



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**RODRIGO MORETTO GALAZZI**

**EMPREGO DE ESTRATÉGIAS ÔMICAS NA AVALIAÇÃO DE PLANTAS DE  
SOJA TRANSGÊNICA E NÃO-TRANSGÊNICA APÓS CULTIVO COM  
NANOPARTÍCULAS DE PRATA**

**CAMPINAS  
2017**

**RODRIGO MORETTO GALAZZI**

**EMPREGO DE ESTRATÉGIAS ÔMICAS NA AVALIAÇÃO DE PLANTAS DE  
SOJA TRANSGÊNICA E NÃO-TRANSGÊNICA APÓS CULTIVO COM  
NANOPARTÍCULAS DE PRATA**

**Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de  
Química da Universidade Estadual de Campinas  
como parte dos requisitos exigidos para a obtenção  
do título de Doutor em Ciências**

**Orientador: Prof. Dr. Marco Aurelio Zezzi Arruda**

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA  
PELO ALUNO RODRIGO MORETTO GALAZZI E ORIENTADA PELO PROF. DR.  
MARCO AURELIO ZEZZI ARRUDA**

**CAMPINAS  
2017**

**Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s):** FAPESP, 2013/15646-3; FAPESP, 2016/18373-6

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca do Instituto de Química  
Camila Barleta Fullin - CRB 8462

G131e Galazzi, Rodrigo Moretto, 1988-  
Emprego de estratégias ômicas na avaliação de plantas de soja transgênica e não-transgênica após cultivo com nanopartículas de prata / Rodrigo Moretto Galazzi. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Marco Aurelio Zezzi Arruda.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Soja. 2. Nanopartículas de prata. 3. Ômicas. 4. Espectrometria de massas. I. Arruda, Marco Aurelio Zezzi, 1965-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

#### Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Omic strategies in the evaluation of transgenic and non-transgenic soybean plants after cultivation with silver nanoparticles

**Palavras-chave em inglês:**

Soybean

Silver nanoparticles

Omics

Mass spectrometry

**Área de concentração:** Química Analítica

**Titulação:** Doutor em Ciências

**Banca examinadora:**

Marco Aurelio Zezzi Arruda [Orientador]

Ana Valéria Colnaghi Simionato Cantú

Carlos Henrique Inacio Ramos

Marcia Andréia Mesquita Silva da Veiga

Fernando Barbosa Júnior

**Data de defesa:** 19-09-2017

**Programa de Pós-Graduação:** Química

## **BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Marco Aurelio Zezzi Arruda (Orientador)

Profa. Dra. Marcia Andréia Mesquita Silva da Veiga (FFCLRP-USP)

Prof. Dr. Fernando Barbosa Júnior (FCFRP-USP)

Profa. Dra. Ana Valéria Colnaghi Simionato Cantú (IQ-UNICAMP)

Prof. Dr. Carlos Henrique Inacio Ramos (IQ-UNICAMP)

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do(a) aluno(a).

Este exemplar corresponde à redação final da Tese de Doutorado defendida pelo(a) aluno(a) **RODRIGO MORETTO GALAZZI**, aprovada pela Comissão Julgadora em 19 de setembro de 2017.

*“O Senhor é o meu pastor e nada me faltará... ainda que eu ande pelo vale da sombra da morte, não temerei mal algum, porque Tu estás comigo.”*

*Salmos 23*

*“Quanto maior a dificuldade, tanto maior o mérito em superá-la.”*

*Henry Ward Beecher*

*“Tudo o que sua mão encontrar para fazer, faça-o com todo o seu coração.”*

*Jesus Cristo*

*Dedico essa Tese aos meus pais,  
Umberto e Rosângela, por nunca  
medirem esforços para garantir a  
minha formação e por sempre  
incentivarem as minhas escolhas.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus por me dar força e perseverança para concluir essa etapa, assim como me direcionar para os melhores caminhos.

Agradeço aos meus pais pelo amor e ajuda irrestritos em todas as situações da minha vida. Ao meu irmão, Lucas, pela grande amizade e bons momentos vividos, desde a nossa infância. Obrigado pelo companheirismo e ajuda sempre! Vocês e meu irmão são tudo pra mim!

A todos os meus familiares, avós, tios, primos, seja do ES ou do RJ, pela torcida e pelos momentos de alegria e tranquilidade quando na presença de vocês.

Aos amigos de sempre, Guilherme e Dudu Lovatti (e família), Felipe Força, Kamila e Luana Seidel, Luiza Daher, Juliana e Daniel, e todos os amigos do CSJ, Natália Foreque, Aldano Lemos, Araceli e Joselito Nardy, Daniel e Lorenza (e família), Marina Pandolfi, Hélio e Lumena, Sabrina, Éder Lana, Sarah e demais amigos do Ifes. Agradeço pela amizade e torcida, assim como pelos bons momentos de conversa e descontração. Vocês são fundamentais e essenciais em minha vida.

Aos companheiros e amigos do grupo GEPAM, Alessandra Sussulini, Alessandra Vieira, Aline Martins, Alisson, Profa. Anne, Alejandro, Bruna Kauelly, Bruna Maciel, Cícero e família, Daiane, Elidiane, Eraldo, Fabi, Gustavo, Heloisa, Herbert e família, Humberto, Ivanilce, Isabela, Jemmyson, Katherine, Larissa Richter, Lidiane e Marcelo, Luana, Otávio, Silvana e família. Agradeço pela boa convivência e pelo imenso aprendizado que adquiri com cada um de vocês! Obrigado pela amizade!

Ao Prof. Marco Aurélio Zezzi Arruda, coordenador do GEPAM, por abrir as portas do laboratório para mim desde o Mestrado, pela orientação e auxílio irrestrito na resolução de diversas questões referentes ao meu Doutorado. Muito obrigado pela oportunidade!

Agradeço ao Laboratoire de Chimie Analytique Bio-Inorganique et Environnement (IPREM), na pessoa da Profa. Joanna Szpunar pela oportunidade de desenvolver parte dessa Tese.

Aos amigos de Pau, França, Javier, Nagore e Marx, Emma e Jonathan, Justyna, Kasia Kinska, Iza, Tiago, Andy, Luca, Daiann, Javi Toledo, Oriol, Paulina e Piotr. Guys, thanks for everything. It was really nice to meet you all and share that time together. You all were like a family for me!

Aos amigos do Instituto de Química, Bruno Quirino, Carlos Diego, João Scaramal, Luiz Carlos Dias, Marcelo P2, Nicolas, Rafael Lisandro, Régis, Thiago Neves pela amizade e momentos de descontração.

À toda família UNIMAR F.C. pelas agradáveis tardes de sábado, principalmente, as resenhas após os jogos.

Aos amigos e companheiros da Academia Linha de Frente, em especial aos Professores Otávio Carneiro e Rodrigo Penteado, pelos ensinamentos e aos amigos Daiane, Leandro Pagotto, Thais Lino, Leozinho, Paola Tame, Fernanda Vasconcelos, Thais Valfré, Dony, Aline Czaikoski, Fernanda Lang, Katia e Felipe, pelos treinos de Muay Thai e momentos de descontração nos treinos e no bar.

Agradeço ao IQ-Unicamp pela excelente infraestrutura oferecida, assim como aos professores pelos conhecimentos transmitidos. Agradeço também pelos funcionários da CPG, em especial a Bel, pelo auxílio em várias questões.

Gostaria de agradecer à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de doutorado regular (processo 2013/15646-3) e BEPE (processo 2016/18373-6), assim como pelo apoio financeiro.

A todos que rezaram, mandaram energia positiva e sempre torceram por mim, essa vitória também é de vocês!

Muito obrigado.

## RESUMO

Inicialmente, foi realizado um estudo acerca da caracterização e quantificação das nanopartículas de prata (AgNP), para avaliar a concentração de prata (Ag) tanto nas AgNP após a síntese (AgNP-total), quanto nas suas frações. Observou-se que ca. 50% da Ag está na forma de nanopartículas (NPs) na solução AgNP-total, enquanto os outros 50% da Ag está na forma iônica. Dessa forma, se a solução obtida após a síntese for diretamente empregada em um estudo, os efeitos observados serão sinérgicos, devido à presença de ambas as formas de Ag. Por isso, assim como nessa Tese, sugere-se que somente seja utilizada a fração que contém as NPs. Em seguida, procedeu-se com um cultivo-teste a uma concentração final de 250 mg kg<sup>-1</sup> de Ag no substrato. Nestas condições, ambas as plantas não-transgênicas (NT) e transgênicas (T) não sobreviveram ao cultivo com o nitrato de Ag (AgNO<sub>3</sub>). Por isso, todos os demais cultivos foram realizados com uma concentração final de 50 mg kg<sup>-1</sup> de Ag no substrato.

Então, um estudo proteômico por 2-D DIGE foi realizado e diversos *spots* diferenciais, foram encontrados entre as plantas de soja NT e T dos grupos controle e as plantas cultivadas com as AgNP e AgNO<sub>3</sub>. As plantas T aparentaram ser menos afetadas pelos tratamentos, uma vez que um menor número de *spots* diferenciais foi observado nas folhas dessa variedade. Algumas espécies relacionadas a importantes processos biológicos, dentre elas a RuBisCO, ATP sintase, superóxido dismutase (SOD), entre outras, foram identificadas nos *spots* diferenciais, por espectrometria de massas. Tais resultados, sugerem que os cultivos com AgNO<sub>3</sub> e AgNP, possivelmente, resultaram em uma condição de estresse para as plantas de soja. Adicionalmente, alterações significativas ( $p < 0,05$ ) na atividade das enzimas catalase (CAT) e SOD, bem como no conteúdo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e malondialdeído (MDA) foram observados, confirmando que as plantas de soja NT e T cultivadas com as AgNP e AgNO<sub>3</sub> estão sob condição de estresse.

Considerando o estudo ionômico, as plantas de soja T translocaram uma maior quantidade de Ag em comparação com a soja NT. Considerando os diferentes tratamentos, independente da variedade de soja, o cultivo com AgNP resultou em uma maior taxa de translocação. Adicionalmente, diferenças significativas ( $p < 0,05$ )

em termos de macro e micronutrientes foram encontradas em todos os compartimentos, principalmente nas raízes das plantas tratadas. Sendo assim, a presença de Ag em suas distintas formas (AgNP e AgNO<sub>3</sub>), interfere na homeostase de alguns nutrientes, indicando a toxicidade da Ag. Tais resultados podem justificar o surgimento de clorose nas folhas das plantas NT e T expostas às AgNP ou AgNO<sub>3</sub>, previamente observado em nosso estudo.

Por fim, o emprego de uma estratégia hifenada baseada em cromatografia líquida acoplada a ambas as técnicas ICP-MS e ESI-Orbitrap foi considerada na avaliação de complexos metálicos que possam estar alterados nas folhas de soja NT e T devido aos cultivos com AgNP ou AgNO<sub>3</sub>. Diferenças, em termos de intensidade dos sinais foram observadas nos perfis de SEC-ICP-MS para Mn, Fe, Zn e Cu entre os grupos controle e tratados. Das quatro frações encontradas em SEC, a fração três (F3) foi analisada por HILIC-ICP-MS. Perfis de HILIC-ICP-MS para Fe, Zn e Cu também foram obtidos e íons com padrão isotópico para esses elementos foram encontrados nas análises por HILIC-ESI-Orbitrap. Tais íons foram selecionados para futuros experimentos de fragmentação por HILIC-ESI-Orbitrap no modo *tandem*, para posterior identificação das espécies metálicas e das possíveis vias que possam estar alteradas nas plantas de soja NT e T devido aos cultivos com AgNP e AgNO<sub>3</sub>.

## ABSTRACT

Initially, a study concerning characterization and quantification of silver nanoparticles (AgNP) was performed to evaluate silver (Ag) concentration in AgNP after the synthesis (AgNP-total), as well as in its fractions, resuspended (AgNP-res) and supernatant (Ag-sup). According to results, *ca.* 50% of Ag is in the form of nanoparticles (NPs) in the AgNP solution after the synthesis, while the other 50% of Ag is in the ionic form. Thus, when AgNP-total is directly employed in any study, synergistic effects can be observed due to the presence of both NPs and ionic Ag in the solution after the synthesis. So that, as performed in such Thesis, only the AgNP-res fraction containing NPs was used. A cultivation test was first carried out with a final concentration of 250 mg kg<sup>-1</sup> of Ag in the substrate. Under these conditions, both non-transgenic (NT) and transgenic (T) soybean plants did not survive to the cultivation with Ag nitrate (AgNO<sub>3</sub>). Then, for a comparative evaluation, cultivations with final concentration of 50 mg kg<sup>-1</sup> of Ag on the substrate were carried out.

Then, a proteomic study by 2-D DIGE was performed and several differentially abundant spots were found between NT and T soybeans from control groups and those plants which grown in the presence of AgNP or AgNO<sub>3</sub>. T soybeans were apparently less affected by treatment, since lower differentially spots were observed in the leaves of such variety. Several species related to important biological processes, including RuBisCO, ATP synthase, superoxide dismutase (SOD), among others, were identified in the differentially abundant spots by mass spectrometry. These results suggest that the cultivation with AgNP and AgNO<sub>3</sub> possibly resulted in a stress condition. Additionally, significant alterations ( $p < 0,05$ ) in catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) activities, as well as in the content of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and malondialdehyde (MDA) were observed, confirming that NT and T plants exposed to AgNP and AgNO<sub>3</sub> are under stress conditions.

Regarding ionic approach, T soybeans translocated a greater amount of Ag when compared to NT plants. Considering the different treatments, regardless of soybean variety, the cultivation with AgNP resulted in a higher translocation rate. Additionally, significant changes ( $p < 0.05$ ) in terms of macro and micronutrients were

found in all compartments, especially in the roots. Therefore, the presence of Ag in its different forms (AgNP and AgNO<sub>3</sub>), interferes nutrient homeostasis putting in evidence Ag toxicity. These results may be related to chlorosis formation in the leaves of those treated plants, as observed in our study.

Finally, the utilization of a hyphenated strategy based on liquid chromatography coupled to both ICP-MS and ESI-Orbitrap techniques was considered in the evaluation of metal species that may be altered in NT and T soybean leaves due to the cultivation with AgNP or AgNO<sub>3</sub>. Alterations in terms of signal intensity were observed in SEC-ICP-MS profiles for Mn, Fe, Zn and Cu between control and treated groups. From four fractions found in SEC, fraction three (F3) was only analyzed by HILIC-ICP-MS. Profiles for Fe, Zn and Cu were also obtained and ions with isotopic pattern for such elements were found by HILIC-ESI-Orbitrap. These ions were selected for future HILIC-ESI-Orbitrap fragmentation experiments in tandem mode for subsequent identification of metal species to provide additional information regarding possible pathways that may be altered in NT and T soybean plants due to AgNP and AgNO<sub>3</sub> cultivations.

## Lista de Abreviaturas e Siglas

2-D DIGE	Eletroforese bidimensional em gel diferencial, do inglês <i>two-dimensional difference gel electrophoresis</i> .
2-D PAGE	Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida, do inglês <i>two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis</i> .
ACN	Acetonitrila.
ADP	Adenosina difosfato.
AEX	Cromatografia de troca aniônica, do inglês <i>anion-exchange chromatography</i> .
Ag <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfato de prata.
AgNO <sub>3</sub>	Nitrato de prata.
AgNP	Nanopartículas de prata.
AgNP-res	Nanopartículas de prata ressuspensas.
AgNP-total	Nanopartículas de prata pós-síntese.
Ag-sob	Fração sobrenadante.
ATP	Adenosina trifosfato.
BSA	Albumina de soro bovino, do inglês <i>bovine serum albumin</i> .
CAT	Catalase.
CHAPS	3-[(3-cloramidopropil)dimetilamônio]-1-propanosulfonato.
Da	Dalton. 1 Da equivale a $1,661 \times 10^{-24}$ g.
DDA	Análise dependente de dados, do inglês <i>data dependent analysis</i> .
DIA	Análise diferencial em gel, do inglês <i>differential in-gel analysis</i> .
DTT	Ditiotreitol.
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético.
EPSPS	5-enolpiruvilshiquimato 3-fosfatase sintase.
ESI	Ionização por eletrospray, do inglês <i>electrospray ionization</i> .
ESI-MS/MS	Ionização por eletrospray acoplada à espectrometria de massas sequencial, do inglês <i>electrospray ionization coupled to tandem mass spectrometry</i> .

GC	Cromatografia em fase gasosa, do inglês <i>gas chromatography</i> .
GEPAM	Grupo de Espectrometria, Preparo de Amostras e Mecanização.
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio.
HILIC	Cromatografia líquida de interação hidrofílica, do inglês <i>hydrophilic interaction liquid chromatography</i> .
HILIC-ESI	Cromatografia líquida de interação hidrofílica acoplada à fonte de ionização por eletrospray, do inglês <i>hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to electrospray ionization</i> .
HILIC-ICP-MS	Cromatografia líquida de interação hidrofílica acoplada à técnica de espectrometria de massas com fonte de plasma indutivamente acoplado, do inglês <i>hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry</i> .
HNO <sub>3</sub>	Ácido nítrico.
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês <i>high-performance liquid chromatography</i> .
HPLC-ICP-MS	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à técnica de espectrometria de massas com fonte de plasma indutivamente acoplado, do inglês <i>high-performance liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry</i> .
HR-MS	Espectrometria de massas de alta resolução, do inglês <i>high-resolution mass spectrometry</i> .
HRTEM	Microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução, do inglês <i>high-resolution transmission electron microscopy</i> .
ICP OES	Espectrometria e emissão óptica com fonte de plasma indutivamente acoplado, do inglês <i>inductively coupled plasma optical emission spectrometry</i> .
ICP-MS	Espectrometria de massas com fonte de plasma indutivamente acoplado, do inglês <i>inductively coupled plasma mass spectrometry</i> .

IEF	Focalização isoeétrica, do inglês <i>isoelectric focusing</i> .
IEX	Cromatografia de troca iônica, do inglês <i>ion-exchange chromatography</i> .
KCl	Cloreto de potássio.
KI	Iodeto de potássio.
LC	Cromatografia líquida, do inglês <i>liquid chromatography</i> .
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, do inglês <i>liquid chromatography coupled to mass spectrometry</i> .
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial, do inglês <i>liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry</i> .
<i>m/z</i>	Razão massa/carga.
MALDI-QTOF-MS	Dessorção a laser assistida por matrix acoplada à espectrometria de massas sequencial com analisadores quadrupolo e por tempo de voo, do inglês <i>matrix-assisted laser desorption ionization coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry</i> .
MDA	Malondialdeído.
MM	Massa molecular.
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.
NBT	Nitroazul de tetrazólio, do inglês <i>nitroblue tetrazolium</i> .
NDK	Nucleosídeo difosfato quinase, do inglês <i>nucleoside diphosphate kinase</i> .
NPs	Nanopartículas.
NT	Soja não-transgênica.
NT-AgNO <sub>3</sub>	Soja não-transgênica cultivada com nitrato de prata.
NT-AgNP	Soja não-transgênica cultivada com nanopartículas de prata.
OEC	Complexo de evolução do oxigênio, do inglês <i>oxygen-evolving complex</i> .
OGM	Organismo geneticamente modificado.
pI	Ponto isoeétrico.
PMSF	Fluoreto de metilsulfonila.

PSI	Fotossistema I, do inglês <i>photosystem I</i> .
PSII	Fotossistema II, do inglês <i>photosystem II</i> .
PVPP	Polivinilpolipirrolidona.
RF	Radiofrequência.
ROS	Espécies reativas de oxigênio, do inglês <i>reactive oxygen species</i> .
RPLC	Cromatografia líquida de fase reversa, do inglês <i>reverse-phase liquid chromatography</i> .
RR	Roundup Ready <sup>®</sup> .
RuBisCO	Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase.
SDS	Dodecil sulfato de sódio.
SEC	Cromatografia de exclusão por tamanho, do inglês <i>size-exclusion chromatography</i> .
SEC-ICP-MS	Cromatografia de exclusão por tamanho acoplada à espectrometria de massas com fonte de plasma indutivamente acoplado, do inglês <i>size-exclusion chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry</i> .
SEM	Microscopia eletrônica de varredura, do inglês <i>scanning electron microscopy</i> .
SOD	Superóxido dismutase.
T	Soja transgênica.
T-AgNO <sub>3</sub>	Soja transgênica cultivada com nitrato de prata.
T-AgNP	Soja transgênica cultivada com nanopartículas de prata.
TBA	Ácido 2-tiobarbitúrico, do inglês <i>2-thiobarbituric acid</i> .
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, do inglês <i>thiobarbituric acid reactive substances</i> .
TCA	Ácido tricloroacético, do inglês <i>trichloroacetic acid</i> .
TEM	Microscopia eletrônica de transmissão, do inglês <i>transmission electron microscopy</i> .
Trx	Tioredoxina.
UV-Vis	Espectroscopia ultravioleta-visível.
V <sub>auxiliar</sub>	Vazão do gás auxiliar.

$V_{\text{nebulização}}$

XRD

Vazão do gás de nebulização.

Difração de raios-X, do inglês *X-ray diffraction*.

## Sumário

Introdução.....	22
Referências Bibliográficas.....	26
Capítulo 1 – Caracterização e quantificação das AgNP para o cultivo das plantas de soja.....	30
1. Objetivo.....	31
2. Revisão Bibliográfica.....	31
2.1. Nanotecnologia e as nanopartículas.....	31
2.2. Soja e a transgenia.....	33
2.3. Nanopartículas e sistemas biológicos.....	35
3. Metodologia.....	39
3.1. Avaliação das AgNP e da solução de AgNO <sub>3</sub> empregadas no cultivo das plantas de soja.....	39
3.1.1. Síntese e caracterização das AgNP, suas frações e da solução de AgNO <sub>3</sub> .....	39
3.1.2. Quantificação de Ag nas AgNP, suas frações e na solução de AgNO <sub>3</sub> .....	40
3.2. Condução da cultura e avaliação das plantas.....	41
4. Resultados e Discussão.....	43
4.1. Estudo das AgNP e AgNO <sub>3</sub> empregadas nos cultivos das sojas NT e T..	43
4.1.1. Caracterização das AgNP, suas frações e AgNO <sub>3</sub> por UV-Vis.....	43
4.1.2. Caracterização das AgNP, suas frações e AgNO <sub>3</sub> por HRTEM.....	45
4.1.3. Quantificação de Ag nas AgNP, em suas frações e na solução de AgNO <sub>3</sub> .....	47
4.2. Avaliação das plantas durante e após o cultivo.....	49
4.2.1. Cultivo com 250 mg kg <sup>-1</sup> de Ag.....	49
4.2.2. Cultivos subsequentes com 50 mg kg <sup>-1</sup> de Ag.....	52
5. Considerações Parciais.....	56
6. Referências Bibliográficas.....	57

Capítulo 2 – Estudo proteômico e enzimático das folhas de soja NT e T após cultivo com AgNP e AgNO <sub>3</sub> .....	62
1. Objetivo.....	63
2. Revisão Bibliográfica.....	63
2.1. Preparo de amostras vegetais para a análise de proteínas empregando eletroforese bidimensional.....	63
2.2. Separação e análise de proteínas por eletroforese em gel e espectrometria de massas.....	65
2.3. Estudo enzimático para avaliação de estresse oxidativo.....	66
2.4. Estudos proteômicos na avaliação dos efeitos das nanopartículas em plantas.....	68
3. Metodologia.....	70
3.1. Estudo proteômico comparativo das folhas de soja.....	70
3.1.1. Extração e quantificação das proteínas das folhas de soja.....	70
3.1.2. Separação das proteínas das folhas de soja empregando eletroforese bidimensional.....	70
3.2. Identificação das proteínas presentes nos spots diferenciais por LC-MS/MS.....	73
3.2.1. Digestão in-gel das proteínas.....	73
3.2.2. Análise por espectrometria de massas.....	74
3.3. Extração das enzimas e determinação da atividade enzimática.....	75
3.3.1. Avaliação da peroxidação lipídica.....	76
3.3.2. Determinação de peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	76
4. Resultados e Discussão.....	77
4.1. Quantificação das proteínas e avaliação do perfil proteômico das folhas de soja por 2-D PAGE.....	77
4.2. Avaliação do perfil proteômico das folhas de soja por 2-D DIGE.....	80
4.3. Identificação das proteínas presentes nos spots diferenciais por espectrometria de massas.....	83
4.4. Interações entre as proteínas identificadas.....	99
4.5. Determinação da atividade enzimática.....	102
5. Considerações Parciais.....	107
6. Referências Bibliográficas.....	109

Capítulo 3 – Estudo ionômico das plantas de soja NT e T após cultivo com AgNP e AgNO <sub>3</sub> .....	118
1. Objetivo.....	119
2. Revisão Bibliográfica.....	119
2.1. Elementos essenciais e a nutrição vegetal.....	119
2.2. Avaliação da influência das nanopartículas no metabolismo das plantas por meio de uma abordagem ionômica.....	123
3. Metodologia.....	126
3.1. Preparo das soluções e limpeza das vidrarias.....	126
3.2. Determinação de prata no solo e elementos químicos presentes nos diferentes compartimentos das plantas de soja.....	126
4. Resultados e Discussão.....	130
4.1. Validação da metodologia analítica para a determinação de Ag no substrato de cultivo e elementos essenciais nas plantas de soja.....	130
4.2. Absorção, acumulação e translocação de prata nas plantas de soja expostas ao cultivo com AgNP e AgNO <sub>3</sub> .....	132
4.3. Influência das AgNP e AgNO <sub>3</sub> na captação e translocação dos elementos essenciais pelas plantas de soja.....	136
4.3.1. Macroelementos: P e S.....	139
4.3.2. Microelementos: Cu, Fe, Mn e Zn.....	140
5. Considerações Parciais.....	143
6. Referências Bibliográficas.....	145

Capítulo 4 – Emprego de estratégias hifenadas para a avaliação de complexos metálicos em folhas de soja NT e T após cultivo com AgNP e AgNO <sub>3</sub> .....	149
1. Objetivo.....	150
2. Revisão Bibliográfica.....	150
2.1. A importância dos estudos metalômicos na avaliação das plantas.....	150
3. Metodologia.....	155
3.1. Reagentes e equipamentos.....	155
3.2. Extração das espécies metálicas presentes nas folhas de soja NT e T...	155
3.3. Avaliação das espécies metálicas presentes nas folhas de soja NT e T	

por meio de estratégias hífenadas.....	156
4. Resultados e Discussão.....	157
4.1. Determinação total elementar nas folhas de soja, extrato e resíduos.....	157
4.2. Avaliação dos extratos de folha de soja por SEC-ICP-MS.....	158
4.3. Avaliação das frações de SEC por HILIC-ICP-MS e HILIC-ESI-Orbitrap.	163
5. Considerações Parciais.....	167
6. Referências Bibliográficas.....	168
Considerações Finais e Perspectivas.....	170

## INTRODUÇÃO

Diferentes áreas de produção, tais como a alimentícia, agrícola e tecnológica demandam de produtos baseados em nanotecnologia [1-2]. Tal fato alerta a comunidade sobre os possíveis efeitos adversos que tais produtos compostos por nanopartículas (NPs) podem causar ao meio ambiente, e, conseqüentemente, aos seres vivos [3, 4]. As nanopartículas de prata (AgNP), por sua vez, têm despertado grande atenção por possuir propriedades importantes como, por exemplo, catalítica e atividade antimicrobiana [5]. Para a síntese destas NPs, tem-se empregado organismos vivos, tais como plantas e micróbios, devido à rapidez e baixo custo do processo [6], uma vez que nas técnicas convencionais há, muitas vezes, necessidade do uso de substâncias tóxicas e produtos perigosos, podendo causar riscos biológicos e ambientais [5].

As NPs podem estar presentes em sistemas biológicos e ligadas a moléculas, desempenhando diferentes funções nos organismos e células [7-9]. Devido à sua alta razão superfície-volume, as NPs são extremamente reativas e catalíticas [10], podendo passar através das membranas celulares. Entretanto, suas interações com tais sistemas não são, ainda, bem conhecidas. Apesar disso, alguns estudos têm alertado sobre os possíveis efeitos das NPs, dentre elas as AgNP, quando em contato com alguns organismos vivos [1, 3-4, 11-12]. Por se tratar de uma espécie coloidal, quando presentes no meio ambiente, as NPs podem ocasionar um estresse coloidal e interferir no desenvolvimento das plantas [13]. Além disso, à exposição de plantas ao cultivo com diferentes NPs, dentre elas as AgNP, pode resultar em uma condição de estresse oxidativo, com conseqüente produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) que, reconhecidamente, causam danos às células das plantas [14-17]. Além disso, alguns estudos alertam sobre a toxicidade dessas NPs sobre plantas de diferentes espécies, podendo alterar a germinação, o crescimento e a absorção de alguns nutrientes pelas plantas [1, 3, 11]. Apesar disso, no Brasil, e, em vários países, não existe ainda uma lei que determine a concentração permitida dessas em alimentos, bem como o descarte das AgNP no meio ambiente [18].

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] é uma importante leguminosa e o seu grão é amplamente empregado em diversos ramos de interesse, em especial o alimentício e o de biocombustíveis, uma vez que as sementes de soja são constituídas por cerca de 40% de proteína e 20% de óleo [19, 20]. Devido à sua importância, essa planta possui elevada demanda e valor econômico. De acordo com o levantamento de 2016, o Brasil é o segundo maior produtor de soja, com uma produção anual de 32% do total mundial, atrás apenas dos Estados Unidos que é responsável por 34% da produção mundial. Este valor representa, aproximadamente, um total de US\$ 40 bilhões para essa cultura [21]. Ao longo dos anos, inúmeras variedades de soja foram desenvolvidas visando uma melhor qualidade nutricional, produtividade e rapidez no cultivo, além de aumentar a resistência das plantas contra pragas [20, 22-23]. Sendo assim, desenvolveu-se a soja *Roundup Ready*<sup>®</sup> (RR), resistente ao glifosato, um dos herbicidas mais empregados em todo o mundo [20, 22, 24-25]. Vários estudos com uma abordagem proteômica e metalômica têm sido desenvolvidos, objetivando avaliar os efeitos dessas modificações genéticas, uma vez que podem alterar o proteoma de sementes de soja, bem como o metaloma da planta [23, 26-28]. Nesse sentido, diversas técnicas de separação, quantificação e identificação são empregadas com essa finalidade em diversos organismos biológicos, modificados geneticamente ou sob o cultivo com metais [23-24, 26, 28-31].

Dentre as técnicas de separação, destacam-se a eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2-D PAGE, do inglês *two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis*) [28] e a eletroforese bidimensional em gel diferencial (2-D DIGE, do inglês *two-dimensional difference gel electrophoresis*) [26, 32]. O acoplamento da técnica de espectrometria de massas com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP-MS, do inglês *inductively coupled plasma mass spectrometry*) com a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *high performance liquid chromatography*) vem sendo amplamente empregado na quantificação de metais em diversos estudos metalômicos, possibilitando uma detecção “em linha” [24, 29-30]. Outro importante aspecto nestes estudos ômicos se refere à identificação das espécies envolvidas, como, por exemplo, proteínas e metabólitos. Para isso, a técnica mais empregada é a espectrometria de massas de alta resolução, nas mais diversas configurações com o uso de diferentes fontes de

ionização, dentre elas a fonte de ionização por *electrospray* (ESI, do inglês *electrospray ionization*) [23-24, 26]. Nesse sentido, o uso de estratégias hifenadas combinando a cromatografia líquida (LC) acoplada a ambos ICP-MS e espectrometria de massas de alta resolução é extremamente útil para a avaliação de espécies metálicas. Tais estudos podem ampliar as informações com relação aos efeitos causados no desenvolvimento das plantas na presença de NPs [4, 24, 33].

Com o exposto e considerando a falta de informação acerca dos possíveis efeitos adversos do contato das NPs com a soja, o presente trabalho, dividido em quatro capítulos, apresenta como principal objetivo, avaliar a influência das AgNP no metabolismo das plantas de soja transgênica (T) e não-transgênica (NT) por meio de abordagens ômicas. Para tanto, as plantas foram cultivadas na presença de AgNP ou nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ), a uma concentração de  $50 \text{ mg kg}^{-1}$  de Ag no substrato de cultivo, onde as alterações observadas para cada grupo foram comparadas com as respostas dos grupos controles.

Inicialmente, todo um estudo acerca da caracterização e quantificação das AgNP foi realizado para avaliar a concentração de prata (Ag) tanto nas AgNP após a síntese, quanto nas suas frações, ressuspendida (AgNP-res) e sobrenadante (Ag-sob). Com esta abordagem, observou-se que aproximadamente 50% da Ag está na forma de NPs na solução de AgNP após a síntese, enquanto os outros 50% da Ag está na forma iônica. Sendo assim, a purificação das AgNP via centrifugação e remoção do sobrenadante (Ag-sob) é requerida, para que apenas a fração AgNP-res, que contém as NPs, seja empregada a fim de minimizar os efeitos sinérgicos devido à presença das NPs e da Ag iônica na solução após a síntese.

Posteriormente, um estudo proteômico combinando as técnicas de 2-D DIGE e espectrometria de massas foi realizado e diversas espécies foram identificadas nos *spots* diferenciais entre as plantas de soja NT e T dos grupos controle e as plantas cultivadas com as AgNP e  $\text{AgNO}_3$ . A soja NT foi mais afetada pelo cultivo com o  $\text{AgNO}_3$ , enquanto que as plantas T foram mais sensíveis ao tratamento com as AgNP. De maneira geral, independente da forma de Ag empregada no cultivo, ambas as variedades de soja estão sob condição de estresse, uma vez que algumas espécies relacionadas à tal condição foram identificadas, dentre elas a *RuBisCO*, *superóxido dismutase*, *ATP synthase*, *triosephosphate isomerase*. Tais resultados

sugerem que os cultivos com  $\text{AgNO}_3$  e AgNP, possivelmente, resultaram em uma condição de estresse oxidativo.

Adicionalmente, foi realizado um estudo enzimático com a finalidade de ampliar o entendimento do estresse oxidativo causado pelos cultivos com  $\text{AgNO}_3$  e AgNP observado nos estudos proteômicos. Diferenças significativas foram encontradas na atividade de enzimas como a catalase (CAT) e a superóxido dismutase (SOD), bem como no conteúdo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e malondialdeído (MDA), confirmando que as plantas de soja NT e T cultivadas com as AgNP e  $\text{AgNO}_3$  estão sob condição de estresse.

Com relação à absorção e assimilação de Ag, de maneira geral, as plantas de soja T translocaram uma maior quantidade de Ag em comparação com a soja NT. Independente da variedade de soja, o cultivo com AgNP resultou em uma maior taxa de translocação do que o tratamento com  $\text{AgNO}_3$ . Considerando o estudo ionômico, diferenças significativas em termos de macro e micronutrientes foram encontradas em todos os compartimentos das plantas tratadas, principalmente nas raízes. Tal fato pode estar relacionado com condições de estresse, devido a consequente formação de clorose nas folhas e surgimento de necrose na parte basal do caule das plantas expostas às AgNP ou  $\text{AgNO}_3$ , como observado em nosso estudo.

Por fim, uma estratégia hifenada baseada em cromatografia líquida (LC) acoplada a ambas as técnicas ICP-MS e ESI-Orbitrap foi considerada na avaliação de espécies metálicas que possam estar alteradas nas folhas de soja NT e T, devido aos cultivos com AgNP ou  $\text{AgNO}_3$ . Após a obtenção de perfis de SEC-ICP-MS, diferenças em termos de intensidade foram observadas para Mn, Fe, Zn e Cu entre os grupos controle e tratados. Então, de um total de quatro frações observadas na SEC-ICP-MS, a fração três (F3) foi analisada por HILIC-ICP-MS e, posteriormente, por HILIC-ESI-Orbitrap em que perfis e íons com padrões isotópicos para Fe, Zn e Cu foram obtidos, respectivamente. Tais íons foram selecionados para futuros experimentos de fragmentação por HILIC-ESI-Orbitrap no modo sequencial (*tandem*). Assim, espera-se identificar as espécies metálicas e as possíveis vias que possam estar alteradas nas plantas de soja NT e T devido aos cultivos com AgNP e  $\text{AgNO}_3$ .

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. W-M. Lee, J. I. Kwak, Y-J. An, *Effect of silver nanoparticles in crop plants Phaseolus radiatus and Sorghum bicolor: Media effect on phytotoxicity. Chemosphere*, **2012**, 86, 491-499.
2. M. C. Roco, *Nanotechnology: convergence with modern biology and medicine. Curr. Opin. Biotechnol.*, **2003**, 14, 337–346.
3. L. Yin, B. P. Colman, B. M. McGill, J. P. Wright, E. S. Bernhardt, *Effects of silver nanoparticle exposure on germination and early growth of eleven wetland plants. PLoS ONE*, **2012**, 7, 1-7.
4. S. C. C. Arruda; A. L. D. Silva, R. M. Galazzi, R. A. Azevedo, M. A. Z. Arruda, *Nanoparticles applied to plant science: A review. Talanta*, **2015**, 131, 693-705.
5. A. Tripathy, A. M. Raichur, N. Chandrasekaran, T. C. Prathna, A. Mukherjee, *Process variables in biomimetic synthesis of silver nanoparticles by aqueous extract of Azadirachta indica (Neem) leaves. J. Nanopart. Res.*, **2010**, 12, 237–246.
6. A. Nabikhan, K. Kandasamy, A. Raj, N. M. Alikunhi, *Synthesis of antimicrobial silver nanoparticles by callus and leaf extracts from saltmarsh plant, Sesuvium portulacastrum L. Colloids Surf., B*, **2010**, 79, 488–493.
7. M. E. Akerman, W. C. Chan, P. Laakkonen, S. N. Bhatia, E. Ruoslahti, *Nanocrystal targeting in vivo. Proc. Natl. Acad. U.S.A.*, **2002**, 99, 12617–12621.
8. A. Hoshino, K. Fujioka, T. Oku, S. Nakamura, M. Suga, Y. Yamaguchi, K. Suzuki, M. Yasuhara, *Nanocrystal targeting in vivo. Microbiol. Immunol.*, **2004**, 48, 985–994.
9. K. G. Suzuki, T. K. Fujiwara, M. Edidin, A. Kusumi, *Dynamic recruitment of phospholipase Cy at transiently immobilized GPI-anchored receptor clusters induces IP3–Ca<sup>2+</sup> signaling: single-molecule tracking study 2. J. Cell Biol.*, **2007**, 177, 731–742.

10. J. Ying, *Nanostructured Materials*, Elsevier, California, **2001**.
11. F. Mirzajani, H. Askari, S. Hamzelou, M. Farzaneh, A. Ghassempour, *Effect of silver nanoparticles on Oryza sativa L. and its rhizosphere bacteria*. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, **2013**, *88*, 48–54.
12. R. R. R. Sardari, S. R Zarchi, A. Talebi, S. Nasri, S. Imani, A. Khoradmehr, R. Sheshde, *Toxicological effects of silver nanoparticles in rats*. **Afric. J. Microbiol. Res.**, **2012**, *6*, 5587-5593.
13. S. Asli, P. M. Neumann, *Rhizosphere humic acid interacts with root cell walls to reduce hydraulic conductivity and plant development*. **Plant Soil**, **2010**, *336*, 313-322.
14. S. S. Gill, N. A. Anjum, R. Gill, S. Yadav, M. Hasanuzzaman, M. Fujita, P. Mishra, S. C. Sabat, N. Tuteja, *Superoxide dismutase—mentor of abiotic stress tolerance in crop plants*. **Environ. Sci. Pollut. Res.**, **2015**, *22*, 10375–10394.
15. O. Sytar, A. Kumar, D. Latowski, P. Kuczynska, K. Strzałka, M. N. V. Prasad, *Heavy metal-induced oxidative damage, defense reactions, and detoxification mechanisms in plants*. **Acta Physiol. Plant.**, **2013**, *35*, 985–999.
16. C. Ma, J. C. White, O. P. Dhankher, B. Xing, *Metal-based nanotoxicity and detoxification pathways in higher plants*. **Environ. Sci. Technol.** **2015**, *49*, 7109–7122.
17. F. Mirzajani, H. Askari, S. Hamzelou, Y. Schober, A. Römpp, A. Ghassempour, B. Spengler, *Proteomics study of silver nanoparticles toxicity on Oryza sativa L.* **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, **2014**, *108*, 335–339.
18. M. E. Vance, T. Kuiken, E. P. Vejerano, S. P. McGinnis, M. F. Hochella Jr., D. Rejeski, M. S. Hull, *Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory*. **Beilstein J. Nanotechnol.**, **2015**, *6*, 1769–1780.
19. T. Yamada, K. Takagi, M. Ishimoto, *Recent advances in soybean transformation and their application to molecular breeding and genomic analysis*. **Breed. Sci.**, **2012**, *61*, 480–494.

20. M. A. Z. Arruda, R. M. Galazzi, B. K. De Campos, M. A. Herrera-Agudelo, S. C. C. Arruda, R. A. Azevedo, Soybean as a Food Source: Comparative Studies Focusing on Transgenic and Nontransgenic Soybean, in: *Genetically Modified Organisms in Food*, R. R. Watson; V. R. Preedy, Eds. Elsevier Inc., **2016**, pp 3-10.
21. SoyStats, The American Soybean Association. Disponível em: <<http://www.soystats.com/>>. Acessado em: 08 de maio de 2017.
22. MONSANTO. Soja Roundup Ready. Disponível em: <[http://www.monsanto.com.br/produtos/sementes/soja\\_roundup\\_ready/soja\\_roundup\\_ready.asp](http://www.monsanto.com.br/produtos/sementes/soja_roundup_ready/soja_roundup_ready.asp)>. Acessado em: 03 de maio de 2013.
23. S. S. Natarajan, *Natural variability in abundance of prevalent soybean proteins*. **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, **2010**, *58*, S26–S29.
24. L. R. V. Mataveli, M. Fioramonte, F. C. Gozzo, M. A. Z. Arruda, *Improving metallomics information related to transgenic and non-transgenic soybean seeds using 2D-HPLC-ICP-MS and ESI-MS/MS*. **Metallomics**, **2012**, *4*, 373–378.
25. K. Çavusoglu, K. Yapar, E. Oruç, E. Yalçın, *Protective effect of Ginkgo biloba L. leaf extract against glyphosate toxicity in Swiss albino mice*. **J. Med. Food**, **2011**, *14*, 1263–1272.
26. H. S. Barbosa, S. C. C. Arruda, R. A. Azevedo, M. A. Z. Arruda, *New insights on proteomics of transgenic soybean seeds: evaluation of differential expressions of enzymes and proteins*. **Anal. Bioanal. Chem.**, **2012**, *402*, 299-314.
27. L. R. V. Mataveli, P. Pohl, S. Mounicou, M. A. Z. Arruda, J. Szpunar, *A comparative study of element concentrations and binding in transgenic and non-transgenic soybean seeds*. **Metallomics**, **2010**, *2*, 800–805.
28. A. Sussulini, G. H. M. F. Souza, M. N. Eberlin, M. A. Z. Arruda, *Comparative metallomics for transgenic and non-transgenic soybeans*. **J. Anal. At. Spectrom.**, **2007**, *22*, 1501–1506.
29. J. Bettmer, M. M. Bayón, J. R. Encinar, M. L. F. Sánchez, M. R. F. De la Campa, A. Sanz-Medel, *The emerging role of ICP-MS in proteomic analysis*. **J. Proteomics**,

2009, 72, 989–1005.

30. J. Szpunar, *Metallomics: a new frontier in analytical chemistry*. **Anal. Bioanal. Chem.**, **2004**, 378, 54–56.

31. M. A. O. da Silva, S. A. L. de Andrade, P. Mazzafera, M. A. Z. Arruda, *Evaluation of sunflower metabolism from zinc and selenium addition to the culture: a comparative metallomic study*. **Inter. J. Mass Spectrom.**, **2011**, 307, 55-60.

32. S. C. C Arruda, H. S. Barbosa, R. A. Azevedo, M. A. Z. Arruda, *Two-dimensional difference gel electrophoresis applied for analytical proteomics: fundamentals and applications to the study of plant proteomics*. **Analyst**, **2011**, 136, 4119-4126.

33. Flis, P.; Ouerdane, L.; Grillet, L.; Curie, C.; Mari, S.; Lobinski, R. *Inventory of metal complexes circulating in plant fluids: a reliable method based on HPLC coupled with dual elemental and high-resolution molecular mass spectrometric detection*. **New Phytol.**, **2016**, 211, 1129–1141.

## **CAPÍTULO 1**

### **Caracterização e quantificação das AgNP para o cultivo das plantas de soja**

## 1. OBJETIVO

1.1. Avaliar a solução de nanopartículas de prata em termos de tamanho, morfologia e concentração de prata para sua posterior aplicação no plantio das sojas NT e T.

1.2. Realizar o cultivo e avaliar os efeitos, em nível macroscópico, decorrentes da exposição das plantas NT e T às nanopartículas de prata.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Nanotecnologia e as nanopartículas

A demanda por produtos baseados em nanotecnologia tem aumentado nos últimos anos, principalmente em diversas áreas relacionadas aos humanos, dentre elas eletrônica, têxtil, óptica, dispositivos médicos, embalagem de alimentos, células combustível, biossensores, entre outras [1-4]. Com isso, há uma crescente preocupação sobre os efeitos potenciais adversos das nanopartículas (NPs) no meio ambiente [5-6]. As NPs são partículas que possuem tamanho entre 1 e 100 nm e apresentam elevada área específica superficial e alta reatividade. De maneira geral, a síntese das NPs partículas ocorre a partir da redução dos íons do metale em solução por meio de um agente passivante/redutor (Figura 1.1) [1].

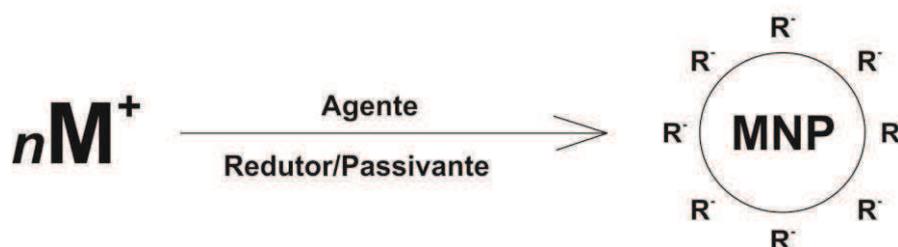


Figura 1.1: Síntese de nanopartículas a partir de um agente redutor/passivante.

