

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA**  
**CAMPUS SÃO GABRIEL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS**  
**BIOLÓGICAS**

**FERNANDA ILLAMAS GALLON**

**DESINFESTAÇÃO DE SEGMENTOS NODAIS DE *Eugenia involucrata* DC.**  
**ATRAVÉS DE NANOPARTÍCULAS DE OURO E DE PRATA VISANDO À**  
**PROPAGAÇÃO *IN VITRO***

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**São Gabriel**

**2017**

**FERNANDA ILLAMAS GALLON**

**DESINFESTAÇÃO DE SEGMENTOS NODAIS DE *Eugenia involucrata* DC.  
ATRAVÉS DE NANOPARTÍCULAS DE OURO E DE PRATA VISANDO À  
PROPAGAÇÃO *IN VITRO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Dr. Valdir Marcos Stefenon

**São Gabriel**

**2017**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos  
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do  
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

G172d Gallon, Fernanda Illamas

Desinfestação de segmentos nodais de *Eugenia involucrata*  
DC. através de nanopartículas de ouro e de prata visando à  
propagação in vitro / Fernanda Illamas Gallon.

60 p.

Dissertação(Mestrado)-- Universidade Federal do Pampa,  
MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, 2017.

"Orientação: Valdir Marcos Stefenon".

1. Biotecnologia Vegetal. 2. Biotecnologia. 3. Cultura de  
Tecidos. 4. Nanotecnologia. 5. Nanopartículas. I. Título.

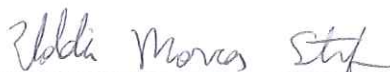
FERNANDA ILLAMAS GALLON

**DESINFESTAÇÃO DE SEGMENTOS NODAIS DE *Eugenia involucrata* DC.  
ATRAVÉS DE NANOPARTÍCULAS DE OURO E DE PRATA VISANDO À  
PROPAGAÇÃO *IN VITRO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas.

Dissertação defendida e aprovado em: 29 de Setembro de 2017.

Banca examinadora:



---

Prof. Dr. Valdir Marcos Stefenon  
Orientador  
UNIPAMPA



---

Prof. Dr. Filipe de Carvalho Victoria  
UNIPAMPA



---

Prof. Dr. Jair Putzke  
UNIPAMPA

A meus pais, Ivalino e Eunice, dedico.

## AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, e pela felicidade deste momento.

Agradeço a todas as pessoas que fizeram parte desta jornada, direta ou indiretamente, seria impossível citar todos os nomes, pois tive o prazer de ter ótimas pessoas que cruzaram meu caminho, a vocês meu muito obrigada.

Aos meus avós Adelaide, Ciro (*in memorian*), Guido (*in memorian*) e Vilma (*in memorian*), que deram toda educação aos meus pais que me passaram os melhores valores; aos meus pais Ivalino e Eunice e minha irmã Alessandra, tia Magda que nunca mediram esforços em me apoiarem para a conquista deste sonho, obrigada por todo apoio, desde o financeiro ao emocional em todas as horas que mais precisei. Ao Francisco por ser meu companheiro, compreendendo minhas dificuldades e por estar presente nesta caminhada.

Ao Professor Gastal (*in memorian*), grande amigo que me mostrou o amor pela botânica, obrigada pelo incentivo e todo seu conhecimento não medindo esforços enquanto estava presente. Obrigada por tua amizade, sou eternamente grata por ter tido a oportunidade de conhecer, ser aluna e amiga, segui teus conselhos e este, é o início de várias conquistas que ainda virão. Obrigada Gastal!

Agradeço ao Professor Valdir Stefenon pela oportunidade de trabalho no Laboratório Núcleo de Cultura de Tecidos Vegetais, nestes 04 anos, obrigada pela orientação, conversas e tempo disponível para a elaboração deste trabalho.

Meus colegas do Laboratório Núcleo de Cultura de Tecidos Vegetais (NCTV), agradeço por esta equipe que sempre esteve disposta para o trabalho, obrigada pelos dias de trabalho, conversas e risadas, vocês foram fundamentais para a execução deste.

