gabriele Sauthier Romano de Melo. -- Maringá, 2018.  
42 f. : il., color., figs., grafs.

Orientador(a): Prof. Dr. Rogério Marchiosi.  
Co-orientador(a): Prof. Dr. Osvaldo Ferrarese-  
Filho.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de  
Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Programa de  
Pós-Graduação Ciências Biológicas - Área de  
Concentração: Biologia Celular e Molecular, 2018.

1. Estresse oxidativo. 2. Enzimas antioxidantes.  
3. Nanopartículas. 4. Dióxido de titânio. I.  
Marchiosi, Rogério, orient. II. Ferrarese-Filho,  
Osvaldo, coorient. III. Universidade Estadual de  
Maringá. Centro de Ciências Biológicas. Programa de  
Pós-Graduação Ciências Biológicas - Área de  
Concentração: Biologia Celular e Molecular. IV.  
Título.

CDD 21.ed. 572.7

AHS-CRB-9/1065

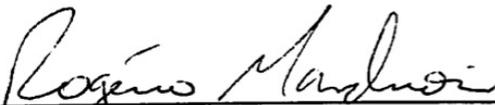
GABRIELE SAUTHIER ROMANO DE MELO

EFEITOS DE NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO (TiO<sub>2</sub>) SOBRE O  
CRESCIMENTO E METABOLISMO ANTIOXIDANTE EM PLANTAS DE SOJA  
(*Glycine max* L.)

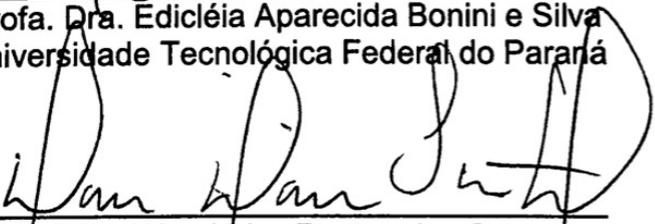
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (área de concentração - Biologia Celular e Molecular), da Universidade Estadual de Maringá para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovado em: 28.10.2018

**BANCA EXAMINADORA**

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Rogério Marchiosi  
Universidade Estadual de Maringá

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Edicléia Aparecida Bonini e Silva  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Wanderley Dantas dos Santos

## BIOGRAFIA

**Gabriele Sauthier Romano de Melo** nasceu em Maringá/PR em 5 de novembro de 1993. Possui graduação em Licenciatura em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Maringá – UEM (2016). Tem experiências na área de Bioquímica Vegetal com ênfase em Metabolismo Antioxidante de Plantas. Iniciou o curso de Mestrado no Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas – área de concentração Biologia Celular e Molecular – em Abril de 2016, desenvolvendo o trabalho “Efeitos de nanopartículas de dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>) sobre o crescimento e metabolismo antioxidante em plantas de soja (*Glycine Max* L.)”, com defesa da dissertação marcada para fevereiro de 2018.

## DEDICATÓRIA

Marcia, Marcos, Lenise, Fabiana, Cleverson, Maria e Naur (*in memoriam*). Vocês são responsáveis por quem me tornei. A vocês dedico todos meus esforços.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha mãe, Marcia. Ela sempre esteve ao meu lado me apoiando em todas etapas. E também ao meu pai, Marcos, que é meu exemplo de caráter aonde quer que eu vá. Ambos nunca mediram esforços para me auxiliar e para investir no meu crescimento. Devo a eles todas as minhas conquistas.

Agradeço a minha tia Fabiana, pelo carinho, amizade e exemplo de vida profissional. Ao meu tio Cleverson e avós Lenise e Maria, pelo apoio e interesse pelo meu trabalho.

Agradeço ao Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Rogério Marchiosi, pela orientação, apoio, confiança e amizade ao longo dos anos. Sua vida é uma inspiração e a palavra obrigada nunca fará justiça a gratidão que sinto. Agradeço também a todos os professores que me auxiliaram em minha jornada.

Agradeço a todos amigos. Com vocês, as pausas entre um parágrafo e outro de produção, melhora tudo o que tenho produzido na vida. E especialmente aos meus amigos do Laboratório de Bioquímica de Plantas (BIOPLAN): Aline, Danielly, Guilherme e Renato. Vocês tornaram meu trabalho mais leve no dia a dia e dividiram as experiências comigo.

Agradeço a Deus que permitiu que tudo isso acontecesse ao longo de minha vida e que em todos os momentos é o maior Mestre que alguém pode conhecer. A Ele, por permitir “o mundo a mudar as coisas, por nunca as fazer serem da mesma forma, pois assim não teríamos o que pesquisar e descobrir”.

## APRESENTAÇÃO

Esta dissertação é composta por um artigo científico que trata dos efeitos de nanopartículas (NPs) de óxido de titânio (TiO<sub>2</sub>) sobre o crescimento e metabolismo antioxidante em plantas de soja (*Glycine max* L.). O artigo será submetido à revista **Journal of Nanobiotechnology** (IF = 4,946), Qualis A1, após realização de experimentos adicionais que serão executados no primeiro ano do curso de doutorado.

Gabriele Sauthier Romano de Melo, Rita de Cássia Siqueira-Soares, Osvaldo Ferrarese-Filho, and Rogério Marchiosi. Effects of titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticles on growth and antioxidant metabolism in soybean (*Glycine max* L.) plants.

## RESUMO GERAL

**INTRODUÇÃO E OBJETIVOS** – As nanopartículas (NPs) são os materiais mais estudados do último século devido a ampla possibilidade de aplicações. Devido às suas propriedades químicas e físicas singulares elas têm sido utilizadas nas áreas das ciências físicas, químicas, biológicas e da saúde. Atualmente, o estudo e a aplicação de nanomateriais (NMs) movimentam 40 bilhões de dólares anualmente. Na agricultura a nanotecnologia tem aprimorado os métodos de fertilização de plantas, mantendo a fertilidade do solo e reduzindo a perda do fertilizante por lixiviação, emissão e incorporação por micro-organismos. Independentemente de onde são aplicadas, o meio ambiente é o destino final das NPs, de modo que possíveis impactos sobre os organismos vivos não podem ser descartados. Estudos mostraram que as NPs podem ser absorvidas, transportadas e acumuladas nos diferentes órgãos das plantas, podendo afetar diversos processos fisiológicos e influenciar no crescimento e desenvolvimento vegetal. Dentre as NPs mais utilizadas estão as de dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>), que podem ser aplicadas em cosméticos, na preparação de alimentos e em sistemas de carregamento de drogas. Somente a produção de pigmento à base de NPs de TiO<sub>2</sub> somou 1,31 milhões de toneladas em 2014. No que se refere ao seu mecanismo de ação, sabe-se que as NPs de TiO<sub>2</sub> podem auxiliar na absorção de água por sementes e beneficiar a germinação, além de regular o funcionamento de aquaporinas e a permeabilidade da membrana. Elas também podem alterar o metabolismo antioxidante em uma variedade de plantas. Por exemplo, em plantas de pepino as NPs de TiO<sub>2</sub> estimularam a produção de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e as atividades da catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX). Em outro estudo, plantas de *Solanum lycopersicum* expostas a NPs de TiO<sub>2</sub> tiveram a atividade da superóxido dismutase (SOD) aumentada. No presente trabalho, foram investigados os efeitos de NPs de TiO<sub>2</sub> sobre o crescimento e metabolismo antioxidante de plantas de soja.

**MATERIAIS E MÉTODOS** – Antecedendo a sua utilização as NPs de TiO<sub>2</sub> foram caracterizadas através de microscopia eletrônica de transmissão (MET). Para determinar os efeitos das NPs de TiO<sub>2</sub> sobre o crescimento e metabolismo antioxidante, sementes de soja foram imersas durante 4 h em suspensões de NPs de TiO<sub>2</sub> (250, 500, 1000 ou 2500 mg L<sup>-1</sup>), germinadas durante três dias em papel Germitest® e, em seguida, cultivadas em recipientes de plástico contendo vermiculita durante 16 dias. O tratamento das plantas foi

realizado a cada dois dias pela adição de 25 mL de solução nutritiva de Hoagland contendo 250, 500, 1000 ou 2500 mg L<sup>-1</sup> das NPs. No 16º dia de cultivo as plantas foram retiradas do sistema experimental para determinação do comprimento e das biomassas fresca e seca de raízes e caules. As alterações morfológicas do ápice radicular e zona pilífera foram monitoradas através de microscopia eletrônica de varredura (MEV). As raízes das plantas também foram submetidas a análise de espectroscopia de raios X por dispersão em energia (EDS) para avaliar a presença de titânio. A atividade da peroxidase (POD) foi determinada pela oxidação do guaiacol, enquanto que a da catalase (CAT) foi avaliada através do consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> do meio de reação. A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada pela redução de azul de nitrotetrazólio (NBT). As proteínas totais foram dosadas pelo método de Bradford. O ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) foi dosado em espectrofotômetro pela detecção indireta de O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, e o nível da peroxidação lipídica foi quantificado pelo acúmulo de malondialdeídos (MDA), que são produtos da decomposição de lipídios poli-insaturados da membrana. A análise variância (ANOVA) foi realizada para testar a significância das diferenças observadas usando o pacote de software *GraphPad Prism*<sup>®</sup> (versão 6.0, GraphPad Software Inc., EUA). As diferenças entre os parâmetros foram avaliadas pelo teste de comparação múltipla de Dunnett ( $p < 0,05$ ).

**RESULTADOS E DISCUSSÃO** – As NPs de TiO<sub>2</sub> afetaram o crescimento das plantas de soja, aumentando o comprimento dos caules. O comprimento das raízes não foi afetado significativamente pelas NPs de TiO<sub>2</sub>, embora tenha apresentado uma tendência de redução. A biomassa seca dos caules foi aumentada nos tratamentos de 250 e 1000 mg/L de NPs de TiO<sub>2</sub>, enquanto a biomassa seca das raízes foi inibida nos tratamentos de 500 e 1000 mg/L. As NPs de TiO<sub>2</sub> causaram severas alterações nas raízes de soja, especialmente no ápice e na zona pilífera. Os ápices de plantas expostas às NPs de TiO<sub>2</sub> mostraram-se delgados e com aspecto estriado. A zona pilífera apresentou uma redução do número de pelos radiculares. As análises de EDS demonstraram a presença de 9,2% do elemento titânio nas raízes, o que não foi observado nas plantas controle. O teor de proteínas totais foi reduzido, porém, a exposição das plantas de soja às NPs de TiO<sub>2</sub> não influenciaram as atividades da POD e da CAT de raízes, embora tenha estimulado a atividade da SOD expressivamente. O conteúdo de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> aumentou com a dose de NPs de TiO<sub>2</sub>, e os níveis

de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram reduzidos. O conteúdo de MDA das raízes não foi modificado pela exposição às NPs de TiO<sub>2</sub>.