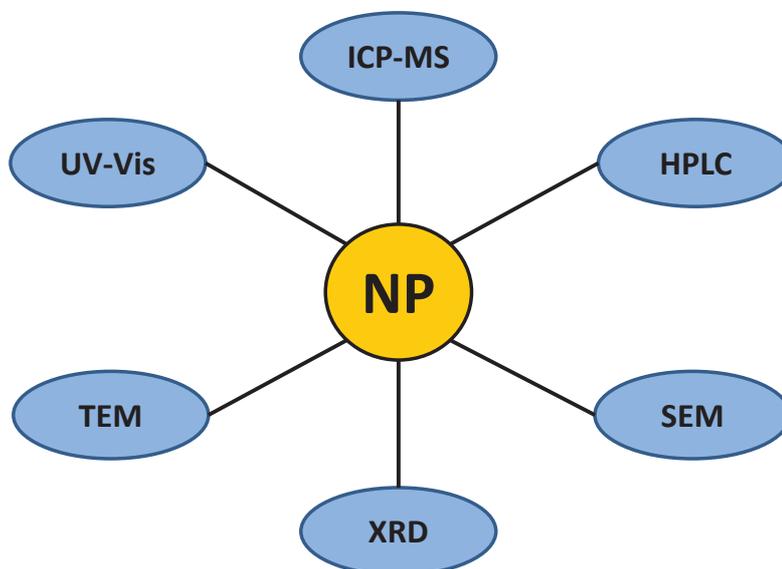
Recentemente, a síntese de nanopartículas de prata (AgNP) tem atraído enorme atenção, devido às suas diversas propriedades, tais como catalíticas, magnéticas, polarizabilidade óptica e atividade antimicrobiana. Inúmeras técnicas para a síntese de AgNP têm sido empregadas, incluindo redução química de íons prata (Ag) em soluções aquosas com ou sem agentes estabilizantes, decomposição térmica em solventes orgânicos e químico e foto redução em micelas reversas. Entretanto, a maioria desses métodos possui elevado custo e envolvem o uso de substâncias tóxicas e produtos perigosos, podendo causar riscos biológicos e ambientais [5, 7].

Nessa perspectiva, organismos vivos, tais como plantas e micróbios, são atualmente utilizados para a fabricação de NPs, devido, principalmente, à rapidez e baixo custo, uma vez que não é necessário o emprego de elevada pressão, energia, temperatura e produtos tóxicos. Além disso, as plantas podem ser usadas em larga escala na síntese de NPs em condições controladas, de acordo com o seu tamanho, forma e dispersão [8].

Outra forma bastante conhecida para a fabricação das NPs são os processos baseados em sol-gel, em que uma solução (sol) atua como precursor de uma rede integrada (ou gel) ou mesmo partículas discretas ou uma rede polimérica [9]. Existem outros métodos para a obtenção das NPs, incluindo processos químicos, atrito e pirólise, com ou sem o emprego de um plasma térmico [10].

Uma vez sintetizadas, procede-se com o estudo das NPs para avaliar as suas características, principalmente a morfologia e o tamanho, uma vez que tais informações são importantes para futura aplicação das NPs. Para isso, diferentes técnicas são empregadas, desde aquelas que irão indicar a distribuição do tamanho das NPs, quanto aquelas em que será possível visualizar, por meio de imagem, a morfologia das NPs (Figura 1.2). Nesse sentido, a microscopia eletrônica de transmitância (TEM, do inglês *transmission electron microscopy*) e a microscopia eletrônica de varredura (SEM, do inglês *scanning electron microscopy*) estão entre as técnicas mais utilizadas para a caracterização das NPs, uma vez que fornecem informação sobre o tamanho e morfologia. Adicionalmente, técnicas de separação e espectrométricas, tais como HPLC, espectroscopia UV-Vis, difração de raios-X (XRD, do inglês *X-ray diffraction*), e ICP-MS em suas diferentes configurações são

empregadas na caracterização das NPs [1].



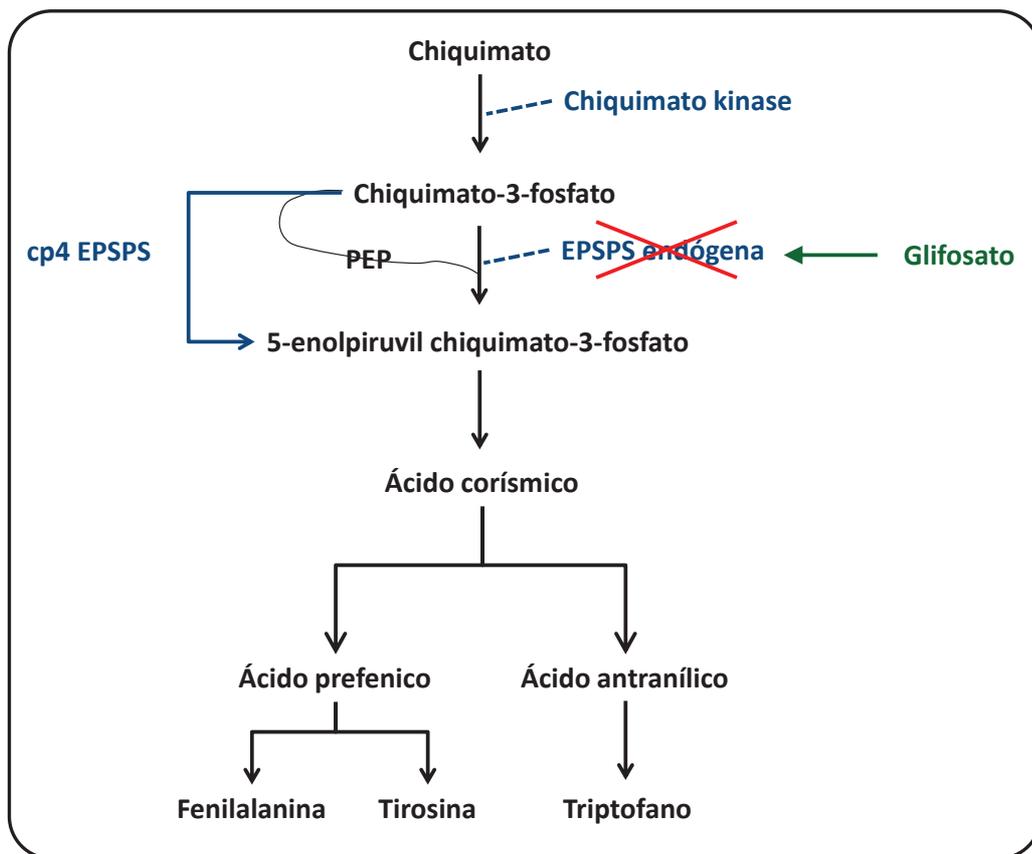
**Figura 1.2:** Técnicas empregadas para a caracterização das NPs. Adaptado de Arruda *et al.* (2015) [1].

Embora os estudos sobre a caracterização das NPs já sejam bem estabelecidos, há na literatura a ausência de uma avaliação da concentração do metal na forma de NP, que pode ampliar a compreensão da solução de NPs, bem como do rendimento da síntese em termos de redução dos íons e consequente formação das NPs. Nesse sentido, buscou-se na primeira parte deste Capítulo 1 investigar a morfologia e a concentração de Ag na solução de AgNP obtida após a síntese.

## 2.2. Soja e a transgenia

Devido a importância da soja, foram desenvolvidos inúmeros estudos ao longo dos anos a fim de melhorar a qualidade nutricional, bem como a resistência dessa planta às pragas [11, 14]. No caso das plantas, apesar das modificações genéticas objetivarem maior produtividade e melhor qualidade em termos

nutricionais, há controvérsia sobre os benefícios e riscos associados à inserção de um gene, bem como se esses organismos geneticamente modificados (OGMs) são seguros para o meio ambiente e para a saúde humana [11, 15]. Nesse sentido, foi desenvolvida a soja *Roundup Ready*<sup>®</sup> (RR), que apresenta resistência ao glifosato, um dos herbicidas mais empregados em todo o mundo e que inibe a enzima 5-enolpiruvilshiquimato 3-fosfatase sintase (EPSPS), envolvida na biossíntese de aminoácidos aromáticos (Figura 1.3).



**Figura 1.3:** Cadeia da síntese de aminoácidos aromáticos mediante a presença do glifosato. Adaptado de Mataveli (2013) [16].

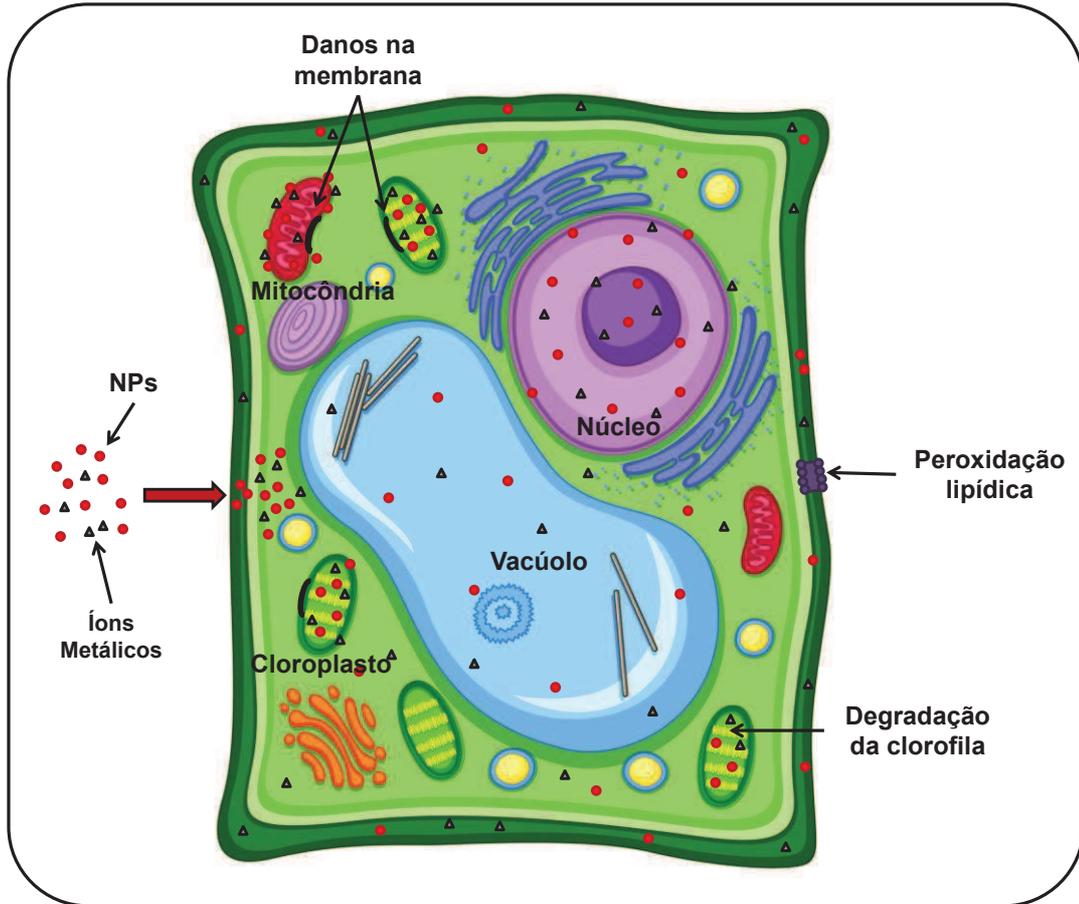
Tal inibição causa um desbalanço de aminoácidos, provocando o atraso no desenvolvimento e conseqüente morte das plantas. Para obter uma variedade tolerante à ação do glifosato, um gene derivado das bactérias de solo *Agrobacterium* sp. cepa CP4, responsável pela produção da enzima cp4 EPSPS que não é afetada pelo herbicida, foi inserido na planta [11, 15-16].

Os organismos transgênicos são modificados pela inserção de um fragmento de DNA exógeno para, por exemplo, sintetizar novas substâncias que não estavam presentes antes da modificação genética. De acordo com a literatura, tais modificações genéticas podem alterar o proteoma de sementes de soja, bem como o metaloma da planta. Nesse sentido, vários estudos têm sido desenvolvidos com o intuito de avaliar os efeitos dessas modificações genéticas na soja com uma abordagem proteômica e metalômica [11, 14, 17-18].

### **2.3. Nanopartículas e sistemas biológicos**

A prata (Ag) pertence à classe de elementos não essenciais para funções biológicas e a presença de tais elementos está diretamente relacionada às condições de estresse em organismos vivos, incluindo plantas [1, 19]. Com relação às AgNP, sua presença no solo pode alterar alguns aspectos (e.g. condutividade hidráulica, transpiração e crescimento foliar) e causar subsequentes efeitos no desenvolvimento das plantas [20-21]. Adicionalmente, a toxicidade das AgNP tem sido atribuída principalmente pela biodisponibilidade dos íons  $\text{Ag}^+$  no solo. De fato, é difícil prever em qual forma particulada as AgNP e  $\text{AgNO}_3$  podem estar nas condições de exposição, dentre elas sais de baixa solubilidade ou solúveis, (nano)aglomerados de Ag insolúveis ou ligados às partículas presentes no solo [22].

As NPs também podem ser ligadas a moléculas biológicas, as quais podem atuar como transportadoras para alvos específicos dentro de um organismo [23], organelas específicas dentro de uma célula [24], ou para seguir uma proteína ou moléculas de RNA em células [25-26]. Essas moléculas podem atuar como anticorpos monoclonais, estreptavidina, aptâmeros ou peptídeos. Eles devem estar covalentemente ligados as NPs e devem estar presentes em um número considerável delas. Apesar de alguns estudos alertarem sobre os possíveis efeitos do contato das NPs com sistemas biológicos, essas interações não são, ainda, bem compreendidas. Sabe-se que, devido às suas propriedades [27], essas NPs, assim como os metais que a compõem, podem estar em contato direto com as células, sendo tóxicas para o organismo (Figura 1.4) [1-2, 5, 28].



**Figura 1.4:** Transporte, interação e efeitos das NPs e dos metais com a célula de um vegetal. Adaptado de Ma *et al.* (2015) [19].

A Ag apresenta elevada ação fungicida e desinfetante, e, em relação a outros tipos de NPs, as AgNP estão sendo produzidas em larga escala e em uma proporção dez vezes maior do que as NPs de C, Zn ou Ti, por exemplo [1, 29]. Dado a esta estatística, conclui-se que tanto os seres humanos como o ambiente estão mais facilmente expostos a elas [1, 5]. Apesar disso, no Brasil e em outros países, não há uma disposição legal em relação à sua concentração máxima permitida em produtos, tais como alimentícios, bem como com relação ao descarte deste material em termos de quantidade permitida nos solos, rios, lagos e afins [30]. Apesar dos benefícios da tecnologia, as AgNP quando absorvidas podem ser também extremamente tóxicas aos seres vivos. Alguns estudos tem demonstrado que as AgNP podem causar danos nas células do fígado, cérebro e intestino de ratos [31-32].

Em um trabalho realizado por Lee *et al.* (2012) foi investigada a fitotoxicidade das AgNP em plantas. As plantas apresentaram uma dependência na eficiência do crescimento com a concentração das AgNP, ou seja, houve um menor crescimento para as plantas cultivadas com as AgNP. Essa inibição do crescimento devido ao cultivo se deve à absorção das AgNP pelas plantas, bem como à presença de íons Ag dissolvidos que podem ser tóxicos [2].

Em um estudo realizado por Mirzajani *et al.* (2013) foram avaliados os efeitos do uso de uma suspensão de AgNP como fertilizante antifúngico e antibacteriano no cultivo de arroz. Após a aplicação das AgNP, foi observada a capacidade de resposta da planta que apresentou uma transformação notável em comparação a coloração das plantas controle. Tal fato ocorre, pois as AgNP se aderem à parede celular e, assim, modificam a coloração da planta. Além disso, há um maior crescimento das plantas em comparação com as plantas que não foram cultivadas com as NPs. Já em concentrações mais elevadas de AgNP, esse efeito não acontece, uma vez que há alterações na morfologia da célula, bem como nas características estruturais que ocasionam um menor crescimento das plantas de arroz [28].

Yin *et al.* (2012), avaliaram os efeitos causados na germinação de sementes e no crescimento de diversas espécies de plantas cultivadas com dois diferentes tipos de AgNP. Foi possível observar que as AgNP causaram efeitos iguais ou superiores ao cultivo com  $\text{AgNO}_3$  sobre o crescimento das plantas, confirmando que a elevada toxicidade das AgNP não se deve somente ao íon Ag. Ainda, os autores destacam, baseados em seus resultados, a importância de estudos nessa abordagem para compreender a interação e o transporte das AgNP, bem como os efeitos diretos e indiretos dessas nanopartículas nas plantas [6].

Nesse contexto, há também estudos relacionados a outros tipos de NPs. Domokos-Szabolcsy *et al.* (2012), por exemplo, avaliaram o acúmulo e os efeitos biológicos em plantas de tabaco a partir do cultivo com  $530 \mu\text{mol L}^{-1}$  de nanopartículas de selênio (SeNP). Após o cultivo, as raízes dessas plantas acumularam elevada concentração de Se, ca.  $3000 \text{ mg kg}^{-1}$ . Além disso, a planta também foi cultivada com selenato, a fim de se avaliar a concentração total e a distribuição do Se na planta em comparação com o cultivo com as SeNP. Os autores

verificaram que o selenato, na faixa de concentração de 265 a 532  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , apresentou efeitos tóxico e inibitório para o crescimento das plantas, bem como uma maior quantidade de Se total nas plantas, enquanto que o tratamento com as SeNP, nas mesmas concentrações, estimulou a iniciação da germinação e o crescimento das plantas. Tal fato pode ter ocorrido em razão das diferentes naturezas entre as duas espécies de Se. Além disso, o selenato em excesso pode induzir um estresse oxidativo na planta, catalisando a oxidação de tióis e gerando, simultaneamente, superóxidos, com consequentes alterações fisiológicas na morfologia das plantas [25].

A fitotoxicidade das nanopartículas de óxido de lantânio ( $\text{La}_2\text{O}_3$  NP) nas plantas de milho foi investigada por Yue *et al.* (2017). A morfologia das raízes, com redução da biomassa, foi severamente alterada no milho cultivado na presença de  $\text{La}_2\text{O}_3$  NP a uma concentração de 250  $\text{mg L}^{-1}$ . Além disso, a inibição do crescimento e a redução na captação de água foram evidentes para as plantas expostas às  $\text{La}_2\text{O}_3$  NP. Em nível molecular, a expressão relativa da maioria dos genes aquaporina e o sinal molecular do ácido abscísico foram significativamente reduzidos devido ao crescimento na presença das  $\text{La}_2\text{O}_3$  NP [33].

Em um trabalho realizado por Larue *et al.* (2012), foram avaliados o acúmulo, a translocação e o impacto de nanopartículas de dióxido de titânio (TiNP) em trigo. Foram encontrados grupos ricos em Ti nas raízes das plantas cultivadas com as TiNP, indicando que este se acumulou nas raízes do trigo. Os autores sugerem que há uma provável interação direta entre as TiNP no que se refere ao seu tamanho e os componentes da parede celular. Com relação à translocação, apenas as TiNP de menor tamanho foram encontradas nas folhas de trigo. Por fim, os autores constataram que o acúmulo das TiNP nas plantas não induz a qualquer stress oxidativo em folhas, indicando que essas NPs não têm impacto sobre a fotossíntese do trigo [29].

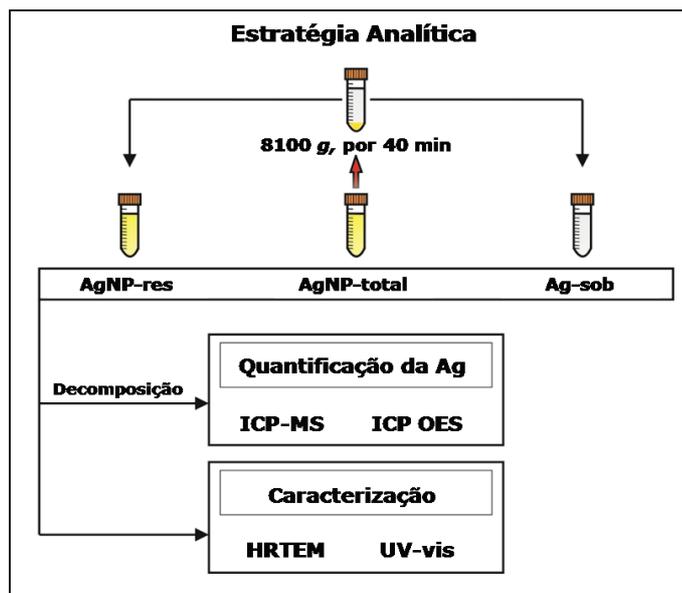
### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. Avaliação das AgNP e da solução de AgNO<sub>3</sub> empregadas no cultivo das plantas de soja

##### 3.1.1. Síntese e caracterização das AgNP, suas frações e da solução de AgNO<sub>3</sub>

As nanopartículas de prata (AgNP) utilizadas em todos os plantios foram produzidas pelo grupo do Professor Ítalo O. Mazali (Depto de Química Inorgânica – Instituto de Química – Unicamp). A síntese das AgNP foi realizada seguindo o método reportado por Lee e Meisel [34], a partir de uma solução aquosa de AgNO<sub>3</sub> na concentração de 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup>. A solução foi aquecida e mantida sob agitação constante até atingir a ebulição. Neste ponto, adicionou-se uma solução 1% (m/v) de citrato de sódio. O aquecimento e agitação foram mantidos até a solução adquirir coloração levemente amarela (aproximadamente 1 h). Posteriormente, interrompeu-se o aquecimento e a agitação foi mantida até o resfriamento da solução.

A solução de AgNP obtida após a síntese (AgNP-total) foi centrifugada por 40 minutos à 8100 g, condição otimizada para que fosse obtida uma linha base no espectro de UV-Vis do sobrenadante, garantindo que uma maior quantidade de nanopartícula fosse precipitada. O sobrenadante foi, então, separado do precipitado e transferido para um tubo falcon. Esta fração foi denominada como Ag-sob. O precipitado contendo as nanopartículas foi ressuspenso em citrato de sódio, e esta fração foi denominada AgNP-res. Todas as amostras, AgNP-total, Ag-sob e AgNP-res foram caracterizadas e quantificadas (n=3), em termos de prata, para avaliar a concentração do metal em cada uma destas frações (Figura 1.5) [35].



**Figura 1.5:** Estratégia analítica empregada para a quantificação de Ag e caracterização das amostras AgNP-total, AgNP-res e Ag-sob. Adaptado de Galazzi *et al.* (2016) [35].

Para a caracterização das AgNP, inicialmente foi obtido um espectro de absorção no UV-Vis da solução de AgNP em um espectrômetro de absorção UV-Vis (Agilent Cary probe 50) para observar a banda plasmon característica do metal. Os espectros foram obtidos diretamente do colóide após a síntese, usando o solvente como branco, neste caso água destilada. Em seguida, foram obtidas imagens em um microscópio JEOL JEM-3010 (300 kV, 1,7 Å de resolução) empregando a técnica de Microscopia Eletrônica de Transmissão de Alta Resolução (HRTEM, do inglês *High-Resolution Transmission Electron Microscopy*) para observar a cristalinidade das partículas e realizar contagem do tamanho médio das nanopartículas.

### 3.1.2. Quantificação de Ag nas AgNP, suas frações e na solução de $\text{AgNO}_3$

Este experimento foi realizado para garantir que em ambas as soluções (AgNP e  $\text{AgNO}_3$ ) fosse adicionado ao substrato de cultivo a mesma quantidade de Ag, bem como para avaliar o quanto da prata, de fato, está na forma de nanopartículas, após a síntese. Após a obtenção das frações, como descrito no item 3.1.1., todas as amostras, incluindo a de  $\text{AgNO}_3$ , foram submetidas à decomposição

ácida assistida por radiação micro-onda (n=3), empregando 2 mL de HNO<sub>3</sub> e 0,5 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, em quatro etapas: (1) 400 W @ 5 min; (2) 790 W @ 8 min; 320 W @ 4 min e (4) 0 W @ 3 min [35]. Após a decomposição, as amostras foram diluídas para 25 mL com água deionizada. Todas as diluições subsequentes foram realizadas com HNO<sub>3</sub> 0,2% (v/v). A Ag foi quantificada por meio de uma curva de calibração nas faixas de 0,5–20 e 10–250 µg L<sup>-1</sup>, empregando as técnicas de ICP-MS e ICP OES, respectivamente. Os parâmetros operacionais das medidas por ICP-MS (Tabela 1.1) e ICP OES (Tabela 1.2) podem ser observados abaixo.

**Tabela 1.1:** Condições operacionais das análises por ICP-MS, sem o emprego da cela de colisão/reação.

Parâmetro	Condição
m/z	<sup>107</sup> Ag <sup>+</sup>
V <sub>nebulização</sub>	0,85 L min <sup>-1</sup>
V <sub>auxiliar</sub>	1,2 L min <sup>-1</sup>
RF	1150 W

**Tabela 1.2:** Condições operacionais das análises por ICP OES.

Parâmetro	Condição
λ	Ag 328,068 nm
V <sub>nebulização</sub>	1,5 L min <sup>-1</sup>
V <sub>auxiliar</sub>	0,5 L min <sup>-1</sup>
RF	1150 W

### 3.2. Condução da cultura e avaliação das plantas

Devido à escassez na literatura sobre o tema em questão aplicado à cultura da soja, bem como à subjetividade no cultivo no que se refere à concentração final de Ag adicionada ao solo, optou-se por realizar um cultivo-teste

com uma concentração final de  $250 \text{ mg kg}^{-1}$  de Ag, tanto proveniente da solução de AgNP, quanto da solução de  $\text{AgNO}_3$  no substrato. O cultivo teve por objetivo avaliar o efeito da Ag em suas diferentes formas, a uma mesma concentração de Ag final no solo. O substrato utilizado é o mesmo que o grupo de trabalho GEPAM vem utilizando nos experimentos com soja, ou seja, 50 g de uma mistura 1:1 de substrato e vermiculita, sendo que foi utilizado o sistema de multivasos (com 48 células de plantio). O experimento controle, também contendo plantas transgênicas (T) e não-transgênicas (NT), foi avaliado da mesma maneira, porém, sem a adição de qualquer nanopartícula ou nitrato de Ag ao substrato.

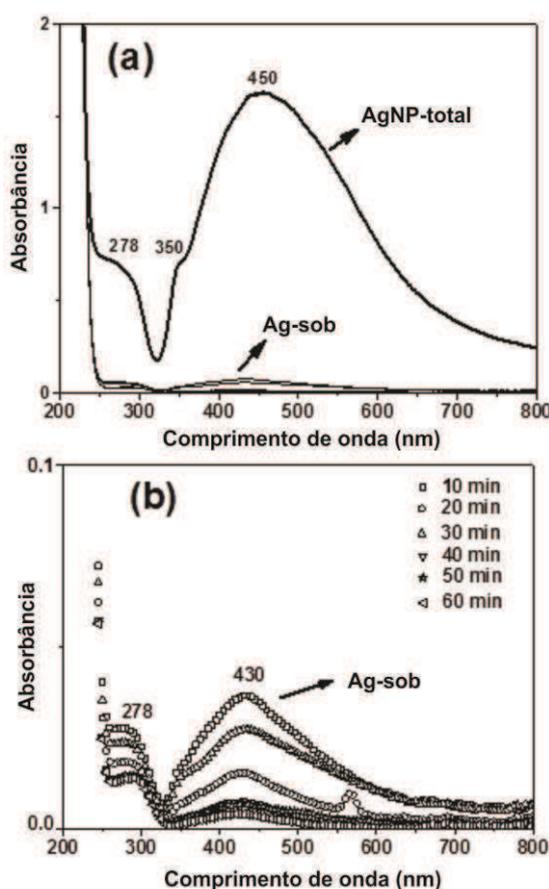
As sementes de soja [*Glycine max* (L.) Merrill] T (variedade M7211RR) e NT (variedade MSOY8200) foram gentilmente cedidas pela empresa Monsanto do Brasil. As sementes T são denominadas “Roundup Ready®” e apresentam tolerância ao glifosato. Inicialmente, essas sementes foram plantadas em solo apropriado. A cultura foi realizada em condições controladas em câmara de crescimento tipo BOD: com temperatura de  $27,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 12 h, durante 21 dias. Foram plantadas três sementes em cada vaso para garantir que cresceriam pelo menos uma planta em cada vaso. Nos primeiros sete dias de cultivo, as plantas NT e T de todos os grupos (controle, AgNP e  $\text{AgNO}_3$ ) foram cultivadas com água deionizada. Após esse período foi realizado o desbaste das plantas, deixando somente uma planta por vaso, no caso a mais desenvolvida entre as três inicialmente plantadas em 50 g de substrato. A partir do sétimo dia, iniciou-se a adição diária, até o 21º dia de cultivo (total de 14 dias), das soluções de AgNP e  $\text{AgNO}_3$  para as plantas tratadas e a adição diária de 15 mL de água deionizada para as plantas controle. Para as plantas tratadas com AgNP e  $\text{AgNO}_3$  foi adicionado uma quantidade de água para que o volume total diário adicionado (solução + água deionizada) fosse de 15 mL. Um total de cinco cultivos foi realizado, onde seis plantas de cada grupo foram obtidas em cada cultivo, representando um total de 30 plantas para cada grupo. Ao final do período, as plantas foram colhidas, separadas em partes (raiz, caule e folha) e armazenadas em freezer à  $-80^\circ\text{C}$ . Durante este procedimento foram estimadas as massas, bem como o comprimento das plantas dos diferentes grupos. Além disso, as plantas foram avaliadas durante todo o período de cultivo.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Estudo das AgNP e AgNO<sub>3</sub> empregados nos cultivos das sojas NT e T

#### 4.1.1. Caracterização das AgNP, suas frações e AgNO<sub>3</sub> por UV-Vis

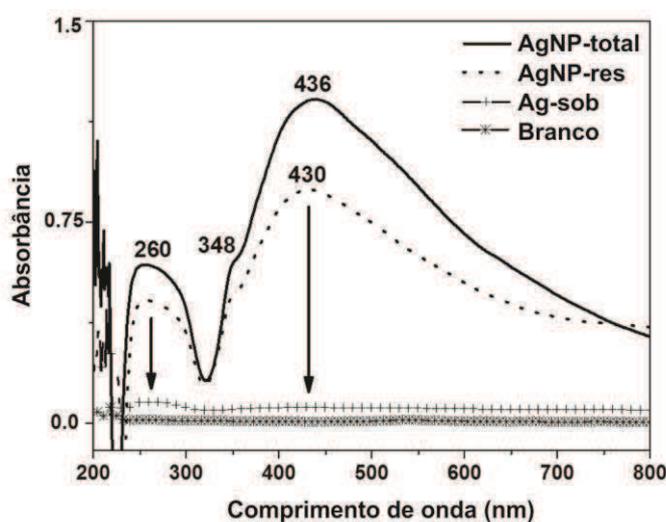
Após a síntese da solução AgNP-total, suas frações (AgNP-res e Ag-sob) foram avaliadas por meio de medidas no UV-Vis. Inicialmente, o tempo de centrifugação (a 8100 g) para AgNP-total foi otimizado avaliando o espectro UV-Vis da fração Ag-sob (Figura 1.6).



**Figura 1.6:** Espectro UV-Vis da solução AgNP-total e fração Ag-sob (a) e otimização do tempo de centrifugação da solução de AgNP-total (b). Adaptado de Galazzi *et al.* (2016) [35].

De acordo com o espectro desta fração, para o tempo de 40 min de

centrifugação é observado um sinal de linha-base, similar ao espectro da solução de nitrato de prata, neste caso, usada como branco. Este tempo de centrifugação garante uma maior quantidade de AgNP depositadas, com uma quantidade significativa de íons prata permanecendo no sobrenadante, bem como uma quantidade mínima de AgNP na fração Ag-sob. Após a otimização do tempo de centrifugação, os espectros UV-Vis para AgNP-total, AgNP-res e Ag-sob foram obtidos (Figura 1.7).



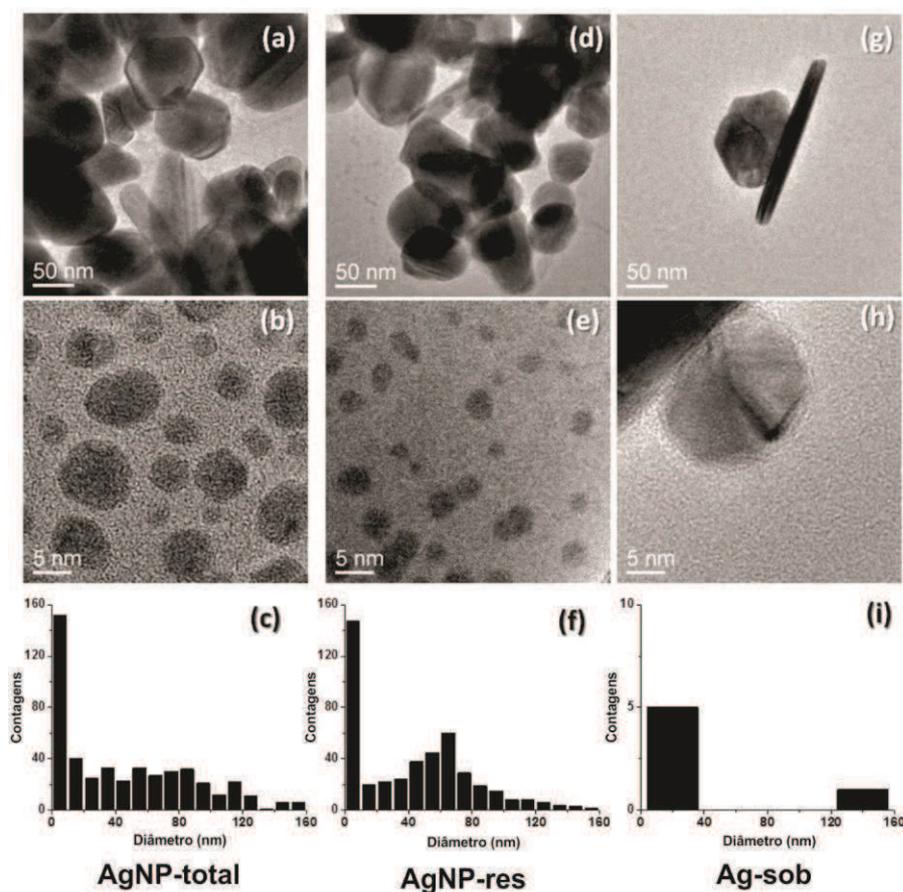
**Figura 1.7:** Caracterização da solução de AgNP-total e suas frações, AgNP-res e Ag-sob por UV-Vis. Adaptado de Galazzi *et al.* (2016) [35].

Os espectros das soluções AgNP-total e AgNP-res foram similares, com a banda plasmon aparecendo na mesma região (ca. 430 nm). Este resultado indica que o processo de centrifugação não modifica significativamente a morfologia das NPs resuspensas presentes na fração AgNP-res, em comparação com àquelas NPs presentes na solução pós-síntese (AgNP-total). Adicionalmente, pode-se observar na Figura 1.7 que há uma banda de absorção intensa (436 nm), devido à excitação da superfície plasmônica das AgNP presentes na solução AgNP-total. Além disso, no mesmo espectro, há uma banda menor em 348 nm, que pode ser atribuída à oscilação quadrupolar, uma vez que, ao serem excitados, os elétrons oscilam na partícula em comportamento similar a um dipolo, gerando um campo elétrico na

direção do dipolo, e resultando em uma determinada frequência de ressonância plasmon na superfície das AgNP [36-37]. Uma terceira banda, localizada em 260 nm, está relacionada à formação de agregados de Ag ou, até mesmo, AgNP ultra pequenas. Evidências da formação de espécies de Ag, tais como  $Ag_4^+$ , agregados  $Ag_n$  ( $n < 10$  átomos) e AgNP ultra pequenas (diâmetro  $< 5$  nm) podem ser observadas analisando o espectro de absorção UV-Vis da solução de AgNP-total. Entretanto, há poucos relatos na literatura que explicam este fato detalhadamente [38-41]. Estes tipos de estruturas não possuem propriedades metálicas, e, conseqüentemente, não contribuem para a banda plasmon da Ag na região do visível, como descrito por Linnert *et al.* [41]. A formação de AgNP ultra pequenas indica que os íons  $Ag^+$  presentes na solução de nitrato de prata não são totalmente reduzidos para formação das AgNP durante a síntese, ou seja, o rendimento da síntese das AgNP é inferior a 100%. Tal fato pode ser problemático quando a proposta é a aplicação direta da solução de AgNP-total, sem qualquer procedimento de purificação. Dependendo do tipo de aplicação, este fato pode significar um problema na interpretação e validação dos resultados, pois, a solução de AgNP pós-síntese (AgNP-total) contém diferentes espécies de prata, e não somente as AgNP.

#### 4.1.2. Caracterização das AgNP, suas frações e $AgNO_3$ por HRTEM

Para avaliar a morfologia e o tamanho médio das NPs em cada fração, foram obtidas imagens de AgNP-total, AgNP-res e Ag-sob empregando a técnica de HRTEM. Para o entendimento de cada solução, bem como para observar a cristalinidade, todas as amostras foram analisadas por microscopia eletrônica de transmissão, e as imagens representativas por HRTEM podem ser visualizadas na Figura 1.8.



**Figura 1.8:** Imagens obtidas por HRTEM e distribuição de tamanho das NPs para AgNP-total (a-c), AgNP-res (d-f) e Ag-sob (g-i). Adaptado de Galazzi *et al.* (2016) [35].

Nota-se que a solução AgNP-total apresenta morfologia esférica e uma estrutura de Ag em forma de bastão pode ser identificada (Figuras 1.8a e 1.8g). Esta estrutura é comumente formada em concentrações muito baixas quando se emprega o método de Lee e Meisel [34]. Apesar de ser obtida uma elevada concentração de AgNP plasmônicas, ca. 60 nm, uma grande quantidade de AgNP com tamanho inferior à 10 nm também pode ser visualizada nas imagens obtidas por HRTEM (Figuras 1.8b e 1.8e) e nos seus respectivos histogramas (Figuras 1.8c e 1.8f). Há, também AgNP ultra pequenas com diâmetros inferiores à 5 nm que não exibem propriedades plasmônicas, como discutido no item anterior. Nas contagens das NPs nas diferentes imagens de HRTEM, foi obtida uma distribuição de tamanho entre 1,3 e 158 nm para ambas as amostras, AgNP-total e AgNP-res, como mostrado na Figura 1.8.

Embora haja evidência da supressão da banda plasmon após a centrifugação durante 40 min, as imagens de HRTEM nas Figuras 1.8g e 1.8h mostram que é possível encontrar algumas partículas na fração Ag-sob. Entretanto, estas são observadas em quantidades muito pequenas (Figura 1.8i), requerendo uma extensiva análise por TEM para encontrá-las. As imagens obtidas por HRTEM confirmam os resultados obtidos por UV-Vis, corroborando que a deposição e separação das NPs presentes na solução de AgNP pós-síntese (AgNP-total) do sobrenadante, pela etapa de centrifugação, mantém a morfologia e o tamanho médio das NPs após a ressuspensão.

#### *4.1.3. Quantificação de Ag nas AgNP, em suas frações e na solução de AgNO<sub>3</sub>*

Para estudos que são realizados nas áreas de plantas, fármacos e medicinal é extremamente importante conhecer o conteúdo total de íons metálicos presente na solução de AgNP pós-síntese. Para avaliar a real concentração de prata na solução de AgNP pós-síntese e nas suas frações, foi realizada a determinação de prata na solução de AgNP-total, bem como em suas frações, AgNP-res e Ag-sob. Para isso, foi avaliada a quantidade de prata na forma de AgNP e como íons Ag<sup>+</sup> em ambas as frações (AgNP-res e Ag-sob), e, subsequentemente, na solução de AgNP pós-síntese (AgNP-total).

A fim de verificar a precisão dos resultados, duas técnicas de quantificação, ICP-MS e ICP OES, foram empregadas para a determinação de prata em cada amostra (AgNP-total, AgNP-res e Ag-sob), após decomposição assistida por radiação micro-ondas. As faixas lineares entre 0,1–20 e 10–250 µg L<sup>-1</sup> foram usadas para as medidas com ICP-MS e ICP OES, respectivamente.

Para a síntese das AgNP, foi utilizada uma solução 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> de AgNO<sub>3</sub> com citrato de sódio 1% (m/v). Considerando que as NPs são formadas a partir dos íons Ag<sup>+</sup>, espera-se que a concentração final de prata seja de 107,9 mg L<sup>-1</sup>, independente se na forma iônica ou como AgNP. Entretanto, devido ao aquecimento empregado durante o procedimento de síntese, a concentração total de prata na solução de AgNP pós-síntese (AgNP-total), pode variar. Comparando os resultados

obtidos após a quantificação da solução de AgNP-total com a concentração esperada, nota-se que o resultado encontrado está de acordo com o previsto, uma vez que foram obtidas recuperações entre 95 e 98% (Tabela 1.3).

A concentração total de prata na solução AgNP-total foi de  $104 \pm 8$  e  $100 \pm 2$  mg L<sup>-1</sup>, de acordo com as quantificações por ICP-MS e ICP OES, respectivamente. Em contraste com as imagens obtidas por HRTEM (Figura 1.4), em que uma pequena quantidade de partículas foram encontradas na fração Ag-sob, a quantidade de prata nesta fração foi de aproximadamente 50% do total presente na solução de AgNP pós síntese (AgNP-total). Isto indica que a prata está presente não somente na forma de AgNP, mas, também, na forma iônica. Adicionalmente, os outros 50% da quantidade de prata presentes na solução AgNP-total estão na forma de nanopartículas, de acordo com os resultados de determinação de prata na fração AgNP-res, ou seja,  $49 \pm 3$  e  $51 \pm 3$  mg L<sup>-1</sup> é a concentração real de AgNP, considerando a quantificação por ICP-MS e ICP OES, respectivamente.

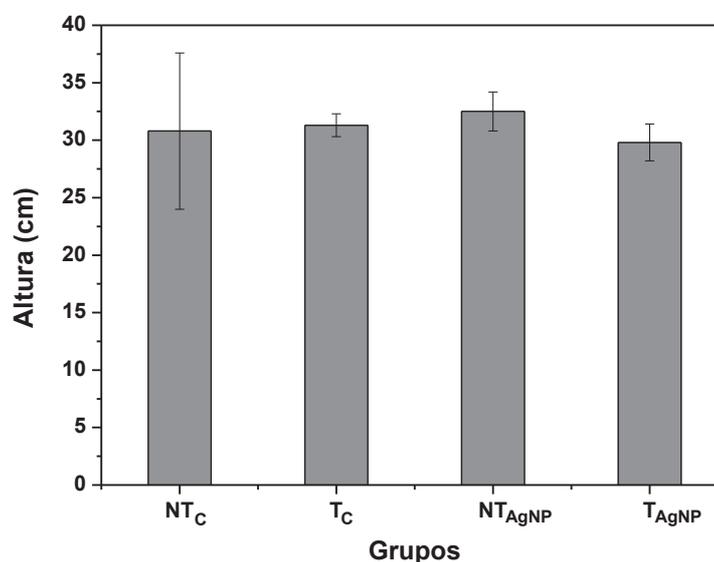
**Tabela 1.3:** Quantificação da solução AgNP-total e suas frações AgNP-res e Ag-sob.

Técnica	Solução	Concentração (mg L <sup>-1</sup> )	% na solução	Recuperação (%)
	AgNP-total	$104 \pm 8$		
ICP-MS	AgNP-res	$49 \pm 3$	50	$95 \pm 4$
	Ag-sob	$50 \pm 7$	50	
	AgNP-total	$100 \pm 2$		
ICP OES	AgNP-res	$51 \pm 3$	52	$98 \pm 1$
	Ag-sup	$47 \pm 2$	48	

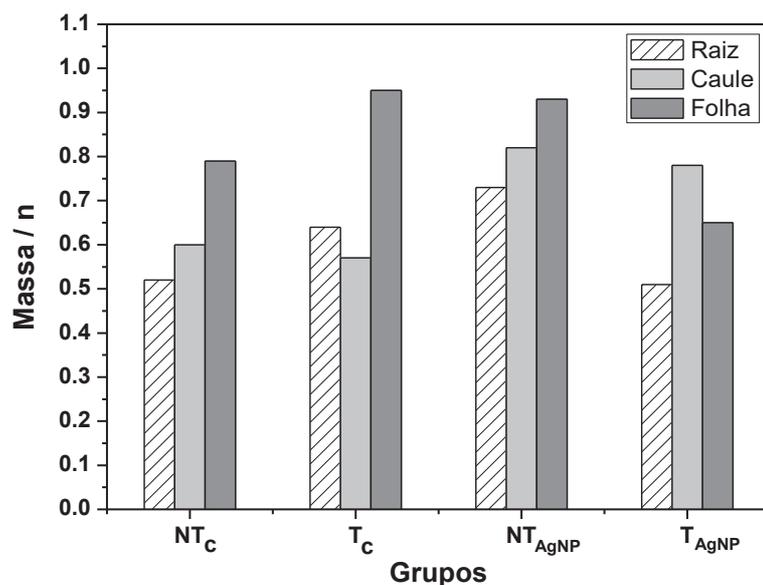
## 4.2. Avaliação das plantas durante e após o cultivo

### 4.2.1. Cultivo com $250 \text{ mg kg}^{-1}$ de Ag

Após a caracterização e quantificação das soluções de  $\text{AgNO}_3$  e AgNP por ICP-MS e ICP OES, iniciou-se o cultivo das plantas de soja. Considerando que não há qualquer informação no que diz respeito à concentração de Ag no cultivo de plantas de soja com AgNP e  $\text{AgNO}_3$ , um cultivo teste foi realizado inicialmente com uma elevada concentração de  $250 \text{ mg kg}^{-1}$  de Ag no substrato. Após o plantio, foram avaliados o comprimento (Figura 1.9) e a massa das plantas (Figura 1.10).



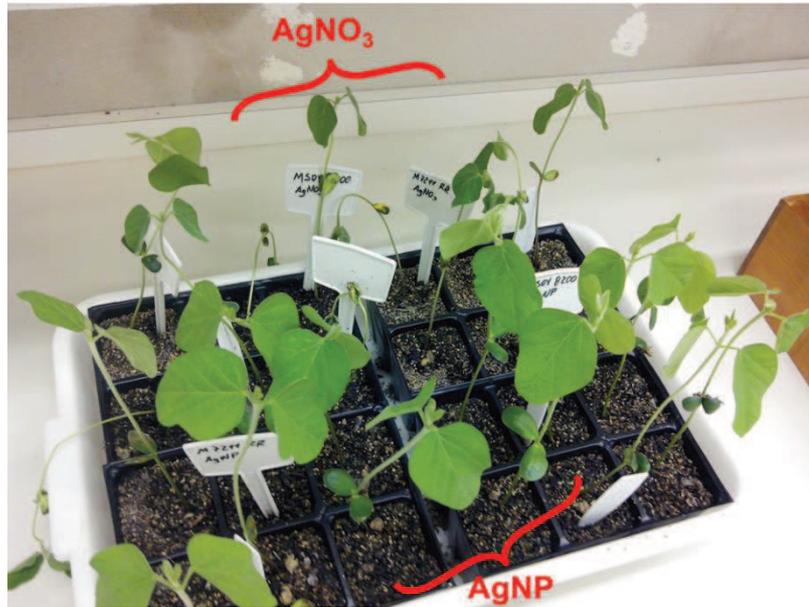
**Figura 1.9:** Comprimento das plantas de soja após 21 dias de cultivo (n=6).