Ao meu coorientador Paulo Diniz, agradeço pela orientação deste trabalho, não medindo esforços durante a pesquisa, obrigada por cada palavra e apoio, à sua esposa Graciela e filho Júnior, obrigada pela amizade tornando-se mais que amigos, uma família que ganhei ao longo deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório Estresse Oxidativo e Sinalização Celular pela ajuda com as análises dos materiais, obrigada. Aos colegas do laboratório NUGEM, obrigada pela ajuda e companheirismo. Ao Rafael Matielo e a Cristiane pela amizade e pelas dúvidas esclarecidas desta caminhada. A minha amiga Mônica, agradeço pelos conselhos, conversas de todos estes anos de amizade, obrigada pelo teu carinho e preocupação comigo sempre.

Aos técnicos de laboratórios que sempre estiveram dispostos para ajudar a cada imprevisto que surgia, obrigada por toda atenção.

Aos membros da banca, agradeço aos Professores Filipe, Jair e Professora Thaís pela disponibilidade e pelas contribuições feitas ao trabalho. Muito obrigada!

À Universidade Federal do Pampa, pela oportunidade de trabalho, conhecimento e crescimento profissional.

Agradeço a todos que tive oportunidade de conhecer ao longo deste trabalho, pois cada pessoa foi fundamental para meu amadurecimento pessoal e profissional. A todos os meus sinceros agradecimentos. Muito Obrigada!!

"Em algum lugar, alguma coisa incrível está esperando para ser descoberta."

Carl Sagan



## RESUMO

A propagação *in vitro* ou micropropagação é uma das técnicas da Cultura de tecidos vegetais que visa o cultivo em larga escala de plantas livre de contaminantes. Estes podem ser de natureza bacteriana ou fúngica, que em excesso podem levar o explante à morte. Novas metodologias surgem para aprimorar esta técnica, e uma inovação é a utilização de nanopartículas na desinfestação de explantes. A *Eugenia involucrata* DC. conhecida como cereja-do Rio Grande pertence à família Myrtaceae que possui 130 gêneros com 4000 espécies. Por possuir madeira resistente e potencial econômico na utilização de seus frutos, é importante cultivar esta espécie, também utilizada na recuperação de áreas degradadas. O presente trabalho teve como objetivo utilizar nanopartículas de prata (AgNps) e nanopartículas de ouro (AuNps) na desinfestação de *Eugenia involucrata* DC. comparativamente com outros diferentes tratamentos. No experimento foram utilizados cinco tipos de tratamento: (1) controle composto de hipoclorito de sódio e álcool 70%, (2) dicloro, (3) antibiótico, (4) nanopartículas de prata e (5) nanopartículas de ouro. Os resultados demonstraram que as nanopartículas de prata oferecem uma desinfestação mais eficaz em comparação aos demais tratamentos para esta espécie.

Palavras- chave: Cultura de tecidos, cereja-do-rio-grande, micropropagação, AgNps, AuNps

## ABSTRACT

*In vitro* propagation or micropropagation is one of the techniques of Plant Tissue Culture that aims at the large scale cultivation of plants free of contaminants. These may be bacterial or fungal in nature, which in excess can lead the explant to death. New methodologies arise to improve this technique, and one innovation is the use of nanoparticles in disinfestation of explants. *Eugenia involucrata* DC. known as cherry of the Rio Grande belongs to the family Myrtaceae that has 130 genera with 4000 species. Because it has resistant wood and economic potential to use of its fruits, it is important to cultivate this species, which is also used in the recovery of degraded areas. The present work aimed to use silver nanoparticles (AgNps) and gold nanoparticles (AuNps) in the disinfestation of *Eugenia involucrata* DC. compared to other different treatments. In the experiment, five types of treatment were used: (1) control composed of sodium hypochlorite and 70% alcohol, (2) dichloro, (3) antibiotic, (4) silver nanoparticles and (5) gold nanoparticles. The results showed that the silver nanoparticles offer a more effective disinfestation in comparison to the other treatments for this species.