A captação e translocação de NPs de TiO<sub>2</sub> tem sido relatada em algumas plantas. De fato, existem evidências de que NPs com dimensões inferiores aos poros da parede celular podem ser captadas. As análises de MET demonstraram que as NPs de TiO<sub>2</sub> utilizadas no presente estudo, em sua maioria, apresentaram tamanho inferior a 30 nm e formato irregular. Desta forma, uma parte da suspensão de NPs de TiO<sub>2</sub> pode ter sido absorvida pelas raízes das plantas de soja. Os dados de EDS corroboram esta hipótese, pois mostraram alto teor do elemento titânio nas raízes. Muitos estudos reforçam os resultados de crescimento encontrados neste trabalho. Por exemplo, foi relatado aumento de comprimento e biomassa fresca e seca de plantas de espinafre expostas às NPs de TiO<sub>2</sub>. Por outro lado, as NPs de TiO<sub>2</sub> reduziram o comprimento de raízes em cebola, milho e *Vicia narbonensis*. As plantas são suscetíveis a diversos estresses abióticos que podem induzir a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), principalmente O<sub>2</sub><sup>•-</sup> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que são combatidos por enzimas do sistema antioxidante, como a CAT, POD e SOD. Nossos dados revelaram que as NPs de TiO<sub>2</sub> elevaram a formação de EROs nas raízes de plantas de soja, particularmente de O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. O aumento de EROs pode ter levado a planta a uma condição de estresse oxidativo, confirmado com o aumento dos teores de MDA, com consequente redução do crescimento das raízes. O aumento da atividade da SOD foi uma resposta da planta para combater o estresse oxidativo, que em algumas situações não foi suprimido, levando à alteração morfológicas das raízes e a redução do crescimento das plantas.

**Palavras-chave:** Estresse oxidativo, enzimas antioxidantes, nanopartículas, dióxido de titânio.

## GERAL ABSTRACT

**INTRODUCTION AND OBJECTIVES** - Nanoparticles (NPs) are the most studied materials of the last century due to the wide possibility of applications. Due to their unique chemical and physical properties they have been used in the areas of physical, chemical, biological and health sciences. Currently, the study and application of nanomaterials (NMs) moves 40 billion dollars annually. In agriculture, nanotechnology has improved the methods of plant fertilization, maintaining soil fertility and reducing fertilizer loss through leaching, emission, and incorporation by microorganism. Regardless of where they are applied, the environment is the destination of NPs, so that possible impacts on living organisms cannot be ruled out. Studies have shown that NPs can be absorbed, transported and accumulated in the different organs of plants, affecting several physiological processes and influencing plant growth and development. Among the most used NPs are titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>), which can be applied in cosmetics, food preparation and drug loading systems. Only the production of TiO<sub>2</sub> based pigments corresponded to 1.31 million tons in 2014. About its mechanism of action, it is known that TiO<sub>2</sub> NPs can aid the absorption of water by seeds and benefit germination, besides regulating the functioning of aquaporins and membrane permeability. They can also alter the antioxidant metabolism in a variety of plants. For example, in cucumber plants the TiO<sub>2</sub> NPs stimulated the production of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and the activities of catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX). In another study, *Solanum lycopersicum* plants exposed to TiO<sub>2</sub> NPs showed increase in superoxide dismutase (SOD) activity. In the present work, the effects of TiO<sub>2</sub> NPs on growth and antioxidant metabolism were investigated in soybean.

**MATERIALS AND METHODS** - Before its use, the TiO<sub>2</sub> NPs were characterized by transmission electron microscopy (TEM). To determine the effects of TiO<sub>2</sub> NPs on growth and antioxidant metabolism, soybean seeds were, initially, immersed for 4 h in suspensions of TiO<sub>2</sub> NPs (250, 500, 1000 or 2500 mg L<sup>-1</sup>), germinated for three days on Germitest<sup>®</sup> paper and then cultivated for 16 days in plastic containers containing vermiculite. The treatment of plants was performed every two days by the addition of 25 mL of Hoagland nutrient solution containing 250, 500, 1000 or 2500 mg L<sup>-1</sup> of the NPs. On the 16th day of cultivation the plants were removed from the experimental

system to determine the length and fresh and dry weights of roots and stems. The morphological alterations of the root tips and hairs zone were monitored by scanning electron microscopy (SEM). The roots of the plants were also submitted to energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS) analysis to evaluate the presence of element titanium. Peroxidase activity (POD) was determined by the oxidation of guaiacol, while that of catalase (CAT) was evaluated by the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consumption of the reaction medium. Superoxide dismutase activity (SOD) was determined by reduction of nitro blue tetrazolium (NBT). Total proteins were measured by the Bradford method. The superoxide anion (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) was measured in a spectrophotometer by the indirect detection of O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, and the level of lipid peroxidation was quantified by the accumulation of malondialdehydes (MDA), which are products of decomposition of the polyunsaturated lipid of the membrane. Analysis of variance (ANOVA) was performed to test the significance of observed differences using the GraphPad Prism<sup>®</sup> software package (version 6.0, GraphPad Software Inc., USA). The differences between the parameters were assessed by Dunnett's multiple comparison test ( $p < 0.05$ ).

**RESULTS AND DISCUSSION** – TiO<sub>2</sub> NPs affected the growth of soybean plants, increasing the length of the stems. Root length was not significantly affected by TiO<sub>2</sub> NPs, although it showed a tendency to decrease. The dry weight of stems was increased in treatments of 250 and 1000 mg/L of TiO<sub>2</sub> NPs, while the dry weights of roots were inhibited in the treatments of 500 and 1000 mg/L. TiO<sub>2</sub> NPs caused severe changes in soybean roots, especially at the tip and hairs zone. The root tips of plants exposed to TiO<sub>2</sub> NPs were thin and striated. A reduction in the number of root hairs was also observed. EDS analysis showed the presence of 9.2% of the titanium element in the roots, which was not observed in the control plants. The total protein content was reduced. However, the exposure of soybean plants to TiO<sub>2</sub> NPs did not influence POD and CAT activities of roots, although it did stimulate SOD activity expressively. The content of O<sub>2</sub><sup>•-</sup> increased with the dose of TiO<sub>2</sub> NP, while the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels were reduced. The MDA content of the roots was not modified by exposure to TiO<sub>2</sub> NPs.

The uptake and translocation of TiO<sub>2</sub> NPs has been reported in some plants. In fact, there is evidence that NPs smaller than the cell wall pores can be uptake. MET analyzes showed that the TiO<sub>2</sub> NPs used in the present study were smaller than 30 nm in size and irregular in shape. In this way, a part of the suspension of TiO<sub>2</sub> NPs may have

been absorbed by the roots of the soybean plants. The EDS data corroborate this hypothesis, since it showed high titanium element content in the roots. Furthermore, many studies reinforce the growth results found in this study. For example, it has been reported an increase in length and fresh and dry weights of spinach plants exposed to TiO<sub>2</sub> NPs. On the other hand, TiO<sub>2</sub> NPs reduced the root length in onion, maize and *Vicia narbonensis*. Plants are susceptible to several abiotic stresses that can induce the formation of reactive oxygen species (ROS), mainly O<sub>2</sub><sup>•-</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, which are scavenged by antioxidant enzymes such as CAT, POD and SOD. Our data revealed that TiO<sub>2</sub> NPs increased the formation of ROS in the roots of soybean plants, particularly O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. The increase of ROS may have led the plant to an oxidative stress condition, confirmed by the increase of MDA contents, with consequent reduction of root growth. The increase in SOD activity was a response of the plant to combat oxidative stress, which in some situations was not suppressed, leading to morphological changes in roots and reduction of plant growth.

**Key words:** Oxidative stress, antioxidant enzymes, nanoparticles, titanium dioxide.

## **Efeitos de nanopartículas de dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>) sobre o crescimento e metabolismo antioxidante em plantas de soja (*Glycine max* L.)**

*Gabriele Sauthier Romano de Melo<sup>1</sup>, Rita de Cássia Siqueira-Soares<sup>1</sup>, Osvaldo Ferrarese-Filho<sup>1</sup>, e Rogério Marchiosi<sup>1</sup>.*

<sup>1</sup>Laboratório de Bioquímica de Plantas, Departamento de Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil.

### **Resumo**

**Introdução:** As plantas estão constantemente expostas a perturbações ambientais que limitam seus crescimentos, e uma dessas condições é a exposição e interação com diferentes nanopartículas (NPs), que são abundantes e continuamente descartadas no meio ambiente. Neste trabalho, foram avaliados os efeitos de NPs de dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>) sobre o crescimento e metabolismo antioxidante em plantas de soja (*Glycine max* L.). Para isso, sementes de soja, cv. BRS-232, foram germinadas durante três dias e as plântulas obtidas cultivadas em recipientes contendo vermiculita durante 16 dias. O tratamento das plantas com as NPs foi realizado a cada dois dias pela adição de 25 mL solução nutritiva de Hoagland contendo NPs de TiO<sub>2</sub> nas concentrações de 250, 500, 1000 e 2500 mg/L.

**Resultados:** Os resultados obtidos no presente estudo revelaram que as NPs de TiO<sub>2</sub> estimularam ligeiramente o comprimento e a biomassa fresca dos caules, mas inibiram o comprimento e as biomassas fresca e seca das raízes. Quando vistos ao microscópio eletrônico de varredura, os ápices radiculares das plantas tratadas com NPs TiO<sub>2</sub> se mostraram mais delgados do que os de plantas controle, além de apresentarem aspecto estriado. Análises de espectroscopia de raios X por dispersão em energia mostraram que o elemento titânio está presente em altas proporções (aproximadamente 10%) nas raízes das plantas expostas às NPs de TiO<sub>2</sub>, o que não foi observado em plantas controle. Houve aumento dose-dependente dos teores do ânion superóxido nas raízes, enquanto que os níveis de malondialdeídos foram aumentados apenas com as menores doses usadas da NP. O conteúdo de peróxido de hidrogênio e o teor de proteínas totais foram drasticamente reduzidos. As atividades da POD e da CAT não foram influenciadas pelo

tratamento com as NPs, enquanto que a atividade da SOD foi abruptamente estimulada, mesmo nas doses mais baixas da NP.

**Conclusões:** Em resumo, os dados sugerem que o estresse oxidativo gerado nas raízes das plantas de soja expostas às NPs de TiO<sub>2</sub> seja responsável pelas alterações morfológicas e pela redução do crescimento. Adicionalmente, as NPs de TiO<sub>2</sub> parecem ter sido captadas ou estarem firmemente aderidas à superfície das raízes das plantas de soja.