**Figura 1.10:** Massas relativas das plantas de soja após 21 dias de cultivo, onde n representa o número de plantas.

De acordo com os resultados da Figura 1.9, nota-se que o tratamento com as AgNP não interferiu significativamente no crescimento das plantas. Entretanto, em termos de massa relativa, a soja NT, quando exposta às AgNP, aumentou a sua massa em comparação à soja NT controle. Já quando exposta ao tratamento com as AgNP, a soja T apresentou uma diminuição de massa em comparação à soja T controle (Figura 1.10).

A ausência de resultados para o cultivo realizado com  $\text{AgNO}_3$  se deve ao fato de que as plantas, tanto T quanto NT, não resistiram ao tratamento com essa solução a uma concentração final de  $250 \text{ mg kg}^{-1}$  de Ag no substrato. As plantas expostas à solução de  $\text{AgNO}_3$  ao longo do cultivo se desenvolveram menos do que as plantas expostas às AgNP (Figura 1.11). A partir do 13º dia de cultivo, as plantas de ambas as variedades NT e T, tratadas com  $\text{AgNO}_3$ , começaram a morrer, enquanto que as plantas NT e T sobreviveram ao cultivo com as AgNP (Figura 1.12).



**Figura 1.11:** Plantas de soja NT e T tratadas com  $\text{AgNO}_3$  e AgNP no 12º dia de cultivo.



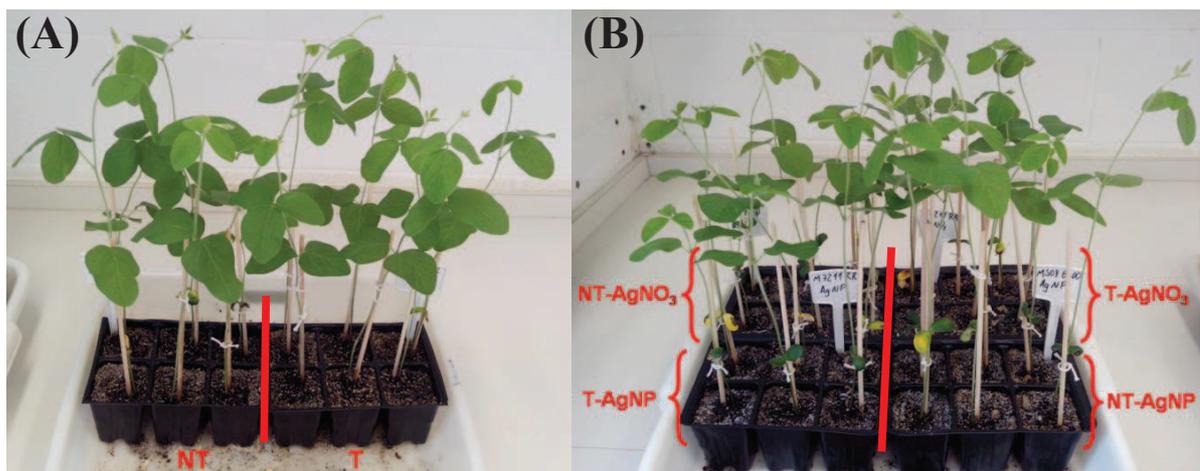
**Figura 1.12:** Comparação entre as plantas de soja NT e T tratadas com  $\text{AgNO}_3$  e AgNP no 13º dia de cultivo.

Essa diferença observada entre os tratamentos possivelmente se deve ao fato de, assim como em NPs compostas por outros elementos [25], a Ag estar mais disponível para ser absorvida pela planta, e, conseqüentemente, ser mais tóxica a uma mesma concentração, quando está na forma iônica ( $\text{AgNO}_3$ ) do que na forma de AgNP. Na forma iônica, o elemento pode ser mais facilmente absorvido e

translocado para as partes aéreas da planta, e, em níveis elevados, pode causar um estresse, como observado neste plantio-teste. Além disso, em um estudo que avaliou a toxicidade das AgNP em plantas, os autores consideraram que a toxicidade das AgNP no solo é baixa quando comparado com a Ag iônica [2]. Entretanto, pelos resultados obtidos fica evidente que as interações entre as AgNP e um organismo depende de diversos fatores, tais como espécie, modificação genética e condições de cultivo.

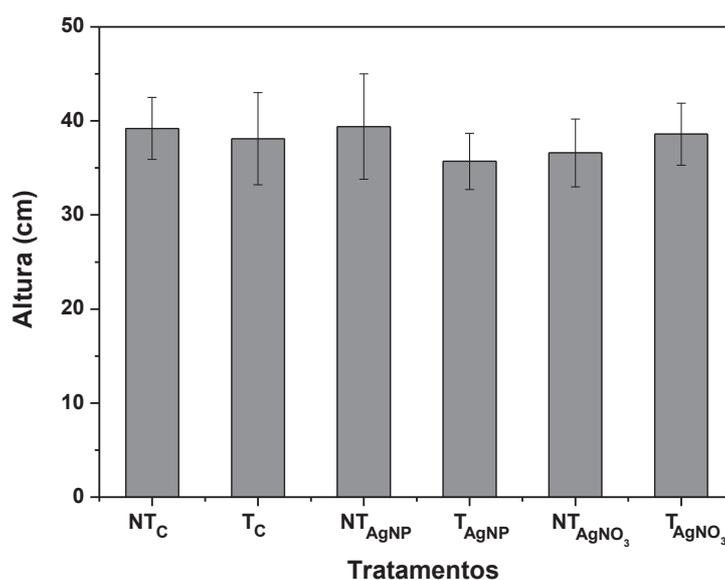
#### 4.2.2. Cultivos subsequentes com $50 \text{ mg kg}^{-1}$ de Ag

Após a realização do cultivo-teste com  $250 \text{ mg kg}^{-1}$  de Ag no solo, todos os demais cultivos foram realizados com uma concentração final de Ag no solo de  $50 \text{ mg kg}^{-1}$  ( $n=30$ ). Essa concentração foi escolhida de maneira que permitisse o desenvolvimento das plantas de ambos os cultivos, com AgNP e  $\text{AgNO}_3$ , para a posterior realização de um estudo comparativo, objetivo dessa Tese. Com exceção da quantidade diária de Ag adicionada, neste caso  $0,1786 \text{ mg}$  de Ag no solo ( $50 \text{ g}$ ), todas as demais condições de cultivo foram as mesmas daquelas empregadas no item 4.2.1. O fenótipo das plantas pode ser observado na Figura 1.13.

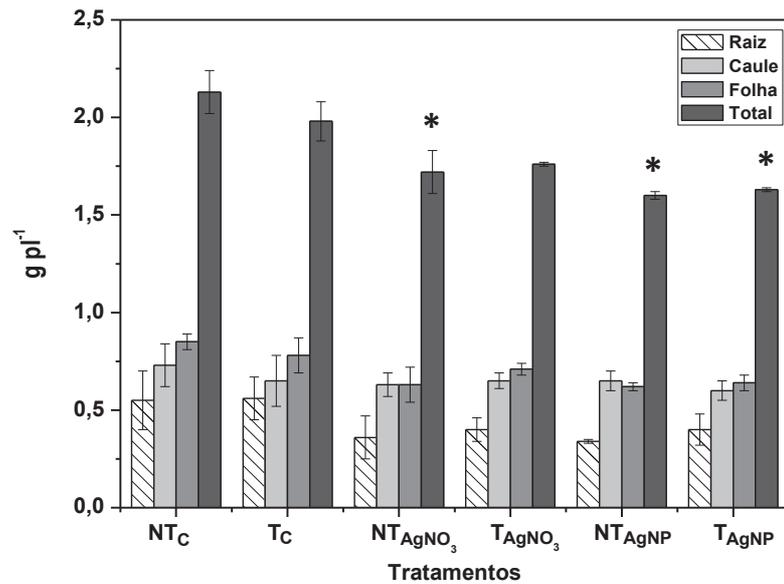


**Figura 1.13:** Cultivo das plantas de soja NT e T controle (A) e tratadas com  $\text{AgNO}_3$  e AgNP (B) após 21 dias de cultivo.

Os tratamentos com as soluções de AgNP e AgNO<sub>3</sub> não alteraram significativamente as plantas em termos de altura, como pode ser observado na Figura 1.14. Entretanto, por meio da Figura 1.15, nota-se que, para as plantas de soja NT, foram observadas mudanças significativas (teste de Tukey -  $p < 0,05$ ) nas massas das plantas tratadas com AgNP e AgNO<sub>3</sub>, que apresentaram uma diminuição de 25 e 19%, respectivamente, em comparação com as plantas controle. Já para as plantas T, apenas a exposição às AgNP apresentou alterações significativas (teste de Tukey -  $p < 0,05$ ), com uma diminuição de 18% da massa total das plantas de soja T tratadas em comparação com as plantas controle (Figura 1.15). Isso pode ser devido à translocação da Ag, causando, então, danos às plantas [42], ou até mesmo uma possível diminuição da absorção de alguns nutrientes devido à presença da Ag no substrato. Além disso, elementos não-essenciais para as funções biológicas, como por exemplo a Ag, estão relacionados a condições de estresse em organismos vivos, tais como as plantas [43].

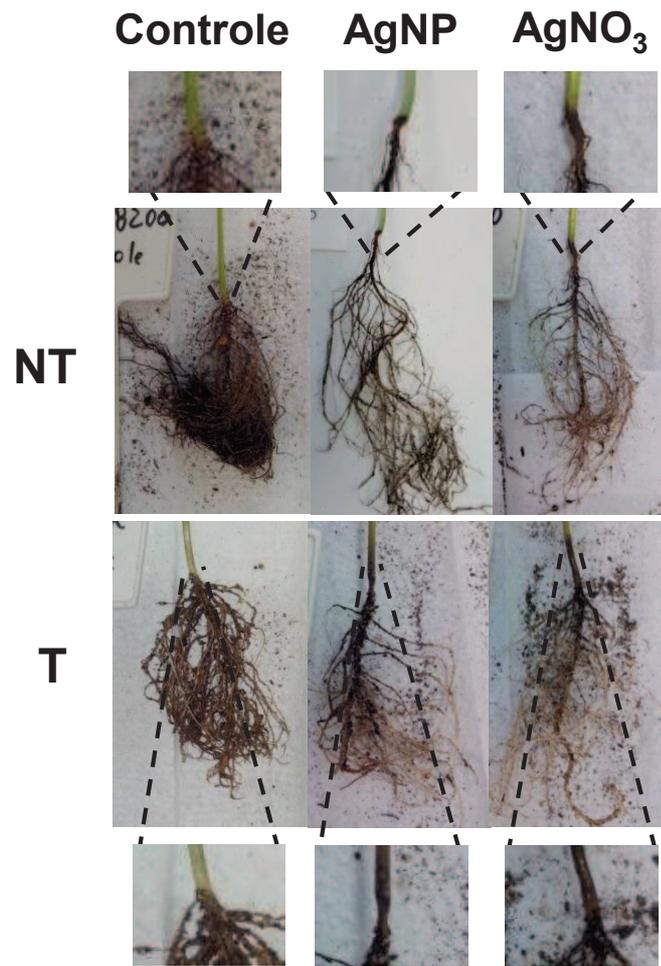


**Figura 1.14:** Comprimento das plantas de soja (n=30) NT e T após 21 dias de cultivo a uma concentração de 50 mg kg<sup>-1</sup>.

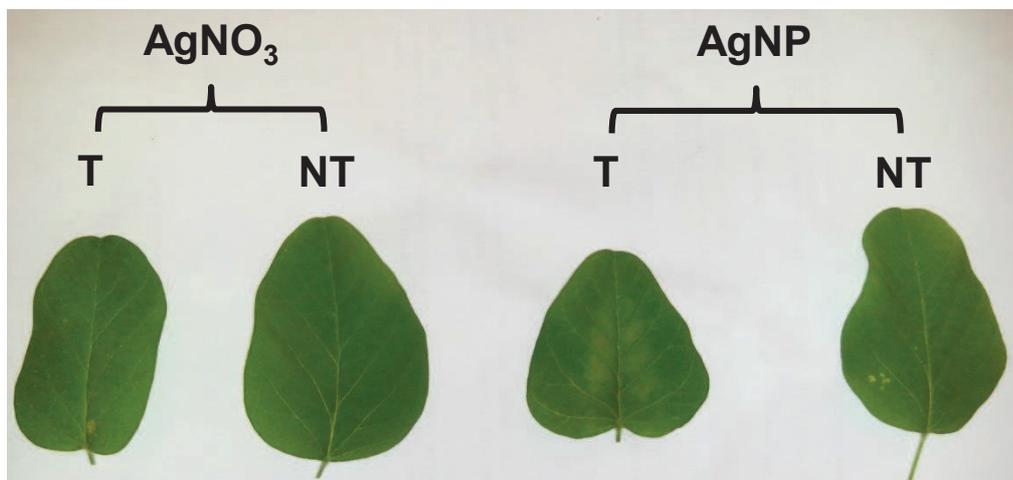


**Figura 1.15:** Massas relativas das plantas de soja (n=30) após 21 dias de cultivo. NT e T correspondem às plantas não transgênicas e transgênicas, respectivamente, enquanto que C, AgNP e AgNO<sub>3</sub>, correspondem às plantas controle e àquelas cultivadas na presença de nanopartículas de prata e de nitrato de prata a uma concentração de 50 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente. (\*) representa as diferenças significativas entre os tratamentos e os respectivos controles.

Ainda, no caso das AgNP, por se tratarem de uma solução coloidal, a presença de espécies coloidais em um solo pode alterar alguns aspectos, dentre eles a condutividade hidráulica das raízes, transpiração e crescimento foliar, causando, assim, efeitos subsequentes no desenvolvimento da planta [20]. De fato, para ambos os tratamentos com AgNP e AgNO<sub>3</sub>, foram visualizados efeitos tóxicos em nível macroscópico naquelas plantas de soja NT e T, como, por exemplo, menor desenvolvimento das raízes e o surgimento de áreas necróticas na parte basal dos caules (Figura 1.16), bem como áreas com algum dano ou clorose nas folhas das plantas tratadas (Figura 1.17).



**Figura 1.16:** Raízes e caules de soja NT e T, após 21 dias de cultivo.



**Figura 1.17:** Folhas de soja NT e T, após 21 dias de cultivo com AgNP ou AgNO<sub>3</sub>.

## 5. CONSIDERAÇÕES PARCIAIS

Considerando que a literatura, em muitos casos, não relata a concentração efetiva do metal na forma de nanopartícula, e que há uma subjetividade na condução do cultivo, principalmente em relação à concentração de Ag no substrato, optou-se por realizar, além dos experimentos tradicionais de caracterização de NPs, a quantificação da solução de NP pós-síntese (AgNP-total), bem como de suas frações, AgNP-res e Ag-sob. Com esta abordagem, pôde-se observar uma grande quantidade de prata na forma iônica no sobrenadante, indicando que metade da prata presente na solução de AgNP-total está na forma iônica. Nesse caso, se a solução de AgNP pós-síntese for diretamente aplicada em estudos envolvendo o cultivo de plantas, por exemplo, possivelmente as alterações observadas se devem aos efeitos sinérgicos provenientes das nanopartículas e dos íons  $\text{Ag}^+$ , também presentes na solução pós-síntese. Para que tal efeito sinérgico não ocorra, deve-se empregar a estratégia proposta neste trabalho, ou seja, separar as NPs do sobrenadante por centrifugação e quantificar cada fração para a aplicação somente das NPs na concentração desejada.

À princípio, por meio do cultivo-teste com  $250 \text{ mg kg}^{-1}$ , houve indícios de uma maior toxicidade da Ag na sua forma iônica do que na forma de AgNP, uma vez que quando na presença da solução de  $\text{AgNO}_3$ , ambas as sojas (NT e T) não resistiram ao cultivo, enquanto que aquelas cultivadas com as AgNP se desenvolveram. Então, os demais cultivos foram realizados com uma concentração de  $50 \text{ mg kg}^{-1}$  de Ag, objetivando um futuro estudo comparativo entre os grupos avaliados. Nestas condições, observaram-se a presença de áreas necróticas na base do caule, assim como áreas de clorose ou com algum dano nas folhas de todas as sojas NT e T cultivadas tanto com as AgNP quanto com o  $\text{AgNO}_3$ . Além disso, para as plantas de soja NT, foram observadas uma redução de 25 e 19% na massa total das plantas tratadas com AgNP e  $\text{AgNO}_3$ , respectivamente, em comparação com as plantas controle. Já para as plantas T, apenas a exposição às AgNP apresentou alterações significativas, com uma diminuição de 18% em sua massa total em comparação com as plantas T controle.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. S. C. C. Arruda, A. L. D. Silva, R. M. Galazzi, R. A. Azevedo, M. A. Z. Arruda, *Nanoparticles applied to plant science: A review*. **Talanta**, **2015**, *131*, 693-705.
2. W-M. Lee, J. I. Kwak, Y-J. An, *Effect of silver nanoparticles in crop plants Phaseolus radiatus and Sorghum bicolor: Media effect on phytotoxicity*. **Chemosphere**, **2012**, *86*, 491-499.
3. M. C. Roco, *Nanotechnology: convergence with modern biology and medicine*. **Curr. Opin. Biotechnol.**, **2003**, *14*, 337–346.
4. G. Ghodake, Y. D. Seo, D. S. Lee, *Hazardous phytotoxic nature of cobalt and zinc oxide nanoparticles assessed using Allium cepa*. **J. Hazard. Mater.**, **2011**, *186*, 952-955.
5. M. Rizwan, S. Ali, M.F. Qayyum, Y.S. Ok, M. Adrees, M. Ibrahim, M. Zia-ur-Rehman, M. Farid, F. Abbas, *Effect of metal and metal oxide nanoparticles on growth and physiology of globally important food crops: A critical review*. **J. Hazard. Mat.**, **2017**, *322*, 2–16.
6. L. Yin, B. P. Colman, B. M. McGill, J. P. Wright, E. S. Bernhardt, *Effects of silver nanoparticle exposure on germination and early growth of eleven wetland plants*. **PLoS ONE**, **2012**, *7*, 1-7.
7. A. Tripathy, A. M. Raichur, N. Chandrasekaran, T. C. Prathna, A. Mukherjee, *Process variables in biomimetic synthesis of silver nanoparticles by aqueous extract of Azadirachta indica (Neem) leaves*. **J. Nanopart. Res.**, **2010**, *12*, 237–246.
8. A. Nabikhan, K. Kandasamy, A. Raj, N. M. Alikunhi, *Synthesis of antimicrobial silver nanoparticles by callus and leaf extracts from saltmarsh plant, Sesuvium portulacastrum L.* **Colloids Surf., B**, **2010**, *79*, 488–493.
9. C. J. Brinker, G. W. Scherer, *Sol-Gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*. Elsevier, California, **1990**.

10. R.J. Aitken, M. Q. Chaudhry, A. B. A. Boxall, M. Hull, *Manufacture and use of nanomaterials: current status in the UK and global trends*. **Occup. Med.**, **2006**, *56*, 300–306.
11. M. A. Z. Arruda, R. M. Galazzi, B. K. De Campos, M. A. Herrera-Agudelo, S. C. C. Arruda, R. A. Azevedo, Soybean as a Food Source: Comparative Studies Focusing on Transgenic and Nontransgenic Soybean, in: *Genetically Modified Organisms in Food*, R. R. Watson; V. R. Preedy, Eds. Elsevier Inc., **2016**, pp 3-10.
12. T. Yamada, K. Takagi, M. Ishimoto, *Recent advances in soybean transformation and their application to molecular breeding and genomic analysis*. **Breed. Sci.**, **2012**, *61*, 480–494..
13. SoyStats, The American Soybean Association. Disponível em: <<http://www.soystats.com/>>. Acessado em: 08 de maio de 2017.
14. S. S. Natarajan, *Natural variability in abundance of prevalent soybean proteins*. **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, **2010**, *58*, S26–S29..
15. K. Çavusoglu, K. Yapar, E. Oruç, E. Yalçın, *Protective effect of Ginkgo biloba L. leaf extract against glyphosate toxicity in Swiss albino mice*. **J. Med. Food**, **2011**, *14*, 1263–1272.
16. L. R. V. Mataveli, *Metalômica comparativa de soja [Glycine max (L.) Merrill] transgênica e não-transgênica utilizando sistema multidimensional de separação*. Tese de Doutorado, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, **2013**, pp.154.
17. H. S. Barbosa, S. C. C. Arruda, R. A. Azevedo, M. A. Z. Arruda, *New insights on proteomics of transgenic soybean seeds: evaluation of differential expressions of enzymes and proteins*. **Anal. Bioanal. Chem.**, **2012**, *402*, 299-314.
18. L. R. V. Mataveli, P. Pohl, S. Mounicou, M. A. Z. Arruda, J. Szpunar, *A comparative study of element concentrations and binding in transgenic and non-transgenic soybean seeds*. **Metallomics**, **2010**, *2*, 800–805.
19. C. Ma, J. C. White, O. P. Dhankher, B. Xing, *Metal-based nanotoxicity and*

*detoxification pathways in higher plants. Environ. Sci. Technol.* **2015**, *49*, 7109–7122.

20. S. Asli, P. M. Neumann, *Rhizosphere humic acid interacts with root cell walls to reduce hydraulic conductivity and plant development. Plant Soil*, **2010**, *336*, 313–322..

21. S. P. C. Gonçalves, M. Strauss, F. S. Delite, Z. Clemente, V. L. Castro, D. S. T. Martinez, *Activated carbon from pyrolysed sugarcane bagasse: Silver nanoparticle modification and ecotoxicity assessment. Sci. Total. Environ.*, **2016**, *565*, 833–840.

22. C. S. Patricia, G.-V. Nerea, U. Erik, S. M. Elena, B. Eider, D. M. W. Darío, S. Manu, *Responses to silver nanoparticles and silver nitrate in a battery of biomarkers measured in coelomocytes and in target tissues of Eisenia fetida earthworms. Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **2017**, *141*, 57–63.

23. M. E. Akerman, W. C. Chan, P. Laakkonen, S. N. Bhatia, E. Ruoslahti, *Nanocrystal targeting in vivo. Proc. Natl. Acad. U.S.A.*, **2002**, *99*, 12617–12621.

24. A. Hoshino, K. Fujioka, T. Oku, S. Nakamura, M. Suga, Y. Yamaguchi, K. Suzuki, M. Yasuhara, *Nanocrystal targeting in vivo. Microbiol. Immunol.*, **2004**, *48*, 985–994.

25. E. Domokos-Szabolcsy, L. Marton, A. Sztrik, B. Babka, J. Prokisch, M. Fari, *Accumulation of red elemental selenium nanoparticles and their biological effects in Nicotiniatabacum. Plant Growth Regul.*, **2012**, *68*, 525–531.

26. K. G. Suzuki, T. K. Fujiwara, M. Edidin, A. Kusumi, *Dynamic recruitment of phospholipase C $\gamma$  at transiently immobilized GPI-anchored receptor clusters induces IP<sub>3</sub>–Ca<sup>2+</sup> signaling: single-molecule tracking study 2. J. Cell Biol.*, **2007**, *177*, 731–742.

27. J. Ying, *Nanostructured Materials*, Elsevier, California, **2001**.

28. F. Mirzajani, H. Askari, S. Hamzelou, M. Farzaneh, A. Ghassempour, *Effect of silver nanoparticles on Oryza sativa L. and its rhizosphere bacteria. Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **2013**, *88*, 48–54.

29. C. Larue, J. Laurette, N. Herlin-Boime, H. Khodja, B. Fayard, A.M. Flank, F. Brisset, M. Carriere, *Accumulation, translocation and impact of TiO<sub>2</sub> nanoparticles in wheat (*Triticum aestivum* spp.): influence of diameter and crystal phase*. **Sci. Total Environ.**, **2012**, 431, 197–208.
30. M. E. Vance, T. Kuiken, E. P. Vejerano, S. P. McGinnis, M. F. Hochella Jr., D. Rejeski, M. S. Hull, *Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory*. **Beilstein J. Nanotechnol.**, **2015**, 6, 1769–1780.
31. R. R. R. Sardari, S. R Zarchi, A. Talebi, S. Nasri, S. Imani, A. Khoradmehr, R. Sheshde, *Toxicological effects of silver nanoparticles in rats*. **Afric. J. Microbiol. Res.**, **2012**, 6, 5587-5593.
32. S. M. Hussain, K. L. Hess, J. M. Gearhart, K. T. Geiss, J. J. Schlager, *In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells*. **Toxicol. In Vitro**, **2005**, 19, 975-983.
33. L. Yue, C. Ma, X. Zhan, J. C. White, B. Xing, *Molecular mechanisms of maize seedling response to La<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP exposure: water uptake, aquaporin gene expression and signal transduction*. **Environ. Sci. Nano**, **2017**, 4, 843-855.
34. P. C. Lee, D. Meisel, *Adsorption and Surface-Enhanced Raman of dyes on silver and gold sols*. **J. Phys. Chem.**, **1982**, 86, 3391-3395.
35. R. M. Galazzi, E. B. Santos, T. Caurin, G. S. Pessôa, I. O. Mazali, M. A. Z. Arruda, *The importance of evaluating the real metal concentration in nanoparticles post-synthesis for their applications: A case-study using silver nanoparticles*. **Talanta**, **2016**, 146, 795-800.
36. D. D. Evanoff, G. Chumanov, *Synthesis and optical properties of silver nanoparticles and arrays*. **Chem. Phys. Chem.**, **2005**, 6, 1221-1231.
37. K. Kim, J. Y. Choi, H. B. Lee, K. S. Shin, *Raman scattering of 4-aminobenzenethiol sandwiched between Ag nanoparticle and macroscopically smooth Au substrate: Effects of size of Ag nanoparticles and the excitation wavelength*. **J. Chem. Phys.**, **2011**, 135, 124705.

38. A. Henglein, *Non-metallic silver clusters in aqueous solution: stabilization and chemical reactions*. **Chem. Phys. Lett.**, **1989**, *154*, 473–476.
39. Y. W. Ma, Z. W. Wu, L. H. Zhang, J. Zhang, G. S. Jian, S. Pan, *Theoretical study of the local Surface Plasmon Resonance properties of silver nanosphere clusters*. **Plasmonics**, **2013**, *8*, 1351-1360.
40. E. B. Santos, N. V. Madalossi, F. A. Sigoli, I. O. Mazali, *Silver nanoparticles: green synthesis, self-assembled nanostructures and their application as SERS substrates*. **New J. Chem.**, **2015**, *39*, 2839-2846.
41. T. Linnert, P. Mulvaney, A. Henglein, H. Weller, *Long-lived nonmetallic silver clusters in aqueous solution: preparation and photolysis*. **J. Am. Chem. Soc.**, **1990**, *112*, 4657–4664.
42. L. Marchiol, A. Mattiello, F. Pošćić, C. Giordano, R. Musetti, *In vivo synthesis of nanomaterials in plants: location of silver nanoparticles and plant metabolism*. **Nanoscale Res. Lett.**, **2014**, *9*, 1-11.
43. C. A. Lopes Júnior, P. Mazzafera, M. A. Z. Arruda, *A comparative ionic approach focusing on cadmium effects insunflowers (Helianthus annuus L.)*. **Environ. Exp. Bot.**, **2014**, *107*, 180-186.

**CAPÍTULO 2**

**Estudo proteômico e enzimático das folhas de soja NT e T após cultivo com  
AgNP e AgNO<sub>3</sub>**

## **1. OBJETIVO**

Avaliar, em nível proteômico e enzimático, as plantas de soja transgênica e não-transgênica após o cultivo com AgNP e AgNO<sub>3</sub>.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Preparo de amostras vegetais para a análise de proteínas empregando eletroforese bidimensional**

Considerando que as proteínas desempenham importante papel em inúmeros processos fisiológicos nas plantas, informações, tais como identidade, concentração, função, entre outros, contribuem para uma melhor compreensão do funcionamento do complexo maquinário bioquímico das plantas. A célula vegetal apresenta milhares de proteínas distintas que variam em faixa de concentração, e, normalmente, aquelas de interesse se encontram em menor abundância [1]. Além disso, outras importantes espécies como açúcares, lipídios, metabólitos secundários, entre outros, também fazem parte da composição vegetal [1-2].

Dessa forma, o preparo de amostra empregando diferentes tipos de estratégias para a redução da complexidade da matriz vegetal é determinante para a extração e posterior análise das proteínas presentes nesse tipo de amostra. Nesse contexto, um método de extração ideal é aquele que é capaz de extrair o maior número possível de proteínas da amostra de maneira reprodutível, minimizando a presença de moléculas interferentes [3-4]. Devido às particularidades e complexidade das amostras vegetais, não há necessariamente um procedimento padrão para a extração das proteínas, sendo os protocolos já existentes adaptados conforme a característica de cada amostra [4].

De maneira geral, a primeira etapa dos protocolos consiste na ruptura celular, por meio do emprego dos mais variados métodos físicos, dentre eles maceração, ultrassom e radiação micro-onda, ou procedimentos alternativos utilizando detergentes na extração das proteínas devido ao aumento da solubilidade das mesmas. Posteriormente, as etapas seguintes objetivam a extração e preservação das proteínas de interesse com concomitante depleção dos interferentes, inclusive proteínas majoritárias. Com o exposto, para cada amostra, deve-se considerar as propriedades físico-químicas das proteínas para a otimização do protocolo de extração. Usualmente nesses procedimentos, alguns reagentes tais como ditioneitol (DTT) e agentes caotrópicos (uréia e tiouréia) são empregados para desenovelar as proteínas, por meio da ruptura de interações e ligações dissulfeto, aumentando a interação destas com o meio extrator [5]. Por fim, considerando que tecidos vegetais apresentam elevado conteúdo de proteases, a etapa de preservação das proteínas é de extrema importância para a obtenção de resultados adequados. Nesse sentido, a adição de inibidores de protease, dentre eles o fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) e o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), minimiza a degradação das proteínas extraídas no decorrer das etapas do preparo de amostra [4].

Uma vez que essa Tese consiste no estudo proteômico das folhas de soja, os procedimentos de extração empregando o fenol apresentam uma melhor separação e purificação das proteínas, mesmo aquelas apresentando baixa concentração [3, 6]. Além disso, o uso de fenol pode evitar a formação de complexos indesejados, tais como lignina, carboidratos, lipídios e polissacarídeos que interferem negativamente na separação das proteínas [3, 7]. Além disso, o uso de fenol no procedimento pode aumentar o rendimento da extração de proteínas [3, 8].

Nesse sentido, Gao *et al.* (2016) avaliaram diferentes métodos de extração para a posterior análise proteômica de alga verde. Dentre os métodos considerados, aqueles que empregaram fenol permitiram a identificação de um maior número de proteínas de alga verde. Nesse mesmo estudo, além de um maior número de proteínas, o protocolo de extração, combinando fenol, ácido tricloroacético (TCA, do inglês *trichloroacetic acid*) e acetona, resultou em uma melhor resolução de separação [3]. Adicionalmente, procedimentos utilizando um

excesso de fenol vêm sendo empregados com sucesso para a extração de proteínas de plantas, e posterior análise por eletroforese em gel e espectrometria de massas [8-10].

## **2.2. Separação e análise de proteínas por eletroforese em gel e espectrometria de massas**

Como mencionado no Capítulo 1, inúmeras técnicas de separação, quantificação e identificação são empregadas para as mais diversas finalidades, dentre elas estudar possíveis mudanças no proteoma de diversos organismos biológicos, modificados geneticamente ou sob o cultivo com metais. Tal tipo de abordagem é extremamente importante, pois, permite avaliar as proteínas em um universo específico, fornecendo informação acerca das respostas de um organismo, quando submetido a qualquer alteração [11-15].

Em um trabalho realizado por Sussulini *et al.* (2007), compararam-se sementes de soja transgênica e não-transgênica em um estudo metalômico. Inúmeras proteínas encontradas para ambos os tipos de semente foram separadas por 2-D PAGE, e, posteriormente, um conjunto de oito delas foram selecionadas aleatoriamente e identificadas por espectrometria de massas do tipo MALDI-QTOF (MALDI-QTOF-MS, do inglês *matrix-assisted laser desorption-ionization quadrupole-time of flight mass spectrometry*). Além disso, entre os tipos de soja, foram observados três diferentes *spots* em termos de concentração de cobre e ferro, devido, possivelmente, à modificação genética [13].

O emprego da técnica de 2-D PAGE também foi descrito por Brandão *et al.* (2010), onde foi realizada uma análise proteômica comparativa entre sementes de soja transgênica e não-transgênica. Foram observadas que 10 proteínas apresentaram abundâncias diferentes em uma comparação entre os dois tipos de sementes. Os autores também sugerem que as diferentes concentrações de cobre e ferro entre as sojas transgênica e não-transgênica podem estar associadas à modificação genética [16].

A técnica de 2-D DIGE é uma alternativa promissora em comparação a 2-

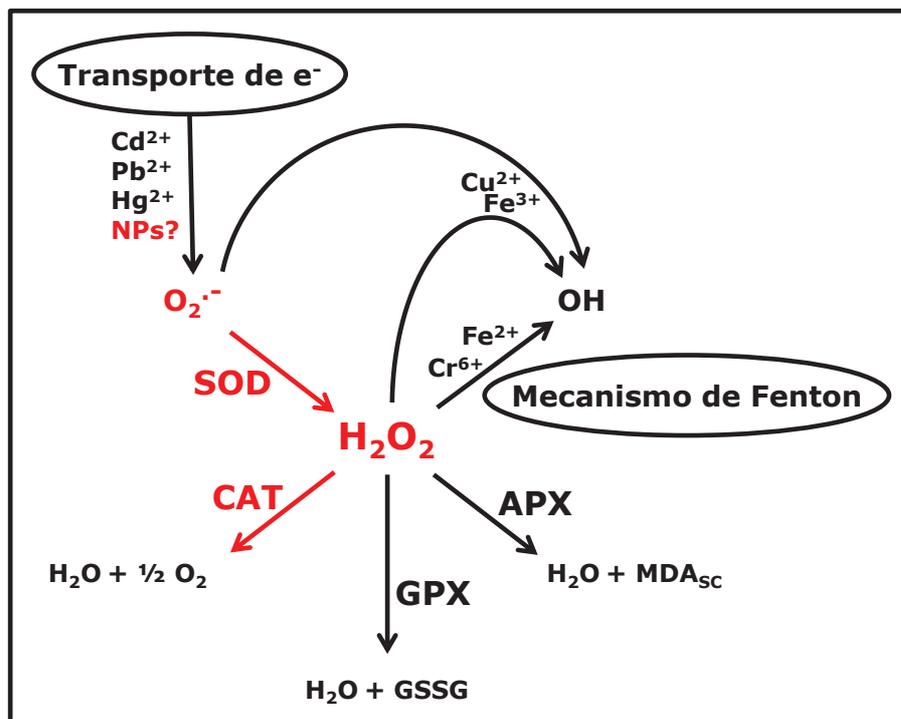
D PAGE, uma vez que minimiza algumas limitações no que se refere à reprodutibilidade e na dificuldade em se realizar medições precisas das proteínas resolvidas em géis de 2-D PAGE. Isso ocorre, pois a 2-D DIGE é uma técnica que consiste no emprego de corantes fluorescentes de cianina, que permite fazer comparações proteômicas exatas entre duas amostras, as quais são resolvidas no mesmo gel, minimizando os problemas já mencionados [17]. Nesse sentido, Barbosa *et al.* (2012) empregaram a técnica 2-D DIGE em um estudo proteômico comparativo entre sementes de soja transgênica e não transgênica. Na análise comparativa da imagem dos géis, foram encontrados quatro spots com intensidades diferentes, indicando que quatro proteínas estavam com diferentes abundâncias entre as amostras de soja, devido, possivelmente, à modificação genética que foi confirmada após a identificação da proteína característica da modificação, a *cp4* EPSPS. Ainda, por meio da combinação das técnicas de 2-D PAGE com espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF-MS (do inglês matrix-assisted laser desorption-ionization time of flight mass spectrometry) e cromatografia líquida acoplada com espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS, do inglês liquid chromatography sequential mass spectrometry), foram identificadas 192 proteínas para a semente de soja transgênica [12].

Natarajan *et al.* (2010) avaliaram a variabilidade natural na abundância de proteínas predominantes em sementes de soja geneticamente modificada. Para a separação, quantificação e identificação das diferentes classes de proteínas da semente foram empregadas as técnicas de 2-D PAGE, MALDI-TOF-MS e LC-MS. Naquele estudo, foram observadas variações significativas nas diferentes classes de proteínas entre a soja transgênica e não-transgênica, alertando para a questão da variação na abundância das proteínas de soja não estar dentro de um intervalo de variação natural [11].

### **2.3. Estudo enzimático para avaliação de estresse oxidativo**

Espécies reativas de oxigênio (ROS), dentre elas radicais superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), oxigênio singlete ( $^1O_2$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radicais hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ), entre outros, podem ser produzidas em excesso pelas células das plantas sob

condições de estresse oxidativo, devido à exposição por metal/metaloide e NPs [18-21]. Para prevenir os danos causados pelo estresse oxidativo, os níveis de ROS devem ser controlados por espécies antioxidantes, incluindo enzimas, tais como a catalase (CAT) e a superóxido dismutase (SOD) (Figura 2.1) [18]. De maneira geral, um aumento na atividade das enzimas antioxidantes é observado sob condições de estresse, sendo que a resposta do organismo depende de diversos fatores, dentre eles a espécie de planta estudada e o tipo de metal/metaloide ou NPs empregados durante o cultivo [18-19, 22]. Nesse sentido, alguns trabalhos relatam alterações nas atividades enzimáticas em respostas aos possíveis efeitos tóxicos causados pelos mais diversos tipos de estresse, inclusive NPs [18-19, 23].



**Figura 2.1:** Geração de ROS devido à presença de metais e nanopartículas. Adaptado de Benavides *et al.* (2005) [24].

Um estudo comparativo realizado por Amist *et al.* (2017), avaliou o efeito do alumínio na forma iônica (Al<sup>3+</sup>) e das nanopartículas de óxido de alumínio (AINP) no crescimento e metabolismo das mudas de repolho. Um aumento na atividade das

enzimas antioxidantes, dentre elas SOD, CAT e peroxidase (POX) foi observado para todas as plantas dos grupos tratados, especialmente as expostas ao  $\text{Al}^{3+}$ . Sendo assim, embora as AINP sejam menos tóxicas, os autores constataram que ambas as formas, iônica e NPs, em elevada concentração, são tóxicas para as plantas de repolho [23].

Tarrahi *et al.* (2017) investigaram a toxicidade das nanopartículas de selênio (SeNP) e de sua forma iônica ( $\text{Se}^{4+}$ ) em uma espécie de planta aquática (*Lemna minor*). Os autores verificaram uma redução no crescimento das plantas e dos pigmentos fotossintéticos, enquanto que foi observado um aumento na peroxidação lipídica, do conteúdo de flavonoides e fenóis totais. Adicionalmente, a atividade das enzimas POX e CAT foi alterada, enquanto que a atividade da SOD não foi significativamente afetada. O  $\text{Se}^{4+}$  apresentou elevada toxicidade para as plantas, e, dessa forma, os autores concluíram que a liberação dos íons pode ser a principal razão para a toxicidade das NPs [25].

#### **2.4. Estudos proteômicos na avaliação dos efeitos das nanopartículas em plantas**

Apesar da pouca informação referente aos possíveis efeitos adversos das NPs, em termos de alterações no proteoma das plantas, há na literatura alguns estudos que apontam sobre tais mudanças [26, 27]. De maneira geral, os estudos referentes a esse tópico se limitam a monitorar a translocação das NPs ou do metal vinculado a essas NPs, bem como avaliar os efeitos tóxicos em termos de fisiologia e desenvolvimento das plantas. Todavia, não há qualquer relato sobre as alterações que podem ocorrer no proteoma da folha das plantas de soja NT e T após o cultivo com AgNP. Considerando esse *status* de fitotoxicidade das NPs, necessita ser investigado o mecanismo molecular da soja afetada pelas NPs [28].

Nesse sentido, Mustafa *et al.* (2016) realizaram um estudo proteômico de raízes de soja que foram expostas às AgNP durante crescimento em condições de estresse. De maneira geral, o número de proteínas relacionadas à síntese de proteínas diminuiu, enquanto que o número de proteínas relacionadas ao

metabolismo de aminoácidos foi aumentado devido ao tratamento com as AgNP. As NPs de maior tamanho, entre 50 e 80 nm, afetaram principalmente as proteínas relacionadas ao citosol, plastídio e mitocôndria. Todavia, as AgNP de 15 nm promoveram o crescimento da soja em condições de estresse, e resultaram em um aumento na abundância das proteínas ribossomais e daquelas relacionadas ao metabolismo de aminoácidos [27].

Yasmeen *et al.* (2016) realizaram uma análise proteômica quantitativa para investigar os efeitos das AINP na recuperação da soja após o crescimento sob condições de estresse. O percentual de sobrevivência foi aumentado e um melhor desenvolvimento das raízes foi observado a uma concentração de 50 ppm de AINP durante o período de recuperação. Adicionalmente, uma maior abundância das proteínas, relacionadas à síntese de proteínas, e ao estresse, foi encontrada nas condições de crescimento na presença ou ausência das AINP [26].

Uma avaliação da toxicidade das AgNP em plantas de arroz (*Oryza sativa* L.), a partir de um ponto de vista proteômico, foi conduzida por Mirzajani *et al.* (2013) [29]. Para tal tarefa, tanto a separação, quanto a análise das proteínas foram realizadas por 2-D PAGE e espectrometria de massas. As diferentes concentrações de AgNP resultaram na acumulação de precursores de proteínas, indicando a dissipação da força motriz protônica, que está relacionada com o armazenamento de energia. Além disso, as proteínas identificadas estão envolvidas na regulação e sinalização de  $Ca^{2+}$ , transcrição e degradação protéica, divisão celular, apoptose, parede celular e dano direto no DNA/RNA. De acordo com os autores, as AgNP interagem com os processos metabólicos celulares normais, tais como a síntese/degradação de proteínas e apoptose, possivelmente penetrando na célula e inibindo a reprodução celular normal. Por fim, o incremento das enzimas envolvidas no processo de detoxificação implica em um impacto tóxico a partir da produção de ROS e toxicidade do metal na presença das AgNP.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. Estudo proteômico comparativo das folhas de soja

##### 3.1.1. Extração e quantificação das proteínas das folhas de soja

Aproximadamente 1,0 g de um *pool* de cada amostra foi congelado e triturado com nitrogênio líquido em almofariz. Em seguida, as proteínas foram extraídas das folhas de soja (n=3) seguindo um procedimento realizado anteriormente por Silva *et al.* (2010) [6]. De maneira geral, para 1,0 g de *pool* de amostra, a extração foi realizada empregando 4,0 mL de um tampão extrator, saturado com fenol, composto por 0,7 mol L<sup>-1</sup> de sacarose, 50 mmol L<sup>-1</sup> de EDTA dissódico, 0,1 mol L<sup>-1</sup> KCl, 10 mmol L<sup>-1</sup> de tiouréia, 50 mmol L<sup>-1</sup> de DTT e 2 mmol L<sup>-1</sup> de PMSF em 2-propanol, diluídos com 0,5 mol L<sup>-1</sup> de tris-HCl em pH 7,5. Em seguida, para a precipitação das proteínas contidas na fase fenólica, foram adicionados, a cada 1,0 mL de amostra, 5,0 mL acetato de amônio 0,1 mol L<sup>-1</sup> em metanol durante 12 horas à -20 °C. Após esse período, o precipitado foi lavado três vezes com acetato de amônio 0,1 mol L<sup>-1</sup> sendo que, entre as lavagens, o sobrenadante foi desprezado. Posteriormente, secou-se o precipitado com nitrogênio gasoso e, em seguida, as proteínas foram ressuspensas com um tampão contendo uréia 7 mol L<sup>-1</sup>, tiouréia 2 mol L<sup>-1</sup>, CHAPS 2% (m/v) e anfólitos pH 4-7 à 0,5% (v/v).

A quantificação foi realizada utilizando o 2-D Quant Kit (GE Healthcare, USA), seguindo as especificações (n=3). Como padrão para a curva de calibração, foi utilizada albumina de soro bovino (BSA) com massa entre 10 e 50 µg, em duplicata. Após todo o procedimento, os padrões e amostras foram transferidos para uma micro placa, e a leitura foi realizada à 482 nm em uma leitora de placas.

##### 3.1.2. Separação das proteínas das folhas de soja empregando eletroforese bidimensional

Para a separação das proteínas nas folhas de soja (n=3), foram aplicados

em uma fita de 13 cm, com um gradiente de pH entre 4 e 7, 250  $\mu\text{L}$  de amostra ressolubilizada contendo 500  $\mu\text{g}$  em massa de proteínas. As amostras ficaram em contato com as fitas por 12 h. Em seguida, as fitas foram transferidas para um sistema focalizador, sendo realizada a primeira dimensão de separação por focalização isoeétrica (IEF, do inglês *Isoelectric focusing*), na qual as proteínas foram separadas pelo seu ponto isoeétrico (pI) em quatro etapas: (1) 500 V até 500 Vh; (2) 1000 V até 800 Vh; (3) 10000 V até 11300 Vh e (4) 10000 V até 2000 Vh. Durante a focalização, as fitas foram recobertas com óleo mineral.

Depois de finalizada a IEF, as fitas foram, então, equilibradas em duas etapas. Na primeira, a etapa de redução, adicionou-se 0,1 g de DTT a 10 mL de um tampão de equilíbrio composto por uréia 6 mol  $\text{L}^{-1}$ , SDS 2% (m/v), glicerol 30% (v/v), Tris-HCl 50 mmol  $\text{L}^{-1}$  em pH 8,8 e azul de bromofenol 0,002% (m/v). As fitas permaneceram sob agitação com o tampão de equilíbrio contendo DTT durante 15 min. O objetivo desta etapa é manter as proteínas nas suas formas reduzidas [30]. De maneira análoga à primeira etapa de equilíbrio, foi adicionado 0,25 g de iodoacetamida ao mesmo tampão de equilíbrio, que ficou em contato com as fitas sob agitação por 15 min. Esta segunda etapa de equilíbrio, denominada alquilação, tem por finalidade alquilar os grupos tióis das proteínas a fim de prevenir a reoxidação destas durante o processo eletroforético [30].