Key words: Tissue Culture, Rio Grande- cherry, Micropropagation, AgNps, AuNps.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Micropropagação de <i>Eugenia involucrata</i> em meio nutritivo MS. .....	15
Figura 02. Contaminação bacteriana em explantes de <i>Eugenia involucrata</i> .....	16
Figura 03. Penetrações de três tamanhos de AuNps em células epiteliais intestinais durante quatro intervalos de tempos (1/2; 01; 02 e 24 horas). ...	20
Figura 04. (A) O plasmodesmo de uma célula vegetal e (B) a carioteca com poros nucleares são as entradas para nanopartículas. ....	21
Figura 05. (A) Pequenas nanopartículas de prata confeccionadas com citrato de sódio; O plasmodesmo de uma célula vegetal e (B) Grande nanopartículas de prata confeccionadas com citrato de sódio. ....	23
Figura 06. Árvore de <i>Eugenia involucrata</i> DC. no bioma pampa. ....	25
Figura 07. Aspectos de frutos de <i>Eugenia involucrata</i> . ....	26
Figura 08. Desinfestação de explantes de <i>Eugenia involucrata</i> , em câmara de fluxo laminar, utilizados os tratamentos T1 (controle), T2 (dicloro), T3 (antibiótico), T4 (AgNps) e T5 (AuNps). ....	29
Figura 09. Nanopartículas de Prata (AgNps) .....	30
Figura 10. Espectrometria de UV-vis. Característica de presença de nanopartículas de prata. ....	30
Figura 11. Nanopartículas de Ouro (AuNps). ....	31

Figura 12. Espectrometria de UV-vis. Característica de presença de nanopartículas de ouro. ....	32
Figura 13. Medição de Índice de clorofila Falker dos tratamentos T4 (AgNps) e das plantas <i>ex vitro</i> . ....	35
Figura 14. (A) Tratamento T2 (dicloro), anterior à inoculação dos explantes no meio nutritivo MS e (B) folhas de <i>Eugenia involucrata</i> após tratamento dicloro. ....	38
Figura 15. Extração de DNA de <i>Eugenia involucrata</i> , B1, B2, B3 (plantas <i>in vitro</i> ), T4 (AgNps). ....	47
Figura 16: Fases do cultivo <i>in vitro</i> de <i>Eugenia involucrata</i> com o tratamento de AgNps, desde a inoculação até a aclimação da planta micropropagada. A) Explante de <i>Eugenia involucrata</i> inoculada no primeiro dia; B) Explante de <i>Eugenia involucrata</i> com 30 dias; C) Explante de <i>Eugenia involucrata</i> com 45 dias, surgimento de folhas no ápice caulinar; D) Explante de <i>Eugenia involucrata</i> com 60 dias, surgimento de raiz e crescimento da ápice caulinar; E) Explante de <i>Eugenia involucrata</i> com 90 dias pronto para aclimação; F) <i>Eugenia involucrata</i> aclimatada no laboratório de Cultura de Tecidos. ....	48

## LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Tabela de contaminação dos tratamentos T1 (controle); T2 (dicloro); T3 (antibiótico); T4 (AgNps) e T5 (AuNps).....40

Tabela 02. Sobrevivência de plantas dos tratamentos T1 (controle); T2 (dicloro); T3 (antibiótico); T4 (AgNps) e T5 (AuNps).  
.....40

Tabela 03. Quantidade de raízes por tratamento T1 (controle) e T4 (AuNps).  
.....44

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

AgNps – Nanopartículas de Prata

AuNps – Nanopartículas de Ouro

MS – Meio de cultura Murashige Skoog

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>14</b>
<b>OBJETIVO GERAL</b>	<b>27</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>27</b>
<b>METODOLOGIA</b>	<b>28</b>
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>37</b>
<b>CONCLUSÃO</b>	<b>49</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>50</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>58</b>

## INTRODUÇÃO

### MICROPROPAGAÇÃO DE PLANTAS

A propagação *in vitro* ou micropropagação (figura 01) compreende o cultivo asséptico de partes vegetais (explantes) em condições controladas de nutrição, umidade, luz e temperatura, e pode ser alcançada pela multiplicação de gemas axilares ou iniciação de gemas adventícias através da organogênese ou embriogênese somática (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). É indicada para plantas de difícil propagação pelos métodos convencionais, com a obtenção de grande número de plantas saudáveis e geneticamente uniformes em curto prazo de tempo.