**Palavras-chave:** Estresse oxidativo, enzimas antioxidantes, nanopartículas, dióxido de titânio.

## Introdução

Nanopartículas (NPs) são os materiais mais amplamente utilizados e estudados do século XXI. Eles deram origem a um novo ramo da ciência denominado nanotecnologia, marcada pelo projeto, caracterização, produção e aplicação de componentes em nanoescala (Uskoković, 2007). Esses nanomateriais (NMs) possuem propriedades únicas devido ao seu tamanho reduzido, que varia entre 1 e 100 nm (1 nm = 10<sup>-9</sup> m) (Ball, 2002). As NPs podem existir nas formas fundidas, agregadas ou aglomeradas, podendo ser esféricas, tubulares ou irregulares (Nowack e Bucheli, 2007; Hatami et al., 2016). Características como alta área de superfície em relação ao volume e reatividade química têm permitido a sua utilização nas áreas das ciências físicas, químicas, biológicas e da saúde, além de outros campos interdisciplinares da ciência e engenharia (Arruda et al., 2015).

A nanotecnologia movimentou 135 bilhões de dólares em 2007 (Científica, 2008). Os Estados Unidos da América, Japão, China e Coreia do Sul são os países que mais investem em nanotecnologia (Galembeck e Rippel, 2004). No Brasil, o Programa Nacional de Desenvolvimento em Nanociência e Nanotecnologia investiu US\$ 30 milhões no período de 2005 a 2006 (Toma, 2005). A pesquisa sobre NPs é atualmente uma área de interesse científico intenso impulsionada pelo desejo de fabricar materiais com propriedades novas e melhoradas devido a uma grande variedade de aplicações (Arruda et al., 2015).

A utilização de NPs nos dias atuais é em sua maioria um aperfeiçoamento de tecnologias existentes. Com os investimentos em nanotecnologia desenvolveu-se a

nanomedicina, pois a nanotecnologia tem um enorme potencial na resolução de problemas relacionados a saúde. NPs estão sendo utilizadas para produção de implantes e órgãos artificiais com maior afinidade pelo tecido original, crescendo células em arcabouços artificiais com estrutura tridimensional, que melhora a adesão de células e orienta o crescimento nas formas desejadas (Thomas et al., 2006). Além disso, o setor da nanomedicina com maior potencial são os sistemas de carregamento e liberação de drogas (Shaffer, 2005). Além de proteger o fármaco contra a degradação prematura no organismo, o encapsulamento em nanossistemas ajuda a direcioná-lo ao tecido ou célula alvo, aumentando sua absorção (Kashyap et al., 2015). Também, NPs de dióxido de titânio ( $\text{TiO}_2$ ) e óxido de zinco ( $\text{ZnO}$ ) são utilizadas em cosméticos como protetores solares. Essas NPs não absorvem a luz visível e bloqueiam a luz UV, melhorando a eficiência dos protetores solares sem apresentar o aspecto esbranquiçado dos demais bloqueadores (Toma, 2004; Neves, 2008). Além disso, essas NPs conferem novas cores para estes cosméticos, aumentando a absorção e prolongando a ação do produto (Rangel, 2008).

A nanotecnologia tem também aprimorado os métodos de fertilização de plantas na agricultura. A incorporação de NPs em fertilizantes facilita a absorção de nutrientes pelas plantas, pois o tamanho reduzido das NPs fornece área de superfície adicional que aumenta a disponibilidade de nutrientes (DeRosa et al., 2010). Além disso, os nanofertilizantes mantêm a fertilidade do solo ao reduzir as perdas de fertilizantes por lixiviação, emissão e incorporação por micro-organismos, além de diminuir os efeitos tóxicos associados à aplicação de fertilizantes químicos tradicionais (Suman et al., 2010).

Devido a sua ampla utilização as NPs frequentemente alcançam o meio ambiente, mais especificamente a água, o solo e o ar. Entretanto, os efeitos desses NMs sobre os organismos vivos ainda são mal compreendidos. Estudos realizados com plantas têm mostrado que as NPs podem ser absorvidas, transportadas e acumuladas em compartimentos celulares específicos tais como vacúolos, núcleo e plasmodesmas (Wang et al., 2016). De fato, as NPs podem afetar uma diversidade de processos fisiológicos e influenciar o crescimento e o desenvolvimento das plantas, muito embora seus mecanismos de ação não sejam completamente compreendidos. Em um estudo, Wang et al., (2012) mostraram que NPs de  $\text{CuO}$  foram transportadas pelo xilema e floema de plantas de milho. Por sua vez, NPs de prata ( $\text{Ag}$ ) e zinco ( $\text{ZnO}$ ) foram capazes de induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em lentilha (Thwala et al., 2013).

Em outro estudo, foi verificado que aplicação de NPs de silício ( $\text{SiO}_2$ ) em plantas de tomate cereja aumentaram a taxa fotossintética e a eficiência do uso da água, além de aprimorar o sistema de defesa das plantas contra o estresse salino (Haghighi e Pessarakli, 2013). Há o relato de Mustafa et al., (2015), no qual a exposição de plantas de soja sob inundação às NPs de alumínio ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) resultou em aumento do crescimento. Segundo os autores, esse resultado se deve a regulação da morte celular e do metabolismo energético. Em adição, plantas de tabaco expostas a essas NPs tiveram a expressão do RNA mitocondrial regulada. Contudo, níveis crescentes da NP de alumínio conduziram à clorose das folhas, bem como à redução da área foliar e da biomassa das raízes (Frazier et al., 2014; Burklew et al., 2012).

Entre as NPs mais utilizadas estão as de titânio, frequentemente utilizadas em cosméticos, filtros solares, preparação de alimentos e sistemas de *Drugdelivery* (Grande e Tucci 2016; Cox et al., 2017). A forma oxidada das NPs de titânio presente naturalmente no ambiente é o dióxido de titânio ( $\text{TiO}_2$ ), ocorrendo nas formas cristalinas anatase, rutilo e brookita (Cox et al., 2017). Em 2010, esta NP foi classificada como um possível carcinogênico para humanos pela Agência para Pesquisas em Câncer (IARC, 2010). Entretanto, a produção de pigmento à base de NPs de  $\text{TiO}_2$  alcançou em 2014 o montante de 1,31 milhões de toneladas (U.S. Geological Survey, 2015).

Um estudo realizado com *Arabidopsis* mostrou que NPs de titânio ( $\text{TiO}_2$  anatase) podem entrar no interior das células, acumular nos vacúolos e núcleos de células radiculares e causar reorganização e eliminação de microtúbulos com consequente redução do alongamento das raízes (Kurepa et al., 2010). Também em *Arabidopsis*, Zheng et al. (2005) observaram que NPs de titânio ( $\text{TiO}_2$ ) auxiliam a absorção de água por sementes e beneficiam a germinação. Esses efeitos positivos sobre a germinação podem ser explicados baseado no papel de regulação que estas NPs exercem sobre as aquaporinas, proteínas responsáveis por regular a permeabilidade de membranas, além de ter um papel importante na germinação e crescimento vegetal (Tyerman et al., 1999; Heinen et al., 2009).

Ao que parece, NPs apresentam um papel importante na proteção de plantas contra vários estresses abióticos. Alguns estudos indicam que NPs são capazes de mimetizar a atividade de enzimas antioxidantes e eliminar EROs (Rico et al., 2013; Wei e Wang, 2013). Com relação as NPs de  $\text{TiO}_2$ , tem sido mostrado que elas podem alterar significativamente o metabolismo antioxidante em uma variedade de plantas. Por

exemplo, a exposição de plantas de pepino a estas NPs resultou no aumento dos níveis de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e das atividades da catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX). As NPs de  $TiO_2$  também estimularam a atividade da superóxido dismutase (SOD) em *Solanum lycopersicum* (Song et al., 2013). Neste trabalho investigamos os efeitos de NPs de  $TiO_2$  sobre a germinação, crescimento e metabolismo antioxidante de plantas de soja, avaliando principalmente as atividades da CAT, peroxidase (POD) e SOD, bem como os teores de  $H_2O_2$ ,  $O_2^{\cdot-}$  e de proteínas totais. As alterações morfológicas do ápice radicular foram monitoradas através de estudos de microscopia eletrônica de varredura (MEV).

## **Seção Experimental**

### **Caracterização das nanopartículas (NPs) de dióxido de titânio ( $TiO_2$ )**

As NPs de  $TiO_2$  foram adquiridas da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA, Product number 544884). De acordo com a empresa, essas NPs possuem o tamanho máximo de 20 nm (BET). No presente trabalho, a forma e tamanho das NPs foram determinados por microscopia eletrônica de transmissão (MET). Para isso, foi utilizado um microscópio eletrônico de alta resolução (JE 1400) com uma tensão de aceleração de 120 kV. Inicialmente, as NPs foram dissolvidas em água deionizada a uma concentração de 250 mg/L e levadas ao banho ultrassônico por 30 min. Em seguida, uma gota da suspensão de NPs foi colocada em uma grade coberta com cobre e drenada com papel filtro. Após secagem será realizada a observação em microscópio.

### **Cultivo e tratamento das plantas**

Sementes de soja foram sanitizadas com hipoclorito de sódio a 2% durante 2 min e enxaguadas exaustivamente com água deionizada. Durante 4 horas, as sementes ficaram submersas em suspensões aquosas de NPs de  $TiO_2$  nas concentrações de 0, 250, 500, 100 e 2500 mg/L, previamente levadas ao banho ultrassônico por 30 min. Após embebição, as sementes foram distribuídas uniformemente em duas folhas de papel Germitest<sup>®</sup> previamente umedecidas com água deionizada. As sementes foram cobertas com uma folha de papel adicional, enroladas e embaladas em tubos de plástico (PVC) contendo

uma pequena película de água para manutenção da umidade. Os recipientes contendo as sementes foram transferidos para câmaras de germinação onde permaneceram no escuro a 25°C por 72 h. Após a germinação, plântulas uniformes foram selecionadas, transferidas para bandejas plásticas (constituídas de celas em formato de pirâmide invertida de 50 mL) preenchidas com substrato vermiculita e irrigadas com água destilada até a capacidade de campo. As bandejas foram mantidas em uma sala de crescimento de plantas a 25°C com um fotoperíodo claro/escuro de 12/12 h e uma densidade de fluxo de fótons de 300  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  durante 16 dias. O tratamento das plantas foi realizado a cada dois dias pela adição de 25 mL de solução nutritiva de Hoagland contendo diferentes concentrações de NPs de  $\text{TiO}_2$  (0, 250, 500, 1000 e 2500 mg/L), previamente levadas ao banho ultrassônico por 30 min. As plantas de controle foram irrigadas a cada dois dias com 25 mL de solução nutritiva. No 16º dia de cultivo, as plantas de soja foram retiradas do sistema experimental e separadas em raízes, caule e folhas. Os comprimentos de raízes e caules foram determinados com auxílio de uma régua milimetrada, sendo em seguida determinada a biomassa fresca. As biomassas secas foram estimadas após desidratação dos tecidos em estufa a 60°C por 72 h.