Ao término das etapas de equilíbrio das fitas, realizou-se a segunda dimensão de separação eletroforética (SDS-PAGE). Dessa forma, as fitas de cada amostra foram posicionadas sobre um gel de poliacrilamida 12,5% (m/v), previamente preparado em uma placa de 180 x 160 x 1,5 mm. Ao lado da fita, foi colocado um pedaço de papel de filtro contendo 8  $\mu\text{L}$  de um padrão de massa molecular. Ambos, fita e papel de filtro, foram vedados com uma solução quente de agarose 0,5 % (m/v) para garantir o contato destes com o gel. A corrida eletroforética ocorreu em duas etapas: (1) 90 V, 15 mA  $\text{gel}^{-1}$ , 100 W por 30 min e (2) 600 V, 25 mA  $\text{gel}^{-1}$ , 100 W por, aproximadamente, 5 h. Ao término da corrida eletroforética, as proteínas separadas no gel foram fixadas com uma solução de ácido acético 10% (v/v) e etanol 40% (v/v) sob agitação durante 1 h. Em seguida, as proteínas foram reveladas com uma solução concentrada de corante Comassie coloidal 0,25% (m/v) em ácido acético 10% (v/v) e etanol 40% (v/v) sob agitação por 30 min. Após este

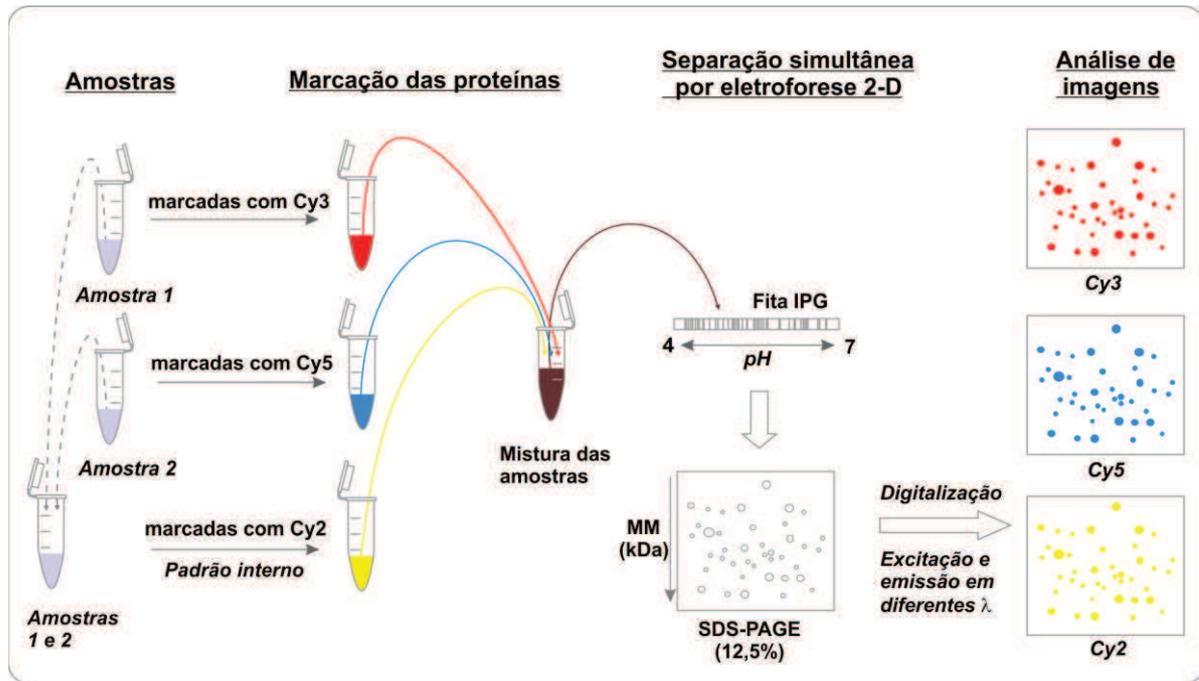
tempo, o corante foi removido dos géis por sucessivas lavagens com água deionizada durante 24 h. Depois da remoção do corante, o gel de cada amostra foi digitalizado por meio de um escâner (Image Scanner II - Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden), operando a uma resolução de 300 dpi.

Para as análises por 2-D DIGE, nove grupos foram avaliados comparativamente: (i) NT vs. NT-AgNO<sub>3</sub>, (ii) NT vs. NT-AgNP, (iii) NT-AgNO<sub>3</sub> vs. NT-AgNP, (iv) T vs. T-AgNO<sub>3</sub>, (v) T vs. T-AgNP, (vi) T-AgNO<sub>3</sub> vs. T-AgNP, (vii) NT vs. T, (viii) NT-AgNO<sub>3</sub> vs. T-AgNO<sub>3</sub>, e (ix) NT-AgNP vs. T-AgNP. Para a separação das proteínas das folhas de soja por 2-D DIGE (Figura 2.2), após a quantificação das proteínas em cada grupo estudado, uma amostra foi marcada com o corante Cy3, enquanto que outra amostra foi marcada com o corante Cy5. Uma mistura igualitária, em termos de massa de proteína, entre as duas amostras foi marcada com o corante Cy2, sendo esta marcação considerada como padrão interno, a fim de normalizar a marcação das amostras e a emissão dos demais corantes. Em cada caso, 60 µg de cada amostra foram marcados com aproximadamente 340 pmol do respectivo corante de DIGE. Tal reação de marcação ocorreu em 30 min em banho de gelo e na ausência de luz. A reação de marcação foi interrompida adicionando 1 µL de lisina 10 mmol L<sup>-1</sup> em cada amostra, incubando-se por 10 min. Por fim, as amostras, marcadas com os seus respectivos corantes, foram misturadas para as etapas seguintes.

Após a etapa de marcação das amostras, procederam-se com as etapas de separação por eletroforese, que foram realizadas de maneira análoga as separações por 2-D PAGE, com exceção da segunda etapa da segunda dimensão de separação, em que foi empregada uma voltagem de 400 V, uma vez que a placa específica para 2-D DIGE possui dimensões de 180 x 160 x 1,0 mm. Além disso, pelo corante empregado na marcação das amostras se tratar de um cromóforo, os experimentos de 2-D DIGE foram realizados na ausência de luz.

Ao término da corrida eletroforética, o gel de cada grupo foi digitalizado e a imagem do mapa proteômico de cada amostra marcada foi separada de acordo com o comprimento de onda de excitação e emissão do respectivo corante utilizado na marcação, usando um escâner Ettan DIGE Imager Scanner (GE Healthcare). As imagens obtidas foram analisadas pelo programa DeCyder 7.0 software (GE

Healthcare), empregando o programa DIA (do inglês, *differential in-gel analysis*), que permite avaliar os *spots* diferenciais, em termos de abundância, entre as amostras marcadas com os corantes Cy3 e Cy5, sendo seus sinais normalizados pelo corante Cy2 (utilizado como padrão interno). Um fator de variação de 2,0 (100% de variação) foi empregado para determinar as proteínas diferenciais.



**Figura 2.2:** Procedimento experimental para a separação e análise de proteínas por 2-D DIGE.

## 3.2. Identificação das proteínas presentes nos *spots* diferenciais por LC-MS/MS

### 3.2.1. Digestão *in-gel* das proteínas

Após o estudo proteômico por 2-D DIGE, procedeu-se com a digestão *in-gel* das proteínas presentes nos *spots* diferencialmente abundantes observados entre os grupos. Para isso, os *spots* (ca. 2 mm) foram manualmente excisados dos géis de eletroforese e depositados em uma placa (Montage<sup>®</sup> In-Gel Digest<sub>ZP</sub> kit - Millipore, Bedford, EUA) contendo micro colunas (micro-SPE), compostas por uma resina com afinidade por peptídeos. Tal sistema é específico para a digestão de proteínas em gel de eletroforese. Dessa forma, o protocolo empregado para a

digestão das proteínas seguiu as recomendações sugeridas pelo fabricante, com pequenas mudanças, uma vez que foram acrescentadas as de redução e alquilação com DTT e iodoacetamida, respectivamente. Foram adicionados 15  $\mu\text{L}$  de uma solução contendo 166 ng de tripsina em cada coluna com os *spots*, para a clivagem das proteínas. Após a adição da tripsina, a placa foi mantida em gelo durante 30 min, e, após este tempo, a reação ocorreu durante 12 h à 37 °C.

### 3.2.2. Análise por espectrometria de massas

Para as análises por LC-MS/MS, os peptídeos obtidos após a digestão com tripsina foram concentrados e, então, ressuspensos em ácido fórmico 0,3% (v/v). Os peptídeos resultantes (4,5  $\mu\text{L}$ ) foram separados empregando uma coluna de fase reversa (C18 - Waters, Manchester, UK, BEHC18, 100 mm x 100  $\mu\text{m}$ ) em um sistema RP-nanoUPLC (nanoAcquity, Waters), acoplado a um espectrômetro de massas Waters Synapt HDMS com uma fonte de ionização por nano-eletrospray (*n*ESI-QTOF-MS/MS) e uma vazão de 1,0  $\mu\text{L min}^{-1}$ . Foi utilizado um gradiente de 2-90% de acetonitrila em ácido fórmico 0,1% (v/v) durante 40 min. O instrumento foi operado usando um software Data Dependent Analysis (DDA), sendo que o equipamento realiza a aquisição de um espectro por segundo, e quando espécies com múltiplas cargas são detectadas, as três espécies mais intensas são fragmentadas na cela de colisão. A energia de colisão é selecionada de acordo com a *m/z* precursora e a carga. A aquisição do espectro foi realizada no modo positivo, usando o software MassLynx v.4.1.

Todos os arquivos provenientes dos espectros de massas no formato "pkl" foram convertidos no formato "mgf" empregando o software Mascot Distiller (Matrix Science, London, UK), e submetidos ao banco de dados do NCBI (outubro de 2015) para espécies de plantas. As buscas pelas proteínas foram realizadas no servidor MASCOT Server 2.3 MS/MS. Alguns parâmetros foram considerados, incluindo a oxidação das metioninas como uma modificação variável, carbamidometilação de cisteínas como modificação fixa, erro de massa de peptídeo e fragmento de  $\pm 0,1$  Da, com digestão por tripsina com um sítio de clivagem perdido. Foi selecionado um limite de significância ( $p < 0,05$ ) que correspondeu a um *score* mínimo de 29. Para

avaliar e entender as funções de cada uma das proteínas identificadas relacionadas às plantas de soja NT e T expostas ao cultivo com  $\text{AgNO}_3$  e AgNP, as funções biológicas e a categoria das proteínas identificadas foram consideradas de acordo com as informações fornecidas pelo UniProt e Bevan *et al.* (1998) [31].

### 3.3. Extração das enzimas e determinação da atividade enzimática

Para as atividades da catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), a extração das enzimas foi realizada de acordo com Arruda *et al.* (2013) [20]. Neste procedimento, 1,0 g (massa fresca) de um *pool* de folhas de soja foi triturado durante 10 min em um almofariz usando nitrogênio líquido. Então, o material vegetal foi homogeneizado em 3 mL de um tampão fosfato de potássio  $100 \text{ mmol L}^{-1}$  (pH 7,5), constituído por EDTA  $1 \text{ mmol L}^{-1}$ , DTT  $3 \text{ mmol L}^{-1}$  e 4% (m/v) de PVPP insolúvel. Após a centrifugação (30 min,  $5000 g$  à  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ), o sobrenadante foi coletado e armazenado à  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  para as análises subsequentes ( $n=3$ ). Para a quantificação das proteínas no extrato das folhas de soja, foi empregado o método de Bradford (1976) [32]. Para tanto, a albumina de soro bovino (BSA) foi utilizada como padrão e as medidas, para subsequente cálculo da atividade enzimática, foram realizadas à  $595 \text{ nm}$  [33].

Para a atividade da CAT, os ensaios enzimáticos foram realizados de acordo com Azevedo *et al.* (1998) [33], à  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . De maneira geral,  $1 \text{ mL}$  de tampão fosfato de potássio  $100 \text{ mmol L}^{-1}$  (pH 7,5) e  $25 \text{ } \mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% (v/v) foram adicionados à  $25 \text{ } \mu\text{L}$  do extrato protéico (sobrenadante) para iniciar a reação. A atividade da CAT foi determinada ( $n=3$ ) pelo monitoramento espectrofotométrico à  $240 \text{ nm}$  da degradação do  $\text{H}_2\text{O}_2$  após 1 min, e a absortividade da atividade da CAT foi de  $39,4 \text{ mmol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

Os ensaios enzimáticos, objetivando avaliar a atividade da SOD, foram determinados pela capacidade desta enzima em inibir a foto-redução do nitroazul de tetrazólio (NBT) na presença de luz, como descrito por Giannopolis *et al.* (1977) [34], com algumas mudanças [20, 33]. A reação foi realizada, adicionando à  $30 \text{ } \mu\text{L}$  de extrato de folha,  $3 \text{ mL}$  de um tampão tampão fosfato de potássio  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  (pH

7,8) com  $75 \mu\text{mol L}^{-1}$  de NBT,  $5 \mu\text{mol L}^{-1}$  de riboflavina,  $13 \text{ mmol L}^{-1}$  de metionina e  $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$  de EDTA. A reação foi iluminada durante 5 min em uma câmara fluorescente, e, após este período, a atividade da SOD foi determinada ( $n=3$ ) em um espectrofotômetro à 560 nm. Os resultados foram expressos em termos de unidade de SOD por  $\text{mg proteína}^{-1}$ .

### 3.3.1. Avaliação da peroxidação lipídica

Para a peroxidação lipídica e para a quantificação do  $\text{H}_2\text{O}_2$ , uma massa de 0,4 g (massa fresca) de um *pool* de folhas de soja foi homogeneizada com 2 mL de uma solução constituída por ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (m/v) e PVPP 20% (m/v). Após a homogeneização, o extrato foi centrifugado (10 min, 10000 g à 4 °C), e, então, utilizado na determinação da peroxidação lipídica e do  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Para estimar a peroxidação lipídica, o conteúdo de malondialdeído (MDA) nas folhas de soja foi determinado ( $n=3$ ) de acordo com Arruda *et al.* (2013) [20], baseado nos trabalhos de Heath *et al.* (1968) [35] e Buege *et al.* (1978) [36]. Resumidamente, uma alíquota de 250  $\mu\text{L}$  do extrato (sobrenadante) foi misturada com 1 mL de TCA 20% (m/v) em ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) 0,5% (v/v). A mistura foi deixada em banho-maria por 30 min à 95 °C, posteriormente, mantida em banho de gelo por 10 min e, então, centrifugada (10 min, 10000 g à 4°C) a fim de separar os resíduos formados durante o processo de aquecimento. A concentração de MDA foi determinada em um espectrofotômetro à 535 nm, empregando uma absorvidade de  $155 \text{ mmol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , seguindo a correção para turbidimetria não específica determinada pela absorbância à 600 nm.

### 3.3.2. Determinação de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )

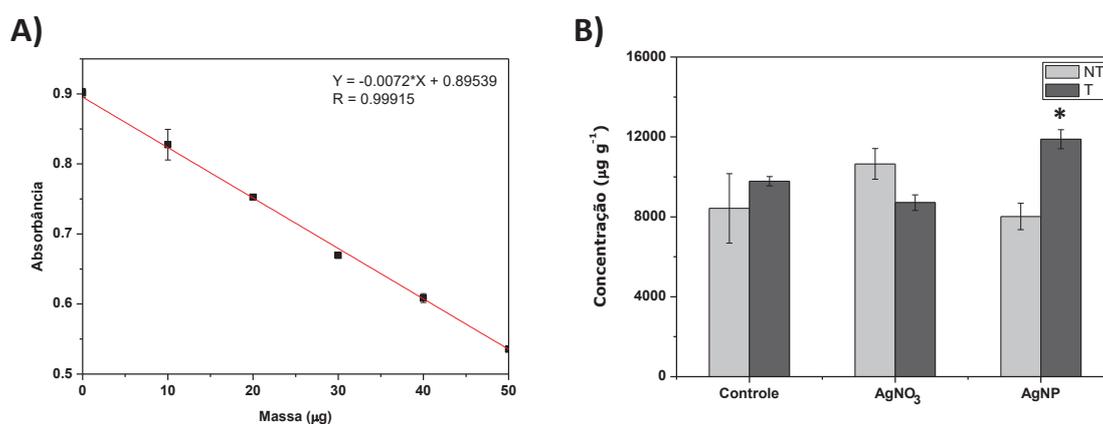
O conteúdo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi determinado pela reação com iodeto de potássio (KI), como descrito por Alexieva *et al.* (2001) [37]. De maneira geral, 200  $\mu\text{L}$  de um tampão fosfato de potássio  $100 \text{ mmol L}^{-1}$  (pH 7,5) e 0,8 mL de KI  $1 \text{ mol L}^{-1}$  foram adicionados à 200  $\mu\text{L}$  do extrato de folha (sobrenadante). A mistura foi mantida em

banho de gelo por 1 h na ausência de luz e as medidas foram realizadas à 390 nm. A concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi determinada ( $n=3$ ) por meio de uma curva de calibração e expressa em  $\text{mmol g}^{-1}$  de massa fresca.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Quantificação das proteínas e avaliação do perfil proteômico das folhas de soja por 2-D PAGE

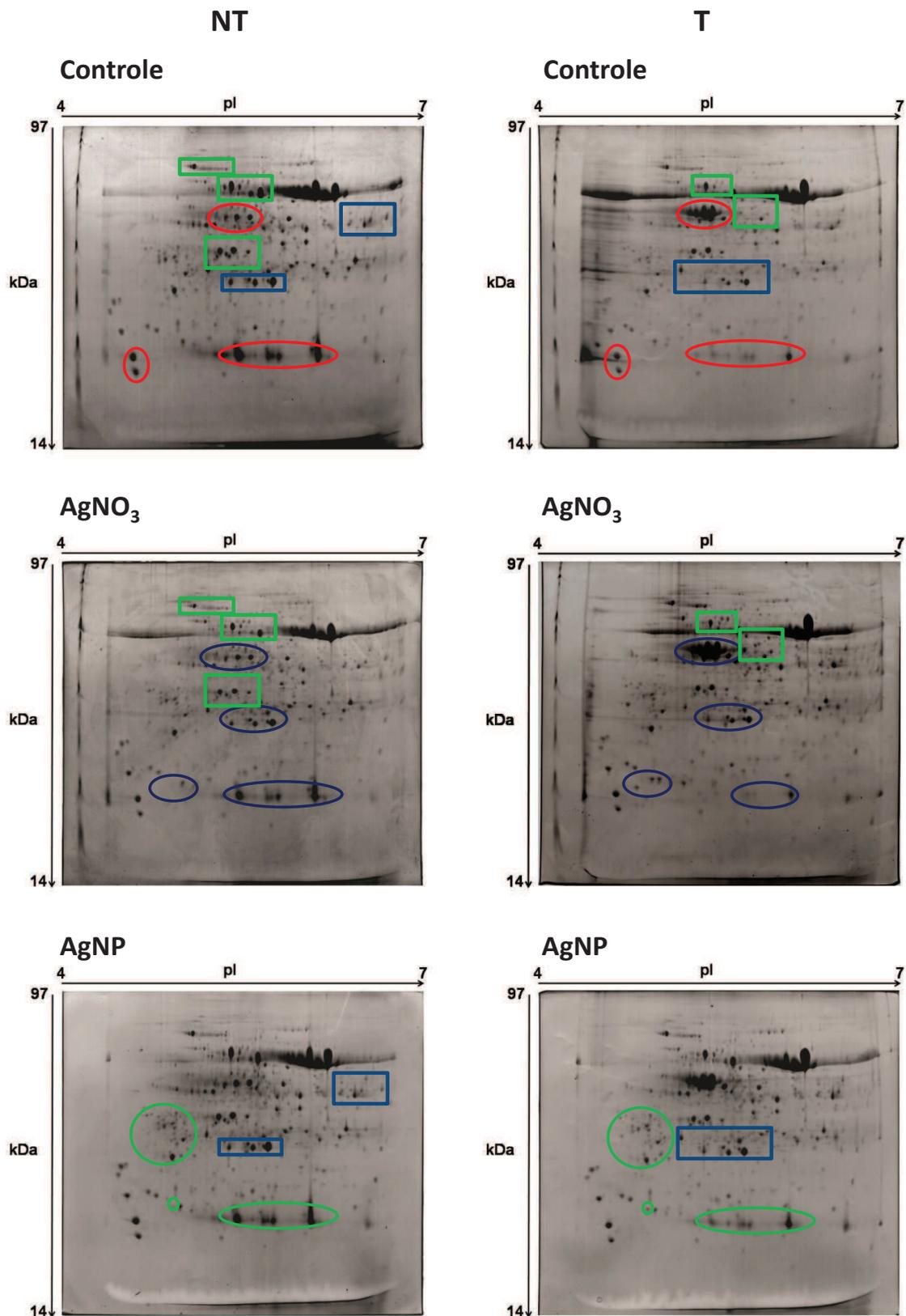
Após a realização dos plantios, foram extraídas as proteínas contidas nas folhas de soja NT e T para todos os tratamentos. Após a precipitação, seguida da lavagem e ressuspensão do precipitado, as proteínas das folhas de soja foram quantificadas por meio do 2-D Quant Kit (GE Healthcare, USA), empregando padrões de BSA para a construção da curva de calibração. Após a quantificação, a concentração de proteínas totais nas folhas de soja foi calculada para cada grupo.



**Figura 2.3:** Curva de calibração com padrões de BSA (A) e quantificação da concentração total de proteínas nas folhas de soja (B).

Como observado na Figura 2.3B, a resposta das plantas em termos de concentração total de proteínas nas folhas está estritamente relacionada ao fato deste organismo ser NT ou T. Entretanto, somente as plantas de soja T cultivadas com as AgNP apresentaram alterações significativas (teste de Tukey -  $p < 0,05$ ) na concentração das proteínas nas folhas, com um aumento de *ca.* 21% em comparação com as plantas T controle. Além disso, as plantas de soja T cultivadas com as AgNP apresentaram uma concentração de proteínas nas folhas *ca.* 36% maior (teste de Tukey -  $p < 0,05$ ) do que àquelas cultivadas com AgNO<sub>3</sub>. Em alguns casos, este aumento no conteúdo de proteínas pode estar relacionado ao estresse oxidativo, promovendo a acumulação de proteínas oxidativamente danificadas [10, 38].

Após a quantificação das proteínas para cada grupo, foram realizados os procedimentos de separação por 2-D PAGE (n=3) para avaliar o protocolo empregado, bem como possíveis alterações no perfil proteômico de cada grupo estudado. Pôde-se observar, pelas imagens dos géis (Figura 2.4) que, visualmente, o perfil proteômico é semelhante entre os grupos avaliados. Entretanto, nota-se que algumas regiões dos géis apresentam algumas diferenças, bem como alguns *spots* das folhas de soja tratadas com AgNP e AgNO<sub>3</sub> podem apresentar diferentes abundâncias quando comparados com os respectivos *spots* das folhas de soja controles.



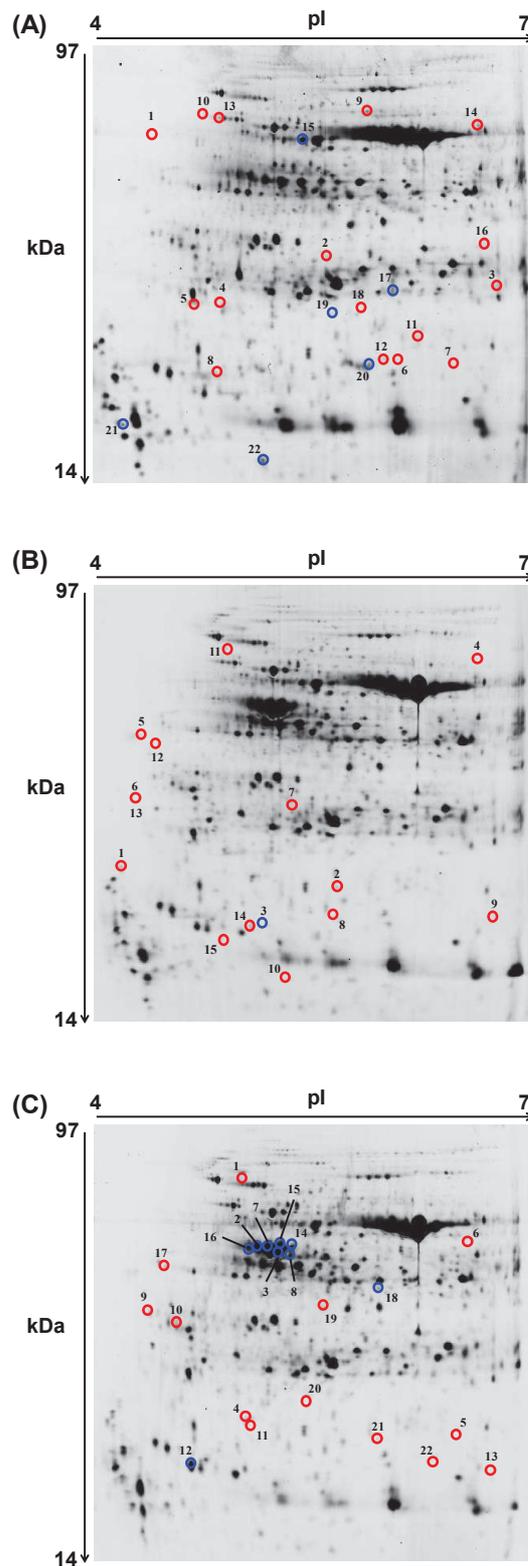
**Figura 2.4:** Géis 2-D PAGE para proteínas de folha de soja. Os círculos/elipses (vermelho, azul e verde) e retângulos (azul e verde) correspondem às regiões com *spots* com diferentes abundâncias entre as variedades de soja e os tratamentos, respectivamente.

## 4.2. Avaliação do perfil proteômico das folhas de soja por 2-D DIGE

Após a realização dos estudos proteômicos por 2-D PAGE, procedeu-se com as análises empregando a técnica de 2-D DIGE, a fim de se avaliar possíveis alterações no proteoma das plantas de soja NT e T expostas aos cultivos com as AgNP e AgNO<sub>3</sub>. Os géis 2-D DIGE representativos para cada grupo podem ser observados na Figura 2.5.

Para os primeiros grupos envolvendo as folhas de soja NT, foram encontrados 19, 11 e 22 *spots* diferenciais em termos de abundância para os grupos NT vs NT-AgNO<sub>3</sub>, NT vs NT-AgNP e NT-AgNO<sub>3</sub> vs NT-AgNP, respectivamente. Ambos os tratamentos com prata reduziram a abundância dos *spots* protéicos. Além disso, é possível relacionar tais números de *spots* diferenciais para cada grupo estudado com as concentrações das proteínas (Figura 2.3). Nota-se que, de fato, o tratamento com AgNO<sub>3</sub> conferiu uma maior quantidade de proteína nas folhas de soja NT em comparação com as folhas do cultivo controle, sendo observados um total de 19 *spots* diferenciais.

Comparando o tratamento com as AgNP em relação ao cultivo controle, não foram observadas diferenças significativas em termos de concentração total de proteínas, o que reflete em um menor número de *spots* diferenciais encontrados (11 *spots*) no estudo comparativo entre estes grupos por 2-D DIGE. Tal fato mostra que a resposta da planta de soja NT, mediante a adição de prata, é dependente da forma em que a prata é adicionada durante o cultivo (AgNP ou AgNO<sub>3</sub>). Neste caso, o tratamento com AgNO<sub>3</sub> conferiu maiores mudanças no perfil proteômico das folhas de soja NT, uma vez que foi observado um maior número de *spots* diferenciais, em termos de abundância. Além disso, este tratamento aumentou a concentração das proteínas nas folhas em relação ao grupo controle. Possivelmente, tal fato pode ser explicado devido à maior facilidade de translocação da prata em comparação ao cultivo com AgNP, uma vez que, na solução de AgNO<sub>3</sub>, a prata se encontra em sua forma iônica.



**Figura 2.5:** Géis 2-D DIGE representativos para os grupos de soja NT (A), T (B) e NT vs T (C). Os *spots* demarcados correspondem às proteínas com diferentes abundâncias: vermelho indica diminuição na abundância, e azul indica aumento na abundância devido ao tratamento.

Além disso, é possível confirmar que a interação entre a soja NT e a prata é dependente da forma em que a prata é adicionada durante o cultivo (AgNP ou  $\text{AgNO}_3$ ), uma vez que foram encontrados 22 *spots* diferenciais para os diferentes tratamentos com prata. Por fim, este número de *spots* diferenciais justifica a diferença entre as concentrações de proteínas entre os grupos de soja NT- $\text{AgNO}_3$  e NT-AgNP (Figura 2.3), visto que foi observada uma menor concentração de proteínas para as folhas de soja NT tratadas com as AgNP. Em seguida, foram estudados os grupos envolvendo as folhas de soja T, onde foram visualizados 8, 12 e 9 *spots* diferenciais em termos de abundância para os grupos T vs T- $\text{AgNO}_3$ , T vs T-AgNP e T- $\text{AgNO}_3$  vs T-AgNP, respectivamente. Apenas um *spot* apresentou maior abundância para as plantas expostas ao tratamento com  $\text{AgNO}_3$ . Todos os demais *spots* diferenciais, para ambos os tratamentos com prata, apresentaram menores abundâncias em relação ao cultivo controle. Também é possível relacionar esses números de *spots* diferenciais para cada grupo estudado com as concentrações das proteínas (Figura 2.3).

Verifica-se que as plantas de soja T mediante ao cultivo com prata, responderam de maneira distinta das plantas de soja NT, uma vez que o tratamento com as AgNP conferiu maior quantidade de proteína nas folhas de soja T em comparação com as folhas do cultivo controle, bem como maior alteração do perfil proteômico, uma vez que foram observados um total de 12 *spots* diferenciais em termos de abundância, ou seja, um número superior àquele encontrado para o grupo NT-AgNP (11 *spots* diferenciais).

Já o tratamento com  $\text{AgNO}_3$ , reduziu a concentração total de proteínas nas folhas de soja T em comparação ao grupo controle, e uma menor alteração no perfil proteômico foi observada, uma vez que foram encontrados 8 *spots* diferenciais. Considerando os resultados obtidos para as plantas NT, nota-se que o cultivo com  $\text{AgNO}_3$  alterou, de maneira mais significativa, o perfil proteômico das folhas em comparação àquelas de soja T, uma vez que para o grupo NT- $\text{AgNO}_3$  foram encontrados 19 *spots* diferenciais em termos de abundância.

Além disso, o estudo comparativo entre os grupos T- $\text{AgNO}_3$  e T-AgNP confirmam, também, assim como comentado para a soja NT, que a interação entre a soja T e a prata é dependente da forma em que a prata é adicionada durante o

cultivo (AgNP ou AgNO<sub>3</sub>), uma vez que foram encontrados 9 *spots* diferenciais. Em contraste com os resultados observados para as folhas de soja NT, foi observada uma maior concentração de proteínas para as folhas de soja T tratadas com as AgNP em comparação àquelas T cultivadas com AgNO<sub>3</sub> (Figura 2.3).

Por fim, avaliaram-se os grupos envolvendo as folhas de soja NT e T, para confirmar se há, de fato, como já observado anteriormente pelo estudo comparativo por 2-D DIGE, diferentes interações entre os tipos de soja mediante aos mesmos tratamentos. Neste estudo, foram observados 13, 11 e 12 *spots* diferenciais em termos de abundância para os grupos NT-AgNO<sub>3</sub> vs T-AgNO<sub>3</sub>, NT-AgNP vs T-AgNP e NT vs T, respectivamente, confirmando o fato de que a resposta mediante ao tratamento é dependente do tipo de soja e que estas possuem sensibilidades diferenciadas em relação a forma a qual a prata é adicionada ao substrato.

#### **4.3. Identificação das proteínas presentes nos *spots* diferenciais por espectrometria de massas**

Após a realização do estudo proteômico por 2-D DIGE, as proteínas presentes nos *spots* diferencialmente abundantes foram identificadas por espectrometria de massas. Os géis 2-D DIGE representativos para cada grupo, com os *spots* diferencialmente abundantes em que foram identificadas as proteínas, são mostrados na Figura 2.5.

Com relação à identificação das proteínas presentes nos *spots* diferencialmente abundantes, os valores experimentais de pI/MM são similares àqueles teóricos para as proteínas identificadas por nESI-LC-MS/MS, indicando que o protocolo utilizado produziu resultados coerentes (Tabela 2.1). Além disso, as proteínas identificadas nos *spots* diferenciais foram agrupadas de acordo com suas respectivas funções (Figura 2.6).

**Tabela 2.1:** Proteínas identificadas nas folhas de soja NT e T após o cultivo com AgNP e AgNO<sub>3</sub>, correspondentes aos *spots* diferencialmente abundantes nas análises de 2-D DIGE, considerando um fator de variação de 2,0 (100% de variação).

<b>Spot</b>	<b>Proteína identificada</b>	<b>Código de acesso da proteína</b>	<b>Score</b>	<b>pI/MW (Da) teóricos</b>	<b>pI/MW (Da) experimental</b>	<b>Peptídeos homólogos</b>	<b>Cobertura (%)</b>	<b>Variação do spot</b>
<b>NT vs NT-AgNO<sub>3</sub></b>								
1	Ribulose biphosphate carboxylase large chain ( <i>Glycine max</i> )	RBL_SOYBN	45	6.00/53033	4.40/50265	3	6	-2.60
2	Triosephosphate isomerase ( <i>Glycine max</i> )	C6T7V6_SOYBN	206	6.35/33388	5.70/29441	10	33	-2.50
3	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial ( <i>Prunus persica</i> )	SODM_PRUPE	150	8.62/25439	6.83/23836	3	13	-4.08
4	Uncharacterized protein ( <i>Glycine max</i> )	I1MUQ0_SOYBN	173	5.97/27426	5.08/23503	8	16	-3.89
5	2-cys peroxiredoxin BAS1 ( <i>Zea mays</i> )	B6T9B3_MAIZE	118	5.81/28445	4.84/22531	6	18	-2.56
6	Superoxide dismutase [Cu-Zn] ( <i>Glycine max</i> )	I1JRI7_SOYBN	42	5.60/15341	6.05/17601	3	8	-3.17
7	Nucleoside diphosphate kinase 1 ( <i>Glycine max</i> )	NDK1_SOYBN	96	5.93/16489	6.52/17259	6	39	-5.34
8	ATP synthase epsilon chain, chloroplastic ( <i>Glycine max</i> )	ATPE_SOYBN	65	5.41/14801	4.99/16813	2	18	-3.55
<b>NT vs NT-AgNP</b>								
9	Ribulose biphosphate carboxylase large chain ( <i>Glycine max</i> )	RBL_SOYBN	112	6.00/53033	5.89/59592	4	8	-3.60

Tabela 2.1. Continuação.

Spot	Proteína identificada	Código de acesso da proteína	Score	pI/MW (Da) teóricos	pI/MW (Da) experimental	Peptídeos homólogos	Cobertura (%)	Varição do spot
10	RuBisCO large subunit-binding protein subunit alpha (Fragment) ( <i>Ricinus communis</i> )	RUBA_RICCO	206	4.77/52461	4.88/54886	8	17	-2.61
11	Oxygen-evolving enhancer protein 2 ( <i>Glycine max</i> )	I1M712_SOYBN	151	7.68/28751	6.12/30920	4	19	-3.22
12	Superoxide dismutase [Cu-Zn] ( <i>Glycine max</i> )	I1JRI7_SOYBN	42	5.60/15341	5.91/17610	3	8	-4.14
<b>NT-AgNO<sub>3</sub> vs NT-AgNP</b>								
13	RuBisCO large subunit-binding protein subunit alpha (Fragment) ( <i>Ricinus communis</i> )	RUBA_RICCO	247	4.77/52461	4.95/58586	10	25	-2.45
14	Ribulose biphosphate carboxylase large chain ( <i>Glycine max</i> )	RBL_SOYBN	471	6.00/53033	6.79/52005	20	34	-7.19
15	ATP synthase subunit beta, chloroplastic ( <i>Glycine max</i> )	ATPB_SOYBN	703	5.29/53778	5.53/50694	33	49	+2.06
16	Gamma-glutamyl hydrolase ( <i>Glycine max</i> )	GGH_SOYBN	132	6.08/37824	6.83/33522	7	20	-2.36
17	Proteasome subunit beta type ( <i>Glycine max</i> )	I1KXF0_SOYBN	142	6.20/24822	6.01/26059	4	14	+2.47
18	Chlorophyll a-b binding protein 6A, chloroplastic ( <i>Solanum lycopersicum</i> )	CB11_SOLLC	88	5.82/26786	5.86/23503	5	8	-2.68

Tabela 2.1. Continuação.

Spot	Proteína identificada	Código de acesso da proteína	Score	pI/MW (Da) teóricos	pI/MW (Da) experimental	Peptídeos homólogos	Cobertura (%)	Varição do spot
19	Protein P21 ( <i>Glycine max</i> )	P21_SOYBN	60	4.84/22361	5.44/22851	2	11	+2.00
20	Superoxide dismutase [Cu-Zn] ( <i>Glycine max</i> )	I1JRI7_SOYBN	42	5.60/15341	5.90/16701	3	8	+2.13
21	Plastocyanin ( <i>Lactuca sativa</i> )	PLAS_LACSA	39	4.32/10410	4.34/9866	2	18	+2.10
22	Thioredoxin M2 ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )	F4JG94_ARATH	54	7.98/7921	5.27/6701	2	13	+2.05
<b>T vs T-AgNO<sub>3</sub></b>								
1	Napin-type 2S albumin 1 ( <i>Glycine max</i> )	Q9ZNZ4_SOYBN	142	6.00/18393	4.33/33416	7	27	-2.95
2	Disease resistance response protein 1 ( <i>Glycine max</i> )	E0YNQ4_SOYBN	196	6.49/28395	5.73/29553	5	16	-2.69
3	Ribulose biphosphate carboxylase small chain ( <i>Glycine max</i> )	C6SVL2_SOYBN	108	8.87/20194	5.27/23949	5	32	+2.05
<b>T vs T-AgNP</b>								
4	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial ( <i>Glycine max</i> )	ATPAM_SOYBN	172	6.23/55581	6.69/72669	6	12	-3.53
5	Uncharacterized protein ( <i>Glycine max</i> )	I1J4S3_SOYBN	279	4.58/39619	4.35/54498	7	23	-2.86
6	3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase ( <i>Glycine max</i> )	Q71LY8_SOYBN	72	5.13/47699	4.32/45346	4	10	-3.31
7	Triosephosphate isomerase ( <i>Glycine max</i> )	C6T7V6_SOYBN	103	6.35/33388	5.36/43474	3	12	-2.70

Tabela 2.1. Continuação.

Spot	Proteína identificada	Código de acesso da proteína	Score	pI/MW (Da) teóricos	pI/MW (Da) experimental	Peptídeos homólogos	Cobertura (%)	Varição do spot
8	Ribulose biphosphate carboxylase large chain ( <i>Glycine max</i> )	RBL_SOYBN	90	6.00/53033	5.69/26207	3	5	-4.12
9	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase ( <i>Glycine max</i> )	I1NJE8_SOYBN	124	9.56/27372	6.76/26011	5	18	-2.10
10	Ribulose biphosphate carboxylase small chain 1, chloroplastic ( <i>Glycine max</i> )	RBS1_SOYBN	48	8.87/20288	5.27/19187	3	13	-3.21
<b>T-AgNO<sub>3</sub> vs T-AgNP</b>								
11	Uncharacterized protein ( <i>Glycine max</i> )	I1JPC5_SOYBN	97	4.98/67939	4.98/78379	7	15	-2.94
12	Plastoglobulin-1, chloroplastic ( <i>Pisum sativum</i> )	PG1_PEA	51	4.60/38379	4.53/53489	4	10	-2.38
13	3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase ( <i>Glycine max</i> )	Q71LY8_SOYBN	72	5.13/47699	4.20/45346	4	10	-3.92
14	Uncharacterized protein ( <i>Glycine max</i> )	C6SZA9_SOYBN	131	5.10/17151	5.04/23416	4	32	-2.11
15	Thylakoid lumenal 17.4 kDa protein, chloroplastic ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )	TL17_ARATH	64	5.97/26084	4.90/22217	3	5	-2.02

Tabela 2.1. Continuação.

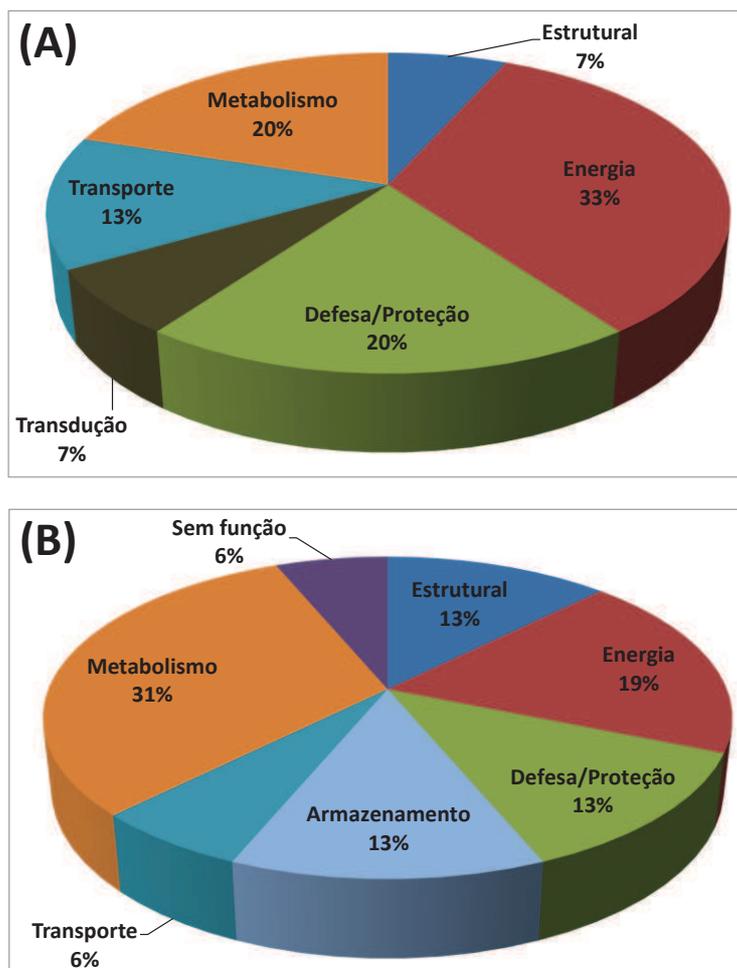
Spot	Proteína identificada	Código de acesso da proteína	Score	pI/MW (Da) teóricos	pI/MW (Da) experimental	Peptídeos homólogos	Cobertura (%)	Varição do spot
<b>NT vs T</b>								
1	Probable mediator of RNA polymerase II transcription subunit 37e ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )	MD37E_ARATH	344	5.03/71712	5.07/80565	14	21	-20.94
2	3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase ( <i>Glycine max</i> )	Q71LY8_SOYBN	546	5.13/47699	5.11/57500	13	25	+2.00
3	3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase ( <i>Glycine max</i> )	Q71LY8_SOYBN	523	5.13/47699	5.23/55979	18	31	+2.11
4	4-hydroxy-4-methyl-2-oxoglutarate aldolase ( <i>Glycine max</i> )	C6T2H9_SOYBN	143	5.19/18052	5.09/28730	5	32	-2.72
5	Nucleoside diphosphate kinase 1 ( <i>Glycine max</i> )	NDK1_SOYBN	96	5.93/16489	6.52/27259	6	39	-3.17
<b>NT-AgNO<sub>3</sub> vs T-AgNO<sub>3</sub></b>								
6	3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase ( <i>Glycine max</i> )	Q587N9_SOYBN	294	5.98/55732	6.61/58164	6	14	-2.29
7	3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase ( <i>Glycine max</i> )	Q71LY8_SOYBN	588	5.13/47699	5.17/57500	15	26	+2.51

Tabela 2.1. Continuação.

Spot	Proteína identificada	Código de acesso da proteína	Score	pI/MW (Da) teóricos	pI/MW (Da) experimental	Peptídeos homólogos	Cobertura (%)	Varição do spot
8	3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase ( <i>Glycine max</i> )	Q71LY8_SOYBN	905	5.13/47699	5.33/54843	26	38	+2.52
9	3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase ( <i>Glycine max</i> )	Q71LY8_SOYBN	179	5.13/47699	4.03/48212	6	16	-2.86
10	Putative uncharacterized protein (Fragment) ( <i>Glycine max</i> )	C6T9I0_SOYBN	130	4.79/30965	4.64/43850	5	13	-2.04
11	Superoxide dismutase [Cu-Zn], chloroplastic ( <i>Petunia hybrida</i> )	SODCP_PETHY	32	6.17/22416	5.11/27830	4	12	-2.36
12	Uncharacterized protein ( <i>Glycine max</i> )	I1NAI6_SOYBN	177	7.74/23083	4.80/23416	5	17	+2.39
13	Nucleoside diphosphate kinase ( <i>Glycine max</i> )	Q8GV25_SOYBN	311	6.91/16402	6.85/23241	8	43	-2.39
<b>NT-AgNP vs T-AgNP</b>								
14	3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase ( <i>Glycine max</i> )	Q71LY8_SOYBN	692	5.13/47699	5.33/59516	21	34	+2.23
15	3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase ( <i>Glycine max</i> )	Q587N9_SOYBN	532	5.98/55732	5.26/58836	18	20	+2.12

Tabela 2.1. Continuação.

Spot	Proteína identificada	Código de acesso da proteína	Score	pI/MW (Da) teóricos	pI/MW (Da) experimental	Peptídeos homólogos	Cobertura (%)	Varição do spot
16	3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase ( <i>Glycine max</i> )	Q71LY8_SOYBN	644	5.13/47699	5.04/57720	21	33	+2.50
17	Uncharacterized protein ( <i>Glycine max</i> )	K7MNM4_SOYBN	156	4.92/49918	4.56/52765	5	16	-2.13
18	Fructose-bisphosphate aldolase ( <i>Glycine max</i> )	I1LPX6_SOYBN	544	6.86/43014	6.00/51062	18	34	+2.47
19	Cysteine synthase ( <i>Glycine max</i> )	I1NC67_SOYBN	192	5.50/34405	5.60/48769	6	20	-2.78
20	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (Fragment) ( <i>Glycine max</i> )	A0A0F6Y5S8_SOYBN	52	5.67/25831	5.54/32562	3	14	-3.86
21	Oxygen-evolving enhancer protein 2 ( <i>Glycine max</i> )	I1M712_SOYBN	164	7.68/28751	5.98/26283	3	14	-2.84
22	Uncharacterized protein ( <i>Glycine max</i> )	I1MBN4_SOYBN	135	8.69/22785	6.53/24080	6	30	-3.41



**Figura 2.6:** Distribuição das proteínas identificadas nos *spots* diferenciais, de acordo com a função biológica, das folhas de soja NT (A) e T (B).