A micropropagação pode diminuir os efeitos da variação de fatores ambientais e que resultam em produções de compostos de valores econômicos como enzimas, de modo que oferecem uma variedade inexplorada de reações bioquímicas para produção de metabólitos (BOTTA *et al.*, 2001). É uma das técnicas mais importantes e difundidas da Cultura de Tecidos Vegetais, com maior interesse científico e econômico (XAVIER *et al.*, 2007), de maneira que a técnica fornece um método para propagação em massa e também possibilita a produção de plantas livres de doenças. Além disso, é utilizada para aumentar a competitividade das indústrias de base agrícolas e florestais, alcançando seu maior potencial quando está combinada com programas de melhoramento genético que estabelecem plantas híbridas com alta produtividade e qualidade fitossanitária. Logo, a produção precisa de um sistema de micropropagação.

Murashige (1974), apresentou o conceito de estágios de desenvolvimento no processo de propagação vegetativa em laboratório, divide-se em:

- Estágio 0, com o pré-tratamento da planta-matriz com fungicidas e antibióticos em semanas anteriores à coleta;
- Estágio I, com a seleção de explantes, desinfestação e cultivo *in vitro* sob condições assépticas;
- Estágio II, com a multiplicação dos propágulos em sucessivas subculturas em meio de cultura próprio para essa finalidade;



- Estágio III, com a transferência das partes aéreas produzidas para o meio de enraizamento e subsequente plantio das plantas obtidas para substrato ou solo (aclimatação).

As espécies arbóreas ou arbustivas apresentam algumas vantagens pela micropropagação, a multiplicação rápida e a fidelidade clonal (GIRI *et al.* 2004), possibilitando o desenvolvimento de matrizes com grande interesse econômico (AUGÉ; BOCCON-GIBOD, 1989). Essas plantas matrizes podem ser empregadas em programas de reflorestamento e conservação de germoplasmas de ótima qualidade (GIRI *et al.*, 2004).

Figura 01: Micropropagação de *Eugenia involucrata*, em meio nutritivo MS.