### **Alterações morfológicas**

As alterações morfológicas do ápice radicular e da zona pilífera foram monitoradas através de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para isso, segmentos de raízes (coifa e zona pilífera) foram fixados em glutaraldeído 2,5% preparado em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2). As amostras foram desidratadas em soluções com concentrações crescentes de etanol (70, 80, 90 e 100%), secas ao ponto crítico do  $\text{CO}_2$ , pulverizadas com ouro e examinadas em microscópio eletrônico de varredura Jeol-JSM-5310<sup>®</sup> (Dos Santos et al., 2008). As amostras também foram submetidas a análise de espectroscopia de raios X por dispersão em energia (EDS) acoplada ao MEV para avaliação elementar das amostras.

### **Ensaio enzimáticos**

Para determinação das atividades enzimática foi, inicialmente, realizada a obtenção do extrato bruto. Para isso, raízes (1 g) de soja foram trituradas com nitrogênio líquido e, em

seguida, homogeneizadas com 1,5 mL de tampão fosfato 100 mM (pH 7,5) contendo DTT 3 mM, EDTA 1 mM e 0,01 g de PVP de acordo com Azevedo et al. (1998). As amostras foram centrifugadas por 30 min a  $20.034 \times g$  e o sobrenadante utilizado como extrato enzimático da POD, CAT e SOD.

A determinação da atividade da POD solúvel foi realizada conforme descrito por dos Santos et al., 2008. O meio de reação (3 mL) continha tampão fosfato 25 mM (pH 6,8),  $H_2O_2$  2,58 mM e guaiacol 10 mM. A reação foi iniciada pela adição de 0,2 mL do extrato enzimático preparado como descrito acima, diluído em tampão fosfato 67 mM (pH 7,0). A oxidação do guaiacol foi acompanhada em espectrofotômetro a 470 nm durante 5 min. A atividade da POD foi calculada usando um coeficiente de extinção molar para o tetraguaiacol de  $25,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Devi e Prasad, 1996). Os resultados foram expressos como  $\mu\text{mols} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1} \times \text{biomassa fresca}$ .

A atividade da CAT foi determinada através do consumo de  $H_2O_2$  da reação a 405 nm (Tománková et al., 2006). A reação (1,1 mL) continha 50  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato 0,1 M (pH 7,0), 50  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático e  $H_2O_2$  27 mM. A reação foi iniciada pela adição de 0,5 mL de  $H_2O_2$  60 mM e interrompida, após 4 min, com a adição de 0,5 mL de molibdato de amônio 0,34 mM. Os resultados foram expressos como  $\mu\text{mols} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}$  biomassa fresca.

A atividade da SOD foi determinada de acordo com o método de Giannopolitis e Ries (1977), tendo como base a capacidade da enzima converter o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular. O meio de reação continha tampão fosfato 50 mM (pH 7,8), NBT 75  $\mu\text{M}$ , L-metionina 13 mM, riboflavina 4  $\mu\text{M}$  e 20  $\mu\text{L}$  de extrato enzimático de folha, totalizando 1,5 mL. A mistura de reação foi mantida a 25°C, sob iluminação, por um período de 10 min. A redução do NBT foi monitorada em espectrofotômetro a 560 nm. Uma unidade de enzima (U) para SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para causar 50% de inibição da taxa de redução de NBT medida a 560 nm. Os resultados foram expressos como  $\text{U} \times \text{g}^{-1}$  biomassa fresca.

### **Determinação do teor de proteínas totais**

A dosagem de proteínas foi feita utilizando o método de Bradford (1976), tendo albumina (50 mg%) como padrão. Amostras (20  $\mu\text{L}$ ), apropriadamente diluídas, foram adicionadas a tubos de ensaio contendo 1,0 mL do reagente de Bradford. Após 5 min de reação foi

realizada a leitura em espectrofotômetro a 595 nm. Os resultados foram expressos como  $\text{mg proteína} \times \text{mg}^{-1}$  biomassa fresca.

### **Análises bioquímicas**

O teor do ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) foi determinado como descrito por Wu e von Tiedemann (2002). O princípio do método é a detecção indireta de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  através da oxidação da hidroxilamina com consequente produção de nitrito, sendo este quantificado a 540 nm após reação colorimétrica com sulfanilamida e dicloridrato de N-(1-naftil)etilenodiamina. Raízes (0,6 g) foram homogeneizadas com 2,7 mL de tampão fosfato 50 mM (pH 7,8) e centrifugadas por 5 min a 2186 g. Em seguida, 0,9 mL do sobrenadante foi incubado com 0,1 mL de hidroxilamina por 15 min a 30°C. Então, 350  $\mu\text{L}$  do meio de incubação foram transferidos para tubos de ensaio contendo 350  $\mu\text{L}$  de sulfanilamida 17 mM (preparada em ácido acético 30%) e 350  $\mu\text{L}$  de dicloridrato de N-(1-naftil)etilenodiamina 7 mM. Em seguida, a absorbância foi determinada a 540 nm. Os resultados foram expressos como  $\text{mol} \times \text{g}^{-1}$  biomassa fresca.

O nível de peroxidação lipídica, quantificado pela medida do acúmulo de malondialdeídos (MDA), um produto da peroxidação de ácidos graxos insaturados, foi determinado como descrito por Baziramakenga et al., (1995). Para isso, 1 g de raízes foram homogeneizadas com 5 mL de tampão fosfato 67 mM (pH 7,0) e 0,1 g de PVPP, com posterior centrifugação a 2186 g por 5 min. Uma alíquota de 0,5 mL do sobrenadante foi combinada com 4 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5 % preparado em ácido tricloroacético 20%. As amostras foram levadas ao banho-maria a 90°C por 10 min, sendo, em seguida, resfriadas em banho de gelo durante 15 min. As amostras foram centrifugadas a 2186 g por 5 min e a absorbância do sobrenadante (complexo colorido MDA-TBA) determinada a 532 nm. O valor obtido foi subtraído de uma absorbância inespecífica obtida a 600 nm. O conteúdo de MDA foi calculado utilizando um coeficiente de extinção molar de  $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Os resultados foram expressos como  $\mu\text{mol MDA} \times \text{g}^{-1}$  biomassa fresca de raízes.

### **Análise Estatística**

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, no qual cada plote representa um recipiente contendo uma planta. Os dados foram expressos como a média de quatro a sete experimentos independentes  $\pm$  erro padrão da média. A análise variância (ANOVA) foi realizada para testar a significância das diferenças observadas usando o pacote de software *GraphPad Prism*<sup>®</sup> (versão 6.0, GraphPad Software Inc., EUA). As diferenças entre os parâmetros foram avaliadas pelo teste de comparação múltipla de Dunnett e os valores de  $p \leq 0,05$  considerados estatisticamente significativos.

## Resultados

As análises de MET revelaram que as NPs de TiO<sub>2</sub> utilizadas no presente estudo possuem formato irregular e tamanho médio inferior a 30 nm (**Fig. 1**), o que está de acordo com as especificações do fabricante (Sigma-Aldrich). Porém, não apresentam homogeneidade, sendo possível visualizar NPs com dimensões significativamente superiores ao tamanho médio.

As NPs de TiO<sub>2</sub> influenciaram de forma dose-dependente o crescimento de raízes e caules das plantas de soja (**Fig. 2**). Por exemplo, foi observado um aumento de 42,38% no comprimento dos caules após tratamento das plantas com 500 mg/L das NPs (**Fig. 2A**), quando comparado com o controle. Os demais tratamentos não influenciaram significativamente o comprimento dos caules das plantas de soja. O comprimento das raízes não foi afetado significativamente pelas NPs de TiO<sub>2</sub>, embora uma tendência de redução tenha sido observada (**Fig. 2A**). Por sua vez, a biomassa seca dos caules foi 27% e 24% maior nas plantas de soja tratadas com 250 e 1000 mg/L das NPs de TiO<sub>2</sub> (**Fig. 2B**). Já a biomassa seca das raízes foi inibida em 21% e 24% nos tratamentos com 500 e 1000 mg/L das NPs de TiO<sub>2</sub> (**Fig. 2B**). As biomassas secas de raízes e caules foram reduzidas em 53,3% e 36,6% após exposição das plantas de soja a 500 mg/L das NPs TiO<sub>2</sub> (**Fig. 2C**). Não foram observadas alterações significativas nas biomassas secas de raízes e caules após os tratamentos com 250, 1000 e 2500 mg/L das NPs de TiO<sub>2</sub> (**Fig. 2C**).

As NPs de TiO<sub>2</sub> causaram severas alterações morfológicas nas raízes de plantas de soja, com especial destaque para o ápice e zona pilífera (**Fig. 3**). Quando vistos ao microscópio eletrônico de varredura, os ápices radiculares das plantas tratadas com NPs TiO<sub>2</sub> se mostraram mais delgados do que os de plantas controle, além de apresentarem

aspecto estriado (**Figs. 3A, B, C e D**). Além disso, houve redução massiva dos pelos radiculares após tratamento com as NPs (**Fig. 3E, F**). Análises de espectroscopia de raios X por dispersão em energia (EDS) da superfície radicular das plantas expostas às NPs revelaram a presença do elemento titânio em um percentual de 9,2% (**Fig. 3H**), o que não foi observado para plantas controle (**Fig. 3G**).

O teor de proteínas totais de raízes de plantas de soja foi reduzido de forma dose-dependente, chegando a 50% na maior concentração de NPs de TiO<sub>2</sub> utilizada (**Fig. 4**). Entretanto, a exposição das plantas de soja às NPs de TiO<sub>2</sub> não influenciaram significativamente as atividades da POD e da CAT de raízes (**Figs. 5B, C**), embora tenha estimulado a atividade da SOD expressivamente. Os aumentos na atividade da SOD foram de 91%, 121,6% e 118,1% após exposição das plantas a 500, 1000 e 2500 mg/L das NPs de TiO<sub>2</sub>, quando comparado com o controle (**Fig. 5A**).

O conteúdo de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> das raízes aumentou linearmente com a dose de NPs de TiO<sub>2</sub> utilizada, sendo aproximadamente 20 vezes maior no tratamento com 2500 mg/L do que no controle (**Fig. 6A**). Contrariamente, os níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram reduzidos, especialmente na concentração de 500 mg/L (41,6%) (**Fig. 6B**). Por sua vez, o conteúdo de MDA das raízes não foi influenciado significativamente pelos tratamentos com as NPs de TiO<sub>2</sub>, exceto por um aumento de 17,4% observado na concentração de 250 mg/L (**Fig. 7**).