Inicialmente, comparando os grupos NT e T, algumas proteínas foram identificadas nas folhas de soja, dentre elas *3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase*, *4-hydroxy-4-methyl-2-oxoglutarate aldolase*, *probable mediator of RNA polymerase II*, e *nucleoside diphosphate kinase 1*. Em um estudo comparativo envolvendo folhas de soja NT e T, realizado em nosso grupo de pesquisa [20], a *3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase* também foi identificada com maior abundância nas plantas de soja T, corroborando os nossos resultados. Esta proteína está envolvida na síntese do fosfoenolpiruvato e na biossíntese de aminoácidos [20]. Considerando a exposição à Ag, de maneira geral, algumas proteínas associadas às condições de estresse foram identificadas nos grupos cultivados com AgNP e AgNO<sub>3</sub>.

De fato, a *ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO)* está presente em todos os grupos tratados e esta proteína com atividade enzimática está envolvida na reação de assimilação de CO<sub>2</sub> pelas plantas na primeira etapa do Ciclo de Calvin. Um desequilíbrio em termos de *RuBisCO* sugere que o sistema está sob condição de estresse. No caso das AgNP, sua presença no solo, e, conseqüente contato com as raízes das plantas, pode apresentar um estresse coloidal, uma vez que as NPs são espécies coloidais, devido à alteração de alguns aspectos das plantas, tais como a condutividade hidráulica, transpiração e crescimento das folhas, interferindo, assim, no desenvolvimento das plantas [39].

Para todos os grupos cultivados com Ag, exceto o grupo T vs T-AgNO<sub>3</sub>, a *RuBisCO* está em menor abundância do que os seus respectivos controles. Estes resultados sugerem que a exposição por Ag pode promover a inativação e degradação da *RuBisCO*, alterando o processo de foto-respiração nas plantas de soja [10, 40]. No caso do grupo T vs T-AgNO<sub>3</sub>, a maior abundância da *RuBisCO* nas folhas de soja T-AgNO<sub>3</sub> podem estar associadas com uma maior taxa de formação de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*), devido a um aumento no número de fragmentos proteolíticos da *RuBisCO* relacionados a um estresse metálico [41]. Adicionalmente, há vários estudos com folhas de outras espécies de plantas já reportados na literatura em que foram observadas alterações no conteúdo da *RuBisCO*, sendo este fato relacionado a condição de estresse metálico [10, 41-42]. Por fim, um trabalho relacionado com raízes de soja expostas ao tratamento com AgNP e AgNO<sub>3</sub>, previamente publicado por Mustafa *et al.* (2015), indicou que as AgNP afetam predominantemente proteínas relacionadas à condição de estresse, sinalização e metabolismo celular nas raízes de soja. De um total de 32 proteínas relacionadas ao estresse, e que foram identificadas nas plantas expostas às AgNP, 26 destas proteínas foram encontradas com menor abundância nas plantas tratadas [43].

Para as plantas de soja NT, o cultivo com AgNO<sub>3</sub> diminuiu a abundância de algumas proteínas relacionadas à funções distintas. A *triosephosphate isomerase*, por exemplo, é uma proteína envolvida em

processos energéticos na rota do ciclo de Calvin, participando da biossíntese de carboidratos. Além disso, essa proteína também está envolvida na via glicolítica e no desenvolvimento primário das raízes. De fato, algumas raízes das plantas do grupo NT-AgNO<sub>3</sub> apresentaram anomalias em seu desenvolvimento em comparação com as raízes controle. Outra espécie identificada com menor abundância no grupo NT-AgNO<sub>3</sub>, a *2-cys peroxiredoxin*, está relacionada a resposta de defesa. Essa enzima pode ser uma enzima antioxidante particular no desenvolvimento das plantas após a germinação e na produção de carboidratos pela fotossíntese em folhas. Além disso, a *2-cys peroxiredoxin* está envolvida na detoxificação de alquil hidroperóxidos com redutores equivalentes fornecidos por meio do sistema da tioredoxina [44].

A *ATP synthase* subunidade beta é uma enzima responsável pela ligação de ATP e nucleotídeo, bem como atua no transporte de próton através da membrana celular no complexo enzimático da ATP sintase. Tal complexo possui atividade catalítica e sintetiza ATP proveniente da ADP e fosfato no fotossistema I (PSI, do inglês *photosystem I*) [45-46]. O ciclo de Calvin utiliza ATP e NADPH para sintetizar a *RuBisCO* [10, 47]. Possivelmente, a menor abundância da *ATP synthase* reflete em uma menor abundância da *RuBisCO* nas folhas de soja do grupo NT-AgNO<sub>3</sub>, e, conseqüentemente, uma diminuição da assimilação de CO<sub>2</sub> por aquelas plantas de soja NT cultivadas com AgNO<sub>3</sub>. Outra proteína identificada que está relacionada com a ligação de ATP é a *nucleoside diphosphate kinase 1*. Esta proteína está envolvida na tradução de sinal, ligação de íon metálico (Mg<sup>2+</sup>) e na atividade da *nucleoside diphosphate kinase* (NDK) no processo biossintético. Da mesma forma, em um estudo prévio relacionado a estresse por Cd em girassol, a NDK também foi encontrada com menor abundância naquelas plantas tratadas com Cd em comparação com as plantas controle [10].

Por fim, para o grupo NT vs NT-AgNO<sub>3</sub>, duas superóxido dismutases (SOD), MnSOD e Cu-ZnSOD, foram encontradas em menor abundância nas plantas tratadas. As SOD são enzimas relacionadas à tolerância ao estresse, removendo os radicais superóxidos em processos de defesa devido à sua atividade antioxidante [48]. Entretanto, em contraste aos nossos resultados,

existem muitos trabalhos reportados em que, em condição de estresse oxidativo, o conteúdo e a atividade da SOD são aumentados. Todavia, a resposta da SOD ao estresse por metal/metaloide é dependente de alguns fatores, tais como a espécie de planta envolvida e os seu estágio de desenvolvimento, o tipo de metal/metaloide empregado no experimento e o tempo de exposição [18, 22]. De fato, existem alguns trabalhos, incluindo um avaliando a soja [49], em que, sob condições de estresse por metal, uma diminuição do conteúdo e atividade da SOD foram observados [18, 49-51], corroborando nossos resultados.

De maneira análoga ao cultivo com  $\text{AgNO}_3$ , para aquelas plantas de soja NT cultivadas com AgNP, uma SOD (Cu-ZnSOD) também foi identificada e esta enzima foi encontrada com menor abundância para as plantas expostas às AgNP do que para as plantas NT controle. Este fato, associado à uma menor abundância em termos de *RuBisCO*, indica que as plantas do grupo NT-AgNP estão sob condição de estresse. Inclusive, este tratamento sugere que o fotossistema II (PSII, do inglês *photosystem II*) está alterado, uma vez que a *oxygen-evolving enhancer protein 2*, também identificada, está envolvida na regulação do PSII. Além disso, esta proteína, com menor abundância nas plantas do grupo NT-AgNP do que nas plantas controle, está associada à processos de energia, relacionados à fotossíntese e a ligação de cálcio.

Finalmente, um importante aspecto deste estudo foi avaliar se as distintas formas de exposição à Ag, ou seja, AgNP e  $\text{AgNO}_3$ , resulta em diferentes interações com as plantas de soja. Como descrito anteriormente, existem proteínas diferencialmente abundantes quando é avaliado o grupo NT- $\text{AgNO}_3$  vs NT-AgNP (22 *spots* proteicos) e algumas destas proteínas foram identificadas. Tal fato corrobora nossa hipótese de que as NPs possivelmente interagem de maneira diferente com um organismo em comparação com o seu respectivo íon metálico ( $\text{Ag}^+$ ). As proteínas identificadas neste grupo indicam que as AgNP e o  $\text{AgNO}_3$  possuem interações distintas com as plantas de soja NT. A *RuBisCO*, por exemplo, apresenta maior abundância para as plantas do grupo NT- $\text{AgNO}_3$  em comparação com as plantas de soja do grupo NT-AgNP. Possivelmente, a maior abundância desta proteína nas plantas de soja NT

cultivadas com  $\text{AgNO}_3$  pode estar associada com uma maior formação de ROS, devido a um incremento no número de fragmentos proteolíticos da *RuBisCO* que estão relacionados a um estresse por metal [10, 41-42].

Considerando processos energéticos, a *chlorophyll a-b binding protein 6A* está mais abundante nas plantas do grupo NT- $\text{AgNO}_3$ . Esta proteína está envolvida nos PSI e PSII. Além disso, essa proteína é capaz de se ligar a, pelo menos, 14 clorofilas (8 Chl-a e 6 Chl-b) e alguns carotenoides, dentre eles a luteína e a neoxantina. Provavelmente, a exposição às AgNP resulta em uma menor ligação com as clorofilas, afetando a fotossíntese das plantas de soja NT cultivadas com AgNP. A última espécie identificada com maior abundância nas plantas do grupo NT- $\text{AgNO}_3$  foi a *gamma-glutamyl hydrolase*. A função desta enzima está relacionada à destinação e armazenamento de proteína, participando da hidrólise da ligação gamma-glutamil, proteólise e processo metabólico da glutamina.

Um total de seis proteínas com maior abundância nas plantas de soja do grupo NT-AgNP foram identificadas, dentre elas *proteasome subunit beta type*, Cu-ZnSOD, *plastocyanin*, *thioredoxin M2 (Trx)*, *ATP synthase* e *protein P21*. A função da *proteasome subunit beta type* está relacionada à destinação e armazenamento de proteína, com atividade catalítica na clivagem de ligações peptídicas com elevada especificidade. Esta proteólise está envolvida no processo catabólico de proteínas celulares. Como discutido anteriormente, as SOD possuem atividade antioxidante, atuando na remoção de radicais superóxido em processos de defesa [18, 48-49] e esta enzima está mais abundante nas plantas de soja NT cultivadas com AgNP do que nas plantas de soja do grupo NT- $\text{AgNO}_3$ . A *plastocyanin* participa na transferência de elétron entre o fotossistema  $\text{P}_{700}$  e o complexo citocromo  $\text{b}_6\text{f}$  no PSI. Esta proteína também está relacionada à processos de oxidação e redução com atividade transportadora de elétron, participando da ligação do íon cobre [45-46]. Outra proteína identificada relacionada à processos de oxidação e redução é a *Trx*. Esta proteína possui atividade como uma oxidoreductase de dissulfeto, participando da homeostase redox celular, processo metabólico de glicerol-éter, assimilação de sulfato e resposta celular ao estresse oxidativo. Estudos

relacionados ao estresse por metal/metaloide em plantas demonstraram que maiores níveis de *Trx* foram encontrados nas plantas expostas, para aumentar suas resistências ao tratamento [51-53] e prevenir a acumulação de ROS [51, 54]. Possivelmente, a maior abundância da *plastocyanin* e da *Trx*, ambas relacionadas a regulação redox, nas plantas de soja NT cultivadas com AgNP em comparação com as plantas do grupo NT-AgNO<sub>3</sub>, sugere que estas proteínas desempenham um papel importante na detoxificação das plantas, com o objetivo de prevenir um maior dano oxidativo nas plantas de soja NT cultivadas com as AgNP.

Considerando as plantas de soja T expostas ao cultivo com AgNO<sub>3</sub>, além da *RuBisCO*, que é mais abundante nas plantas tratadas, outras duas proteínas foram identificadas com menor abundância para a soja do grupo T-AgNO<sub>3</sub>. A *Napin-type 2S albumin 1* é uma proteína relacionada ao armazenamento de proteína, com atividade para reservar nutrientes. Além disso, este tipo de proteína tem demonstrado atividades antifúngicas e antimicrobianas [55-56]. Outra proteína identificada com as mesmas atividades é a *disease resistance response protein* e sua função está relacionada com a resposta à defesa/doença em plantas.

Para as plantas de soja T cultivadas com AgNP, todas as proteínas identificadas são referentes à *spots* com menor abundância nas folhas de soja T expostas ao tratamento com AgNP em comparação com as plantas T controle. Da mesma forma do que àquelas plantas pertencentes ao grupo NT-AgNO<sub>3</sub>, as plantas do grupo T-AgNP apresentaram uma combinação da *RuBisCO* e *ATP synthase* com menor abundância do que as plantas T controle. Como discutido previamente, possivelmente, a menor abundância da *ATP synthase* ocasiona uma menor abundância da *RuBisCO* nas plantas T cultivadas com AgNP, uma vez a ATP e NADPH são utilizadas para sintetizar a *RuBisCO* via ciclo de Calvin. Este fato sugere uma condição de estresse, o qual foi provavelmente causado pela diminuição da assimilação de CO<sub>2</sub> pelas plantas de soja T expostas ao cultivo com as AgNP [10, 47]. De fato, como descrito anteriormente, foi observado um aumento de ca. 21% (teste de Tukey -  $p < 0,05$ ) na concentração das proteínas nas folhas das plantas de soja do

grupo T-AgNP em comparação com as plantas T controle, e um aumento no conteúdo proteico pode estar relacionado a um estresse oxidativo [10, 38].

Adicionalmente, duas *isomerases* foram identificadas com menor abundância nas plantas de soja do grupo T-AgNP. Como previamente comentado para as plantas do grupo NT-AgNO<sub>3</sub>, a *triosephosphate isomerase* participa do processo energético na rota do ciclo de Calvin e da biossíntese de carboidratos. Além disso, esta proteína está envolvida na via glicolítica e no desenvolvimento primário das raízes das plantas. De maneira similar às plantas de soja do grupo NT-AgNO<sub>3</sub>, as raízes das plantas de soja T cultivadas com as AgNP também apresentaram anomalias no seu desenvolvimento em comparação com as plantas de soja T controle.

Embora *isomerases* sejam diferencialmente abundantes apenas nas plantas dos grupos NT-AgNO<sub>3</sub> e T-AgNP, as outras plantas de soja NT e T tratadas também apresentaram anomalias em algumas raízes. De fato, em um trabalho relatado na literatura [57], ambas as formas de Ag, AgNP e AgNO<sub>3</sub>, ocasionaram anomalias e uma diminuição no comprimento e biomassa das raízes das plantas (*Lolium multiflorum*), corroborando nossos resultados no que se refere à toxicidade de ambas as formas de Ag. Entretanto, considerando o cultivo-teste realizado com uma concentração final de 250 mg kg<sup>-1</sup> de Ag (item 4.2.1 do Capítulo 1), ficou evidente a maior toxicidade da Ag iônica em comparação com as AgNP, à uma super dosagem. A outra *isomerase* identificada foi a *peptidyl-prolyl cis-trans isomerase*. Essa enzima acelera o processo de enovelamento das proteínas para que atinjam sua conformação funcional, e catalisa a isomeração cis-trans de ligações peptídicas em oligopeptídeos.

Aditivamente, por se tratar de soja T, a enzima envolvida na modificação genética das sojas Roundup Ready<sup>®</sup>, *3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase (EPSPS)*, foi identificada. Essa enzima, previamente identificada por nosso grupo de pesquisa em folhas de soja T [20], está relacionada à biossíntese de aminoácidos aromáticos, e sua inibição pelo glifosato pode causar a morte de plantas. Possivelmente, o cultivo com as AgNP das plantas de soja T resulta em uma menor biossíntese de

aminoácidos, especialmente os aromáticos.

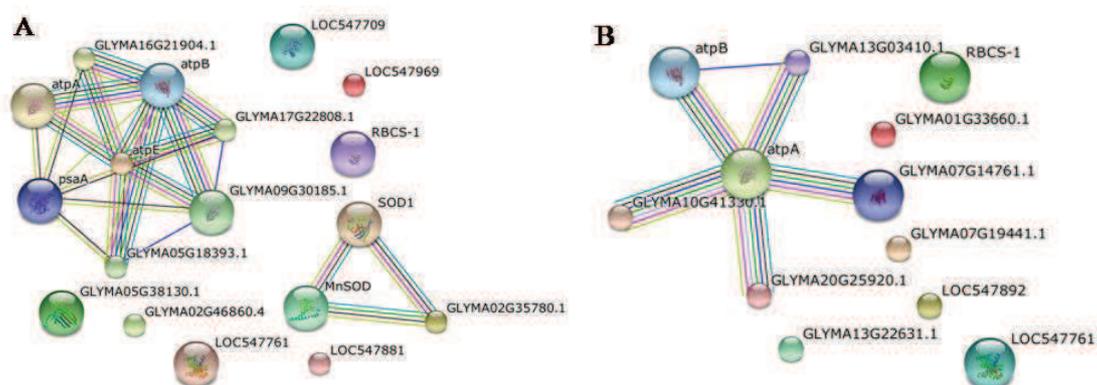
Da mesma forma como previamente descrito para a soja NT, a interação das AgNP e AgNO<sub>3</sub> com as plantas de soja T também foi avaliada. Como esperado, de maneira similar à soja NT, existem proteínas referentes aos *spots* diferencialmente abundantes entre os grupos T-AgNP vs T-AgNO<sub>3</sub> (9 *spots* proteicos), corroborando o fato de que as NPs interagem de forma diferente com um organismo em comparação com o seu respectivo íon metálico (AgNO<sub>3</sub>). De maneira análoga, como previamente comentado, por se tratar de plantas do grupo T, a enzima *EPSPS*, envolvida na modificação genética das sojas T, também foi identificada no grupo T-AgNP vs T-AgNO<sub>3</sub>, com menor abundância naquelas plantas de soja T cultivadas com AgNP. Provavelmente, a exposição às AgNP resulta em uma menor biossíntese de aminoácidos, especialmente os aromáticos em comparação com as plantas T cultivadas com AgNO<sub>3</sub>. A *plastoglobulin* é uma proteína que, juntamente com outras plastoglobulinas, pode formar um revestimento na superfície de uma partícula de lipoproteína. Este revestimento pode conter receptores para a fixação à membrana tilacoide, bem como de proteínas reguladoras que podem ter a função de transferir lipídios para as membranas tilacoide. De fato, ambas as proteínas *plastoglobulin* e *thylakoid* foram identificadas, e estão em maior abundância para as plantas de soja do grupo T-AgNO<sub>3</sub> em comparação com as sojas do grupo T-AgNP. Normalmente, um maior nível de plastoglobulinas está relacionado com condição de estresse e, também, com o aumento do tamanho do plastoglóbulo [58-59].

Para expandir o entendimento acerca das diferenças entre a exposição à Ag e a modificação genética, outros dois grupos relacionados às distintas formas de cultivo com Ag, NT-AgNO<sub>3</sub> vs T-AgNO<sub>3</sub> e NT-AgNP vs T-AgNP, também foram avaliados. Considerando o cultivo com AgNO<sub>3</sub>, foram identificadas: *3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase*, *putative uncharacterized protein*, *Cu-ZnSOD* e *NDK*. Para àquelas plantas de soja NT e T expostas às AgNP, foram identificadas: *3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase*, *cysteine synthase*, *fructose-bisphosphate aldolase*, *RuBisCO* e *oxygen-evolving enhancer protein 2*. Da mesma maneira que os

grupos NT vs NT-AgNO<sub>3</sub> e T vs T-AgNP, os cultivos das sojas NT e T com AgNO<sub>3</sub> e AgNP apresentaram a NDK e *oxygen-evolving enhancer protein 2* como proteínas diferencialmente abundantes, respectivamente. Com isso, fica evidente que, de fato, as diferentes variedades de soja (NT e T) respondem de maneira distinta aos cultivos com as AgNP e com o AgNO<sub>3</sub>, uma vez que algumas espécies foram identificadas nesses grupos. Possivelmente, as plantas NT aparentam ser mais afetadas pelos tratamentos com ambas as formas de Ag, uma vez que algumas espécies, tais como a *Cu-ZnSOD*, *NDK*, *RuBisCO* e *oxygen-evolving enhancer protein 2* foram identificadas em *spots* com menor abundância nas plantas de soja NT em comparação com as plantas de soja T (Tabela 2.1).

#### 4.4. Interações entre as proteínas identificadas

Para ampliar as informações obtidas na identificação das proteínas referentes aos *spots* diferencialmente abundantes, as interações de algumas destas proteínas foram avaliadas empregando o STRING v10, e utilizando como organismo a *Glycine max*. Para isso, todos os grupos avaliados foram separados em quatro grupos majoritários: NT e T (Figura 2.7); AgNO<sub>3</sub> e AgNP (Figura 2.9).

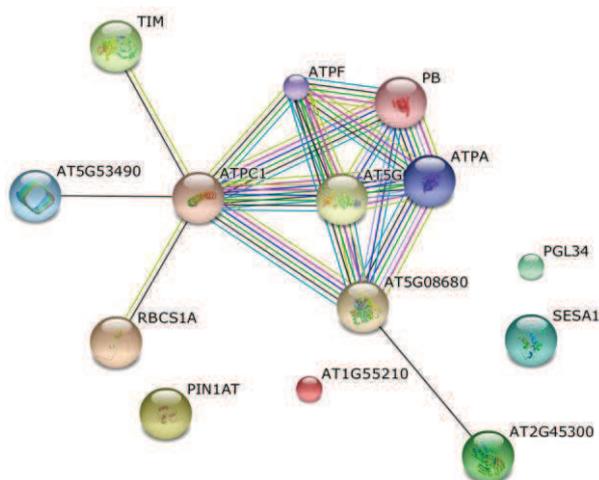


**Figura 2.7:** (A) Rede de interações proteína-proteína geradas pelo programa STRING 10 para proteínas identificadas nos grupos de soja NT, e (B) para proteínas identificadas nos grupos de soja T.

Considerando os grupos de soja NT, as interações proteína-proteína (Figura 2.7A) apresentam resultados de 13 proteínas daquelas diferenciais encontradas e identificadas em nosso estudo (Tabela 2.1). Como mostrado na Figura 2.7A, dois *clusters* são visualizados indicando uma estreita correlação entre essas proteínas. No maior *cluster*, diferentes *ATP synthases* (atpA, atpB, atpE e GLYMA05G18393.1 – *Uncharacterized protein*) e uma *plastocyanin* (psaA) estão presentes. Há neste *cluster*, também, três proteínas não caracterizadas. Como comentado no item anterior, *ATP synthases* e a *plastocyanin* estão envolvidas nos processos fotossintéticos (PSI) e alterações nessas proteínas podem estar associadas às condições de estresse ambiental em plantas superiores, sendo, em algumas ocasiões, *ATP synthases* e a *plastocyanin* estreitamente correlacionadas com o conteúdo da *RuBisCO* e capacidade de assimilação das folhas [45-46]. De fato, foram observadas alterações na abundância das *ATP synthases*, *plastocyanin* e *RuBisCO* em nosso estudo para o grupo NT vs NT-AgNO<sub>3</sub> (Tabela 2.1), sugerindo que o PSI pode estar alterado nas plantas NT devido à exposição ao AgNO<sub>3</sub>. No outro *cluster*, três proteínas diferencialmente abundantes, duas SOD (SOD1 e MnSOD) e uma *2-cys peroxiredoxin* (GLYMA02G35780.1), estão presentes, apresentando estreita correlação entre si. De fato, como discutido previamente no item 4.3., a *2-cys peroxiredoxin* e SOD estão relacionadas à resposta de defesa sob condições de estresse, atuando conjuntamente na detoxificação de O<sub>2</sub><sup>-</sup> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em plantas [44, 48].

Para os grupos de soja T, as interações proteína-proteína (Figura 2.7B) apresentam resultados de 7 proteínas daquelas que foram encontradas e identificadas em nosso estudo (Tabela 2.1). Como o banco do organismo *Glycine max* foi considerado, apenas um único *cluster* com diferentes *ATP synthases* (atpB, atpA, GLYMA10G41330.1 e GLYMA20G25920.1) está presente. Outras proteínas identificadas no nosso trabalho com conhecida correlação com as *ATP synthases*, como por exemplo a *RuBisCO* (RBCS-1) e *isomerases* (GLYMA07G19441.1 e LOC547761) não puderam ser correlacionadas com as *ATP synthases* pelo STRING. Como previamente comentado no item 4.3., a quantidade de *RuBisCO* é dependente também da atividade da *ATP synthase*, demonstrando que ambas as espécies possuem

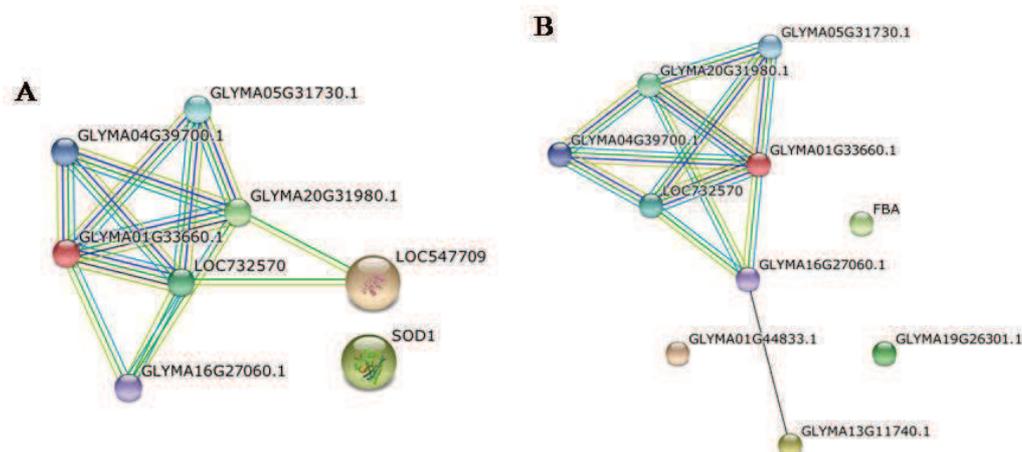
uma correlação próxima [10, 47]. De fato, se considerarmos a *Arabidopsis thaliana* como organismo modelo para a construção da rede de interações, empregando as mesmas proteínas identificadas para o organismo *Glycine max*, são observadas estreitas correlações entre *ATP synthases*, *triosephosphate isomerase* e *RuBisCO* (Figura 2.8). Este fato pode ser justificado, pois, todas estas espécies participam do PSI, uma vez que o ciclo de Calvin utiliza ATP e NADPH para sintetizar a *RuBisCO* [10, 46-47].



**Figura 2.8:** Rede de interações proteína-proteína geradas pelo programa STRING 10 para proteínas identificadas nos grupos de soja T, considerando a *Arabidopsis thaliana* como organismo modelo.

Considerando a modificação genética, as interações proteína-proteína, por meio dos grupos AgNO<sub>3</sub> (Figura 2.9A) e AgNP (Figura 2.9B), apresentam resultados de três e cinco proteínas, respectivamente, daquelas diferencialmente abundantes, e previamente identificadas em nosso estudo (Tabela 2.1). Para o grupo NT-AgNO<sub>3</sub> vs T-AgNO<sub>3</sub> (Figura 2.9A), um *cluster* pode ser observado, mostrando uma estreita correlação entre duas espécies identificadas: NDK (LOC547709) e *EPSPS* (GLYMA01G33660.1). Também, neste *cluster*, duas *chorismate synthases* (LOC732570 e GLYMA20G31980.1) estão presentes. Como se sabe, a *EPSPS* e a *chorismate synthase* participam da via da *shikimate* na síntese de aminoácidos aromáticos [60], justificando a estreita correlação entre essas enzimas obtidas pelo STRING. Como

comentado no item 4.3., a NDK está envolvida na tradução de sinal, ligação de íon metálico ( $Mg^{2+}$ ) e na atividade da NDK nos processos biossintéticos. Essa proteína foi encontrada com menor abundância nas plantas NT expostas ao cultivo com  $AgNO_3$  do que nas plantas NT controle.



**Figura 2.9:** (A) Rede de interações proteína-proteína geradas pelo STRING 10 para proteínas identificadas no grupo NT- $AgNO_3$  vs T- $AgNO_3$ , e (B) para proteínas identificadas no grupo NT- $AgNP$  vs T- $AgNP$ .

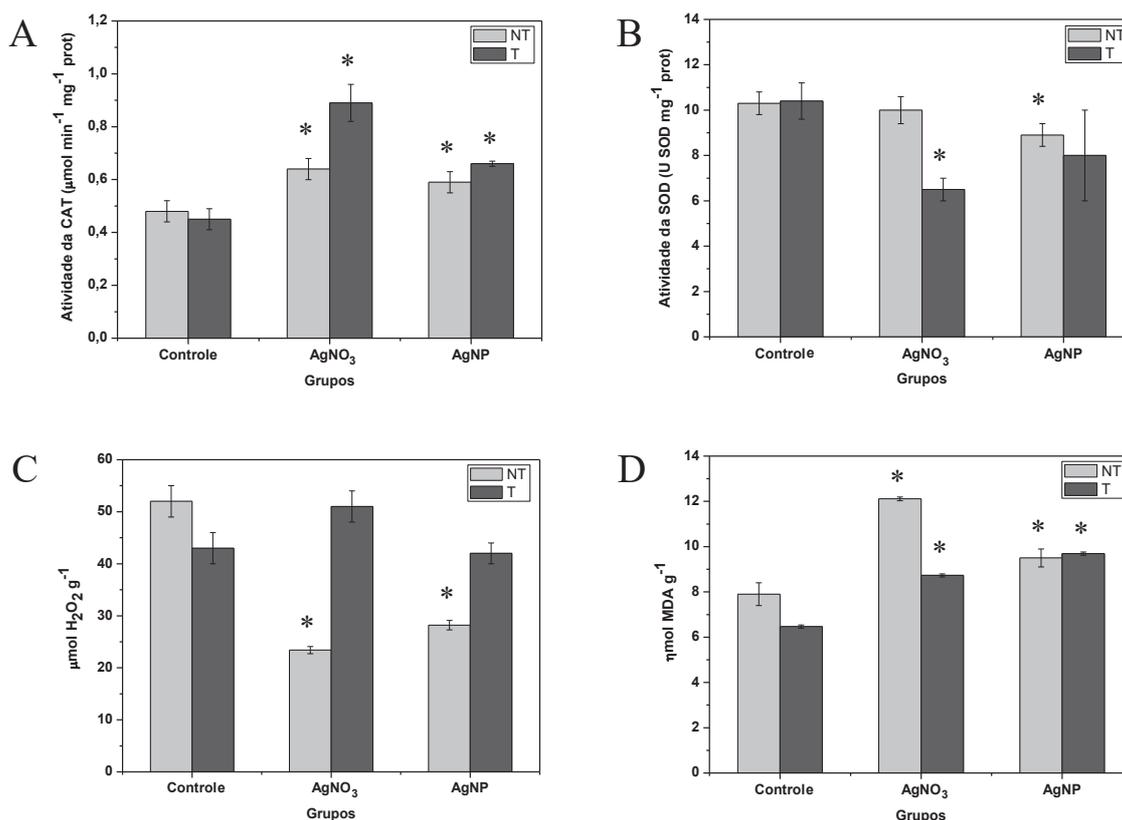
Para o grupo NT- $AgNP$  vs T- $AgNP$  (Figura 2.9B), a mesma estreita correlação entre a *EPSPS* (GLYMA01G33660.1) e a *chorismate synthase* (LOC732570 e GLYMA20G31980.1) pode ser visualizada, uma vez que neste grupo também estão presentes as variedades de soja NT e T, assim como no grupo NT- $AgNO_3$  vs T- $AgNO_3$ . Há também, no grupo NT- $AgNP$  vs T- $AgNP$ , uma correlação entre uma *RuBisCO* (GLYMA13G11740.1) identificada e uma proteína não caracterizada que pertence a este *cluster*.

#### 4.5. Determinação da atividade enzimática

Como previamente mencionado, espécies reativas de oxigênio (ROS), tais como radicais superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), oxigênio singlete ( $^1O_2$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radicais hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ), entre outros, podem ser produzidos em excesso pelas células das plantas sob condições de estresse

oxidativo, devido à exposição por metal/metaloide ou até mesmo NPs [20-21]. No nosso estudo, as enzimas CAT e SOD, que atuam na prevenção dos danos e controle dos níveis de ROS [18], foram consideradas para avaliar o estresse oxidativo nas folhas de soja NT e T cultivadas com  $\text{AgNO}_3$  e AgNP. Além disso, a concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi avaliada como ROS e a peroxidação lipídica foi expressa em termos da concentração de malondialdeído (MDA), uma substância reativa do ácido tiobarbitúrico (TBARS) [18]. Os resultados para as atividades da CAT e SOD, assim como as concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e MDA estão apresentadas na Figura 2.10.

Avaliando a atividade da CAT, foram observadas diferenças significativas (teste de Tukey -  $p < 0,05$ ) para os grupos NT vs NT- $\text{AgNO}_3$ , NT vs NT-AgNP, T vs T- $\text{AgNO}_3$  e T vs T-AgNP. Para todos os tratamentos, foi detectado um aumento na atividade da CAT em comparação com o seu respectivo controle (Figura 2.10A). Para a soja NT, os cultivos com  $\text{AgNO}_3$  e AgNP apresentaram um aumento de *ca.* 33 e 23% na atividade da CAT, respectivamente, enquanto que para a soja T, os mesmos cultivos resultaram em um aumento de *ca.* 98 e 47%, respectivamente. Esses resultados sugerem que a soja T é mais suscetível, em termos da atividade da CAT, à ambos os cultivos em comparação à soja NT. Além disso, de acordo com os nossos resultados, as sojas NT e T expostas ao  $\text{AgNO}_3$  estão mais estressadas do que as plantas cultivadas com AgNP. Para confirmar tais diferenças entre os cultivos, foi observada diferença significativa (teste de Tukey -  $p < 0,05$ ) no grupo T- $\text{AgNO}_3$  vs T-AgNP, sendo que a atividade da CAT para as plantas do grupo T- $\text{AgNO}_3$  foi *ca.* 35% maior do que a atividade nas plantas do grupo T-AgNP. Em todos os casos, a maior atividade da CAT nas plantas de soja tratadas indicam que esta enzima antioxidante atua na proteção contra os efeitos tóxicos das ROS, especialmente na dismutação do  $\text{H}_2\text{O}_2$  em  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{O}_2$  [18-19, 21].



**Figura 2.10:** Avaliação enzimática considerando a atividade da CAT (A) e da SOD (B); avaliação das ROS pela concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (C) e avaliação da peroxidação lipídica em termos da concentração de MDA (D), onde (\*) representa as diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos tratados e os seus respectivos controles.

Da mesma forma que a discussão sobre o conteúdo da SOD no item 4.5., a atividade da CAT sob condições de estresse é também dependente de uma série de fatores, dentre eles a espécie de planta e o tipo de metal/metalóide empregado no experimento [18, 22]. Considerando as NPs, de maneira análoga, a geração das ROS e a atividade das enzimas antioxidantes também podem variar de acordo com alguns aspectos, tais como as condições de exposição, tipo de NP empregada e a espécie de planta estudada [19]. De fato, existem na literatura uma variedade de estudos que relatam o aumento ou a diminuição na atividade enzimática e na produção de ROS sob condições de estresse oxidativo devido ao cultivo com metal/metalóide ou NPs [18-19].

Considerando a atividade da SOD, diferenças significativas (teste de

Tukey -  $p < 0,05$ ) foram observadas apenas para os grupos NT vs NT-AgNP e T vs T-AgNO<sub>3</sub>. Para a soja NT, o cultivo com as AgNP apresentou uma diminuição de ca. 14% na atividade da SOD, enquanto que para a soja T uma diminuição de ca. 38% na atividade da SOD foi observada para aquelas plantas de soja T expostas ao AgNO<sub>3</sub> (Figura 2.10B). Esses resultados indicam vias distintas de resposta entre as variedades das plantas, uma vez que para a soja NT somente o cultivo com as AgNP apresentou alterações na atividade da SOD, enquanto que para a soja T somente à exposição ao AgNO<sub>3</sub> apresentou alterações. Usualmente, sob condições de estresse, é observado um aumento na atividade da SOD [18, 22], uma vez que esta enzima antioxidante pode proteger as plantas dos danos causados pelas NPs, e, conseqüente geração de ROS, convertendo O<sub>2</sub><sup>·-</sup> em O<sub>2</sub> ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [19, 48]. Entretanto, como previamente discutido no item 4.3., a atividade da SOD, assim como de outras enzimas antioxidantes, é dependente de diferentes fatores, especialmente a espécie de planta estudada e o tipo de metal/metalóide ou tipo de NP empregado no tratamento [18-19, 22]. De fato, existem estudos relatados na literatura em que, sob condição de estresse por metais, algumas plantas apresentam uma diminuição no conteúdo e atividade da SOD [18, 22, 49-50], incluindo um estudo com a soja em que o cultivo com Cd reduziu a abundância e a atividade da SOD [49], corroborando nossos resultados.

Avaliando a concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, somente para as plantas de soja NT cultivadas com AgNO<sub>3</sub> e AgNP foram observadas diferenças significativas (teste de Tukey -  $p < 0,05$ ), com uma diminuição de ca. 55 e 46% na concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, respectivamente, em comparação com as plantas NT controle (Figura 2.10C). Possivelmente, essa menor concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para as plantas de soja NT expostas sugere que a CAT, que apresentou maior atividade para as plantas dos grupos NT-AgNO<sub>3</sub> e NT-AgNP, converteram de maneira eficaz o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em H<sub>2</sub>O ou O<sub>2</sub>, uma vez que esta é uma função comum da CAT [18-19]. Todavia, embora tenham sido visualizadas diferenças significativas na atividade da CAT, não foram observadas diferenças significativas na concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para as plantas de soja T expostas aos cultivos com AgNO<sub>3</sub> e AgNP. Provavelmente, as plantas de soja T devem gerar outros tipos de ROS ou possuir outra via de detoxificação das ROS que podem

estar relacionadas com outras enzimas antioxidantes, não avaliadas neste estudo, tais como a glutathione e ascorbate peroxidases [19].

A peroxidação lipídica foi considerada em termos da concentração do MDA. Como mostrado na Figura 2.10D, diferenças significativas (teste de Tukey -  $p < 0,05$ ) na concentração de MDA foram observadas para os grupos NT vs NT-AgNO<sub>3</sub>, NT vs NT-AgNP, T vs T-AgNO<sub>3</sub> e T vs T-AgNP. Para as plantas de soja NT, ambos os cultivos apresentaram um aumento na peroxidação lipídica, sendo ca. 53 e 20% para o AgNO<sub>3</sub> e AgNP, respectivamente. Da mesma maneira, para as plantas de soja T, àquelas expostas ao AgNO<sub>3</sub> e AgNP apresentaram um aumento de ca. 35 e 50% na concentração de MDA, respectivamente. Esses resultados sugerem uma diferente resposta das sojas NT e T mediante à exposição aos diferentes tipos de Ag, uma vez que a soja NT se mostrou mais suscetível ao cultivo com o AgNO<sub>3</sub>, enquanto que a soja T foi mais afetada pelo cultivo com as AgNP, em termos de concentração de MDA. A peroxidação lipídica pelo conteúdo de MDA é um importante e comum indicador de estresse. Um incremento na concentração de MDA indica uma condição de estresse, uma vez que a geração das ROS é conhecida por ser um fator primário, que resulta no dano da membrana celular por meio da peroxidação lipídica [18-20].

De acordo com os nossos resultados, todas as plantas de soja NT e T cultivadas com AgNO<sub>3</sub> e AgNP, respectivamente, estão sob maior condição de estresse. Em um estudo reportado por Verma e Dubey (2003) [61], a toxicidade do chumbo foi avaliada e este tratamento resultou em um aumento entre 21 e 177% na peroxidação lipídica em plantas de arroz, em termos de níveis de TBARS. Em um trabalho relatado por Dimkpa *et al.* (2012) [62], foi observado um aumento de ca. 271 e 89% na concentração de MDA em raízes de trigo expostas à CuO e ZnO NPs, respectivamente. Outro estudo relacionado à exposição com ZnO NPs, reportado por Kumari *et al.* (2011) [63], apresentou um aumento na peroxidação lipídica, em termos de conteúdo de TBARS, em sementes de cebola. Por fim, para avaliar as diferenças entre os cultivos considerando as variedades de soja e a exposição com diferentes tipos de Ag, foram encontradas diferenças significativas (teste de Tukey -  $p < 0,05$ )

no conteúdo de MDA para os grupos NT vs T, NT-AgNO<sub>3</sub> vs NT-AgNP e T-AgNO<sub>3</sub> vs T-AgNP. Por meio da Figura 2.10D, pode-se observar que a concentração de MDA nas folhas de soja NT é ca. 22% maior que nas folhas de soja T. Considerando ambos os cultivos com Ag, foram visualizadas diferenças significativas (teste de Tukey -  $p < 0,05$ ) para os grupos NT-AgNO<sub>3</sub> vs NT-AgNP e T-AgNO<sub>3</sub> vs T-AgNP. A concentração de MDA para as plantas do grupo NT-AgNO<sub>3</sub> foi ca. 28% maior do que para as plantas do grupo NT-AgNP, enquanto que para as plantas do grupo T-AgNO<sub>3</sub> o conteúdo de MDA foi ca. 10% menor do que para as plantas T expostas às AgNP. Esses resultados sugerem que, de fato, a resposta da planta, em termos de ROS e atividade das enzimas antioxidantes, sob condições de estresse oxidativo, é dependente da espécie de planta estudada (no nosso caso, da variedade) e do tipo de metal/metalóide ou NPs empregados durante o cultivo [18-19, 22].

## 5. CONSIDERAÇÕES PARCIAIS

Após os indícios de alteração no perfil proteômico observados nos estudos por 2-D PAGE, foi realizado um estudo por 2-D DIGE entre todos os grupos. Os resultados indicam que a resposta da soja, em termos de *spots* diferenciais, é dependente da variedade da planta e da forma de Ag adicionada durante ao cultivo. No caso dos estudos com as folhas de soja NT, para os grupos NT vs NT-AgNO<sub>3</sub>, NT vs NT-AgNP e NT-AgNO<sub>3</sub> vs NT-AgNP foram observados 19, 11 e 22 *spots* diferenciais em termos de abundância, respectivamente. Já as folhas de soja T apresentaram um comportamento diferente referente aos tratamentos com prata. Para os grupos T vs T-AgNO<sub>3</sub>, T vs T-AgNP e T-AgNO<sub>3</sub> vs T-AgNP foram observados 8, 12 e 9 *spots* diferenciais, respectivamente. Essas diferentes respostas das plantas NT e T mediante o tratamento com prata, foram corroboradas com um estudo comparativo entre os grupos NT vs T, NT-AgNO<sub>3</sub> vs T-AgNO<sub>3</sub> e NT-AgNP vs T-

AgNP onde foram observados 13, 11 e 12 *spots* diferenciais em termos de abundância, respectivamente.

As proteínas presentes nos *spots* diferenciais foram identificadas por espectrometria de massas. Então, pode-se avaliar de maneira mais ampla os efeitos causados pela exposição aos diferentes tipos de Ag. Como esperado, para ambas as sojas NT e T, tanto para o cultivo com a Ag iônica, quanto para o cultivo com as AgNP, foram encontradas espécies relacionadas às condições de estresse oxidativo e ao fotossistema nos *spots* diferenciais, dentre elas *RuBisCO*, *superóxido dismutase*, *ATP synthase*, *triosephosphate isomerase*, *oxygen-evolving enhancer protein 2*, entre outras. No caso do AgNO<sub>3</sub>, tal condição se deve ao estresse metálico, enquanto que, no caso das AgNP, além deste, há, provavelmente, um estresse coloidal, uma vez que NPs são colóides. Para complementar a informação sobre as funções das espécies identificadas, a rede de interações proteína-proteína foi acessada por meio do software STRING 10, confirmando as estreitas relações entre algumas das proteínas identificadas em cada grupo.

Para ampliar o entendimento acerca do estresse oxidativo indicado pelo estudo proteômico, foram realizados ensaios enzimáticos. Foram encontradas diferenças significativas para os grupos NT vs NT-AgNO<sub>3</sub>, NT vs NT-AgNP, T vs T-AgNO<sub>3</sub> e T vs T-AgNP, sendo que os tratamentos aumentaram a atividade da CAT em comparação com o respectivo controle. As plantas expostas ao AgNO<sub>3</sub> estão mais estressadas do que as plantas cultivadas com AgNP. A soja T foi mais suscetível aos cultivos com AgNO<sub>3</sub> e AgNP, uma vez que foram visualizadas maiores atividades da CAT para as plantas geneticamente modificadas do que para a soja NT. Todavia, somente para as sojas NT, expostas ao AgNO<sub>3</sub> e AgNP, foram observadas reduções na concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Este resultado sugere que a CAT atua de maneira eficaz apenas na soja NT, e que, provavelmente, a soja T deve gerar outros tipos de ROS ou, até mesmo, possuir outras vias de detoxificação. Apenas para os grupos NT vs NT-AgNP e T vs T-AgNO<sub>3</sub>, foram observadas diferenças significativas, com uma diminuição da atividade da SOD em ca. 14 e 38%, respectivamente. Esses resultados indicam que, possivelmente, as plantas de

soja NT e T possuam vias distintas de resposta. Por fim, avaliou-se a peroxidação lipídica por meio da concentração do MDA, visto que os cultivos das sojas NT e T com AgNO<sub>3</sub> e AgNP resultaram em um aumento da concentração de MDA, indicando condição de estresse. As plantas de soja NT e T apresentaram respostas distintas, uma vez que a soja NT foi mais afetada pela exposição ao AgNO<sub>3</sub>, enquanto que a soja T foi mais suscetível ao cultivo com as AgNP.

Considerando os estudos acerca das proteínas diferenciais identificadas e da avaliação enzimática, todos os resultados obtidos neste trabalho sugerem que, de fato, a resposta de uma planta, em termos de ROS, conteúdo e atividade das enzimas antioxidantes, sob condições de estresse oxidativo, é dependente de vários fatores, dentre eles a espécie de planta estudada (no nosso caso, da variedade) e do tipo de metal/metaloide ou NPs empregados durante o cultivo.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. G. K. Agrawal, R. Rakwal, *Plant Proteomics*. John Wiley & Sons, Inc.: New Jersey, USA, **2008**, 600p.
2. S. C. Carpentier, B. Panis, A. Vertommen, R. Swennen, K. Sergeant, J. Renault, K. Laukens, E. Witters, B. Samyn, B. Devreese, *Proteome analysis of non-model plants: a challenging but powerfull approach*. **Mass Spectrom Rev**, **2008**, *27*, 354-377.
3. Y. Gao, T. K. Lim, Q. Lin, S. F. Y. Li, *Evaluation of sample extraction methods for proteomics analysis of green algae *Chlorella vulgaris**. **Electrophoresis**, **2016**, *37*, 1270-1276.