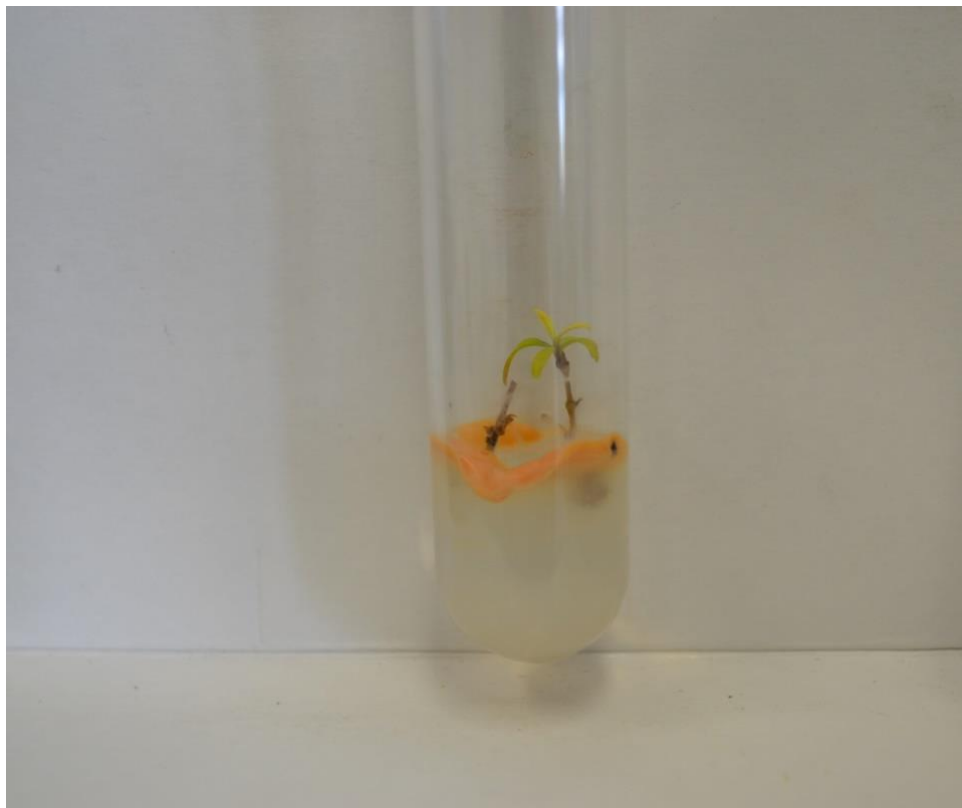


Fonte: Fernanda Illamas Gallon (2017)

## CONTAMINAÇÃO *IN VITRO*

Na cultura de tecidos vegetais, existem diversas técnicas que são utilizadas em espécies frutíferas, algumas com relativo sucesso enquanto outras ainda necessitam de mais estudos. A micropropagação é uma dessas técnicas que apresenta maior impacto nas aplicações da cultura de tecidos vegetais, de resultados mais concretos (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Engloba diferentes etapas que vão desde o estabelecimento da cultura *in vitro* até seu enraizamento, culminando com a aclimatização da microplanta (BASTOS *et al.*, 2007). A técnica precisa de condições de manuseio assépticas (SHARP *et al.*, 1979) além de uma planta matriz com qualidade sanitária que pode reduzir a contaminação no meio de cultura. No entanto, um dos maiores entraves no estabelecimento *in vitro* de espécies lenhosas está na dificuldade de obter tecidos livres de contaminações provocadas por fungos e bactérias (figura 02) e ainda por oxidações provocadas por compostos fenólicos (THORPE *et al.*, 1991; GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Figura 02: Contaminação bacteriana em explantes de *Eugenia involucrata*.



Fonte: Fernanda Illamas Gallon (2017)

A desinfestação de segmentos nodais em espécies lenhosas é a primeira etapa a ser considerada para a realização de ótimo estabelecimento *in vitro* (PIERIK, 1990). Os níveis de contaminação tendem a ser maiores, quando as plantas matrizes usadas como fonte de explantes são provenientes do campo. No entanto, mesmo as plantas submetidas a rigoroso controle fitossanitário e mantidas em viveiro protegido ou casa de vegetação são fontes potenciais de microrganismos (bactérias, fungos e vírus), que podem tornar-se limitantes aos procedimentos de cultivo *in vitro* (MEDEIROS, 1999; ALMEIDA; MARTINS; DUTRA, 2008).

A contaminação microbiana é vista como uma séria ameaça ao sucesso da micropropagação (THOMAS, 2004). No entanto, trabalhos como o de Almeida *et al.* (2009), Abreu-Tarazi *et al.* (2010) e Esposito-Polesi (2010) comprovaram que a presença de bactérias em plantas micropropagadas sadias e assintomáticas (sem manifestação de colônias bacterianas no meio de cultura), que vivem endossimbioticamente nos xilemas, desta forma, quebrando o paradigma de que plantas cultivadas *in vitro* são axênicas.

Os microrganismos que vivem no interior de plantas e habitam de modo geral suas partes aéreas, como folhas e caules, mas não causam aparentemente nenhum dano a seus hospedeiros, são chamados de endofíticos.

A dificuldade da micropropagação reside no estágio I no estabelecimento *in vitro* e surge de problemas com as contaminações bacterianas e fúngicas devido à endossimbioses entre os vegetais, micorrizas e as bactérias endofíticas, porque este estágio não busca a desinfecção dos materiais apesar da utilização de antibióticos e fungicidas. Assim, essa contaminação na Cultura de Tecidos Vegetais não devido à ineficiência das técnicas ou do descuido na manipulação (SPRENT; JAMES, 1995; ALMEIDA *et al.*, 2009; ABREU-TARAZI *et al.*, 2010 e ESPOSITO-POLESI, 2010), pode causar problemas devido à disputa pelos nutrientes do meio de cultura com explantes, diminuindo o seu crescimento (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

No cultivo *in vitro*, considera-se que a manifestação de colônias microbianas no meio de cultura, quando não ocorre nos primeiros dias após a introdução do material, não é caracterizada como contaminação, considerando-se o fato de não afetarem o crescimento do vegetal e, muitas vezes, apresentam associações benéficas com ele (ALMEIDA *et al.*, 2005; ALMEIDA *et al.*, 2009; ABREU-TARAZI *et al.*, 2010; BATAGIN-PIOTTO, 2013).