## **Discussão**

Os processos iniciais de interação das NPs com as plantas dependem de sua adsorção à superfície das raízes, incorporação na parede celular e/ou captação pelas células (Nowack e Baucheli, 2007). NPs com dimensões superiores às dos poros da parede celular, que possuem cerca de 5 a 20 nm (Rondeau-Mouro et al., 2008), podem ser aderidas a raiz da planta causando injúrias mecânicas (Miralles et al., 2012), bloqueando os poros e reduzindo a absorção de água e nutrientes (Martínez-Fernández et al., 2016). Entretanto, NPs de reduzido tamanho (< 20 nm) podem penetrar pelas junções celulares, passar pelo córtex e atingir o xilema (Dietx e Herth, 2011). Não obstante, alguns estudos têm mostrado que algumas espécies de plantas podem captar e translocar NPs com tamanho superior a 20 nm (Ma et al., 2010).

Mais especificamente, a captação e translocação de NPs de  $\text{TiO}_2$  já tem sido relatada em plantas de trigo, *Arabidopsis*, tomate, pepino e soja cultivada em hidroponia (Zuverza-Mena et al., 2017). No presente estudo, a análise por MET de uma suspensão de NPs de  $\text{TiO}_2$ , usada para o tratamento das plantas de soja, revelou a existência de um elevado percentual de partículas com dimensões menores do que 30 nm (**Fig. 1**). Dessa forma, uma parte substancial da suspensão de NPs de  $\text{TiO}_2$  aplicada pode ter sido absorvida pelas raízes das plantas de soja, haja vista possuírem tamanho médio menor do que a malha da parede celular. Corroborando esta hipótese, análises por EDS mostraram que o elemento titânio está presente em altas proporções (aproximadamente 10%) nas raízes dessas plantas (**Fig. 3H**), o que não foi observado em plantas controle. Embora esta informação confirme a presença do elemento titânio nos tecidos radiculares, ela não agrega informação sobre a estrutura química do analito, não sendo possível definir se o titânio está presente no interior das raízes em sua forma nanoparticulada. Entretanto, pesquisadores verificaram, através de um estudo de aproximação de estrutura por absorção de raios X, que o titânio captado e translocado por plantas de pepino estava presente na forma de NP anatase (Servin et al., 2013). Esse resultado mostra que algumas plantas podem captar e translocar NPs sem transformá-las. Outra hipótese que explicaria nossos dados seria a firme adsorção das NPs de  $\text{TiO}_2$  à superfície das raízes, com consequente limitação da absorção de nutrientes e do crescimento. De fato, a presença de NPs de  $\text{TiO}_2$  no interior das células de plantas de trigo ou o seu acúmulo nas paredes celulares alteraram as condições bioquímicas na área de contato, afetando a disponibilidade de nutrientes e o crescimento da planta (Du et al., 2011).

Nossos dados também revelaram que as NPs de  $\text{TiO}_2$  influenciaram significativamente o crescimento das plantas de soja (**Fig. 2**). De modo geral, para o caule foram observados estímulos no comprimento e na biomassa fresca com as menores doses de NPs de  $\text{TiO}_2$  utilizadas (**Figs. 2A, B**). Para as raízes, foram observadas reduções em todos os parâmetros de crescimento com doses de até 1000 mg/L, com certa recuperação na dose mais elevada (2500 mg/L) (**Fig. 2**).

Efeitos estimulatórios e/ou inibitórios sobre o crescimento têm sido descritos após a exposição de uma diversidade de plantas às NPs e o efeito final observado geralmente depende da planta analisada, da NP utilizada, da concentração e do tempo de exposição às NPs (Lee et al., 2010; Gubbins et al., 2011; Trujillo-Reyes et al., 2014; Nair e Chung, 2015). Com relação às NPs de  $\text{TiO}_2$ , os efeitos sobre o crescimento

frequentemente são benéficos (Zheng et al., 2005; Yang et al., 2006; Mingyu et al., 2007; Khot et al., 2012; Laware e Raskar et al., 2014), embora existam dados contraditórios. Por exemplo, plantas de espinafre expostas à 0,25% de NPs de TiO<sub>2</sub> apresentaram aumento do comprimento e das biomassas fresca e seca da planta (Gao et al., 2006). NP de TiO<sub>2</sub> também estimularam o crescimento de plântulas de cebola apenas quando em baixas concentrações (10 µg mL<sup>-1</sup> e 20 µg mL<sup>-1</sup> de NPs de TiO<sub>2</sub>) (Laware e Raskar, 2014). Quando aspergidas nas folhas nas concentrações de 0,01, 0,03 e 0,05%, as NPs de TiO<sub>2</sub> também foram capazes de aumentar a altura de plantas de soja (Rezaei et al., 2015). Por outro lado, foi relatada a inibição de crescimento de plântulas de cebola quando expostas a maiores doses de NPs de TiO<sub>2</sub> (40 µg mL<sup>-1</sup> e 50 µg mL<sup>-1</sup> de NPs de TiO<sub>2</sub>) (Laware e Raskar, 2014). Corroborando nossos resultados, Ghosh et al. (2010) demonstraram uma redução radicular em plantas de cebola expostas a 6 mM e 8 mM de NPs de TiO<sub>2</sub>. Em milho e em *Vicia narbonensis*, doses de 4% de NPs de TiO<sub>2</sub> diminuíram o comprimento da raiz de ambas espécies (Castiglione et al., 2011)

Estudos prévios indicam que o maior crescimento das plantas expostas às NPs de TiO<sub>2</sub> estaria associado ao estímulo do metabolismo do nitrogênio e da fotossíntese (Yang et al., 2006; Mingyu et al., 2007). De fato, plantas de espinafre cultivadas sob condições de deficiência de nitrogênio mantiveram suas folhas mais velhas verdes quando o meio foi suplementado com NPs de TiO<sub>2</sub>, enquanto plantas controles cultivadas na ausência das NPs apresentaram clorose característica da deficiência de nitrogênio (Yang et al., 2006). Também foi mostrado que NPs de TiO<sub>2</sub> melhoram a absorção e a conversão da energia luminosa em plantas de espinafre, além de promover as reações de assimilação do carbono (Gao et al., 2006). Além disso, os NMs de um modo geral podem adsorver nutrientes em sua superfície, servindo como um estoque para as plantas (Navarro et al., 2008). Também, os efeitos positivos dos NMs podem estar relacionados à ativação de genes responsáveis por aquaporinas, que garantem um crescimento regulado da planta e do ciclo celular (Khodakovskaya et al., 2012).

Como organismos sésseis, as plantas são suscetíveis a diversos estresses abióticos como seca, salinidade, inundação, temperaturas, radiação, etc (Khan et al., 2016). Tais estresses abióticos podem induzir a formação de EROs em cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos, estabelecendo uma condição de estresse oxidativo (Foyer e Noctor, 2000). As EROs acumuladas, principalmente o ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) e o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), podem danificar lipídios de membrana, proteínas e ácidos nucleicos

(Foyer e Noctor, 2000), além de serem capazes de afetar o crescimento das plantas (Begun et al., 2012). Como mecanismo compensatório, as plantas possuem um sistema enzimático antioxidante, como as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase (POD), que combatem constantemente as EROs. A SOD é capaz de eliminar  $O_2^{\cdot-}$ , em uma reação que produz  $H_2O_2$ , que soma a produção de  $H_2O_2$  pela célula. Este, por sua vez, é o substrato para enzimas como CAT e POD, que por possuírem o mesmo substrato, são enzimas que competem entre si. De modo geral, a atividade aumentada das enzimas SOD, CAT e POD está comumente associada a elevados níveis de EROs nas células, constituindo uma resposta de defesa das plantas contra o estresse oxidativo (Rico et al., 2015). Se a magnitude do estresse sobrepujar a capacidade da planta de combater as EROs, eventualmente ocorre a morte da planta (Zhang et al., 2008).

Nossos dados revelaram que as NPs de  $TiO_2$  elevaram a formação de EROs nas raízes de plantas de soja, particularmente de  $O_2^{\cdot-}$  (**Fig. 6A**). Além disso, há evidências de que este incremento na produção de EROs pode ter levado a uma condição de estresse oxidativo nas plantas com consequente redução do crescimento das raízes (ao menos nas menores concentrações de NPs de  $TiO_2$  utilizadas, como sugerido pelo aumento nos teores de MDA). Neste contexto, destaca-se o abrupto incremento da atividade da SOD com concentrações de NPs superiores a 500 mg/L, que pode ser considerado como uma resposta da planta para suplantar os elevados níveis de  $O_2^{\cdot-}$ . A produção exacerbada de  $O_2^{\cdot-}$  por plantas expostas às NP de  $TiO_2$  pode estar diretamente relacionada com alterações nas reações de transporte de elétrons da fotossíntese, consequência das propriedades termal e fotocatalítica deste material (Rezaei et al., 2015; Rico et al., 2015). Neste contexto, destaca-se o estímulo da reação de Hill e da atividade de cloroplastos pelo aumento da absorção de luz pela clorofila *a*, transferência de elétrons e taxa de evolução do oxigênio (Zuverza-Mena et al., 2017).

Corroborando nossos dados, está o achado que NPs de  $TiO_2$  induziram o acúmulo de  $O_2^{\cdot-}$  em *Lemna minor* (Song et al., 2012). Os mesmos autores também observaram um aumento da atividade da SOD nas menores concentrações usadas da NP, com uma redução significativa em doses mais altas. Esse comportamento foi relacionado com a perda da capacidade enzimática em combater seu substrato (Song et al., 2012). No presente estudo, uma possível perda na capacidade de combater as EROs pode estar

relacionada com a redução do teor de proteínas totais (**Fig. 4**) e, portanto, com a disponibilidade de enzimas do sistema antioxidante.

Neste trabalho, também não foram observadas alterações significativas nas atividades da CAT e POD de raízes após a exposição das plantas de soja às NPs de TiO<sub>2</sub> (**Figs. 5B, C**). Ambas as enzimas possuem como substrato o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que foi drasticamente reduzido nas plantas tratadas com as NPs (aproximadamente 42% menor no tratamento com 500 mg/L) (**Fig. 6B**). Em termos gerais, a atividade das enzimas antioxidantes geralmente aumenta quando a planta se encontra em uma situação de baixo estresse, e diminui quando a situação de estresse é elevada (Song et al., 2012).

Os malondialdeídos (MDA) são produtos da decomposição de lipídios poli-insaturados da membrana, e servem como indicadores de peroxidação lipídica causada pelo acúmulo de EROs (Song et al., 2012). Dessa forma, o aumento significativo de MDA (**Fig. 7**) observado em plantas de soja expostas às NPs de TiO<sub>2</sub> reforça a presença de estresse oxidativo nestas plantas. Além disso, as EROs também podem causar a degradação de proteínas (Song et al., 2012), o que auxilia a explicar a acentuada redução do teor de proteínas totais de raízes verificada após o tratamento das plantas com as NPs de TiO<sub>2</sub> (**Fig. 4**).