4. W. Wang , F. Tai, S. Chen, *Optimizing protein extraction from plant tissues for enhanced proteomics analysis*. **J. Sep. Sci.**, **2008**, *31*, 2032-2039.
5. C. A. Lopes Júnior, *Ômicas para estudar a influência do cádmio no metabolismo do girassol (Helianthus annuus L.)*. Tese de Doutorado, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, **2014**, pp.171.
6. M. A. O. Da Silva, J. S. Garcia, G. H. M. F. de Souza, M. N. Eberlin, F. C. Gozzo, M. A. Z. Arruda, *Evaluation of sample preparation protocols for proteomic analysis of sunflower leaves*. **Talanta**, **2010**, *80*, 1545-1551.
7. M. Sebastiana, A. Figueiredo, F. Monteiro, J. Martins, C. Franco, A. V. Coelho, F. Vaz, T. Simões, D. Penque, M. S. Pais, S. Ferreira, *A possible approach for gel-based proteomic studies in recalcitrant woody plants*. **Springerplus**, **2013**, *2*, 210-226.
8. V. Singh, B. Singh, R. Joshi, P. Jaju, P. K. Pati, *Changes in the leaf proteome profile of Withania somnifera (L.) Dunal in response to Alternaria alternata infection*. **PLoS ONE**, **2017**, *12*, 1-19.
9. D. Wang, Y. Sun, Z. Tong, Q. Yang, L. Chang, X. Meng, L. Wang, W. Tian, X. Wang, *A protein extraction method for low protein concentration solutions compatible with the proteomic analysis of rubber particles*. *Electrophoresis*, **2016**, *37*, 2930–2939.
10. C. A. Lopes Júnior, H. S. Barbosa, R. M. Galazzi, H. H. F. Koolen, F. C. Gozzo, M. A. Z. Arruda, *Evaluation of proteome alterations induced by cadmium stress in sunflower (Helianthus annuus L.) cultures*. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, **2015**, *119*, 170–177.
11. S. S. Natarajan, *Natural variability in abundance of prevalent soybean proteins*. **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, **2010**, *58*, S26–S29.
12. H. S. Barbosa, S. C. C. Arruda, R. A. Azevedo, M. A. Z. Arruda, *New insights on proteomics of transgenic soybean seeds: evaluation of differential*

*expressions of enzymes and proteins. Anal. Bioanal. Chem.*, **2012**, *402*, 299-314.

13. A. Sussulini, G. H. M. F. Souza, M. N. Eberlin, M. A. Z. Arruda, *Comparative metallomics for transgenic and non-transgenic soybeans. J. Anal. At. Spectrom.*, **2007**, *22*, 1501–1506.

14. J. Bettmer, M. M. Bayón, J. R. Encinar, M. L. F. Sánchez, M. R. F. De la Campa, A. Sanz-Medel, *The emerging role of ICP-MS in proteomic analysis. J. Proteomics*, **2009**, *72*, 989–1005.

15. M. A. O. da Silva, S. A. L. de Andrade, P. Mazzafera, M. A. Z. Arruda, *Evaluation of sunflower metabolism from zinc and selenium addition to the culture: a comparative metallomic study. Inter. J. Mass Spectrom.*, **2011**, *307*, 55-60.

16. A. R. Brandão, H. S. Barbosa, M. A. Z. Arruda, *Image analysis of two-dimensional gel electrophoresis for comparative proteomics of transgenic and non-transgenic soybean seeds. J. Proteomics*, **2010**, *73*, 1433–1440.

17. S. C. C. Arruda, H. S. Barbosa, R. A. Azevedo, M. A. Z. Arruda, *Two-dimensional difference gel electrophoresis applied for analytical proteomics: fundamentals and applications to the study of plant proteomics. Analyst*, **2011**, *136*, 4119.

18. O. Sytar, A. Kumar, D. Latowski, P. Kuczynska, K. Strzałka, M. N. V. Prasad, *Heavy metal-induced oxidative damage, defense reactions, and detoxification mechanisms in plants. Acta Physiol. Plant.*, **2013**, *35*, 985–999.

19. C. Ma, J. C. White, O. P. Dhankher, B. Xing, *Metal-based nanotoxicity and detoxification pathways in higher plants. Environ. Sci. Technol.* **2015**, *49*, 7109–7122.

20. S. C. C. Arruda, H. S. Barbosa, R. A. Azevedo, M. A. Z. Arruda, *Comparative studies focusing on transgenic through cp4EPSPS gene and non-*

*transgenic soybean plants: An analysis of protein species and enzymes*. **J. Proteomics**, **2013**, *93*, 107–116.

21. P. L. Gratão, A. Polle, P. J. Lea, R. A. Azevedo, *Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier*. **Funct. Plant Biol.**, **2005**, *32*, 481-494.

22. S. S. Gill, N. A. Anjum, R. Gill, S. Yadav, M. Hasanuzzaman, M. Fujita, P. Mishra, S. C. Sabat, N. Tuteja, *Superoxide dismutase—mentor of abiotic stress tolerance in crop plants*. **Environ. Sci. Pollut. Res.**, **2015**, *22*, 10375–10394.

23. N. Amist, N. B. Singh, K. Yadav, S. C. Singh, J. K. Pandey, *Comparative studies of Al<sup>3+</sup> ions and Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles on growth and metabolism of cabbage seedlings*. **J. Biotechnol.**, **2017**, *254*, 1-8.

24. M. P. Benavides, S. M. Gallego, M. L. Tomaro, *Cadmium toxicity in plants*. **Braz. J. Plant Physiol.**, **2005**, *17*, 21–34.

25. R. Tarrahi, A. Khataee, A. Movafeghi, F. Rezanejad, G. Gohari, *Toxicological implications of selenium nanoparticles with different coatings along with Se<sup>4+</sup> on Lemna minor*. **Chemosphere**, **2017**, *181*, 655-665.

26. F. Yasmeen, N. I. Raja, G. Mustafa, K. Sakata, S. Komatsu, *Quantitative proteomic analysis of post-flooding recovery in soybean root exposed to aluminum oxide nanoparticles*. **J. Proteomics**, **2017**, *143*, 136-150.

27. G. Mustafa, K. Sakata, S. Komatsu, *Proteomic analysis of soybean root exposed to varying sizes of silver nanoparticles under flooding stress*. **J. Proteomics**, **2016**, *148*, 113-125.

28. G. Mustafa, S. Komatsu, *Nanoparticles mediated soybean response mechanism at morphological, physiological, and proteomic level*. **Current proteomics**, **2017**, *14*, 3-12.

29. F. Mirzajani, H. Askari, S. Hamzelou, Y. Schober, A. Römpf, A. Ghassempour, B. Spengler, *Proteomics study of silver nanoparticles toxicity on *Oryza sativa* L.* **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, **2014**, *108*, 335–339.

30. T. Berkelman, T. Stenstedt, *2-D Electrophoresis using immobilized pH gradients: Principles and Methods*. Munich: Amersham Biosciences, **1998**.
31. M. Bevan, I. Bancroft, E. Bent, K. Love, H. Goodman, C. Dean, R. Bergkamp, W. Dirkse, M. Van Staveren, W. Stiekema, L. Drost, P. Ridley, S. A. Hudson, K. Patel, G. Murphy, P. Piffanelli, H. Wedler, E. Wedler, R. Wambutt, T. Weitzenegger, T. M. Pohl, N. Terry, J. Gielen, R. Villarroel, R. De Clerck, M. Van Montagu, A. Lecharny, S. Auborg, I. Gy, M. Kreis, N. Lao, T. Kavanagh, S. Hempel, P. Kotter, K. D. Entian, M. Rieger, M. Schaeffer, B. Funk, S. Mueller-Auer, M. Silvey, R. James, A. Montfort, A. Pons, P. Puigdomenech, A. Douka, E. Voukelatou, D. Milioni, P. Hatzopoulos, E. Piravandi, B. Obermaier, H. Hilbert, A. Düsterhöft, T. Moores, J. D. G. Jones, T. Eneva, K. Palme, V. Benes, S. Rechman, W. Ansorge, R. Cooke, C. Berger, M. Delseny, M. Voet, G. Volckaert, H. W. Mewes, S. Klosterman, C. Schueller, N. Chalwatzis, *Analysis of 1.9 Mb of contiguous sequence from chromosome 4 of Arabidopsis thaliana*. **Nature**, **1998**, 391, 485-488.
32. M. M. Bradford, *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. **Anal. Biochem.**, **1976**, 72, 248–254.
33. R. A. Azevedo, R. M. Alas, R. J. Smith, P. J. Lea, *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 barley*. **Physiol. Plantar.**, **1998**, 104, 280-292.
34. C. N. Giannopolitis, S. K. Ries, *Superoxide Dismutases*. **Plant Physiol. Biochem.**, **1977**, 59, 309–14.
35. R. L. Heath, L. Packer, *Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation*. **Arch. Biochem. Biophys.**, **1968**, 125, 189-198.
36. J. A. Buege, S. D. Aust, *Microsomal lipid peroxidation*. **Methods Enzymol.**, **1978**, 52, 302-310.

37. V. Alexieva, I. Sergiev, S. Mapelli, E. Karanov, *The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat*. **Plant Cell Environ.**, **2001**, *24*, 1334–1337.
38. M. C. Romero-Puertas, F. J. Corpas, L. M. Sandalio, M. Leterrier, M. Rodríguez-Serrano, L. A. del Río, J. M. Palma, *Glutathione reductase from pea leaves: response to abiotic stress and characterization of the peroxisomal isozyme*. **New Phytol.**, **2006**, *170*, 43–52.
39. S. Asli, P. M. Neumann, *Rhizosphere humic acid interacts with root cell walls to reduce hydraulic conductivity and plant development*. **Plant Soil**, **2010**, *336*, 313-322.
40. A. Polatajko, I. Feldmann, H. Hayen, N. Jakubowski, *Combined application of a laser ablation-ICP-MS assay for screening and ESI-FTICR-MS for identification of a Cd-binding protein in Spinacia oleracea L. after exposure to Cd*. **Metallomics**, **2011**, *3*, 1001–1008.
41. M. Hajduch, R. Rakwal, G. K. Agrawal, M. Yonekura, A. Pretova, *High-resolution two-dimensional electrophoresis separation of proteins from metal-stressed rice (Oryza sativa L.) leaves: Drastic reductions/fragmentation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and induction of stress related proteins*. **Electrophoresis**, **2001**, *22*, 2824–2831.
42. B. Printz, K. Sergeant, C. Guignard, J. Renaut, J. F. Hausman, *Physiological and proteome study of sunflowers exposed to a polymetallic constraint*. **Proteomics**, **2013**, *13*, 1993–2015.
43. G. Mustafa, K. Sakata, Z. Hossain, S. Komatsu, *Proteomic study on the effects of silver nanoparticles on soybean under flooding stress*. **J. Proteomics**, **2015**, *122*, 100–118.
44. R. Mittler, S. Vanderauwera, M. Gollery, F. Van Breusegem, *Reactive oxygen gene network of plants*. **Trends Plant Sci.**, **2004**, *9*, 490-498.

45. M. A. Schöttler, S. Z. Tóth, *Photosynthetic complex stoichiometry dynamics in higher plants: environmental acclimation and photosynthetic flux control*. **Front. Plant Sci.**, **2014**, *5*, 1-15.
46. T. Shikanai, *Central role of cyclic electron transport around photosystem I in the regulation of photosynthesis*. **Curr. Opin. Biotechnol.**, **2014**, *26*, 25-30.
47. M. Yoshida, E. Muneyuki, T. Hisabori, *ATP synthase — a marvellous rotary engine of the cell*. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, **2001**, *2*, 669–677.
48. C. Bowler, M. Van Montagu, D. Inzé, *Superoxide dismutase and stress tolerance*. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, **1992**, *43*, 83-116.
49. G. O. Noriega, K. B. Balestrasse, A. Batlle, M. L. Tomaro, *Cadmium induced oxidative stress in soybean plants also by the accumulation of d-aminolevulinic acid*. **Biometals**, **2007**, *20*, 841–851.
50. B. Guo, Y.C. Liang, Y.G. Zhu, F.J. Zhao, *Role of salicylic acid in alleviating oxidative damage in rice roots (Oryza sativa) subjected to cadmium stress*. **Environ. Pollut.**, **2007**, *147*, 743–749.
51. Y. Song, J. Cui, H. Zhang, G. Wang, F. J. Zhao, Z. Shen, *Proteomic analysis of copper stress responses in the roots of two rice (Oryza sativa L.) varieties differing in Cu tolerance*. **Plant Soil**, **2013**, *366*, 647–658.
52. Q. Y. Li, H. B. Niu, J. Yin, H. B. Shao, J. S. Niu, J. P. Ren, Y. C. Li, X. Wang, *Transgenic barley with overexpressed PTrx increases aluminum resistance in roots during germination*. **J. Zhejiang Univ. Sci. B**, **2010**, *11*, 862–870.
53. Y. B. Kim, C. Garbisu, I. J. Pickering, R. C. Prince, G. N. George, M. J. Cho, J. H. Wong, B. B. Buchanan, *Thioredoxin h overexpressed in barley seeds enhances selenite resistance and uptake during germination and early seedling development*. **Planta**, **2003**, *218*, 186–191.
54. M. Y. Lee, K. H. Shin, Y. K. Kim, J. Y. Suh, Y. Y. Gu, M. R. Kim, Y. S. Hur, O. Son, J. S. Kim, E. Song, M. S. Lee, K. H. Nam, M. K. Sung, H. J. Kim, J. Y.

Chun, M. Park, T. I. Ahn, C. B. Hong, S. H. Lee, H. J. Park, J. S. Park, D. P. S. Verma, C. I. Cheon, Induction of thioredoxin is required for nodule development to reduce reactive oxygen species levels in soybean roots. **Plant Physiol.**, **2005**, *139*, 1881–1889.

55. X. H. Duan, R. Jiang, Y. J. Wen, J. H. Bin, *Some 2S albumin from peanut seeds exhibits inhibitory activity against Aspergillus flavus*. **Plant Physiol. Biochem.**, **2013**, *66*, 84-90.

56. M. Rico, M. Bruix, C. González, R. I. Monsalve, R. Rodríguez, *<sup>1</sup>H NMR assignment and global fold of Napin Bn1b, a Representative 2S Albumin Seed Protein*. **Biochem.**, **1996**, *35*, 15672-15682.

57. L. Yin, Y. Cheng, B. Espinasse, B.P. Colman, M. Auffan, M. Wiesner, J. Rose, J. Liu, E.S. Bernhardt, *More than the ions: The effects of silver nanoparticles on Lolium multiflorum*. **Environ. Sci. Technol.**, **2011**, *45*, 2360–2367.

58. V. Shanmugabalaji, C. Besagni, L. E. Piller, V. Douet, S. Ruf, R. Bock, F. Kessler, *Dual targeting of a mature plastoglobulin/fibrillin fusion protein to chloroplast plastoglobules and thylakoids in transplastomic tobacco plants*. **Plant Mol. Biol.**, **2013**, *81*, 13–25.

59. B. Gillet, A. Beyly, G. Peltier, P. Rey, *Molecular characterization of CDSP 34, a chloroplastic protein induced by water deficit in Solanum tuberosum L. plants, and regulation of CDSP 34 expression by ABA and high illumination*. **Plant J.**, **1998**, *16*, 257–262.

60. Y. Gao, B. Tao, L. Qiu, L. Jin, J. Wu, *Role of physiological mechanism and EPSPS gene expression. In glyphosate resistance in wild soybeans (Glycine soja)*. **Pestic. Biochem. Physiol.**, **2014**, *109*, 6-11.

61. S. Verma, R. S. Dubey, *Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants*. **Plant Sci.**, **2003**, *164*, 645-655.

62. C. O. Dimkpa, J. E. McLean, D. E. Latta, E. Manangón, D. W. Britt, W. P. Johnson, M. I. Boyanov, A. J. Anderson, *CuO and ZnO nanoparticles: phytotoxicity, metal speciation, and induction of oxidative stress in sand-grown wheat*. **J. Nanopart. Res.**, **2012**, *14*, 1-15.

63. M. Kumari, S. S. Khan, S. Pakrashi, A. Mukherjee, N. Chandrasekaran, *Cytogenetic and genotoxic effects of zinc oxide nanoparticles on root cells of Allium cepa*. **J. Hazard. Mat.**, **2011**, *190*, 613-621.

**CAPÍTULO 3**

**Estudo ionômico das plantas de soja NT e T após cultivo com AgNP e  
AgNO<sub>3</sub>**

## **1. OBJETIVO**

Avaliar a distribuição da prata e elementos essenciais nos diferentes compartimentos das plantas de soja transgênica e não-transgênica após cultivo com nanopartículas de prata e nitrato de prata.

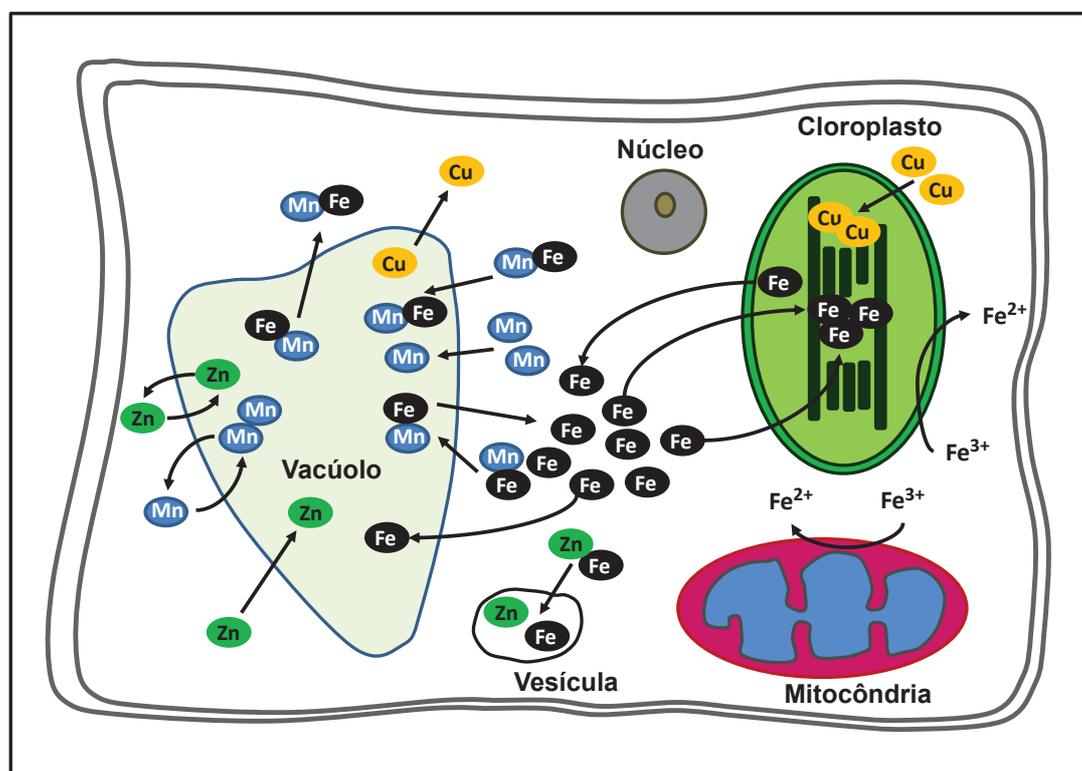
## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Elementos essenciais e a nutrição vegetal**

Os vegetais, por meio das suas células, possuem a capacidade de absorver as mais diversas substâncias, dentre elas os nutrientes, do meio ambiente e utilizar esses compostos para a síntese de seus componentes celulares ou como fonte de energia. Como as plantas não são capazes de sintetizar os nutrientes minerais, elas necessitam adquirir os mesmos a partir do solo [1-2].

Juntamente com nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg) e enxofre (S) são classificados como macronutrientes essenciais. Os demais oito nutrientes essenciais, cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn), molibdênio (Mo), níquel (Ni), zinco (Zn), boro (B) e cloro (Cl), constituem um distinto grupo de elementos que são requeridos pelas plantas em pequenas quantidades e, portanto, denominados como micronutrientes [3-4]. Embora os solos possam conter quantidades significativas de micronutrientes, a disponibilidade desses minerais para as plantas pode ser regulada por diversos fatores, tais como pH, matéria orgânica, geomorfologia do solo, ânions, microbiota do solo e cátions competidores. Além disso, pode haver um processo de competição entre os micronutrientes a serem absorvidos pela planta [3]. Um fornecimento adequado dos nutrientes essenciais para os

vegetais é requerido para o crescimento ótimo das plantas. Tal fato é importante, pois, o fornecimento de nutrientes deve ser balanceado, uma vez que a deficiência em qualquer elemento essencial não pode ser compensada pela absorção de outro nutriente qualquer. Considerando que diversos metais atuam como cofatores e catalisadores nos processos fotossintéticos, um estresse abiótico pode resultar em uma deficiência de nutrientes, restringindo o crescimento da planta, bem como reduzindo o rendimento da colheita [5]. Nesse sentido, é importante compreender de que maneira os macro e micronutrientes desempenham um papel fundamental no metabolismo das plantas e organelas celulares (Figura 3.1).



**Figura 3.1:** Transporte de Fe, Mn, Cu e Zn nas diferentes organelas celulares. Adaptado de Bashir *et al.* (2016) [6].

Com relação aos macronutrientes, diversos estudos já relataram alterações na concentração de P e S em plantas que foram expostas a

condições de estresse abiótico [7-10]. O P é um componente estrutural importante de ácidos nucleicos e lipídios da membrana, participando de vias regulatórias envolvendo moléculas de sinalização derivadas dos fosfolípidos ou reações de fosforilação. Tais grupos ligados ao P ativam enzimas e metabólitos intermediários, fornecendo um armazenamento reversível de energia em ATP [4, 9]. A depleção de P provoca uma diminuição rápida nas taxas fotossintéticas, devido às muitas etapas intermediárias que ocorrem durante a fixação de carbono, que envolvem fosfatos de açúcar [4]. O S é um componente de diversos importantes compostos biológicos, incluindo os aminoácidos (cisteína e metionina) e vários metabólitos secundários [9]. A deficiência de P e S pode afetar a formação de clorofila, bem como levar ao desacoplamento do transporte de elétron devido, com consequente formação de complexos de baixa solubilidade. A presença de tais espécies pode reduzir o transporte e alterar a difusão tanto do P, quanto do S pelas raízes das plantas [11-13].

Mediante a falta de alguns nutrientes, dentre eles Fe, P, Mn e Mg, devido a algum estresse abiótico, as plantas podem exibir clorose foliar. Adicionalmente, o vegetal pode apresentar uma redução na concentração da clorofila, uma vez que os íons Fe atuam na ativação das enzimas envolvidas na síntese da mesma, assim como os íons Mg participam da estrutura da molécula fotossintética [14]. Além disso, uma redução dos níveis de Fe, Cu, Mn e Zn pode resultar no aumento da concentração das espécies reativas de oxigênio (ROS), devido a diminuição da atividade da superóxido dismutase, catalase e ascorbato peroxidase, uma vez que tais elementos atuam nos sítios ativos dessas enzimas [15].

O Fe é um dos metais mais comuns presentes nos organismos vivos, sendo o metal de transição mais abundante. Apesar da sua elevada quantidade no solo, a biodisponibilidade do Fe para as plantas é relativamente muito baixa. Proteínas que contêm Fe desempenham importantes papéis na respiração celular, metabolismo intermediário e fotossíntese nas plantas. Mais de 80% do Fe presente nas células foliares é encontrado nos cloroplastos. A deficiência deste elemento é um problema comum, que causa a redução da

atividade fotossintética, uma vez que espécies que participam do PSI e PSII dependem do Fe. Nesse sentido, o déficit de Fe é uma grande restrição para o crescimento das plantas [16-17].

O Cu é um importante elemento para as funções biológicas das plantas, sendo que a sua biodisponibilidade é um pré-requisito para o crescimento e desenvolvimento [16]. O Cu atua como um cofator em certas metaloproteínas envolvidas no transporte de elétrons no PSI e PSII e na resposta ao estresse oxidativo [16, 18]. Nos cloroplastos, tal elemento é um constituinte da plastocianina, uma proteína responsável pelo carregamento dos elétrons nas reações primárias da fotossíntese. Além disso, o Cu é componente da enzima antioxidante SOD, que protege o vegetal das ROS. Assim como o Fe, a deficiência de Cu afeta as folhas jovens, causando clorose e redução da atividade fotossintética. Por outro lado, o excesso de Cu pode inibir o crescimento, interferir na respiração e fotossíntese, sendo o mais importante efeito aparente da toxicidade desse elemento, a inibição da evolução do oxigênio no PSII [16, 18-19]. Além disso, um aumento nos níveis de Cu pode ser observado devido ao estímulo dos transportadores de Cu nas raízes, como resultado de um estresse metálico [7, 18].

No que se refere ao Mn, esse elemento também é necessário para o crescimento da planta, sendo a sua deficiência geralmente confundida com o déficit de Fe. Isso, porque o Mn é requerido na fotossíntese das plantas para a formação de um complexo no PSII. Esse complexo de Mn catalisa o processo de oxidação da água no complexo de evolução do oxigênio (OEC, do inglês *oxygen-evolving complex*). Portanto, a deficiência de Mn pode alterar o complexo OEC, inibir a fotossíntese, e, conseqüentemente o desenvolvimento das plantas [5, 16]. Adicionalmente, um dos principais sintomas do déficit de Mn é o surgimento de clorose interveinal nas folhas jovens, bem como uma diminuição das raízes em decorrência da falta de carboidratos requeridos para o alongamento celular [20]. Em nível molecular, a deficiência de Mn nas folhas é caracterizada pela diminuição do número de cloroplastos, e pela redução dos centros funcionais do PSII [5].

O Zn é o segundo metal de transição mais abundante nos

organismos vivos. Na fotossíntese, está envolvido em diversas funções catalíticas de enzimas e metaloproteínas, assim como é parte integral de enzimas envolvidas no metabolismo de ácidos nucleicos, proteínas, carboidratos e lipídios [6, 16]. Dessa forma, o déficit de Zn pode resultar em estresse oxidativo, pois, tal elemento é requerido para a dismutação do  $H_2O_2$  e do ânion superóxido ( $O_2^-$ ) [20-21]. Além disso, a deficiência de Zn induz, na raiz das plantas, a liberação de exsudatos de baixa massa molecular, dentre eles fenólicos, aminoácidos, açúcares e potássio [11, 20, 22].

## **2.2. Avaliação da influência das nanopartículas no metabolismo das plantas por meio de uma abordagem ionômica**

Os estudos ionômicos têm por finalidade a compreensão da conexão entre os elementos e a parte fisiológica e genética dos organismos, bem como seus mecanismos de captação, transporte e acumulação nas plantas. Tal abordagem visa à determinação de elementos em células, tecidos de um organismo mediante a qualquer alteração [23]. Para uma avaliação por tal abordagem, necessita-se de uma técnica analítica que permita a análise quantitativa simultânea de vários elementos. Dessa forma, a técnica de espectrometria de massas com fonte de plasma indutivamente acoplada (ICP-MS) é a mais recomendada para esse tipo de estudo [24]. A técnica de ICP-MS apresenta diversas características analíticas que são extremamente úteis para estudos com uma abordagem ionômica. Destacam-se a possibilidade de uma análise multielementar, baixos limites de detecção e ampla faixa dinâmica de geralmente quatro ordens de grandeza. Adicionalmente, para determinações quantitativas, os métodos são de fácil calibração, sendo possível a obtenção de resultados com precisão e exatidão equivalentes ou superiores aos de outras técnicas empregadas para tal finalidade [24-25].

Com o exposto, a técnica de ICP-MS vem sendo amplamente empregada para a avaliação ionômica de plantas que foram, por exemplo, expostas ao tratamento com elementos possivelmente tóxicos [7, 26-27] ou NPs [8, 11, 28-29]. Com os resultados obtidos por meio dessa estratégia

multielementar, é possível investigar as alterações no ionoma, fisiologia e metabolismo dos vegetais submetidos a qualquer condição de estresse [7, 27].

Elementos não essenciais, tais como a Ag, podem ser captados pelas plantas devido ao seu comportamento similar ao dos elementos essenciais [20]. A taxa de captação e translocação dos elementos não essenciais dependem das características intrínsecas de cada espécie de planta em termos de absorção dos elementos. Tal comportamento não resulta somente do contato entre as raízes e o elemento que se encontra no solo. Na prática, as plantas possuem mecanismos de defesa que são usados como estratégia para a prevenção de danos nos tecidos sintéticos [7, 11]. De maneira análoga, mesmo possuindo mecanismos de defesa, as NPs podem ser tóxicas e interferir na absorção dos nutrientes pelas plantas devido à liberação do metal ou devido à sua captação na forma intacta pelos vegetais, com consequente alteração na bioquímica e desenvolvimento da planta [28, 30-31]. Todavia, a captação, bioacumulação, biotransformação e riscos das NPs nas plantas ainda não são bem compreendidos [28-29].

Nesse sentido, Antisari *et al.* (2015) avaliaram a captação e translocação de metais e alguns nutrientes em tomate cultivado em solo contaminado com diferentes tipos de NPs. De maneira geral, apesar de serem encontradas principalmente nas raízes, as NPs investigadas, dentre elas  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}$ ,  $\text{TiO}_2\text{NP}$ ,  $\text{AgNP}$ , entre outras, apresentaram efeitos distintos em suas respectivas assimilação e translocação, assim como na morfologia do tomate. As plantas cultivadas na presença das NPs de Ag, Co e Ni apresentaram concentração desses metais superior do que aquelas obtidas para as plantas controle. Adicionalmente, foram encontradas alterações na composição mineral do tomate e, de acordo com os autores, tais distúrbios fisiológicos podem ser diretamente correlacionados com a exposição às NPs. Por fim, um desequilíbrio na translocação do potássio foi detectado nas plantas tratadas com as NPs de Ag, Co e  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  [29].

Peralta-Videa *et al.* (2014) investigaram as alterações no valor nutricional das plantas de soja cultivadas com nanopartículas de dióxido de cério ( $\text{CeO}_2\text{NP}$ ) e de óxido de zinco ( $\text{ZnONP}$ ). Ambas as NPs, afetaram de

maneira distinta a acumulação dos micronutrientes nos diferentes compartimentos da soja. Quando comparada ao controle, as vagens expostas às CeO<sub>2</sub>NP, a uma concentração de 1000 mg kg<sup>-1</sup>, tiveram uma redução significativa no conteúdo de Ca, porém, aumento nos níveis de P e Cu. Todavia, as plantas tratadas com as ZnONP, a uma concentração de 100 mg kg<sup>-1</sup>, apresentaram um incremento na concentração de Zn, Mn e Cu. Em termos de macronutrientes, os tratamentos com as CeO<sub>2</sub>NP perturbaram a captação de Ca, Mg, P, K e S, enquanto as ZnONP interferiram com a acumulação de K e Mn. Adicionalmente, a captação de Mg foi significativamente reduzida nas raízes devido ao cultivo com elevadas concentrações das CeO<sub>2</sub>NP e ZnONP. Com tais resultados, os autores sugerem que ambas as NPs são capazes de alterar o valor nutricional da soja, o que poderia afetar a saúde das plantas, humanos e animais [8].

A fitotoxicidade e a captação das diferentes formas de Ag, iônica e NP, nas plantas de soja e trigo foi avaliada por Quah *et al.* (2015). A concentração de Ag nas partes aéreas da soja foi significativamente maior para as plantas expostas às AgNP do que para as plantas tratadas com Ag na forma iônica. Embora uma considerável quantidade de Ag seja adsorvida na superfície das raízes da soja, a Ag iônica remanescente pode ser rapidamente transportada desde a raiz para as partes aéreas por meio do xilema. Por se tratar de uma planta dicotiledônea, o transporte de Ag não é tão favorecido na soja quanto em espécies de planta monocotiledôneas. Assim, as diferenças anatômicas não aparentam ser determinantes para a translocação das AgNP e tal fato sugere que as AgNP podem estar sujeitas a um diferente mecanismo de transporte nas plantas do que a Ag na forma iônica [11].

Li *et al.* (2014) investigaram os efeitos tóxicos das NPs de óxido de cério (CeNP) em algodão T e NT. Empregando a técnica de ICP-MS para uma avaliação ionômica, os resultados mostraram que as CeNP alteraram o conteúdo da maioria dos nutrientes nas plantas. Uma redução foi observada nos níveis de Fe, Ca, Mg, Zn e Na nas raízes do algodão, após 52 dias de cultivo. Além disso, foi visualizada uma diminuição na altura das plantas e uma redução da biomassa das raízes das plantas tratadas com as CeNP. De acordo

com os autores, o algodão T é mais sensível a exposição às CeNP do que a variedade NT, indicando que os nanomateriais são potencialmente mais prejudiciais às plantas T do que as convencionais [32].

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1. Preparo das soluções e limpeza das vidrarias**

Todas as soluções foram preparadas empregando reagentes com grau analítico e água deionizada ( $\geq 18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ ) proveniente de um sistema de purificação Milli-Q (Millipore, Bedford, USA). Para as diluições dos padrões/amostras, além de água deionizada, ácido nítrico sub-destilado proveniente de um sistema sub-destilador de ácido (Berghof, Eningen, Germany) foi também utilizado.

Tubos de polipropileno do tipo Falcon<sup>®</sup> foram utilizados no preparo das soluções para a determinação dos diferentes elementos por ICP-MS. Todas as vidrarias, bem como os tubos de polipropileno foram previamente descontaminados com banho de  $\text{HNO}_3$  10% (v/v) e lavadas com água deionizada.

#### **3.2. Determinação de prata no solo e elementos químicos presentes nos diferentes compartimentos das plantas de soja**

Um *pool* dos materiais vegetais (raízes, caules e folhas) foram inicialmente triturados com o auxílio de almofariz e pistilo na presença de nitrogênio líquido. Em seguida, realizou-se a secagem dos mesmos, até massa constante, em uma estufa com temperatura ajustada para 60 °C.

A decomposição do material vegetal (n=3) foi realizada em um forno micro-ondas DTG-100 (Provecto Analítica, Jundiaí, Brazil) equipado com um sensor de temperatura e um magnetron de  $2450 \pm 13$  MHz com uma potência nominal de 1200 W. Para essa tarefa, a aproximadamente 150 mg de amostra contida em frascos de Teflon<sup>®</sup>, foram adicionados 6 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado sub-distilado e 0,5 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% (m/v), sendo a decomposição assistida por radiação micro-onda realizada em 4 etapas (Tabela 3.1). Para certificar a eficiência de toda a metodologia, desde o preparo de amostra até as determinações dos elementos, uma amostra certificada de folha de tomate (*Tomato leaves*, 1573a - NIST) foi submetida ao mesmo método de decomposição e a concentração dos elementos foi avaliada em termos de recuperação.

**Tabela 3.1:** Programa de decomposição ácida assistida por radiação micro-onda para os materiais vegetais.

<b>Etapa</b>	<b>Tempo (min)</b>	<b>Potência (W)</b>
1	5	400
2	8	790
3	4	320
4	3	0

Após a etapa de decomposição, as amostras foram filtradas e diluídas para 25 mL com água deionizada. Em seguida, diferentes diluições empregando ácido nítrico 0,2% (v/v) foram realizadas para a determinação dos distintos elementos nos compartimentos das plantas.

Para a avaliação da concentração de Ag remanescente no substrato de cultivo, o mesmo foi quarteado e seco em estufa com temperatura ajustada em 60 °C. Posteriormente, ca. 200 mg de amostra foi adicionada aos frascos de Teflon<sup>®</sup>, seguido da adição dos reagentes oxidantes que foram 10 mL de água régia (mistura HCl:HNO<sub>3</sub> 3:1) e 5 mL de ácido fluorídrico (Merck,

Darmstadt, Alemanha). A decomposição do substrato de cultivo ocorreu no mesmo forno utilizado para a decomposição do material vegetal, empregando radiação micro-onda que foi realizada em cinco etapas (Tabela 3.2). Após a decomposição, ca. 300 mg de ácido bórico foram adicionados para eliminar o flúor, na forma de fluorato de boro. Então, as amostras do substrato de cultivo foram novamente submetidas à decomposição assistida por radiação micro-onda seguindo o mesmo programa de decomposição em cinco etapas (Tabela 3.2).

Após a segunda decomposição, os frascos foram deixados abertos para a exaustão dos gases gerados, e, então, as amostras foram filtradas e diluídas para 50 mL utilizando água deionizada.

**Tabela 3.2:** Programa de decomposição ácida assistida por radiação micro-onda para o substrato de cultivo.

<b>Etapa</b>	<b>Tempo (min)</b>	<b>Potência (W)</b>
1	3	250
2	5	500
3	5	600
4	5	700
5	2	80

Para certificar a eficiência de toda a metodologia, desde o preparo de amostra até a determinação de Ag, uma amostra certificada de sedimento marinho (PACS-2 – *National Research Council Canada*) foi submetida ao mesmo método de decomposição, e a concentração de Ag foi avaliada em termos de recuperação.

**Tabela 3.3:** Condições operacionais do equipamento ICP-MS para a determinação quantitativa dos diferentes elementos químicos.

<b>Parâmetros instrumentais</b>				
Câmara de nebulização				Ciclônica
Nebulizador				Meinhard®
Potência RF (W)				1240
Vazão do gás nebulizador – Ar (L min <sup>-1</sup> )				0,90 – 0,93
Vazão do gás auxiliar – Ar (L min <sup>-1</sup> )				1,1
<b>Medidas</b>				
Modo de aquisição				Peak hopping
<i>Dwell time</i> (ms)				50
Tempo morto do detector (ns)				60
<i>Sweeps</i>				20
Tempo de integração (ms)				1000
Replicatas				5
Razões <i>m/z</i> monitoradas				<sup>107</sup> Ag <sup>+</sup> , <sup>55</sup> Mn <sup>+</sup> , <sup>56</sup> Fe <sup>+</sup> , <sup>63</sup> Cu <sup>+</sup> , <sup>64</sup> Zn <sup>+</sup> , <sup>31</sup> P <sup>16</sup> O <sup>+</sup> , <sup>32</sup> S <sup>16</sup> O <sup>+</sup>
Equação de correção				
<sup>64</sup> Zn <sup>+</sup>				-0,035297 x <sup>60</sup> Ni <sup>+</sup>
<b>Condições de operação para a cela dinâmica de colisão/reação</b>				
Elemento	Razão <i>m/z</i> monitorada	Gás de colisão/reação	Vazão do gás (mL min <sup>-1</sup> )	RPq (V)
Mn	<sup>55</sup> Mn <sup>+</sup>	Metano	0,70	0,70
Fe	<sup>56</sup> Fe <sup>+</sup>	Metano	0,90	0,65
Cu	<sup>63</sup> Cu <sup>+</sup>	Metano	0,70	0,70
P	<sup>31</sup> P <sup>16</sup> O <sup>+</sup>	Oxigênio	0,75	0,40
S	<sup>32</sup> S <sup>16</sup> O <sup>+</sup>	Oxigênio	0,75	0,40

As análises elementares foram conduzidas em um ICP-MS, localizado no interior de uma sala limpa classe 10000, modelo Elan DRC-e

(PerkinElmer, Norwalk, CT, USA) e equipado com uma cela dinâmica de colisão/reação. O sistema de introdução de amostra consistiu em um nebulizador concêntrico do tipo Meinhard<sup>®</sup> e uma câmara ciclônica, ambos feitos de vidro. Os isótopos monitorados, bem como as condições operacionais do ICP-MS e da cela de colisão/reação podem ser observados na Tabela 3.3.

Cinco réplicas para todas as determinações, inclusive do branco, foram realizadas, sendo os testes estatísticos *t* de Student e de *Tukey* ( $p < 0,05$  para ambos) considerados para a análise dos resultados de maneira comparativa.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1. Validação da metodologia analítica para a determinação de Ag no substrato de cultivo e elementos essenciais nas plantas de soja**

Previamente à avaliação dos perfis ionômicos das raízes, caules e folhas das sojas cultivadas e expostas às AgNP e AgNO<sub>3</sub>, a exatidão do protocolo empregado para o material vegetal foi verificada por meio da decomposição ácida de um material certificado (*Tomato leaves* – SRM 1573a), com a posterior determinação de cobre, enxofre, ferro, fósforo, manganês e zinco.

Como pode ser observado na Tabela 3.4, os resultados obtidos podem ser considerados estatisticamente iguais aos valores de referência em um nível de 95% de confiança, empregando o teste *t* de Student. Tais resultados indicam que o método de decomposição ácida proposto é adequado para as determinações elementares no material vegetal, como já demonstrado em estudos anteriores [7, 33].

**Tabela 3.4:** Determinação de cobre, enxofre, ferro, fósforo, manganês e zinco no material certificado SRM 1573a.

Elemento	Concentração (mg kg <sup>-1</sup> )	
	Método proposto	Valor certificado
Cobre	5,1 ± 0,5	4,70 ± 0,14
Enxofre	9845 ± 325	9600*
Ferro	273 ± 13	368 ± 7
Fósforo	2466 ± 67	2160 ± 40
Manganês	234 ± 4	246 ± 8
Zinco	35 ± 3	30,9 ± 0,7

\*Valor de referência.

De forma análoga, antes da avaliação da concentração de Ag no substrato de cultivo, a exatidão do protocolo empregado foi verificada por meio da decomposição ácida de um material certificado (PACS-2 – *National Research Council Canada*), com a posterior determinação de prata.

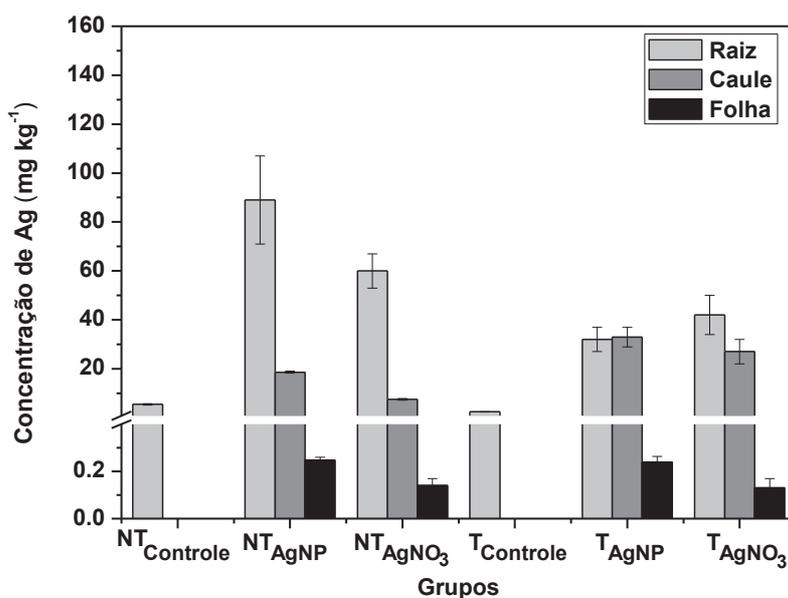
O resultado obtido (Tabela 3.5) para a concentração de Ag pode ser considerado estatisticamente igual ao valor de referência a um nível de 95% de confiança empregando o teste *t* de Student. Tal resultado indica que o método de decomposição ácida proposto é adequado para a determinação de Ag no substrato de cultivo, como já demonstrado em estudos anteriores do grupo GEPAM [7].

**Tabela 3.5:** Determinação de prata no material certificado PACS-2.

Elemento	Concentração (mg kg <sup>-1</sup> )	
	Método proposto	Valor de certificado
Prata	1,21 ± 0,16	1,22 ± 0,14

#### 4.2. Absorção, acumulação e translocação de prata nas plantas de soja expostas ao cultivo com AgNP e AgNO<sub>3</sub>

A Ag e outros elementos não essenciais podem ser captados pelas plantas devido à mobilidade destes no solo e um comportamento similar ao dos elementos essenciais [20]. A taxa de captação dos elementos não essenciais é dependente de diversos fatores, especialmente o tipo de elemento que é adicionado no cultivo, bem como as características intrínsecas de cada espécie de planta em termos de absorção dos elementos [7, 11]. Sendo assim, a concentração total de Ag foi determinada nos diferentes compartimentos (raízes, caules e folhas) das plantas de soja NT e T (Figura 3.2).

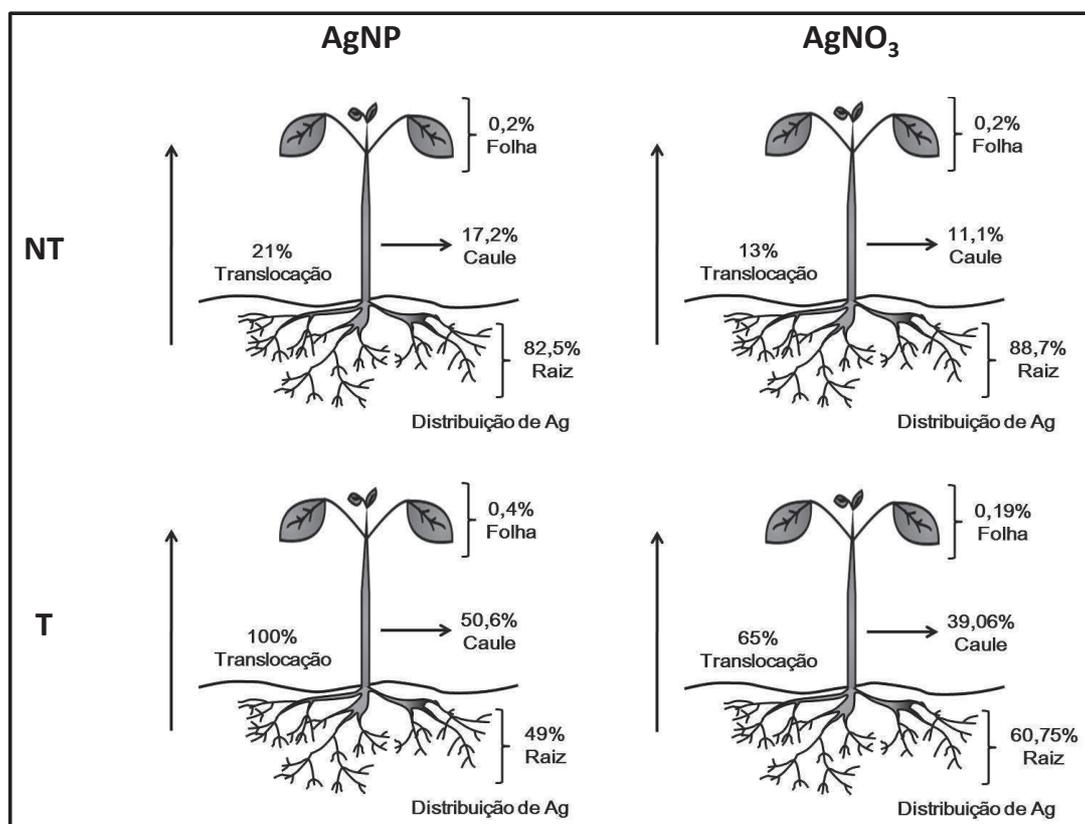


**Figura 3.2:** Concentração de prata determinada nas raízes, caules e folhas das plantas de soja NT e T para os seis diferentes grupos estudados.