## **Conclusões**

Em resumo, nossos dados sugerem que as NPs de TiO<sub>2</sub> podem ter sido captadas pelas raízes das plantas de soja, como evidenciado pelo seu reduzido tamanho (MET) e pela presença do elemento titânio nos tecidos radiculares (EDS). Foi também evidente a indução de um estresse oxidativo, corroborado pelo incremento expressivo dos teores de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> e de malondialdeído nas raízes, este último responsável por danos celulares e pela oxidação/degradação de proteínas. Por sua vez, o aumento da atividade da SOD destaca-se como uma resposta da planta na tentativa de combater o estresse oxidativo gerado pela produção exacerbada de seu substrato, o O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Em conjunto, o estresse oxidativo não sobrepujado pelo sistema antioxidante pode ter conduzido às alterações morfológicas de raízes e a redução do crescimento.

## **Contribuição dos autores**

Gabriele Sauthier Romano de Melo executou os experimentos e escreveu o manuscrito. Rita de Cássia Siqueira-Soares auxiliou na execução dos experimentos. Osvaldo Ferrarese-Filho revisou o manuscrito. Rogério Marchiosi idealizou os experimentos e corrigiu o manuscrito.

### **Agradecimentos**

Ao CNPq pela bolsa de estudos concedida. Ao professor Rogério Marchiosi por idealizar os experimentos. A Rita de Cássia Siqueira-Soares pelo auxílio nos experimentos e ao professor Osvaldo Ferrarese-Filho pela revisão do manuscrito.

### **Conflito de interesses**

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

### **REFERÊNCIAS**

- Arora A, Sairam RK, Srivastana GC. Oxidative stress and antioxidant system in plants. *Curr Sci.* 2002;82:1227-1238.
- Arruda SCC, Silva ALD, Galazzi RM, Azevedo RA, Arruda MAS. Nanoparticles applied to plant science: A review. *Talanta.* 2015:693-705
- Asada K, Takahashi M. Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. *Topics in photosynthesis.* 1987;9:227-287.
- Azevedo RA, Alas RM, Smith RJ, Lea PJ. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. *Physiol Plant.* 1998;104:280-292.
- Ball P. Natural strategies for the molecular engineer. *Nanotechnol.* 2002;13: 15–28.
- Baziramakenga R, Leroux GD, Simard RR. Effects of benzoic and cinnamic acids on membrane permeability of soybean roots. *J Chem Ecol* 1995;21:1271-1285.
- Begun P, Fugetsu B. Phytotoxicity of multi-walled carbon nanotubes on red spinach (*Amaranthus tricolor* L) and the role of ascorbic acid as an antioxidant. *J Hazard Mater* 2012;243:212–222.
- Bradford MM. A Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-254.

Burklew CE, Ashlock J, Winfrey WB, Zhang B. Effects of Aluminum Oxide Nanoparticles on the Growth, Development, and microRNA Expression of Tobacco (*Nicotiana tabacum*). 2012;7.

Cabiscol E, Tamarij J, Ros J. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Int Microbiol.* 2000;3:3-8.

Castiglione MR, Giorgetti L, Geri C, Cremonini R. The effects of nano-TiO<sub>2</sub> on seed germination, development and mitosis of root tip cells of *Vicia narbonensis* L. and *Zea mays* L. *J Nanopart Res.* 2011;13:2443-2449.

Cientifica. The Nanotechnology Opportunity Report. Executive Summary. 3rd ed. London: Cientifica Ltd, 2008.

Cox A, Venkatachalam P, Sahi S, Sharma N. Silver and titanium dioxide nanoparticle toxicity in plants: A review of current research. *Plant Physiol Biochem.* 2016; doi: 10.1016/j.plaphy.2016.05.022.

DeRosa MC, Monreal C, Schnitzer M, Walsh R, Sultan Y. Nanotechnology in fertilizers. *Nat Nanotech.* 2010;5:91–94.

Devi SR, Prasad MNV. Ferulic acid mediates changes in oxidative enzymes of maize seedlings: Implications in growth. *Biol. Plant.* 1996;38:387-395.

Dietz KJ, Herth S. Plant nanotoxicology. *Trends Plant Sci.* 2011;16:582–589.

dos Santos WD, Ferrarese ML, Nakamura CV, Mourao KS, Mangolin CA, Ferrarese-Filho O. Soybean (*Glycine max*) root lignification induced by ferulic acid. The possible mode of action. *J Chem Ecol.* 2008;34:1230-1241.

Du W, Sun Y, Ji R, Zhu J, Wu J, Guo H. TiO<sub>2</sub> and ZnO nanoparticles negatively affect wheat growth and soil enzyme activities in agricultural soil. 2011. doi: 10.1039/c0em00611d

Ferreira AG, Borghetti F. Germinação: do básico ao aplicado. *Artmed*; 2004.

Foyer CH, Noctor G. Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signaling. *New Phytol.* 2000;14:359–388.

Frazier TP, Burklew CE, Zhang B. Titanium dioxide nanoparticles affect the growth and microRNA expression of tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Funct Integr Genomics.* 2014;14:75-83.

Galembeck F, Rippel MM. *Parcerias Estratégicas*, 2004; 18:43.

Gao F, Hong F, Liu C, Zheng L, Su M, Wu X, Yang F, Wu C, Yang P. Mechanism of Nano-anatase TiO<sub>2</sub> on Promoting Photosynthetic Carbon Reaction of Spinach. *Biol Trace Elem Res.* 2006;111:239.

- Ghosh M, Bandyopadhyay M, Mukherjee A. Genotoxicity of titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticles at two trophic levels Plant and human lymphocytes. 2010; doi: 10.1016/j.chemosphere.2010.09.022.
- Giannopolitis CN, Ries SK. Superoxide dismutases occurrence in higher plants. *Plant Physiol.* 1977;59:309-314.
- Grande F, Tucci P. Titanium Dioxide Nanoparticles: a Risk for Human Health?. *Mini-Rev. Med. Chem.* 2016;16:762-769.
- Gubbins EJ, Batty LC, Lead JR. Phytotoxicity of silver nanoparticles to *Lemna minor*. *L. Environ. Poll.* 2011;59:1551–1559.
- Haghighi M.; Pessarakli M. Influence of silicon and nano-silicon on salinity tolerance of cherry tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.) at early growth stage. *Sci Hortic.* 2013;161:111-117.
- Hatami M, Kariman K, Ghorbanpour M. Engineered nanomaterial-mediated changes in the metabolism of terrestrial plants. *Sci Total Environ.* 2016:275-291.
- Heinen RB, YE Q, Chaumont, F. Role of aquaporins in leaf physiology. *J Exp Bot.* 2009;11:2971-2985.
- Hodges DM, Delong JM, Forney CF, Prange RK. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta.* 1999;207: 604-611.
- International Agency for Research on Cancer, 2010. Carbon Black, Titanium Dioxide, and Talc. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to humans. 2010. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol93/mono93.pdf>. Accessed 24 Jan 2018.
- Kashyap PL, Xiang X, Heiden P. Chitosan nanoparticle based delivery systems for sustainable agriculture. *Int J Biol Macromol.* 2015;77:36-51.
- Khan MN, Mobin M, Abbas ZK, AlMutairi KA, Siddiqui ZH. Role of nanomaterials in plants under challenging environments. 2016; doi: 10.1016/j.plaphy.2016.05.038
- Khodakovskaya MV, de Silva K, Biris AS, Dervishi E, Villagarcia H. Carbon nanotubes induce growth enhancement of tobacco cells. *ACS Nano.* 2012;6: 2128–2135.
- Kurepa J, Paunesku T, Vogt S, Arora H, Rabatic BM, Lu J, Wanzer MB, Woloschak GE, Smalle JA. Uptake and distribution of ultrasmall anatase TiO<sub>2</sub> alizarin red S nanoconjugates in *Arabidopsis thaliana*. *Nano Letters.* 2010;10:2296-2302.
- Laware SL, Raskar S. Effect of titanium dioxide nanoparticles on hydrolytic and antioxidant enzymes during seed germination in onion. *Int J Curr Microbiol App Sci.* 2014;3:749–760.
- Lee CW, Mahendra S, Zodrow K, Li D, Tsai YC, Braam J, Alvarez PJ. Developmental phytotoxicity of metal oxide nanoparticles to *Arabidopsis thaliana*. *Environ Toxicol Chem.* 2010;29:669-675.

- Ma X, Geiser-Lee J, Deng Y, Kolmakov A. Interactions between engineered nanoparticles (ENPs) and plants: Phytotoxicity, uptake and accumulation *Sci. Total Environ.* 2010. doi:10.1016/j.scitotenv.2010.03.031
- Martínez-Fernández D, Barroso D, Komárek M. Root water transport of *Helianthus annuus* L. under iron oxide nanoparticle exposure. *Environ. Sci. Pollut.* 2016;23:1732–1741.
- Mingyu S, Fashui H, Chao L, Xiao W, Xiaoqing L, Liang C, Fengqing G, Fan Y, Zhongrui, L. Effects of nano-anatase TiO<sub>2</sub> on absorption, distribution of light, and photoreduction activities of chloroplast membrane of spinach. *Biol Trace Elem Res* 2007;118:120–130.
- Miralles P, Church TL, Harris AT. Toxicity, uptake, and translocation of engineered nanomaterials in vascular plants. *Environ. Sci. Technol.* 2012;46:9224–9239.
- Mustafa G, Sakata K, Hossain Z, Komatsu S. Proteomic analysis of flooded soybean root exposed to aluminum oxide nanoparticles. *J Proteomics.* 2015;128:280-297.
- Navarro E, Baun A, Behra R, Hartmann NB, Filser J, Miao A, Quigg A, Santschi PH, Sigg L. Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. *Ecotoxicology.* 2008;17:372-386.
- Neves K. Nanotecnologia em cosméticos. *Cosmetics & Toiletries.* 2008;20:22.
- Nowack B, Bucheli T. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environ. Pollut.* 2007;150:5–22
- Rangel R. O mundo maravilhoso (e promissor) das partículas anãs. *Revista Inovação em Pauta.* 2008;4.
- Resende ECO. Enzimas antioxidantes em frutos com diferentes padrões de amadurecimento. Dissertação de mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical (Tecnologia da Produção Agrícola). Instituto Agrônômico, 2010
- Rezaei F, Moaveni P, Highway F. Effect of Different Concentrations and Time of Nano TiO<sub>2</sub> Spraying on Quantitative and Qualitative yield of Soybean (*Glycine max* L.) at Shahr-e-Qods, Iran. *Biological Forum.* 2015;7:957-964.
- Rico C, Hong J, Morales MI, Zhao L, Barrios AC, Zhang JY, Peranta-Videa JR, Gardea-Torresdey JL. Effect of cerium oxide nanoparticles on rice: a study involving the antioxidant defense system and in vivo fluorescence imaging. *Environ Sci Technol.* 2013;47:5635-5642.
- Rico CM, Peralda-Videa JR, Gardea-Torresdey JL. Chemistry, Biochemistry of nanoparticles, and their role in antioxidant defense system in plants. *Nanotech and Plant Sci.* 2015:1-17.
- Rondeau-Mouro C, Defer D, Leboeuf E, Lahaye M. *Int J Biol Macromol* 2008;42:83–92.

Scandalios JG. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res.* 2005;38:995-1014.

Servin AD, Morales MI, Castillo-Michel H, Hernandez-Viezcas JA, Munoz B, Zhao L, Nunez JE, Peralta-Videa JR, Gardea-Torresdey JL. Synchrotron verification of TiO<sub>2</sub> accumulation in Cucumber fruit: a possible pathway of TiO<sub>2</sub> nanoparticle transfer from soil into the food chain. *Environ. Sci. Technol.* 2013. doi: 10.1021/es403368j.

Shaffer, C. Nanomedicine transforms drug delivery. *Drug Discovery Today.* 2005; 1581-1582.

Song G, Gao Y, Wu H, Hou W, Zhang C, Ma H. Physiological effect of anatase TiO<sub>2</sub> nanoparticles on *Lemna minor*. *Environ Toxicol Chem.* 2012;31:2147.

Song U, Jun H, Waldman B, Roh J, Kim Y, Yi J, Lee EJ. Functional analyses of nanoparticle toxicity: a comparative study of the effects of TiO<sub>2</sub> and Ag on tomatoes (*Lycopersicon esculentum*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2013. doi: 10.1016/j.ecoenv.2013.03.033.

Suman PR, Jain VK, Varma A. Role of nanomaterials in symbiotic fungus growth enhancement. *Current Science.* 2010;99:1189-1191.

Thomas V, Dean DR, Vohra YK. Nanostructured biomaterials for regenerative medicine. *Current Nanoscience.* 2006; 155-177.

Thwala M, Musee N, Sikhwivhilu L, wepener V. The oxidative toxicity of Ag and ZnO nanoparticles towards the aquatic plant *Spirodela punctata* and the role of testing media parameters. *Environ. Sci. Proc. Impacts.* 2013. doi:10.1039/c3em00235g.

Toma HE. *O mundo nanométrico: a dimensão do novo século.* 2nd ed. São Paulo: Oficina de Textos, 2004.

Toma HE. Interfaces e organização da pesquisa no Brasil: da Química à Nanotecnologia. *Química Nova.* 2005;28:48-51.

Tománková K, Luhová, L, Petrvalsky M, Pec P, Lebeda A. Biochemical aspects of reactive oxygen species formation in the interaction between *Lycopersicon* spp. and *Oidium neolycopersici*. *Physiol Mol Plant Pathol.* 2006;68:22-32.

Trujillo-Reyes J, Majumdar S, Botez CE, Peralta-Videa JR, Gardea-Torresdey JL. Exposure studies of core-shell Fe/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> and Cu/CuO NPs to lettuce (*Lactuca sativa*) plants: Are they a potential physiological and nutritional hazard?. *J Hazard Mater.* 2014; doi: 10.1016/j.jhazmat.2013.11.067

Tyerman SD, Bohnert HJ, Maurel C, Steudle E, Smith JAC. Plant aquaporins: their molecular biology, biophysics and significance for plant water relations. *J Exp Bot.* 1999;50:1055-1071.

U.S. Geological Survey. Mineral commodity Summaries 2015. U.S. Government Printing Office. 2015. doi: 10.3133/70140094

- Uskokovic V. Nanotechnologies: What we do not know. *Technol Soc.* 2007;43-61.
- Wang X, Yang X, Chen S, Li Q, Wang W, Hou C, Gao X, Wang L, Wang S. Zinc oxide nanoparticles affect biomass accumulation and photosynthesis in *Arabidopsis*. *Front Plant Sci.* 2016. doi: 10.3389/fpls.2015.01243
- Wang Z, Xie X, Zhao J, Liu X, Feng W, White JC, Xing B. Xylem-and phloem based transport of CuO nanoparticles in maize (*Zea mays* L.). *Environ. Sci. Technol.* 2012. doi:10.1021/es204212z
- Wei H, Wang E. Nanomaterials with enzyme-like characteristics (nanozymes): next-generation artificial enzymes. *Chem Soc Rev.* 2013;42:6060-6093.
- Wu YX, von Tiedemann A. Impact of fungicides on active oxygen species and antioxidant enzymes in spring barley (*Hordeum vulgare* L.) exposed to ozone. *Environ. Pollut.* 2002;116:37-47.
- Yang F, Hong F, You W, Liu C, Gao F, Wu C, Yang P. Influences of nano-anatase TiO<sub>2</sub> on the nitrogen metabolism of growing spinach. *Biol Trace Elem Res* 2006;110:179–90.
- Zhang Y, Tang HR, Luo Y. Variation in antioxidant enzyme activities of two strawberry cultivars with short-term low temperature stress. *World J Agri Sci* 2008;4:458–462.
- Zheng L, Hong F, Lu S, Liu C. Effect of nano-TiO<sub>2</sub> on strength of naturally aged seeds and growth of spinach. *Biol Trace Elem Res* . 2005;105:83-91.
- Zheng L, Hong F, Lu S, Liu C. Effect of nano-TiO<sub>2</sub> on strength of naturally aged seeds and growth of spinach. *Biol. Trace Elem. Res.* 2005;105:83–91.
- Zuverza-Mena N, Martínez-Fernández D, Du W, Hernandez-Viezcás JA, Bonilla-Bird N, López-Moreno ML. Exposure of engineered nanomaterials to plants: insights into the physiological and biochemical responses-a review. *Plant Physiol. Biochem.* 2017;110:236–264.

## LEGENDAS DAS FIGURAS

**Fig. 1.** Microscopia eletrônica de transmissão de NPs de dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>). As NPs foram visualizadas com aumentos de 50 (A), 100 (B), 200 (C) e 300 (D) mil vezes.

**Fig. 2.** Efeitos de NPs de dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>) sobre o crescimento de plantas de soja. Comprimentos (A), biomassas frescas (B) e biomassas secas (C) de raízes e caules de plantas de soja após exposição por 16 dias às NPs de TiO<sub>2</sub> nas concentrações de 250, 500, 1000 ou 2500 mg/L. Médias (n=4–7 ± EPM) assinaladas com asterisco (\*) diferem significativamente do controle de acordo com o teste de Dunnet ( $p \leq 0,05$ ).

**Fig. 3.** Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de raízes de plantas de soja expostas por 16 dias às NPs de TiO<sub>2</sub> na concentração de 2500 mg/L. Ápice radicular de plantas de soja controle (A, B) ou expostas por 16 dias às NPs de TiO<sub>2</sub> na concentração de 2500 mg/L (C, D). Zona pilífera de plantas controle (E) ou expostas por 16 dias às NPs de TiO<sub>2</sub> na concentração de 2500 mg/L (F). Espectroscopia por dispersão de raios X em energia (EDS) do ápice radicular de plantas controle (G) ou expostas por 16 dias às NPs de TiO<sub>2</sub> na concentração de 2500 mg/L (H).

**Fig. 4.** Efeitos de NPs de dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>) sobre o teor de proteínas totais de raízes de plantas de soja expostas por 16 dias às NPs de TiO<sub>2</sub> nas concentrações de 250, 500, 1000 e 2500 mg/L. Médias (n=4–7 ± EPM) assinaladas com asterisco (\*) diferem significativamente do controle de acordo com o teste de Dunnet ( $p \leq 0,05$ ).

**Fig. 5.** Efeitos de NPs de dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>) sobre a atividade da SOD (A), CAT (B) e POD (C) de raízes de plantas de soja expostas por 16 dias às NPs de TiO<sub>2</sub> nas concentrações de 250, 500, 1000 e 2500 mg/L. Médias (n=4–7 ± EPM) assinaladas com asterisco (\*) diferem significativamente do controle de acordo com o teste de Dunnet ( $p \leq 0,05$ ).

**Fig. 6.** Efeitos de NPs de dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>) sobre os teores do ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) (A) e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (B) de raízes de plantas de soja expostas por 16 dias às NPs de TiO<sub>2</sub> nas concentrações de 250, 500, 1000 e 2500 mg/L. Médias (n=4–

7 ± EPM) assinaladas com asterisco (\*) diferem significativamente do controle de acordo com o teste de Dunnet ( $p \leq 0,05$ ).

**Fig. 7.** Efeitos de NPs de dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>) sobre o teor de malondialdeídos (MDA) de raízes de plantas de soja expostas por 16 dias às NPs de TiO<sub>2</sub> nas concentrações de 250, 500, 1000 e 2500 mg/L. Médias (n=4-7 ± EPM) assinaladas com asterisco (\*) diferem significativamente do controle de acordo com o teste de Dunnet ( $p \leq 0,05$ ).