Como pode ser observado na Figura 3.2, uma quantidade considerável de Ag foi assimilada pelas plantas NT e T expostas a ambos os cultivos com AgNP e AgNO<sub>3</sub>. De acordo com os resultados, a concentração de Ag nas raízes da soja NT foi maior do que àquela encontrada para a soja T. As concentrações de Ag para as plantas de soja NT e T cultivadas com AgNP e

AgNO<sub>3</sub> foram  $89 \pm 18$  e  $60 \pm 7$  mg kg<sup>-1</sup>, e  $32 \pm 5$  e  $42 \pm 8$  mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente. Tal fato sugere que as plantas de soja NT e T possuem comportamentos distintos no que se refere à absorção de Ag. Adicionalmente, uma baixa concentração de Ag é observada nas raízes das plantas NT e T, sendo essa concentração relacionada à concentração natural de Ag presente no solo [34].

Com relação à taxa de translocação, tal parâmetro foi calculado a partir da razão entre a concentração de Ag nas partes aéreas (caule e folha) das plantas e a concentração de Ag nas raízes:  $([Ag]_{\text{parte aérea}} / [Ag]_{\text{raiz}}) \times 100$ . Para as plantas NT e T cultivadas com AgNP ou AgNO<sub>3</sub>, uma quantidade significativa de Ag foi encontrada nas partes aéreas. Todavia, em contraste com a concentração de Ag nas raízes, a taxa de translocação foi maior nas plantas T do que na soja NT (Figura 3.3).



**Figura 3.3:** Translocação e distribuição de prata nos diferentes compartimentos das plantas de soja NT e T após o cultivo com AgNP ou AgNO<sub>3</sub>.

Para as plantas de soja T cultivadas com AgNP e AgNO<sub>3</sub>, a taxa de translocação foi ca. 100 e 65%, respectivamente, enquanto que para a soja NT ca. 21 e 13% da Ag assimilada pelas raízes foram translocadas após o tratamento com AgNP e AgNO<sub>3</sub>, respectivamente. Esses resultados sugerem que, uma vez que as raízes da soja T assimilam a Ag durante a exposição às AgNP, essas plantas são capazes de translocar a Ag para as partes aéreas.

Considerando apenas o cultivo com as AgNP, para ambas as variedades de soja, uma maior taxa de translocação foi observada nas plantas expostas às AgNP do que as sojas cultivadas com AgNO<sub>3</sub> (Figura 3.2). Além disso, maiores concentrações de Ag,  $0,25 \pm 0,01$  e  $0,24 \pm 0,02$  mg kg<sup>-1</sup>, foram encontradas nas folhas das plantas NT e T expostas às AgNP, respectivamente. Para as plantas de soja NT e T cultivadas com AgNO<sub>3</sub>, foram, respectivamente, observadas concentrações de  $0,14 \pm 0,03$  e  $0,13 \pm 0,04$  mg kg<sup>-1</sup> nas folhas (Tabela 3.6). Esse mesmo comportamento foi observado em um estudo realizado por Quah *et al.* (2015), visto que a concentração de Ag nas partes aéreas da soja foi significativamente maior para as plantas expostas às AgNP do que para as plantas tratadas com Ag na forma iônica [11]. Embora uma considerável quantidade de Ag seja adsorvida na superfície das raízes da soja, a Ag iônica remanescente pode ser rapidamente transportada desde a raiz para as partes aéreas por meio do xilema. Uma vez que o tipo de espécie de planta é um importante fator no que se refere ao transporte de Ag, e a soja é uma planta dicotiledônea, o transporte de Ag não é tão favorecido na soja quanto em espécies de plantas monocotiledôneas [11, 35]. Tal fato pode justificar a menor translocação de Ag observada para as plantas de soja cultivadas com AgNO<sub>3</sub> do que àquelas expostas às AgNP em nosso estudo. Dessa forma, as diferenças anatômicas não aparentam ser determinantes para a translocação das AgNP, uma vez que não foram observadas alterações significativas na concentração e translocação de Ag entre as espécies mono e dicotiledôneas expostas às AgNP [11]. Este fato sugere que as AgNP podem estar sujeitas a um diferente mecanismo de transporte nas plantas do que a Ag na forma iônica.

Considerando a Ag translocada, para todos os grupos estudados,

uma maior quantidade de Ag foi encontrada nos caules, enquanto nas folhas, apenas uma pequena concentração de Ag foi encontrada. De acordo com esses resultados, as plantas de soja, independentemente da variedade, poderiam ser consideradas como uma espécie excludora, ou seja, que não apresentam como característica translocar o metal absorvido para as partes aéreas, uma vez que menos que 0,5% da quantidade total de Ag está presente nas folhas das plantas NT e T cultivadas com as AgNP e AgNO<sub>3</sub> (Fig. 3.2). De fato, em alguns estudos relacionados com a exposição de soja à cádmio e chumbo, baixas translocações foram observadas e a soja foi considerada uma espécie excludora. Além disso, de acordo com os autores, a taxa de translocação pode ser aumentada em cultivos na presença de uma elevada concentração de metal [36-37]. De forma análoga, em um estudo prévio que avaliou a distribuição de Ag em plantas de soja expostas à AgNP e Ag na forma iônica, a concentração de Ag nas raízes foi substancialmente maior do que àquela observada nas partes aéreas. De acordo com os autores, tal comportamento se deve em parte à deposição de Ag na superfície das raízes [11].

Após o término do tempo de exposição, a concentração de Ag remanescente no substrato de cultivo foi determinada. De acordo com os resultados, uma baixa concentração de Ag é observada no substrato de cultivo das plantas controle. Considerando os substratos de cultivo após o tratamento com as AgNP ou AgNO<sub>3</sub>, uma concentração ligeiramente maior de Ag foi observada para as plantas de soja T em comparação com as plantas NT (Tabela 3.6).

**Tabela 3.6:** Concentração de prata no substrato após 21 dias de cultivo.

<b>Grupo</b>	<b>Concentração de Ag (mg kg<sup>-1</sup>)</b>
NT-controle	0,11 ± 0,05
NT-AgNP	68 ± 5
NT-AgNO <sub>3</sub>	71 ± 5
T-controle	0,18 ± 0,05
T-AgNP	87 ± 9
T-AgNO <sub>3</sub>	86 ± 3

Como mencionado anteriormente, por meio dos resultados da Figura 3.2, a concentração de Ag nas raízes da soja NT foi maior do que àquela encontrada para a soja T. Tal resultado pode justificar a menor concentração de Ag remanescente no substrato de cultivo das plantas NT, devido à maior absorção de Ag por parte da variedade não geneticamente modificada.

#### **4.3. Influência das AgNP e AgNO<sub>3</sub> na captação e translocação dos elementos essenciais pelas plantas de soja**

A translocação dos elementos não essenciais é dependente da espécie de planta e do o tipo de elemento não essencial, sendo que tal comportamento não é somente resultado do contato entre as raízes e o solo contendo Ag. Na prática, as plantas possuem alguns mecanismos de defesa que são utilizados como estratégia para prevenir danos aos tecidos fotossintéticos [7]. Todavia, mesmo com tais mecanismos, a presença de AgNP no solo pode conduzir as plantas de soja à condição de estresse, resultando em mudanças no perfil proteômico e atividade enzimática (Capítulo 2) com consequente alteração na bioquímica e desenvolvimento da planta [31]. Frequentemente, a absorção de elementos não essenciais pode resultar em alterações na distribuição dos elementos essenciais nos diferentes compartimentos das plantas, sendo este fato relacionado a diversos distúrbios nos processos fisiológicos [7, 20]. De fato, como previamente apresentado,

necrose na parte basal dos caules e danos ou clorose nas folhas foram observados, resultando em mudanças no proteoma das plantas de soja NT e T cultivadas com AgNP e AgNO<sub>3</sub>.

Buscando avaliar se a assimilação de Ag promove qualquer distúrbio na absorção de nutrientes pelas plantas de soja NT e T, a concentração de alguns elementos essenciais para as funções biológicas, dentre eles cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn), zinco (Zn), fósforo (P) e enxofre (S) foi determinada nos diferentes compartimentos das plantas. Os resultados obtidos para todos os elementos, bem como para a Ag, nas raízes, caules e folhas das sojas NT e T são apresentados na Tabela 3.7.

**Tabela 3.7:** Concentração dos elementos ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) nos diferentes compartimentos das plantas de soja NT e T.

Grupo	Raiz						
	Ag	Cu	Fe	Mn	P	S	Zn
NT-controle	5,5 ± 0,3	0,4 ± 0,1	3001 ± 26	145 ± 1	10494 ± 580	12763 ± 917	149 ± 4
NT-AgNP	89 ± 18	0,87 ± 0,05	3667 ± 49	133 ± 5	6954 ± 228	7037 ± 123	75 ± 2
NT-AgNO <sub>3</sub>	60 ± 7	0,87 ± 0,02	2254 ± 347	142 ± 5	7835 ± 385	8639 ± 668	78 ± 3
T-controle	2,4 ± 0,1	13,9 ± 0,4	2745 ± 115	214 ± 15	11626 ± 1322	15220 ± 1296	82 ± 17
T-AgNP	32 ± 5	16,8 ± 0,5	2397 ± 113	183 ± 2	8882 ± 123	10225 ± 164	89 ± 11
T-AgNO <sub>3</sub>	42 ± 8	15,9 ± 0,3	1905 ± 116	176 ± 5	9137 ± 214	10215 ± 135	86 ± 8
	Caulo						
	Ag	Cu	Fe	Mn	P	S	Zn
NT-controle	< LD	6 ± 1	40 ± 2	21,3 ± 0,4	7624 ± 377	6976 ± 319	24 ± 6
NT-AgNP	18,6 ± 0,4	4,52 ± 0,09	37 ± 2	23 ± 1	7421 ± 576	7696 ± 739	48 ± 12
NT-AgNO <sub>3</sub>	7,5 ± 0,4	5,4 ± 0,3	47 ± 5	26 ± 2	6639 ± 183	7250 ± 119	39 ± 5
T-controle	< LD	6,8 ± 0,5	50 ± 4	24 ± 2	8217 ± 170	8519 ± 209	27 ± 2
T-AgNP	33 ± 4	9 ± 1	49 ± 2	29,6 ± 0,6	9401 ± 386	9572 ± 395	41 ± 9
T-AgNO <sub>3</sub>	27 ± 5	9 ± 2	41 ± 3	26,8 ± 0,9	7833 ± 328	8688 ± 279	37 ± 3
	Folha						
	Ag	Cu	Fe	Mn	P	S	Zn
NT-controle	< LQ	6,3 ± 0,2	105 ± 3	57,8 ± 0,8	7447 ± 128	5537 ± 36	40 ± 2
NT-AgNP	0,25 ± 0,01	7 ± 1	102 ± 4	61 ± 2	7382 ± 420	5891 ± 233	51 ± 9
NT-AgNO <sub>3</sub>	0,14 ± 0,03	6,7 ± 0,1	138 ± 22	59,8 ± 0,9	6979 ± 36	6096 ± 131	44 ± 4
T-controle	< LD	7 ± 1	90 ± 3	48,5 ± 0,4	7037 ± 110	5424 ± 87	31 ± 4
T-AgNP	0,24 ± 0,02	7 ± 1	104 ± 3	51 ± 2	7563 ± 236	5347 ± 95	40 ± 6
T-AgNO <sub>3</sub>	0,13 ± 0,04	7,4 ± 0,9	97 ± 8	47,2 ± 0,2	6330 ± 129	4853 ± 95	37 ± 6

\* As cores verdes e vermelhas indicam as diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as amostras controle e tratadas.

#### 4.3.1. Macroelementos: P e S

Com relação aos macronutrientes P e S, foram encontradas alterações em todos os compartimentos (Tabela 3.7). As concentrações de P e S nas raízes foram menores para as plantas de soja NT e T expostas às AgNP e AgNO<sub>3</sub>, em comparação com os seus respectivos controles. Considerando o P, os cultivos com AgNP e AgNO<sub>3</sub> reduziram a concentração desse elemento *ca.* 34 e 25% nas plantas NT, e *ca.* 24 e 21% na soja T, respectivamente (Tabela 3.7). De acordo com os resultados, para ambas as plantas NT e T o cultivo com as AgNP afetou mais a assimilação de P pelas raízes, uma vez que uma menor concentração foi encontrada nas raízes das plantas expostas às NPs. Adicionalmente, uma vez que a Ag é adsorvida, devido a ambos os tratamentos com AgNP e AgNO<sub>3</sub>, a soja NT é mais suscetível do que a variedade T, visto que uma maior redução na quantidade de P é verificada nas raízes das plantas NT (Tabela 3.7). Com relação ao S, um comportamento similar foi verificado, uma vez que os cultivos com AgNP e AgNO<sub>3</sub> reduziram a concentração de S nas raízes de ambas as variedades NT e T. Para a soja NT, assim como ocorreu para o P, o cultivo com as AgNP levou a uma maior redução na concentração de S, *ca.* 45%. Já o tratamento com AgNO<sub>3</sub> diminuiu *ca.* 32% o conteúdo de S em comparação com as plantas NT-controle. Para as plantas de soja T, ambos os cultivos com AgNP e AgNO<sub>3</sub> reduziram *ca.* 33% a concentração de S em comparação com as plantas do grupo T-controle (Tabela 3.7).

Para o caule, um comportamento distinto foi observado para ambas as variedades de soja, uma vez que para as plantas NT apenas a exposição ao AgNO<sub>3</sub> levou a uma redução de *ca.* 13% na concentração de P. Para a soja T, o cultivo com as AgNP aumentou a concentração de P e S *ca.* 14 e 12% no caule, respectivamente (Tabela 3.7). Não foram observadas mudanças significativas na concentração de S para as plantas dos grupos NT-AgNP, NT-AgNO<sub>3</sub> e T AgNO<sub>3</sub>.

A exposição ao AgNO<sub>3</sub> conduziu a um pequeno desequilíbrio nas concentrações de P e S nas folhas de soja de ambas as variedades NT e T. Para o P, reduções de *ca.* 6 e 10% foram encontradas, respectivamente, enquanto que para o S um aumento de *ca.* 10% e uma diminuição de *ca.* 11% foram observadas nas folhas das plantas NT e T, respectivamente. Todavia, o cultivo empregando somente

as AgNP alterou significativamente a concentração de P nas folhas da soja T, com um aumento de ca. 7% em comparação com as plantas do grupo T-controle (Tabela 3.7).

Alguns estudos já relataram alterações na concentração de P e S em plantas que foram expostas a elementos não essenciais e NPs [7-8, 29]. A presença de cádmio (Cd) e NP de CeO<sub>2</sub> no solo reduziram a concentração de P e S nas raízes de girassol e soja, respectivamente. A depleção na absorção de tais macronutrientes pode afetar a formação de clorofila [7-8, 10], assim como levar ao desacoplamento do transporte de elétron como resultado da formação de distintos compostos de Ag com baixa solubilidade, dentre eles o Ag<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ( $K_{sp} = 1.2 \times 10^{-5}$ ). A formação de tais componentes pode reduzir o transporte e alterar a difusão do P e S pelas raízes [11-13].

Além disso, como abordado no Capítulo 2, distúrbios no fotossistema com uma diminuição na abundância da *ATP synthase* e *RuBisCO*, que podem afetar a absorção de CO<sub>2</sub>, foram observados para as plantas de soja cultivadas com AgNP e AgNO<sub>3</sub>. Adicionalmente, alguns efeitos tóxicos foram visualizados em nível macroscópico para as plantas de soja que foram expostas às NPs, podendo afetar a eficiência bioquímica e enzimática [38]. Tais alterações podem ser um resultado da diminuição da absorção de P e S pelas raízes das plantas de soja cultivadas com ambas as formas de Ag.

#### 4.3.2. Microelementos: Cu, Fe, Mn e Zn

Considerando os micronutrientes, mudanças significativas em todos os compartimentos foram encontradas, principalmente na raiz. Na maioria dos casos, uma menor concentração dos microelementos foram observadas para as plantas de soja NT e T cultivadas com AgNP e AgNO<sub>3</sub>, em comparação com as plantas dos grupos controle (Tabela 3.7).

Com relação ao Fe, são observadas alterações significativas nas raízes das plantas NT e T de todos os grupos tratados. Para a variedade NT, um aumento de ca. 22% na concentração de Fe foi encontrada para as plantas expostas às

AgNP. Em contraste, o tratamento com AgNO<sub>3</sub> diminuiu o conteúdo de Fe na raiz das plantas NT em ca. 25%. Da mesma maneira, ambas as formas de cultivo com Ag conduziram a uma diminuição na concentração de Fe nas raízes em ca. 13 e 31% para as plantas dos grupos T-AgNP e T-AgNO<sub>3</sub>, respectivamente (Tabela 3.7). Para ambas as variedades de soja, o tratamento com AgNO<sub>3</sub> afetou de forma mais pronunciada a concentração de Fe nas raízes do que o cultivo com as AgNP. O surgimento de clorose por deficiência de Fe é uma grande restrição para o crescimento das plantas [17] e tal alteração foi verificada nas plantas NT e T expostas às AgNP e AgNO<sub>3</sub>, como apresentado no Capítulo 1 dessa tese (Figura 1.13).

Os cultivos com AgNP e AgNO<sub>3</sub> também alteraram a concentração de Cu nas raízes de ambas as variedades de soja em que, para todos os grupos tratados, um aumento na concentração de Cu é observado (Tabela 3.7). Para as plantas NT, as exposições às AgNP e AgNO<sub>3</sub> aumentaram o conteúdo de Cu em ca. 118%. Para a soja T, os cultivos com AgNP e AgNO<sub>3</sub> aumentaram a concentração de Cu em ca. 21 e 14%, respectivamente. Tal comportamento pode ser observado durante algum estresse metálico pelo estímulo da atividade dos transportadores de Cu nas raízes devido ao excesso de Ag no solo [7, 18]. Conseqüentemente, elevadas concentrações de Cu nas raízes podem resultar em um estresse oxidativo pela geração de ROS com subsequente alteração das respostas antioxidantes. Além disso, um excesso de Cu pode inibir o crescimento e interferir em importantes processos celulares, dentre eles a fotossíntese e respiração, sendo o mais importante efeito aparente da toxicidade do Cu no PSII a inibição da evolução do oxigênio. Adicionalmente, plantas que crescem em tais condições normalmente apresentam uma redução na biomassa e sintomas de clorose, uma vez que um menor conteúdo de clorofila, alterações na estrutura do cloroplasto e da composição da membrana tilacoide foram encontradas nas folhas de plantas em tais condições de exposição [18]. De fato, como previamente mencionado, uma redução de biomassa e clorose nas folhas de soja, assim como alterações no PSII, por meio de um desequilíbrio na proteína *oxygen-evolving enhanced protein 2*, foram observadas nas plantas NT e T cultivadas com AgNP e AgNO<sub>3</sub>.

No que diz respeito ao Mn, foram observadas mudanças significativas em

seu conteúdo para as raízes das sojas NT e T. Para a variedade NT, apenas o cultivo com as AgNP resultou em uma redução sutil na concentração de Mn em ca. 8% em comparação com as plantas NT do grupo controle. Por outro lado, ambos os tratamentos com AgNP e AgNO<sub>3</sub> reduziram ca. 14 e 18% do conteúdo de Mn nas raízes das plantas T, respectivamente (Tabela 3.7). A deficiência de Mn pode causar vários distúrbios nas plantas em diferentes níveis. Uma vez que o Mn é requerido para a formação de um complexo de Mn no PSII, o déficit desse elemento pode alterar o complexo *oxygen evolving complex* (OEC), inibindo a fotossíntese, e, conseqüentemente, o desenvolvimento das plantas [5, 16, 20]. Adicionalmente, o principal sintoma da deficiência de Mn é a clorose interveinal em folhas jovens, bem como raízes menores devido à falta de carboidratos requeridos para o alongamento das células [20]. De fato, além de áreas com clorose, alterações no desenvolvimento das raízes das plantas de soja NT e T expostas às AgNP e AgNO<sub>3</sub>. Além disso, as plantas NT cultivadas com AgNP apresentaram uma menor abundância na proteína *oxygen-evolving enhancer protein 2* (Tabela 2.1). Adicionalmente, considerando as variedades NT e T dos grupos controle, nota-se que a concentração de Cu foi significativamente maior nas raízes das plantas T (Tabela 3.7). Tal fato pode ser justificado pela maior concentração de Cu encontrado nas sementes de soja T do que na variedade NT, como reportado em um estudo prévio do nosso grupo de pesquisa [39].

Com relação ao Zn, nenhuma alteração na concentração de Zn foi encontrada para a variedade T, enquanto que a soja NT foi significativamente alterada pelos cultivos com AgNP e AgNO<sub>3</sub> com reduções na concentração de Zn de ca. 50 e 48%, respectivamente. A deficiência de Zn pode causar estresse oxidativo uma vez que, como um componente de enzimas antioxidantes, tal elemento é requerido para a dismutação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e o ânion superóxido O<sub>2</sub><sup>-</sup> [20-21]. Adicionalmente, o déficit de Zn induz, na raiz, a liberação de exsudatos de baixa massa molecular, tais como aminoácidos, fenólicos, açúcares e potássio em espécies dicotiledôneas, como a soja [11, 20, 22].

Embora mudanças significativas na concentração dos elementos foram observadas nas raízes, por outro lado, poucas alterações em termos de micronutrientes, apenas para Fe e Mn, são vistas nos compartimentos aéreos das

plantas (Tabela 3.7). No caule, a concentração de Fe e Mn diminuiu *ca.* 18% e aumentou *ca.* 23% para as plantas dos grupos T-AgNO<sub>3</sub> e T-AgNP, respectivamente.

Nas folhas, o conteúdo de Fe foi afetado apenas para as plantas T expostas às AgNP, visto que foi observado um aumento de *ca.* 16% em comparação com as plantas T controle. Em contraste, o cultivo com AgNP não alterou a concentração de Mn nas folhas da planta de soja T. Todavia, uma redução sutil, *ca.* 3%, no conteúdo de Mn foi observada nas folhas da soja do grupo T-AgNO<sub>3</sub>. Para a variedade NT, os cultivos com AgNP e AgNO<sub>3</sub> resultaram em aumentos de *ca.* 6 e 3% na concentração de Mn. Como previamente discutido no item 4.2., a soja é considerada como uma espécie excludora, uma vez que menos de 0,5% da Ag total foi translocada das raízes para as folhas (Figura 3.2). Tal fato pode justificar as poucas alterações, em termos da concentração dos micronutrientes, observadas para as plantas de soja NT e T expostas ao cultivo com as AgNP e AgNO<sub>3</sub>.

## 5. CONSIDERAÇÕES PARCIAIS

Após a validação da metodologia analítica, por meio da utilização de materiais de referência, empregando a decomposição ácida assistida por radiação micro-onda, a concentração de prata e elementos essenciais foi avaliada no substrato de cultivo e nos diferentes compartimentos das plantas de soja NT e T. Com relação à translocação de prata, para ambas as variedades de soja, o cultivo com as AgNP resultou em maiores níveis de Ag nas partes aéreas das plantas. Adicionalmente, a soja T apresentou uma maior taxa de translocação quando comparada com a soja NT. Entretanto, apesar da quantidade significativa de Ag assimilada pelas plantas de soja, esse elemento permaneceu majoritariamente nas raízes. Considerando que menos de 0,5% da Ag absorvida foi translocada até as folhas de ambas as variedades NT e T, a soja pode ser considerada como uma espécie de planta excludora.

Uma vez confirmada a assimilação de Ag pela soja NT e T, a concentração de alguns elementos essenciais para as plantas foi então acessada. De maneira geral, mudanças significativas em todos os compartimentos das plantas foram verificadas, sendo as maiores alterações observadas nas raízes. Possivelmente, tal fato se deve à maior presença de Ag encontrada nesse compartimento. Os cultivos com AgNP e AgNO<sub>3</sub> resultaram em mudanças significativas nos níveis de todos os nutrientes avaliados. A concentração de fósforo e enxofre foi substancialmente reduzida nas raízes devido aos tratamentos da soja NT e T com ambas as formas de Ag. Em contraste, para o cobre, todos os tratamentos resultaram em um aumento na concentração desse elemento em comparação com as plantas do grupo controle. Além disso, alterações nos níveis de ferro, manganês e zinco, este último apenas para a soja NT, foram encontradas nas raízes das plantas expostas aos cultivos com as AgNP e AgNO<sub>3</sub>. O caule foi o compartimento que menos foi afetado pelos tratamentos com as duas formas de Ag, e pequenas alterações, apenas para fósforo, enxofre, manganês e ferro foram observadas somente para alguns grupos. Da mesma forma, nas folhas, ocorreram mudanças significativas para os mesmos elementos, especialmente manganês, fósforo e enxofre para as plantas de alguns grupos tratadas com AgNP e AgNO<sub>3</sub>. Tal comportamento, em termos de alterações nos níveis dos nutrientes nas partes aéreas, pode ser justificado pelo fato de a soja ser considerada uma espécie excludora.

Por fim, as mudanças significativas, principalmente nas raízes, encontradas na concentração dos nutrientes, dentre eles manganês, fósforo e enxofre sugerem que o fotossistema pode estar alterado. Tais resultados, corroboram os àqueles obtidos nos Capítulos 1 e 2, devido às alterações na abundância de proteínas relacionadas à fotossíntese e condições de estresse, assim como necrose na parte basal dos caules e algum dano ou clorose nas folhas das plantas cultivadas com as AgNP e AgNO<sub>3</sub>.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. K. Mengel, E. A. Kirkby, H. Kosegarten, T. Appel, *Principles of Plant Nutrition*. 5ª edição, **2001**, Springer: Dordrecht, Holanda, pp.850.
2. A. O. Uncu, S. Doganlar, A. Frary, *Biotechnology for enhanced nutritional quality in plants*. **Critical Rev. Plant. Sci.**, **2013**, 32, 321-343.
3. C. O. Dimkpa, P. S. Bindraban, *Fortification of micronutrients for efficient agronomic production: a review*. **Agron. Sustain. Dev.**, **2016**, 36, 1-27.
4. F. J. M. Maathuis, *Physiological functions of mineral macronutrients*. **Curr. Opin. Plant Biol.**, **2009**, 12, 250-258.
5. S. B. Schmidt, P. E. Jensen, S., *Manganese deficiency in plants: The impact on Photosystem II*. **Trends Plant Sci**, **2016**, 21, 622-632.
6. K. Bashir, S. Rasheed, T. Kobayashi, M. Seki, N. K. Nishizawa, *Regulating subcellular metal homeostasis: the key to crop improvement*. **Front. Plant Sci.**, **2016**, 7, 1-9.
7. C. A. Lopes Júnior, P. Mazzafera, M. A. Z. Arruda, *A comparative ionic approach focusing on cadmium effects insunflowers (Helianthus annuus L.)*. **Environ. Exp. Bot.**, **2014**, 107, 180-186.
8. J. R. Peralta-Videa, J. A. Hernandez-Viezcas, L. Zhao, B. C. Diaz, Y. Ge, J. H. Priester, P. A. Holden, J. L. Gardea-Torresdey, *Cerium dioxide and zinc oxide nanoparticles alter the nutritional value of soil cultivated soybean plants*. **Plant Physiol. Biochem.**, **2014**, 80, 128-135.
9. A. Amtmann, P. Armengaud, *Effects of N, P, K and S on metabolism: new knowledge gained from multi-level analysis*. **Curr. Op. Plant Biol.**, **2009**, 12, 275–283.
10. M. J. Hawkesford, *Plant responses to sulphur deficiency and the genetic*

*manipulation of sulphate transporters to improve S-utilization efficiency.* **J. Exp. Bot.**, **2000**, *51*, 131-138.

11. B. Quah, C. Musante, J. C. White, X. Ma, *Phytotoxicity, uptake, and accumulation of silver with different particle sizes and chemical forms.* **J. Nanop. Res.**, **2015**, *17*, 277.

12. C. S. Patricia, G.-V. Nerea, U. Erik, S. M. Elena, B. Eider, D. M. W. Darío, S. Manu, *Responses to silver nanoparticles and silver nitrate in a battery of biomarkers measured in coelomocytes and in target tissues of Eisenia fetida earthworms.* **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, **2017**, *141*, 57–63.

13. C. Levard, E. M. Hotze, G. V. Lowry, G. E. Brown, Jr., *Environmental transformations of silver nanoparticles: Impact on stability and toxicity.* **Environ. Sci. Technol.**, **2012**, *46*, 6900–6914.

14. B. Basa, G. Lattanzio, A. Solti, B. Toth, J. Abadia, F. Fodor, E. Sarvari, *Changes induced by cadmium stress and iron deficiency in the composition and organization of thylakoid complexes in sugar beet (Beta vulgaris L.).* **Environ. Exp. Bot.**, **2014**, *101*, 1-11.

15. G. DalCorso, A. Manara, A. Furini, *An overview of heavy metal challenge in plants: from roots to shoots.* **Metallomics**, **2013**, *5*, 1117-1132.

16. I. Yruela, *Transition metals in plant photosynthesis.* **Metallomics**, **2013**, *5*, 1090-1109.

17. W. Li, P. Lan, *The understanding of the plant iron deficiency responses in strategy i plants and the role of ethylene in this process by omic approaches.* **Front. Plant Sci.**, **2017**, *8*, 1-15.

18. I. Yruela, *Copper in plants.* **Braz. J. Plant Physiol.**, **2005**, *17*, 145-156.

19. B. Printz, S. Lutts, J.-F. Hausman, K. Sergeant, *Copper trafficking in plants and its implication on cell wall dynamics.* **Front. Plant Sci.**, **2016**, *7*, 1-16.

20. G. DalCorso, A. Manara, S. Piasentin, A. Furini, *Nutrient metal elements in plants.*

**Metallomics**, 2014, 6, 1770-1788.

21. I. Cakmak, H. Marschner, *Enhanced superoxide radical production in roots of zinc-deficient plants*. **J. Exp. Botany**, 1988, 39, 1449-1460.

22. F. Zhang, V. Romheld and H. Marschner, *Release of zinc mobilizing root exudates in different plant species as affected by zinc nutritional status*, **J. Plant Nutr.**, 1991, 14, 675–686.

23. D. E. Salt, I. Baxter, B. Lahner, *Ionomics and the study of the plant ionome*. **Annu. Rev. Plant Biol.**, 2008, 59, 709-733.

24. R. Thomas, *Practical guide to ICP-MS: a tutorial for beginners*. 3<sup>a</sup> edição, CRC Press: New York, USA, 2013, 446p.

25. J. Szpunar, *Advances in analytical methodology for bioinorganic speciation analysis: metallomics, metalloproteomics and heteroatom-tagged proteomics and metabolomics*. **Analyst**, 2005, 130, 442-465.

26. M. A. O. da Silva, S. A. L. de Andrade, P. Mazzafera, M. A. Z. Arruda, *Evaluation of sunflower metabolism from zinc and selenium addition to the culture: a comparative metallomic study*. **Inter. J. Mass Spectrom.**, 2011, 307, 55-60.

27. V. Mihaylova, V. Lyubomirova, R. Djingova, *Optimization of sample preparation and ICP-MS analysis for determination of 60 elements for characterization of the plant ionome*. **Int. J. Environ. Anal. Chem.**, 2013, 93, 1441-1456.

28. S. C. C. Arruda, A.L.D. Silva, R. M. Galazzi, R. A. Azevedo, M. A. Z. Arruda, *Nanoparticles applied to plant science: A review*. **Talanta**, 2015, 131, 693-705.

29. L. V. Antisari, S. Carbone, A. Gatti, G. Vianello, P. Nannipieri, *Uptake and translocation of metals and nutrients in tomato grown in soil polluted with metal oxide (CeO<sub>2</sub>, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, SnO<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub>) or metallic (Ag, Co, Ni) engineered nanoparticles*. **Environ. Sci. Pollut. Res.**, 2015, 22, 1841–1853.

30. M. Rizwan, S. Ali, M.F. Qayyum, Y.S. Ok, M. Adrees, M. Ibrahim, M. Zia-ur-Rehman, M. Farid, F. Abbas, *Effect of metal and metal oxide nanoparticles on growth*

*and physiology of globally important food crops: A critical review. J. Hazard. Mat., 2017, 322, 2–16.*

31. Z. Hossain, G. Mustafa, K. Sakata, S. Komatsu, *Insights into the proteomic response of soybean towards Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, ZnO, and Ag nanoparticles stress. J Hazard Mat., 2016, 304, 291-305.*

32. X. Li, X. Gui, Y. Rui, W. Ji, Z. Yu, S. Peng, *Bt-transgenic cotton is more sensitive to CeO<sub>2</sub> nanoparticles than its parental non-transgenic cotton, J.Hazard. Mater. 2014, 274, 173–180.*

33. J. S. Garcia, P. L. Gratão, R. A. Azevedo, M. A. Z. Arruda, *Metal contamination effects on sunflower (Helianthus annuus L.) growth and protein expression in leaves during development. J. Agric. Food Chem., 2006, 54, 8623-8630.*

34. L. J. Evans, S. J. Barabash, Molybdenum, Silver, Thallium and Vanadium, in: *Trace Elements in Soil*, P. S. Hooda, Ed. John Wiley & Sons Ltd., 2010, pp.523.

35. O. Patterson, *Heavy-metal ion uptake by plants from nutrient solutions with metal ion, plant species and growth period variations. Plant Soil, 1976, 45, 445–459.*

36. Y. Zhi, K. He, T. Sun, Y. Zhu, Q. Zhou, *Assessment of potential soybean cadmium excluder cultivars at different concentrations of Cd in soils. J. Environ. Sci., 2015, 35, 108–114.*

37. Y. Zhi, T. Sun, Q. Zhou, *Assessment of lead tolerance in 23 Chinese soybean cultivars and the effect of lead on their mineral ion complement. Environ. Sci. Pollut. Res., 2014, 21, 12909–12921.*

38. M. H. Ghafariyan, M. J. Malakouti, M. R. Dadpour, P. Stroeve, M. Mahmoudi, *Effects of magnetite nanoparticles on soybean chlorophyll. Environ. Sci. Technol., 2013, 47, 10645–10652.*

39. L. R. V. Mataveli, P. Pohl, S. Mounicou, M. A. Z. Arruda, J. Szpunar, *A comparative study of element concentrations and binding in transgenic and non-transgenic soybean seeds. Metallomics, 2010, 2, 800–805.*

**CAPÍTULO 4**

**Emprego de estratégias hifenadas para a avaliação de complexos metálicos  
em folhas de soja NT e T após cultivo com AgNP e AgNO<sub>3</sub>**

## **1. OBJETIVO**

Empregar estratégias hifenadas para a avaliação de complexos metálicos presentes nas folhas da soja transgênica e não-transgênica após o cultivo com as nanopartículas de prata.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. A importância dos estudos metalômicos na avaliação das plantas**

A metalômica consiste no estudo do metaloma e é uma ciência integrada que tem por finalidade investigar as espécies biometálicas envolvidas em um organismo ou ecossistema. Nesse sentido, tal área busca avaliar a distribuição elementar, biomoléculas ligadas a metais, tais como metaloproteínas, metaloenzimas, metalometabólitos, entre outras, que apresentam importante papel nos processos biológicos [1-2].

A maior parte dos metais encontrados em baixas concentrações nos fluidos biológicos e órgãos estão ligados a inúmeras proteínas. Tais moléculas são chamadas de metaloproteínas, que são proteínas cujas funções são conferidas por um metal, presente em seu sítio ativo. Dentre as funções dessas metalobiomoléculas, destaca-se a atividade catalítica, que resulta na reação de transferência de elétrons de íons metálicos redox ativos ou estabilização da estrutura terciária ou quaternária da proteína [2]. Quando atuam como catalisadores biológicos na regulação das reações biológicas e funções fisiológicas de um organismo, as metaloproteínas são denominadas como metaloenzimas [1]. Adicionalmente, as metalobiomoléculas podem apresentar as mais diversas funções em um organismo, participando e sendo resultado de mecanismos de defesa, homeostase, manutenção da estrutura celular, entre outras [3-6].

Todavia, no que se referem às bases moleculares, muitos processos bioquímicos metal-dependentes continuam não descritos, e os mecanismos ao qual o metal ou metaloide é identificado, armazenado ou incorporado como cofator em uma célula ainda são pouco conhecidos [5]. Dessa forma, os estudos com uma abordagem metalômica se apresentam como perspectiva para promover a interação entre os eventos que ocorrem em nível fisiológico e molecular, quando regulados por metalobiomoléculas, possibilitando uma melhor compreensão do metabolismo da planta. Nesse sentido, pode-se considerar o estudo do tipo *plant metallomics* (metalômica de plantas), uma vez que tal organismo está entre os principais campos de pesquisa da metalômica [2, 4]. Ao decifrar um metaloma, as seguintes informações poderão ser obtidas: (i) como um elemento (metal ou metaloide) está distribuído nos compartimentos celulares de um dado tipo celular; (ii) seu ambiente de coordenação, ou seja, em qual biomolécula o elemento é incorporado ou por qual bioligante é complexado, e (iii) a concentração individual das espécies presentes [7].

A técnica de ICP-MS é muito útil para determinação elementar em diversos estudos, dentre eles metalômicos, principalmente aliada à cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-ICP-MS) [1, 7-9]. Além disso, a técnica de ICP-MS tem sido bastante empregada na detecção on-line de metais em cromatografia, geralmente a de exclusão por tamanho (SEC, do inglês *size-exclusion chromatography*), de troca iônica (IEX, do inglês *ion-exchange*) e de interação hidrofílica (HILIC, do inglês *hydrophilic interaction liquid chromatography*) [3, 7, 9-10].

Considerando a importância na avaliação do desenvolvimento de uma cultura na presença de NPs, e a completa ausência de informação na literatura relacionada aos possíveis efeitos das NPs na soja NT e T, estudos com uma abordagem metalômica são de grande valor. Dessa forma, estudos empregando uma estratégia hifenada, por meio do acoplamento da cromatografia líquida (LC) com ambos ICP-MS e espectrometria de massas de alta resolução (HR-MS, do inglês *high-resolution mass spectrometry*), poderiam expandir a informação acerca dos efeitos causados nas plantas devido à exposição às NPs. Com tal abordagem, os elementos podem ser determinados e as diversas espécies bioinorgânicas, tais como metaloproteínas, metaloenzimas, metalometabólitos e metalopeptídeos que participam de qualquer rota bioquímica importante, podem ser identificadas [3, 7, 9].

Dessa forma, Mataveli *et al.* (2012) empregaram a técnica de HPLC-ICP-MS em duas dimensões a fim de obter informações, em nível metalômico, referentes a sementes de soja transgênica e não-transgênica. Nesse trabalho, a SEC e a cromatografia de troca aniônica (AEX, do inglês *anion-exchange chromatography*) foram usadas como primeira e segunda etapa de separação, respectivamente. Para a segunda dimensão, três sub-frações contendo Fe, Mg e Mn, uma contendo Cu e outras três contendo Co, Cu, Mg, Mn e Zn foram obtidas. Após todas as separações, 33 proteínas de diferentes características funcionais, dentre elas crescimento e divisão celular, metabolismo, destinação e armazenamento de proteínas, entre outras, foram identificadas usando a técnica de ESI-MS/MS [9].

Yiannikouris *et al.* (2009) caracterizaram complexos metal-peptídeos, assim como investigaram alguns elementos essenciais em suplementos alimentares. Nesse trabalho, comprovou-se a aplicação da técnica de HPLC-ICP-MS para quantificar metais e monitorar a distribuição de massa molecular de metais ligados às moléculas em suplementos alimentares. Para isso, a fração solúvel foi fracionada e analisada por SEC-ICP-MS. Então, as frações contendo Cu foram avaliadas por nanoLC-ICP-MS e nanoLC-ESI-MS/MS. Por meio dessa estratégia, foi possível identificar mais de 30 peptídeos quelantes de Cu. Assim, foi possível identificar os aminoácidos envolvidos na ligação com o Cu, sendo que os resultados confirmaram o papel dominante da cisteína na complexação do Cu [11].

Alguns estudos já apontam para a toxicidade das NPs em nível macroscópico, uma vez que em casos específicos, a dose letal mediana (DL<sub>50</sub>) foi observada. Esse parâmetro pode ser considerado em uma etapa prévia, pois, é possível prever que alguns fatores externos podem resultar em uma condição de estresse e assessorar a toxicidade de qualquer contaminante [12-13]. Entretanto, é extremamente útil considerar outras estratégias para obter informações adicionais sobre os efeitos tóxicos. Além dos resultados previamente comentados, que podem ser obtidos por meio do uso das estratégias hifenadas, a técnica de LC-ICP-MS pode também ser usada para separar as NPs de acordo com o seu tamanho, bem como distinguir as mesmas dos seus íons. Tal informação pode ser de grande valor para avaliar as NPs e sua estabilidade nas matrizes ambientais [14-15]. Apesar da ausência de estudos metalômicos na avaliação de plantas expostas ao cultivo com

NPs, a potencialidade do emprego de estratégias hífenadas para essa finalidade será explorada abaixo.

Nesse sentido, Peng *et al.* (2015) utilizaram a LC acoplada de maneira sincronizada ao ICP-MS e ESI-QTOF-MS para investigar a toxicidade do ponto quântico (QD, do inglês *quantum dot*) CdSe/ZnS em células de carcinoma hepatocelular humanas (HepG2, do inglês *Human hepatocellular carcinoma cells*) por meio de uma abordagem metalômica. QDs são partículas semicondutoras, que possuem nanoescala e apresentam propriedades ópticas. Assim, diferentes QDs, com distintos grupos funcionais (amina e ácido carboxílico) e comprimento de emissão máxima, foram avaliados pelos autores. Após a incubação, uma parte da amostra foi digerida e analisada por ICP-MS, enquanto que a outra parte foi sonicada e o sobrenadante separado por SEC. Duas frações, QD-1 e QD-2, com diferentes tempos de retenção foram observadas e coletadas para posterior análise por ICP-MS a fim de verificar a quantidade total de QD-1 e QD-2 nas células HepG2. Por meio do emprego de uma estratégia hífenada, acoplando a LC em fase reversa (RPLC, do inglês *reverse-phase liquid chromatography*) ao ICP-MS e ESI-QTOF-MS, foi possível confirmar que a espécie QD-2 é um tipo de metalotioneína. Na análise de especiação, após a incubação das células HepG2 com os quatro QDs CdSe/ZnS, apenas duas espécies, QD-1 e QD-2, foram encontradas nas células. De acordo com os autores, a transformação das espécies de QDs nos sistemas biológicos não pode ser descartada, uma vez que a toxicidade dos QDs é dependente da sua estabilidade e transformação, bem como da liberação do elemento após a captação dos QDs pelas células [16].

Adicionalmente, para compreender qual será o comportamento das NPs uma vez absorvidas, é extremamente importante investigar se o contato dessas partículas com um organismo pode alterar alguma biomolécula com subsequente perturbação de alguma rota bioquímica. Em um trabalho realizado por Zhao *et al.* (2016), a cromatografia gasosa (GC, do inglês *gas chromatography*) acoplada às técnicas de ICP-MS e TOF-MS foi considerada para a avaliação de frutas de pepino expostas às nanopartículas de Cu (CuNP), por meio de uma abordagem metalômica e metabolômica. As plantas foram cultivadas durante *ca.* 3 meses em solo contaminado com as CuNP em diferentes níveis. De maneira geral, uma redução na

taxa fotossintética com subsequente aumento das taxas de condutância e transpiração estomatal foram observadas para as plantas tratadas com CuNP quando comparadas com as plantas controle. A concentração dos nutrientes e distribuição de Cu nos compartimentos das plantas foram determinadas por ICP-MS. Como esperado, o conteúdo de Cu foi significativamente maior em todos os compartimentos das plantas tratadas. Tal resultado indica que, uma vez assimilado pelas raízes, o Cu é transportado até as frutas. Mesmo sendo translocado, foi encontrada uma maior quantidade de Cu nas raízes das plantas. Em termos de homeostase dos nutrientes minerais, nas raízes e folhas das plantas expostas às NPs, foi observada uma diminuição no conteúdo de Fe. Tal fato pode ocorrer devido à competição entre a absorção do Fe e do Cu. Por outro lado, de maneira geral, foi observado um aumento na concentração de Ca, K, S, P, Zn e Mg para os grupos tratados. Para a análise metabolômica, após o preparo de amostras, os metabólitos extraídos foram analisados por GC-TOF-MS. Após a análise por PLS-DA, 239 metabólitos foram detectados, sendo que um total de 107 foi identificado. Diversos metabólitos, dentre eles carboidratos, aminoácidos, ácidos carboxílicos e ácidos graxos foram claramente alterados. Adicionalmente, alguns outros metabólitos identificados estão relacionados ao estresse biótico e abiótico, desempenhando um papel importante para elevar a tolerância das plantas de pepino mediante ao excesso de Cu. Assessando a via metabólica, foram observados distúrbios significativos no metabolismo de carbono e nitrogênio, que afetam os níveis de biomoléculas importantes, dentre elas aminoácidos e carboidratos. A combinação dos perfis metabólico e metalômico pode fornecer informações adicionais sobre os efeitos e mecanismos que estão envolvidos devido à exposição por metal ou NPs [17].

Embora os trabalhos acima citados tenham investigado a captação, estabilidade e transformação das NPs e QDs, bem como dos elementos envolvidos, a avaliação da toxicidade dessas espécies nas mais diversas matrizes ainda representa um desafio. Dessa forma, no Capítulo 4 dessa Tese, buscou-se empregar uma estratégia hifenada, baseada na LC acoplada a ambos ICP-MS e HR-MS, para a avaliação de espécies metálicas presentes nas folhas da soja NT e T, após o cultivo com as nanopartículas de prata. Com os resultados alcançados, espera-se ampliar as informações acerca dos efeitos causados pela exposição às NPs.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. Reagentes e equipamentos

Todos os reagentes e padrões empregados no preparo das amostras foram de grau analítico e a fase móvel preparada com reagentes de grau HPLC. Todas as soluções foram preparadas com água deionizada ( $\geq 18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ ) proveniente de um sistema purificador Milli-Q (Millipore). As separações e o monitoramento das espécies metálicas nas folhas de soja foram realizados por meio de um sistema baseado em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A cromatografia de exclusão por tamanho (SEC) e a cromatografia com interação hidrofílica (HILIC), esta última utilizando uma coluna acoplada a ambos ICP-MS (Agilent 7500 cs) e ESI-Orbitrap (LTQ Orbitrap Velos, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany), foram consideradas como estratégia hifenada.

#### 3.2. Extração das espécies metálicas presentes nas folhas de soja NT e T

Inicialmente, um *pool* das folhas de soja pertencentes aos grupos NT-controle, NT-AgNP, NT-AgNO<sub>3</sub>, T-controle, T-AgNP e T-AgNO<sub>3</sub> foram separadamente trituradas em nitrogênio líquido com o auxílio de almofariz e pistilo. Em seguida, as amostras foram congeladas e posteriormente liofilizadas. Os extratos foram obtidos a partir de três diferentes soluções (n=3) de acordo com trabalhos prévios [6, 9, 18], com pequenas alterações. Para a extração dos complexos metálicos, as três soluções consideradas foram SDS 2% (m/v), tris-HCl 30 mmol L<sup>-1</sup> em pH 7,5 e acetato de amônio 100 mmol L<sup>-1</sup> em pH 7,4. Resumidamente, 500  $\mu\text{L}$  da solução extratora foram adicionados a *ca.* 20 mg de amostra e agitados durante 1 min em *vortex* à 3000 rpm. Em seguida, as espécies metálicas foram extraídas durante 15 min com o auxílio de um banho ultrassom. Após essa etapa, as amostras foram centrifugadas por 10 min (10000 g) a uma temperatura de 4 °C. O sobrenadante foi então coletado e armazenado em uma sala com temperatura controlada em 4 °C. Ao resíduo, novamente foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  da solução extratora, sendo o protocolo de extração realizado por três vezes. Após a extração, os extratos das

folhas foram filtrados com uma membrana (0,25  $\mu\text{m}$ ) e então propriamente armazenados para posterior análise.

### **3.3. Avaliação das espécies metálicas presentes nas folhas de soja NT e T por meio de estratégias hífenadas**

Previamente às análises dos extratos por SEC-ICP-MS, a concentração total de alguns elementos nas folhas de soja, extrato e resíduo foi determinada. Para isso, ca. 100 mg de folha de soja foram submetidos à decomposição com 2,5 mL de ácido nítrico concentrado, que ocorreu em um bloco digestor por um período de 4,5 h à 75 °C. Em seguida, 1 mL de peróxido de hidrogênio foi adicionado, sendo a decomposição mantida por mais 4,5 h à 75 °C (n=3). O mesmo procedimento foi realizado para 250  $\mu\text{L}$  do extrato e para o resíduo da extração (após secagem na estufa), que foi realizada conforme descrito no item 3.2, entretanto, para uma massa de ca. 100 mg de amostra (n=3). Após a diluição das amostras, a concentração de Mn, Fe, Zn e Cu foi determinada por ICP-MS (Agilent 7500 cs).

Para a avaliação das espécies metálicas por SEC-ICP-MS, os extratos foram diluídos e as análises cromatográficas efetuadas em um sistema cromatográfico equipado com uma bomba quaternária e uma coluna cromatográfica de exclusão por tamanho Superdex (GE Healthcare Life Sciences). Um tampão acetato de amônio 100  $\text{mmol L}^{-1}$  em pH 7,4 foi empregado como fase móvel e a separação dos complexos metálicos, a partir de 100  $\mu\text{L}$  de volume de injeção, foi realizada no modo de eluição isocrática a uma vazão de 0,7  $\text{mL min}^{-1}$ . Uma detecção simultânea com UV (280 nm) e ICP-MS foi efetuada para obter informações no que se refere à distribuição de Mn, Fe, Zn e Cu nos extratos, de acordo com a massa molecular. Após a obtenção dos perfis por SEC-ICP-MS, um teste de recuperação foi realizado para verificar a concentração dos elementos antes e após a separação.

Posteriormente, as frações eluídas a partir da SEC foram coletadas e então liofilizadas para futura análise por HILIC-ICP-MS empregando uma coluna TSKgel amide-80 (Tosoh Bioscience). As frações liofilizadas foram solubilizadas com uma mistura 1:1 de formato de amônio 10  $\text{mmol L}^{-1}$  em pH 5,5 e acetonitrila (ACN),

que também foi utilizada como fase móvel. A partir de um volume de injeção de 6  $\mu\text{L}$ , as separações foram realizadas em um sistema nanoLC no modo de eluição gradiente entre 35 e 90% de ACN em formato de amônio  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  em pH 5,5 a uma vazão de  $50 \mu\text{L min}^{-1}$ . Para as análises por espectrometria de massas de alta resolução, o sistema nanoLC foi acoplado ao espectrômetro de massas Orbitrap Velos. Após a separação cromatográfica, em que as condições foram análogas às empregadas em HILIC-ICP-MS, o acoplamento foi efetuado por meio de uma fonte de ionização por eletrospray (HESI II, Thermo Fisher Scientific). A fonte de íons foi operada em ambos os modos positivo e negativo em 3,0 kV. No modo varredura, a resolução foi fixada em 100000 ( $m/z$  400) e os dados foram processados pelos softwares XCALIBUR 2.1 e METWORKS 1.2.1 com o intuito de apresentar os espectros de massas para moléculas que podem conter os metais avaliados. Para obter a precisão de massa, os espectros de massas foram recalibrados usando íons precursores/fragmentados com fórmula conhecida que resultaram na determinação de uma fórmula única para cada espécie metálica [3].

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Determinação total elementar nas folhas de soja, extrato e resíduos

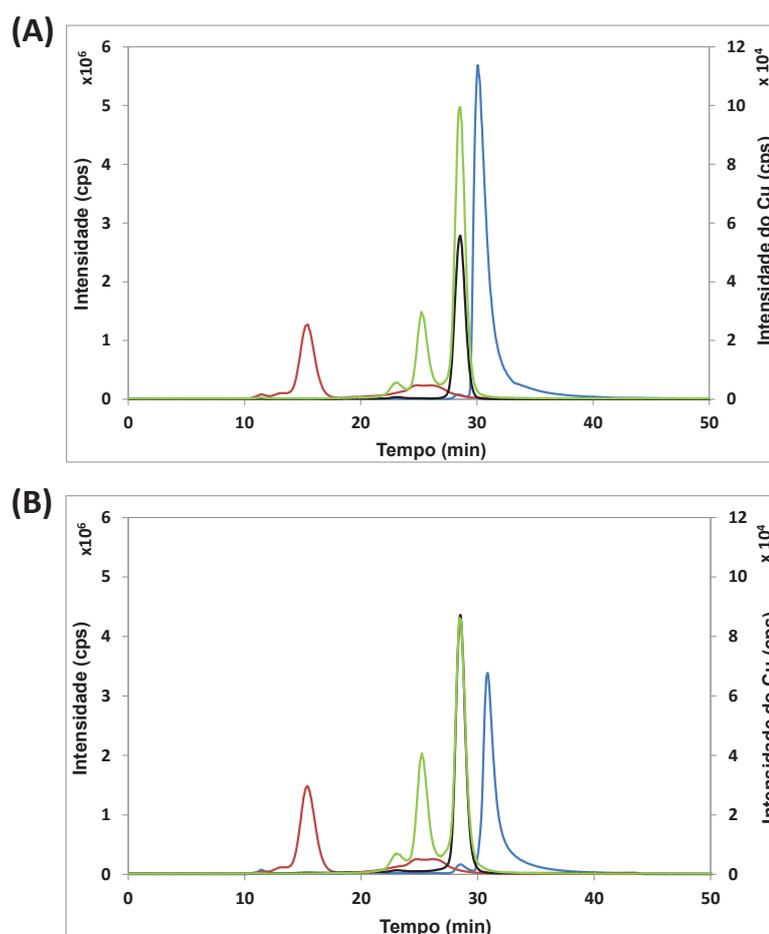
A concentração total elementar nos extratos e resíduos foi comparada com o conteúdo elementar nas folhas de soja com a finalidade de verificar a recuperação obtida após o procedimento de extração. Como apresentado na Tabela 4.1, foram obtidas recuperações quantitativas para Mn, Fe, Zn e Cu. Dessa maneira, esses elementos foram considerados para as análises por SEC-ICP-MS. Para tal tarefa, e considerando que os extratos de folha seriam futuramente avaliados por ESI-Orbitrap, o extrato com SDS não foi considerado para as etapas seguintes. Dessa forma, espera-se evitar qualquer problema relacionado ao excesso da concentração de sais na fonte de ESI.

**Tabela 4.1:** Concentração dos elementos nas folhas de soja, extratos e resíduos.

Elemento	Amostra	Acetato de amônio (mg kg <sup>-1</sup> )	Tris-HCl (mg kg <sup>-1</sup> )	SDS (mg kg <sup>-1</sup> )	Total (mg kg <sup>-1</sup> )
<sup>55</sup> Mn	Extrato	33,64	21,57	52,8	
	Resíduo	27,81	45,20	14,65	76,75
	<b>Recuperação</b>	<b>80</b>	<b>87</b>	<b>88</b>	
<sup>56</sup> Fe	Extrato	47,58	98,67	123,66	
	Resíduo	129,61	132,14	82,27	173,92
	<b>Recuperação</b>	<b>102</b>	<b>133</b>	<b>118</b>	
<sup>57</sup> Fe	Extrato	495,98	452,97	661,58	
	Resíduo	464,04	589,13	325,91	793,98
	<b>Recuperação</b>	<b>121</b>	<b>131</b>	<b>124</b>	
<sup>63</sup> Cu	Extrato	17,49	22,15	22,61	
	Resíduo	3,74	4,08	1,43	21,30
	<b>Recuperação</b>	<b>100</b>	<b>123</b>	<b>112</b>	
<sup>65</sup> Cu	Extrato	17,36	22,86	15,31	
	Resíduo	3,83	4,62	2,29	22,06
	<b>Recuperação</b>	<b>96</b>	<b>125</b>	<b>80</b>	
<sup>66</sup> Zn	Extrato	47,63	26,09	56,63	
	Resíduo	31,63	28,93	20,15	62,84
	<b>Recuperação</b>	<b>126</b>	<b>88</b>	<b>122</b>	
<sup>68</sup> Zn	Extrato	44,5	41,74	51,45	
	Resíduo	31,23	28,26	18,48	63,49
	<b>Recuperação</b>	<b>119</b>	<b>110</b>	<b>110</b>	

#### 4.2. Avaliação dos extratos de folha de soja por SEC-ICP-MS

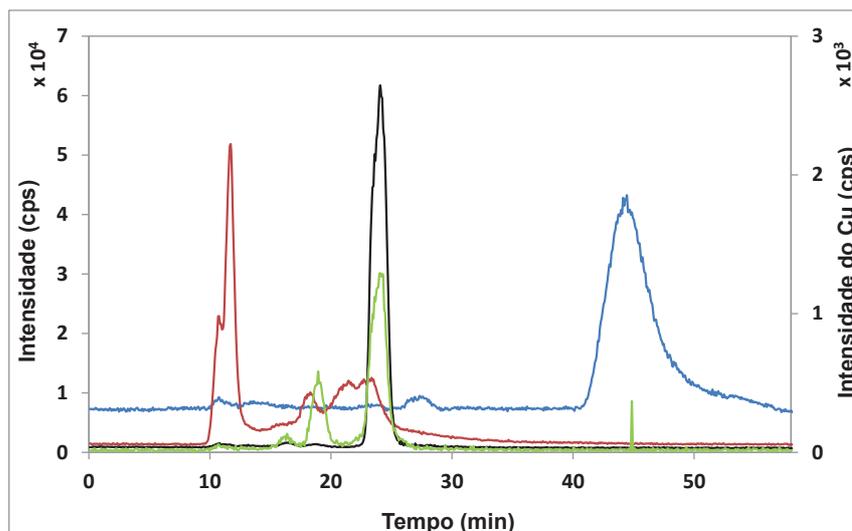
Após as análises para a verificação da concentração total elementar, foram obtidos perfis de SEC-ICP-MS, utilizando uma coluna Superdex 200 10/300 GL, para Mn, Fe, Zn e Cu para as folhas de soja após as extrações com os tampões acetato de amônio e tris-HCl. De acordo com os resultados, os perfis de SEC-ICP-MS observados para a extração com acetato de amônio (Figura 4.1A) e tris-HCl (Figura 4.1B) foram similares.



**Figura 4.1:** Perfis de SEC-ICP-MS para os extratos de folha com acetato de amônio 100 mmol L<sup>-1</sup> (A) e 30 mmol L<sup>-1</sup> tris-HCl (B) usando uma coluna Superdex 200. — <sup>55</sup>Mn, — <sup>56</sup>Fe, — <sup>64</sup>Zn, — <sup>65</sup>Cu.

Considerando que o perfil obtido a partir da extração com acetato de amônio apresentou uma maior intensidade nos sinais, e, que esse tampão é usualmente empregado em análises de espectrometria de massas de alta resolução, essa extração foi selecionada para investigar as possíveis diferenças nos perfis de SEC-ICP-MS entre as amostras.

Adicionalmente, um perfil de SEC-ICP-MS para a extração com acetato de amônio também foi obtido empregando a coluna Superdex 75 10/300 GL (Figura 4.2). Comparando os perfis entre as diferentes colunas Superdex, embora o tempo de eluição para o Mn tenha aumentado, uma melhor resolução e menores tempos de retenção para Fe, Zn e Cu foram observados para a coluna Superdex 75.



**Figura 4.2:** Perfis de SEC-ICP-MS para os extratos de folha com acetato de amônio  $100 \text{ mmol L}^{-1}$  usando uma coluna Superdex 75. —  $^{55}\text{Mn}$ , —  $^{56}\text{Fe}$ , —  $^{64}\text{Zn}$ , —  $^{65}\text{Cu}$ .

Após a obtenção dos perfis de SEC-ICP-MS para a extração com acetato de amônio, um teste de recuperação para ambas as colunas Superdex foram realizados para verificar a concentração dos elementos, antes e depois da separação. Como apresentado na Tabela 4.2, recuperações quantitativas foram alcançadas em ambas as colunas para todos os elementos monitorados.

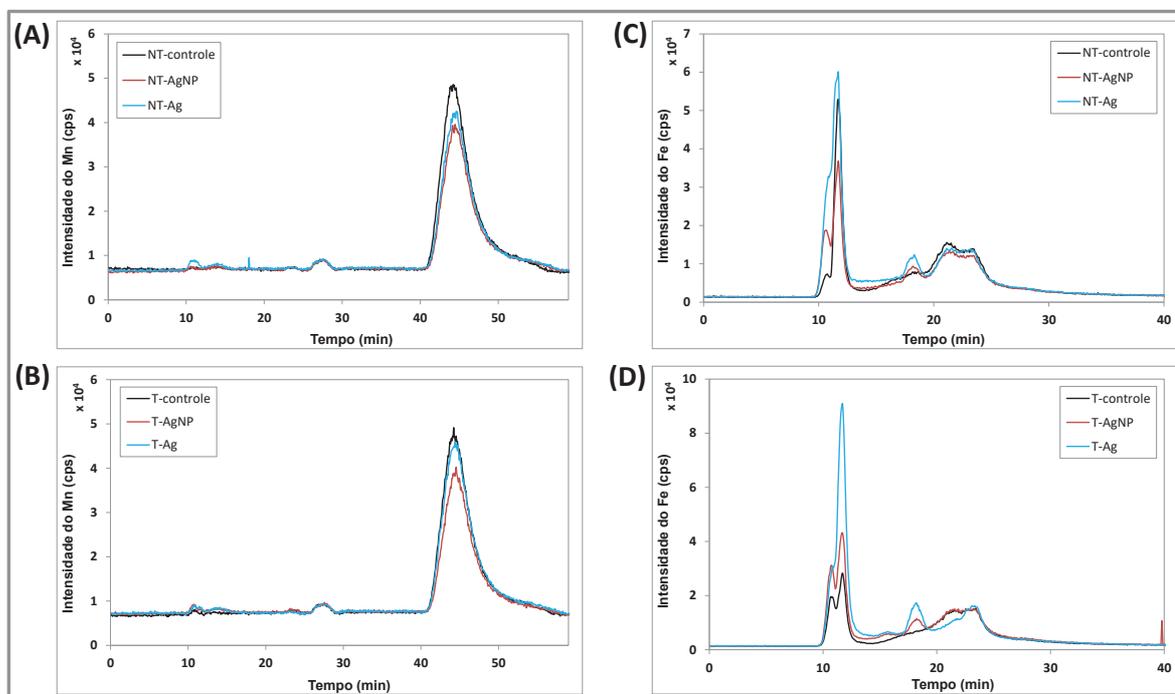
**Tabela 4.2:** Recuperação dos elementos após a separação do extrato de folha de soja usando as colunas Superdex.

Elemento	Recuperação (%)	
	Superdex 200	Superdex 75
Mn	$111 \pm 2$	$91,9 \pm 0,2$
Fe	$100 \pm 1$	$83,1 \pm 0,4$
Cu	$80 \pm 7$	$95 \pm 7$
Zn	$88 \pm 4$	$76 \pm 4$

Considerando que os complexos metálicos presentes no extrato de folha

compreendem espécies pequenas, a coluna Superdex 75, com uma faixa ótima de separação entre 3 e 70 kDa, foi considerada para a análise das diferentes amostras. Então, foram obtidos perfis de SEC-ICP-MS para Mn, Fe, Zn e Cu para todos os grupos e avaliados comparativamente. De acordo com os resultados, algumas diferenças na intensidade dos picos podem ser visualizadas entre as plantas do grupo controle e aquelas cultivadas com AgNP ou AgNO<sub>3</sub> (Figuras 4.3 e 4.4).

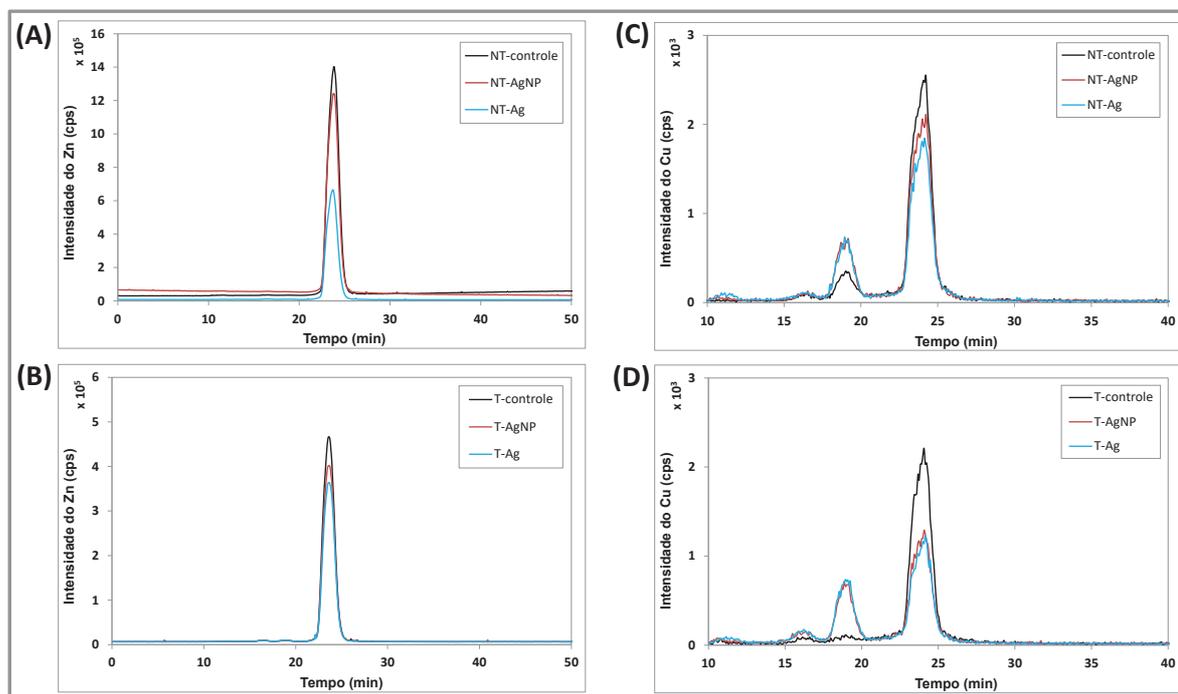
Com relação ao Mn, foram observadas diferenças sutis para a soja NT com uma pequena redução na intensidade do pico das plantas cultivadas com as AgNP ou AgNO<sub>3</sub> (Figura 4.3A). Para a variedade T, apenas o tratamento com as AgNP resultou em uma sutil redução na intensidade do sinal (Figura 4.3B). De maneira análoga, poucas diferenças foram encontradas nos perfis de SEC-ICP-MS para o Fe nas plantas do grupo NT (Figura 4.3C). Já para a soja T, foi observado um aumento na intensidade do pico que aparece entre 10 e 13 min para o grupo T-AgNO<sub>3</sub> quando comparado com as plantas T controle (Figura 4.3D).



**Figura 4.3:** Perfis de SEC-ICP-MS para Mn no extrato de folha das sojas NT (A) e T (B), e para o Fe no extrato de folha das sojas NT (C) e T (D).

Relativamente ao Zn, o cultivo com  $\text{AgNO}_3$  resultou em uma maior diminuição na intensidade do sinal para ambas as variedades NT e T (Figura 4.4). Uma considerável redução de ca. 2 vezes na intensidade do pico foi observada para as plantas NT expostas ao  $\text{AgNO}_3$  em comparação com as plantas NT do grupo controle. Já para o tratamento com as AgNP, apenas uma pequena diminuição foi observada na soja NT (Figura 4.4A). Para a variedade T, ambos os cultivos com AgNP e  $\text{AgNO}_3$  resultaram em uma pequena redução na intensidade do sinal, quando comparado com as plantas T-controle (Figura 4.4B).

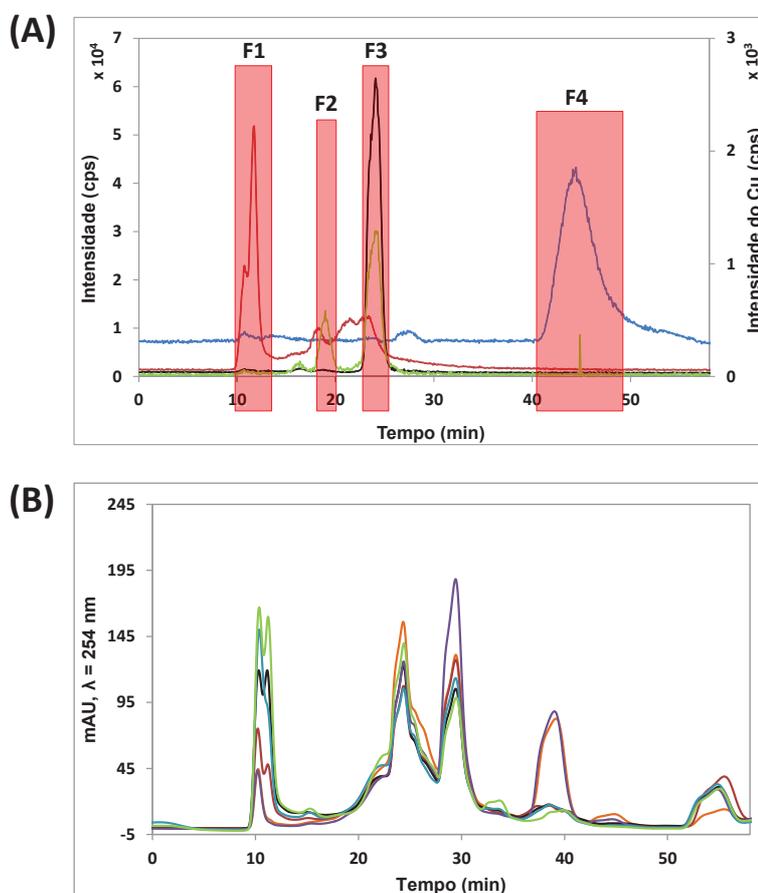
Considerando o Cu, um comportamento similar foi observado para as plantas de soja NT e T (Figura 4.4). De maneira geral, maiores alterações na intensidade do sinal foram visualizadas para a variedade T. Para ambas as plantas de soja NT e T cultivadas com AgNP e  $\text{AgNO}_3$ , um aumento na intensidade do pico presente entre 17 e 20 min, e uma redução no sinal do pico presente entre 22 e 25 min foram observados.



**Figura 4.4:** Perfis de SEC-ICP-MS para Zn no extrato de folha das sojas NT (A) e T (B), e para o Cu no extrato de folha das sojas NT (C) e T (D).

### 4.3. Avaliação das frações de SEC por HILIC-ICP-MS e HILIC-ESI-Orbitrap

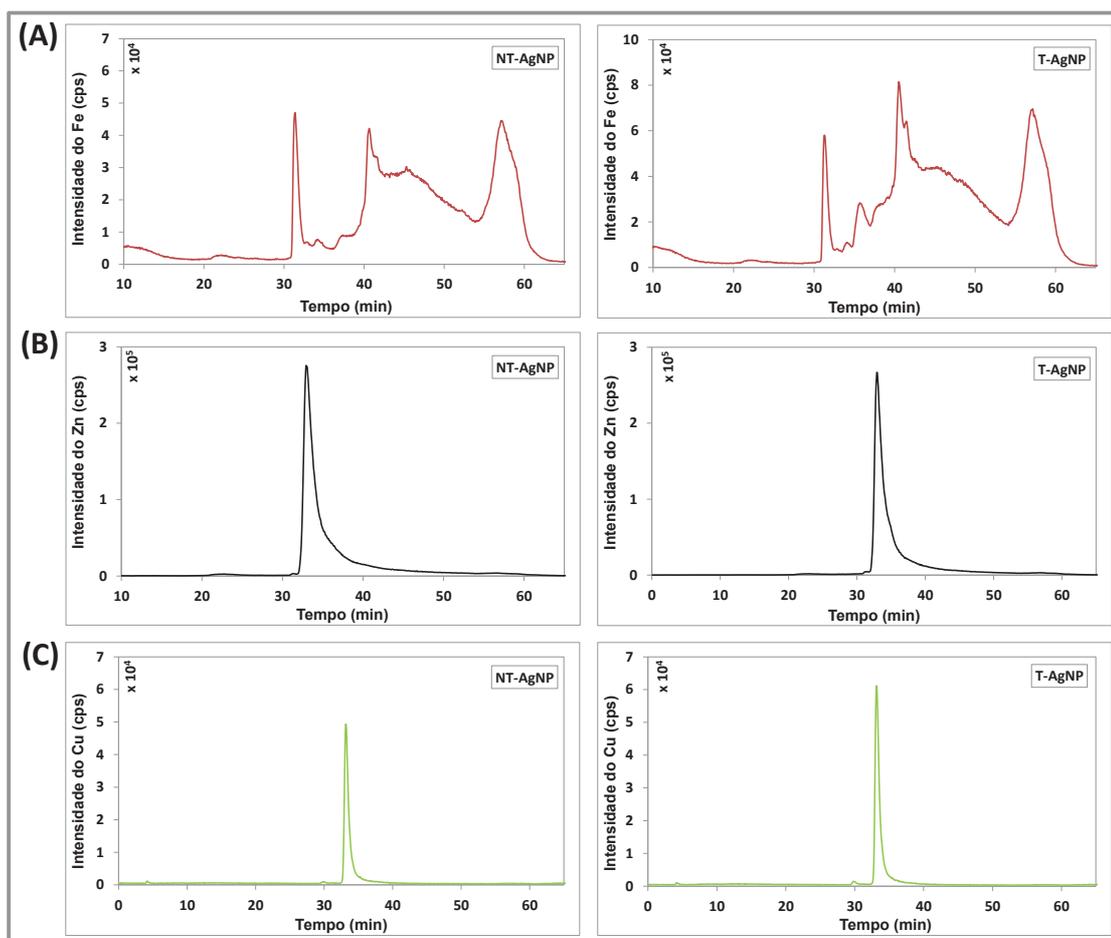
Após os estudos realizados por SEC-ICP-MS, embora um total de quatro frações fosse encontrado, apenas as frações F2, F3 e F4 provenientes da SEC foram selecionadas para a avaliação por HILIC-ICP-MS (Figura 4.5A). A fração F1 não foi considerada, pois, nessa fração, poderia haver moléculas grandes, como pode ser observado pelo cromatograma de SEC-UV (Figura 4.5B), que não seriam passíveis de análise por HILIC.



**Figura 4.5:** Frações de SEC coletadas para futuras análises por HILIC-ICP-MS. — <sup>55</sup>Mn, — <sup>56</sup>Fe, — <sup>64</sup>Zn, — <sup>65</sup>Cu (A) e perfil de SEC-UV para os extratos de folhas de soja NT e T. — NT-controle, — NT-AgNP, — NT-AgNO<sub>3</sub>, — T-controle, — T-AgNP, — T-AgNO<sub>3</sub> (B).

De acordo com os resultados apresentados na Figura 4.6, apenas na fração F3 foram obtidos picos, para aqueles elementos previamente monitorados por SEC-ICP-MS, nas análises de HILIC-ICP-MS. As amostras dos grupos NT-AgNP e

T-AgNP foram utilizadas como exemplo para verificar se os sinais dos elementos provenientes da SEC-ICP-MS apareceriam na avaliação por HILIC-ICP-MS para ambas as variedades de soja. Nota-se, por meio da Figura 4.6, que perfis similares para a fração F3 são observados para Fe, Zn e Cu nas plantas NT e T. Sendo assim, os perfis de HILIC-ICP-MS para a fração F3 podem ser relacionados com o respectivo pico da fração F3 previamente visualizada em SEC-ICP-MS.



**Figura 4.6:** Perfis de HILIC-ICP-MS para Fe (A), Zn (B) and Cu (C) a partir da fração F3 da SEC.

Então, foram realizadas as análises de HILIC-ESI-Orbitrap para a fração F3 das plantas de soja NT e T, utilizando as mesmas condições e a mesma coluna TSKgel amide-80 empregadas na HILIC-ICP-MS. Em um primeiro momento, as espécies metálicas presentes na fração F3 foram separadas por uma coluna HILIC, e, então, analisadas por ESI-Orbitrap. Após o emprego de um filtro para íons

metálicos (Fe, Zn e Cu), os íons que apresentaram provável padrão isotópico para Fe, Zn e Cu no espectro de massas, como exemplificado na Figura 4.7, foram manualmente selecionados para experimentos futuros de fragmentação por HILIC-ESI-Orbitrap no modo sequencial (*tandem*). O intuito desses experimentos é a identificação das espécies metálicas presentes na fração F3. Com tais resultados, espera-se expandir a informação acerca de quais vias podem ser alteradas nas plantas de soja NT e T, após os cultivos com AgNP e AgNO<sub>3</sub>.

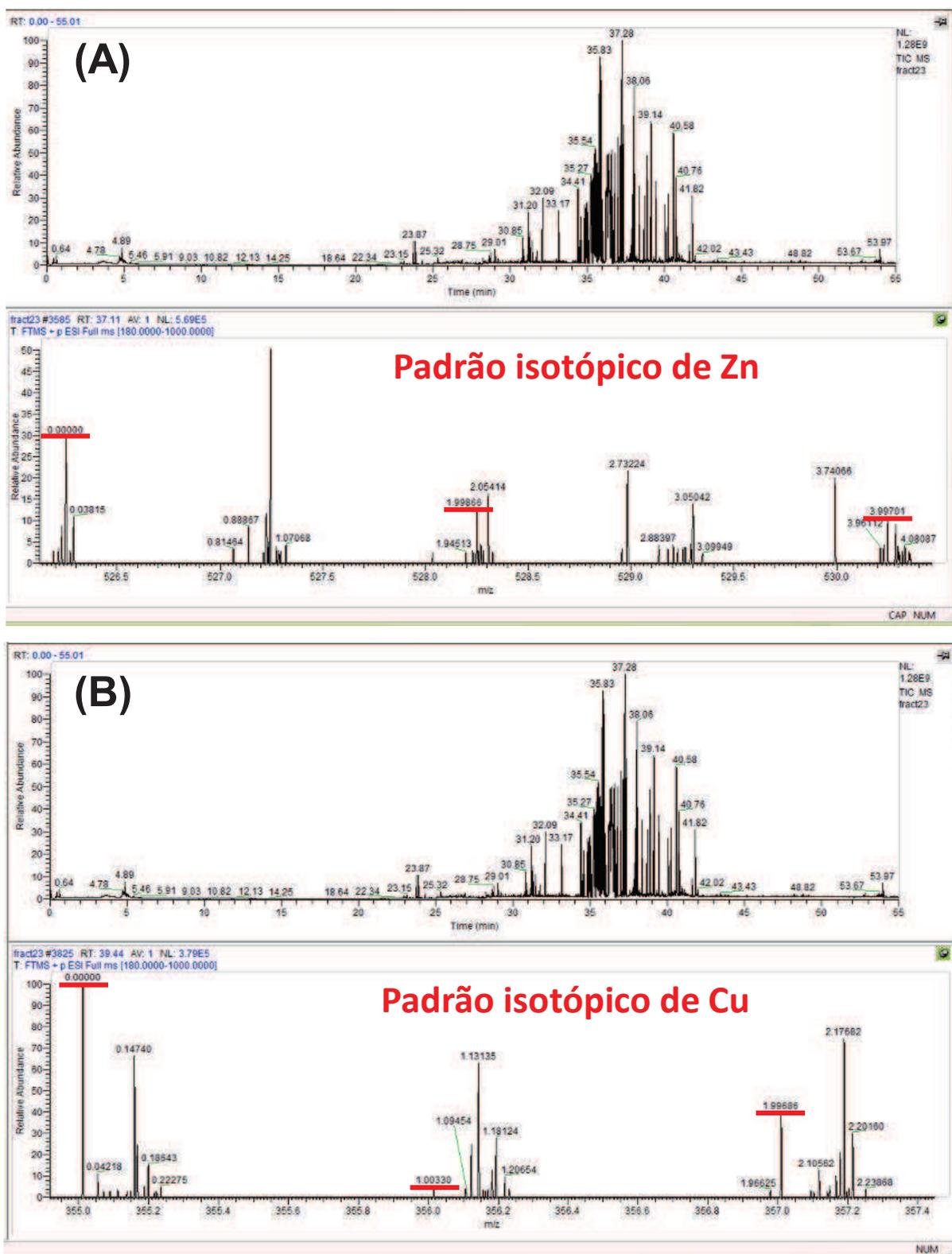


Figura 4.7: Exemplo de padrões isotópicos para Zn (A) e Cu (B) presentes na fração F3.

## 5. CONSIDERAÇÕES PARCIAIS

Após a realização de uma extração empregando tampões brandos com uma etapa com ultrassom, as espécies metálicas presentes nos extratos de folha foram avaliadas por meio de uma estratégia hifenada. Em seguida, alguns parâmetros analíticos foram verificados, dentre eles a concentração dos elementos nos extratos e resíduos, bem como a recuperação após a separação das espécies metálicas, previamente extraídas com acetato de amônio  $100 \text{ mmol L}^{-1}$  em pH 7,4, usando a coluna Superdex 75.

Então, foram obtidos perfis de SEC-ICP-MS para Mn, Fe, Zn e Cu para os grupos NT-controle, NT-AgNP, NT-AgNO<sub>3</sub>, T-controle, T-AgNP e T-AgNO<sub>3</sub>. Algumas diferenças, em termos de intensidade do sinal, foram observadas entre as variedades NT e T controles, e aquelas plantas cultivadas na presença de AgNP ou AgNO<sub>3</sub>. Embora, pequenas diferenças foram visualizadas para Mn e Fe, um considerável aumento na intensidade do sinal para Fe foi encontrado para as plantas T expostas ao AgNO<sub>3</sub>. Da mesma forma, o cultivo com AgNO<sub>3</sub> resultou em uma considerável diminuição do sinal do Zn na soja NT, enquanto que para os demais grupos apenas pequenas reduções no sinal do Zn foram observadas. Com relação ao Cu, um comportamento similar foi observado para ambas as variedades NT e T, visto que foi encontrado um aumento na intensidade para o primeiro pico e uma significativa redução para o segundo pico para as plantas expostas às AgNP ou AgNO<sub>3</sub>.

Assim, de um total de quatro frações, apenas a fração F3 proveniente da SEC foi avaliada por HILIC-ICP-MS, onde foram obtidos perfis para Fe, Zn e Cu para as plantas NT e T. Então, empregando as mesmas condições, a mesma coluna HILIC foi acoplada ao ESI-Orbitrap. Após essas análises, alguns íons com padrões isotópicos, principalmente para Cu e Zn, foram encontrados e selecionados para futuros experimentos de fragmentação por ESI-Orbitrap, no modo *tandem*. Com tais resultados, espera-se identificar as espécies metálicas, e, conseqüentemente, as possíveis vias que possam estar alteradas nas plantas de soja NT e T devido aos cultivos com AgNP e AgNO<sub>3</sub>.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. H. Haraguchi, *Metallomics as integrated biometal science*. **J. Anal. At. Spectrom.**, **2004**, *19*, 5-14.
2. S. Mounicou, J. Szpunar, R. Lobinski, *Metallomics: the concept and methodology*. **Chem. Soc. Reviews**, **2009**, *38*, 1119-1138.
3. P. Flis, L. Ouerdane, L. Grillet, C. Curie, S. Mari, R. Lobinski, *Inventory of metal complexes circulating in plant fluids: a reliable method based on HPLC coupled with dual elemental and high-resolution molecular mass spectrometric detection*. **New Phytol.**, **2016**, *211*, 1129–1141.
4. G. DalCorso, A. Manara, A. Furini, *An overview of heavy metal challenge in plants: from roots to shoots*. **Metallomics**, **2013**, *5*, 1117-1132.
5. R. Lobinski, D. Schaumlöffel, J. Szpunar, *Mass spectrometry in bioinorganic analytical chemistry*. **Mass Spectrom. Rev.**, **2006**, *25*, 255-289.
6. L. Ouerdane, S. Mari, P. Czernic, M. Lebrunb, R. Lobinski, *Speciation of non-covalent nickel species in plant tissue extracts by electrospray Q-TOFMS/MS after their isolation by 2D size exclusionhydrophilic interaction LC (SEC-HILIC) monitored by ICP-MS*. **J. Anal. At. Spectrom.**, **2006**, *21*, 676-683.
7. J. Szpunar, *Advances in analytical methodology for bioinorganic speciation analysis: metallomics, metalloproteomics and heteroatom-tagged proteomics and metabolomic*. **Analyst**, **2005**, *130*, 442-465.
8. S. X. Li, L. H. Chen, F. Y. Zheng, Y. C. Li, *Effect of the cp4-epsps gene on metal bioavailability in maize and soybean using bionic gastrointestinal tracts and ICP-MS determination*. **J. Agric. Food Chem.**, **2013**, *61*, 1579–1584.
9. L. R. V. Mataveli, M. Fioramonte, F. C. Gozzo, M. A. Z. Arruda, *Improving metallomics information related to transgenic and non-transgenic soybean seeds using 2D-HPLC-ICP-MS and ESI-MS/MS*. **Metallomics**, **2012**, *4*, 373–378.
10. J. Bettmer, M. M. Bayón, J. R. Encinar, M. L. F. Sánchez, M. R. F. De la Campa,

- A. Sanz-Medel, *The emerging role of ICP-MS in proteomic analysis*. **J. Proteomics**, **2009**, 72, 989–1005.
11. A. Yiannikouris, C. Connolly, R. Power, R. Lobinski, *Characterization of metal–peptide complexes in feed supplements of essential trace elements*. **Metallomics**, **2009**, 1, 235–248.
12. K. Mehennaoui, A. Georgantzopoulou, V. Felten, J. Andreï, M. Garaud, S. Cambier, T. Serchi, S. Pain-Devin, F. Guérol, J.-N. Audinot, L. Giambérini, A. C. Gutleb, *Gammarus fossarum (Crustacea, Amphipoda) as a model organism to study the effects of silver nanoparticles*. **Sci Total Environ**, **2016**, 566-567, 1649-1659.
13. T. Li, B. Albee, M. Alemayehu, R. Diaz, L. Ingham, S. Kamal, M. Rodriguez, S. W. Bishnoi, *Comparative toxicity study of Ag, Au, and Ag–Au bimetallic nanoparticles on Daphnia magna*. **Anal Bioanal Chem**, **2010**, 398, 689–700.
14. A. Malysheva, E. Lombi, N. H. Voelcker, *Bridging the divide between human and environmental nanotoxicology*. **Nature Nanotechnol**, **2015**, 10, 835-844.
15. J. Soto-Alvaredo, M. Montes-Bayón, J. Bettmer, *Speciation of silver nanoparticles and silver(I) by Reversed-Phase Liquid Chromatography coupled to ICPMS*. **Anal Chem**, **2013**, 85, 1316–1321.
16. L. Peng, M. He, B. Chen, Y. Qiao, B. Hu, *Metallomics study of CdSe/ZnS quantum dots in HepG2 cells*. **ACS Nano**, **2015**, 9:10, 10324-10334.
17. L. Zhao, Y. Huang, H. Zhou, A. S. Adeleye, H. Wang, C. Ortiz, S. J. Mazere, A. A. Keller, *GC-TOF-MS based metabolomics and ICP-MS based metallomics of cucumber (Cucumis sativus) fruits reveal alteration of metabolites profile and biological pathway disruption induced by nano copper*. **Environ Sci Nano**, **2016**, 3, 1114-1123.
18. K. Chacón-Madrid, G. S. Pessoa, M. M. Salazar, G. A. G. Pereira, J. M. T. Carneiro, T. B. de Lima, F. C. Gozzo, M. A. Z. Arruda, *Evaluation of genetically modified Arabidopsis thaliana through metallomic and enzymatic approaches focusing on mass spectrometry-based platforms*. **Int. J. Mass Spectrom.**, **2017**, 418, 6-14.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

O estudo proposto nesta Tese possibilitou obter informações acerca das características da solução de nanopartículas após a síntese, em termos da morfologia das NPs e da concentração de prata. O emprego de abordagens ômicas permitiu melhor compreensão dos efeitos causados nas plantas de soja transgênica e não-transgênica pelo cultivo na presença de nanopartículas de prata.

Os experimentos relacionando a concentração de prata na solução pós-síntese (AgNP-total) e suas frações, AgNP-res e Ag-sob, permitiu determinar que apenas metade da prata presente na solução AgNP-total está na forma de NP. Sendo assim, antes da aplicação de qualquer NP, sugere-se a avaliação da mesma para evitar possíveis efeitos sinérgicos com os íons  $\text{Ag}^+$  também presentes na solução pós-síntese. Após esse estudo, as plantas de soja NT e T foram expostas ao cultivo com as AgNP e  $\text{AgNO}_3$ , à uma concentração final de  $50 \text{ mg kg}^{-1}$  de prata no substrato de cultivo. Com essa concentração, foi possível obter as plantas de todos os grupos para posterior avaliação comparativa. Nessas condições, foram visualizadas áreas necróticas na parte basal do caule e clorose ou com algum dano nas folhas das plantas NT e T tratadas. Além disso, foram observadas reduções na massa total das plantas dos grupos NT-AgNP, NT- $\text{AgNO}_3$  e T-AgNP.

Com relação ao estudo proteômico, a resposta da soja, em termos de *spots* diferenciais, é dependente da variedade da planta e da forma de Ag adicionada durante ao cultivo. De fato, a soja T se mostrou mais robusta aos tratamentos, uma vez que um menor número de *spots* diferenciais foi encontrado para essa variedade. Como esperado, para ambas as sojas NT e T, tanto para o cultivo com a Ag iônica, quanto para o cultivo com as AgNP, foram encontradas, nos *spots* diferenciais, espécies relacionadas às condições de estresse oxidativo e ao fotossistema, dentre elas *RuBisCO*, *superóxido dismutase*, *ATP synthase*, *triosephosphate isomerase*, *oxygen-evolving enhancer protein 2*, entre outras. No caso do  $\text{AgNO}_3$ , tal condição se deve ao estresse metálico, enquanto que, no caso das AgNP, além do estresse metálico, há, provavelmente, um estresse coloidal, uma vez que NPs são colóides.

Adicionalmente, foram encontradas diferenças significativas na atividade da CAT e concentração do MDA para os grupos NT vs NT-AgNO<sub>3</sub>, NT vs NT-AgNP, T vs T-AgNO<sub>3</sub> e T vs T-AgNP, em que os tratamentos aumentaram a atividade da CAT e a concentração do MDA em comparação com os respectivos controles. Em termos de CAT, as plantas expostas ao AgNO<sub>3</sub> estão mais estressadas do que as plantas cultivadas com AgNP e a soja T foi mais suscetível aos cultivos com AgNO<sub>3</sub> e AgNP. Todavia, somente para as sojas NT expostas ao AgNO<sub>3</sub> e AgNP foram observadas reduções na concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Apenas para os grupos NT vs NT-AgNP e T vs T-AgNO<sub>3</sub>, foram observadas diferenças significativas, com uma diminuição da atividade da SOD de ca. 14 e 38%, respectivamente. As plantas de soja NT e T apresentaram respostas distintas, uma vez que a soja NT foi mais afetada pela exposição ao AgNO<sub>3</sub>, enquanto que a soja T foi mais suscetível ao cultivo com as AgNP.

Os dados obtidos com o estudo ionômico revelaram que ambas as variedades NT e T acumulam a prata majoritariamente nas raízes, como uma possível estratégia de defesa por parte do vegetal. Com relação à translocação de prata, para ambas as variedades de soja, o cultivo com as AgNP resultou em maiores níveis de prata nas partes aéreas das plantas. Adicionalmente, a soja T apresentou uma maior taxa de translocação quando comparada com a variedade NT. Considerando que menos de 0,5% da prata absorvida foi translocada até as folhas de ambas as variedades NT e T, a soja pode ser considerada como uma espécie de planta excludora. Com relação aos elementos essenciais, de maneira geral, foram verificadas mudanças significativas em todos os compartimentos das plantas como resultado dos tratamentos com as AgNP e AgNO<sub>3</sub>, sendo as maiores alterações observadas nas raízes.

Por fim, foi considerada uma estratégia hifenada baseada no acoplamento da cromatografia líquida a ambos ICP-MS e HR-MS a fim de avaliar possíveis metalobiomoléculas nas folhas de soja. Após a extração das espécies metálicas por meio de um tampão brando, perfis de SEC-ICP-MS foram obtidos para Mn, Fe, Zn e Cu. Algumas diferenças foram observadas, em termos de intensidade do sinal, entre as variedades NT e T controles e àquelas plantas cultivadas na presença de AgNP ou AgNO<sub>3</sub>. De um total de quatro frações observadas na SEC-ICP-MS, apenas a

fração F3 foi avaliada por HILIC-ICP-MS em que perfis para Fe, Zn e Cu foram obtidos para as plantas NT e T. Então, empregando as mesmas condições, a mesma coluna HILIC foi acoplada ao ESI-Orbitrap. Após essas análises, alguns íons com padrões isotópicos, principalmente para Cu e Zn, foram encontrados e selecionados para futuros experimentos de fragmentação por ESI-Orbitrap no modo *tandem* (sequencial).

Como perspectivas, pode-se buscar identificar as espécies metálicas observadas por meio das técnicas de LC-ICP-MS e LC-ESI-MS e, conseqüentemente, investigar as possíveis vias que possam estar alteradas nas plantas de soja NT e T devido aos cultivos com AgNP e AgNO<sub>3</sub>. Dessa forma, seriam obtidas informações adicionais acerca dos efeitos causados nas plantas de soja pelo cultivo com as AgNP e AgNO<sub>3</sub>. Além disso, uma avaliação metabolômica seria interessante e poderia contribuir para uma melhor compreensão no que se refere à influência das nanopartículas de prata no metabolismo da soja.