# FIGURAS

Figura 1

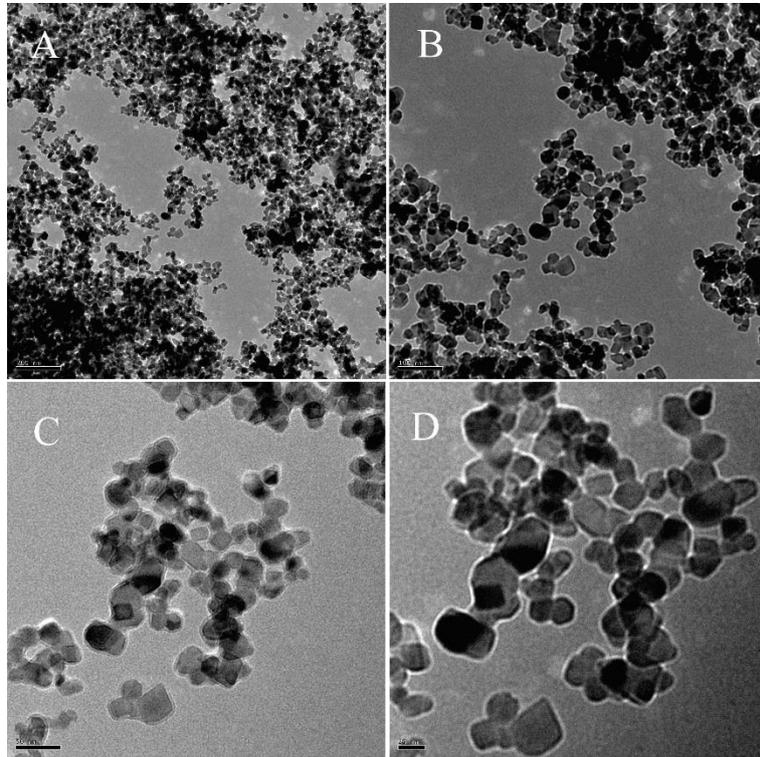
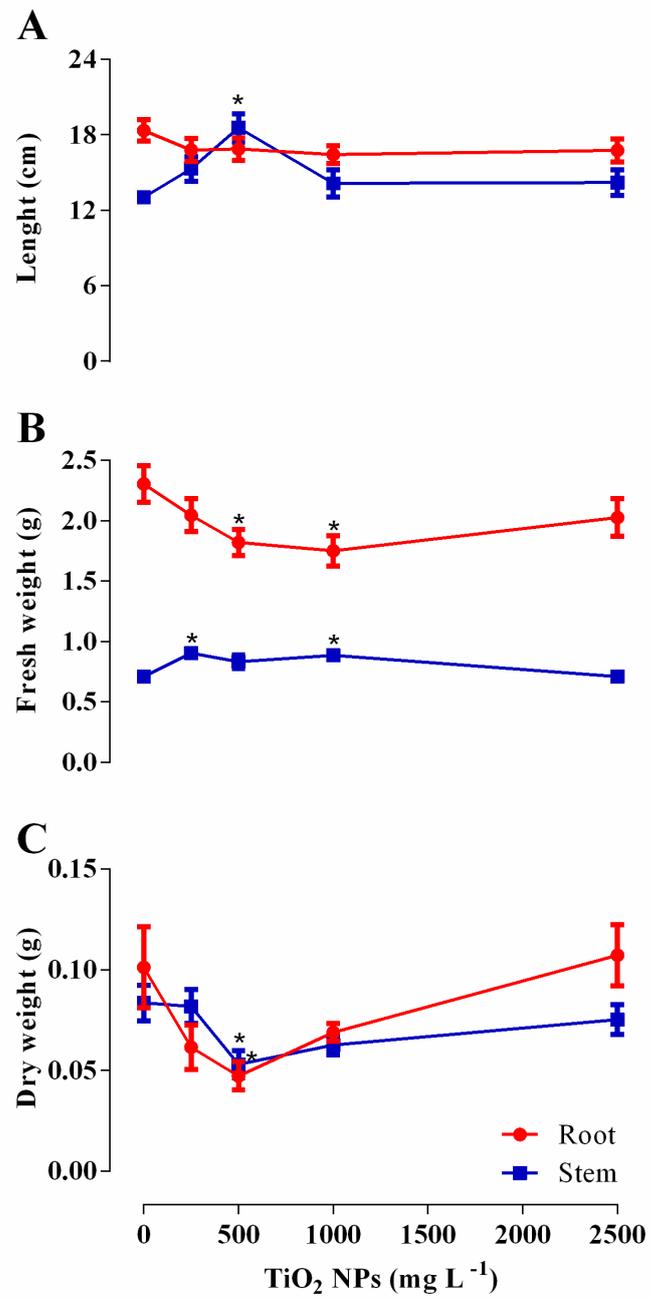
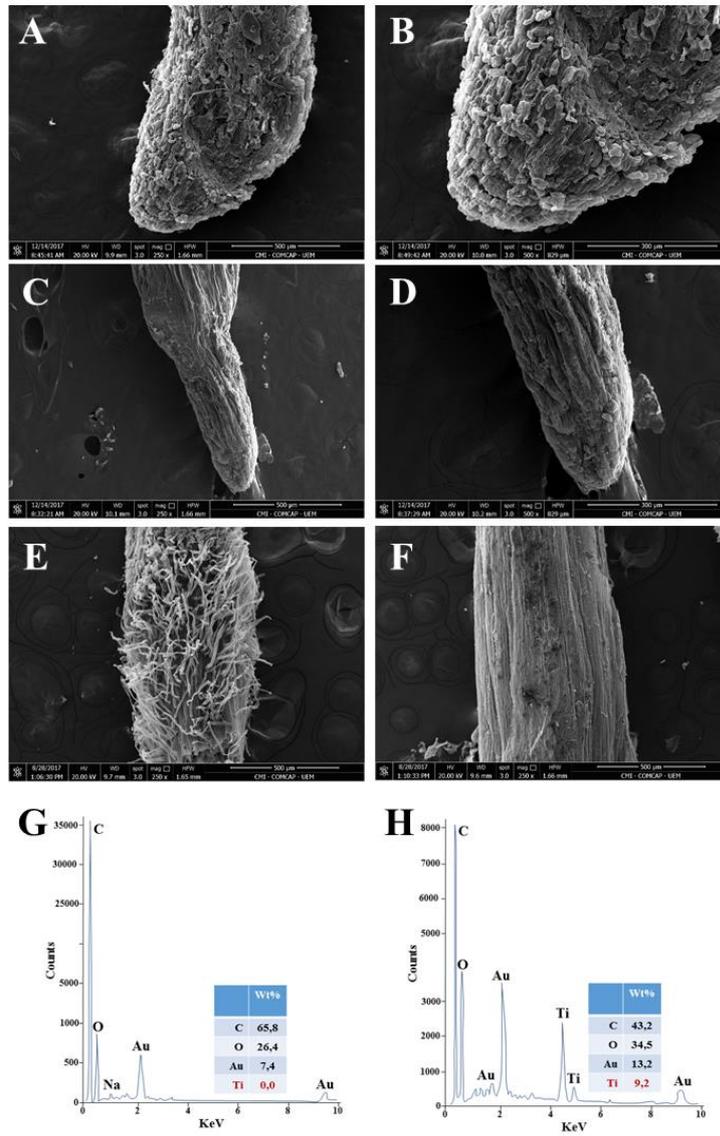


Figura 2



**Figura 3**



**Figura 4**

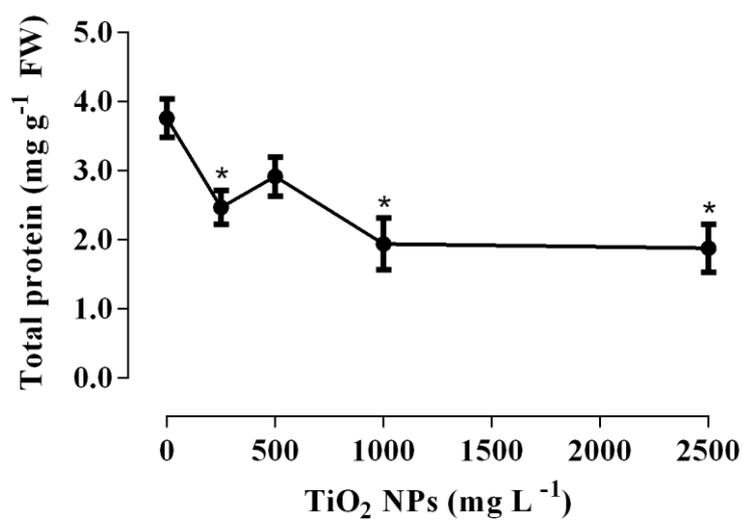
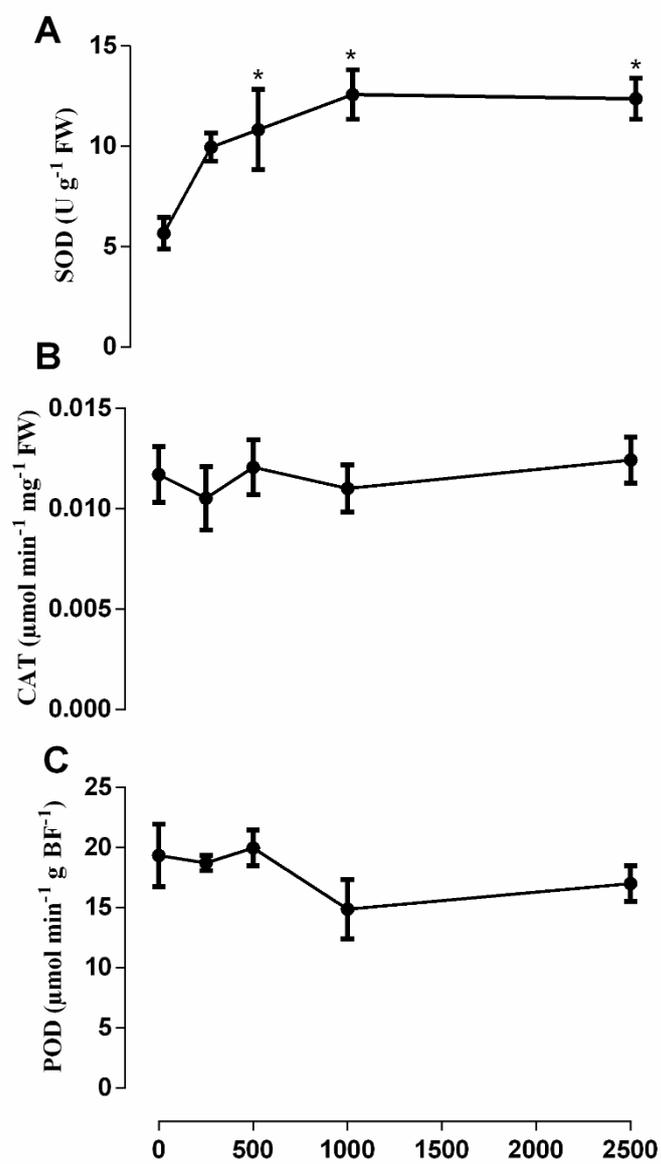
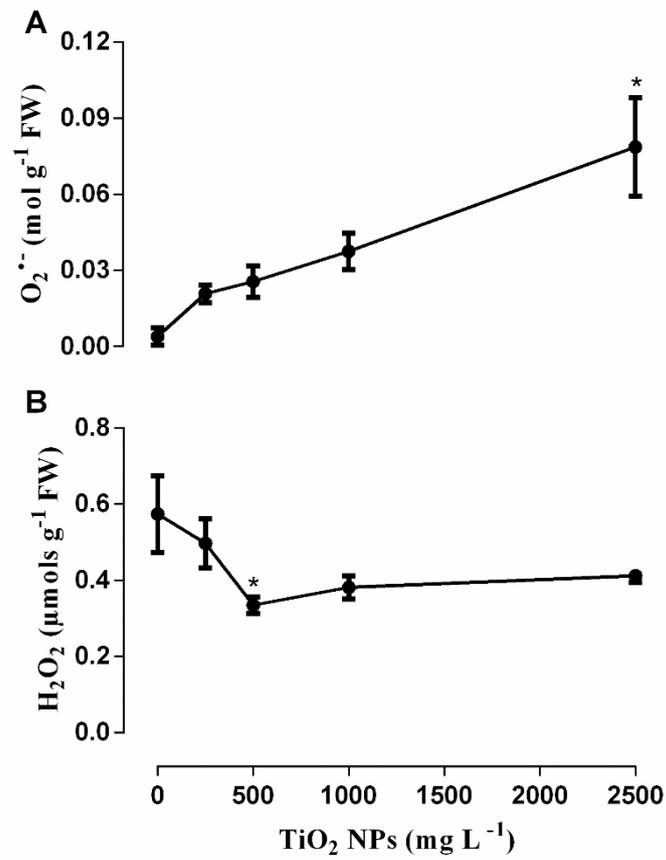


Figura 5



**Figura 6**



**Figura 7**