Novas pesquisas sugerem que bactérias endofíticas podem promover o crescimento vegetal e reduzir os sintomas de doenças causadas por diversos fitopatógenos (HALLMANN *et al.* 1997). Além de exercerem diversas funções de importância para o hospedeiro, esses microrganismos são potencialmente úteis na agricultura e na indústria, sobretudo na farmacêutica e de defensivos agrícolas (SANTOS; VARAVALLO, 2011). Dentre as espécies da família Myrtaceae, muitas apresentam associações bacterianas endofíticas como a *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cabbage (ESPOSITO-POLESI *et al.* , 2015) e a *Eugenia involucrata* DC. (GOLLE *et al.* , 2013; PAIM, 2011).

Às vezes, para a diminuição das contaminações existe necessidades de um pré-tratamento dos ápices caulinares com fungicidas (Benomil<sup>®</sup>, Derosal<sup>®</sup>, Mancozeb<sup>®</sup>, captan<sup>®</sup>, etridiazole<sup>®</sup>) e com os antibióticos (estreptomicina, canamicina, carbelicilina, vrfampicina, tetraciclinas, etc), que devem ser aplicados a intervalos de 7 a 14 dias, antes da coleta dessas ápices (CID, 2010).

A assepsia superficial ou a desinfestação dos explantes acontece pela remoção dos contaminantes superficiais dos materiais de campo ou da casa de vegetação. Esta usa procedimentos alternativos como banhos de álcool 70° GL e diferentes concentrações de hipoclorito de sódio.

Atualmente, busca-se a possibilidade de não se descartar microplantas *in vitro* que apresentem colônias bacterianas, mas controlar o desenvolvimento e multiplicação destas, baseado na possibilidade desses microrganismos endofíticos serem vitais para o crescimento das microplantas. Isso se dá em razão da estreita relação entre o endófito e o hospedeiro, a qual envolve processos de coevolução, influenciando na fisiologia do vegetal, bem como otimizando o crescimento e a adaptação das plantas às diferentes condições de cultivo, seja *in vitro* ou *in vivo* (ALMEIDA *et al.*, 2009). Então, o ideal é que as colonizações bacterianas ou fúngicas fiquem retidas dentro do vegetal e não multipliquem-se no meio de cultura, entretanto sem uso dos antibióticos.

As mirtáceas apresentam intensa colonização por bactérias e fungos, principalmente os micorrízicos arbusculares como os gêneros *Glomus* e *Acaulospora* para a *Eugenia uniflora* (LOPES, 2009). Como tal, a cereja-do-Rio-Grande que é a espécie estudada, possui uma associação endossimbiótica bacteriana (LORENZI, 2008).

## NANOPARTÍCULAS

Os vestígios e as peças estudadas que foram deixados pelos romanos, mostraram que as nanopartículas (Nps) não são um fenômeno da civilização da atualidade. Como exemplo, a análise da taça "Lycurgus" do século V d.C., que está locada no "British Museum" , é composta de nanopartículas de prata, de ouro e de cobre, de tamanho com máximo de 100 nm.

Assim, o ressurgimento do emprego das Nps foi idealizado por Richard Feynman, durante a conferência "There's Plenty of Room at the Bottom" em 1959, aonde apresentou universo nanométrico, imaginando avanços tecnológicos que serviriam dos diversos estudos (FORMIGA, 2007). Porém o termo "Nanotecnologia" foi cunhado pelo pesquisador Norio Taniguchi (CASANOVA, 2010).

O prefixo "nano" deriva do grego "anão", em que 1 nm equivale a 1 bilionésimo de metro. Nanopartículas metálicas como ouro, prata, platina, ferro, entre outras são bons exemplos do cenário atual da nanotecnologia. Mas devido a suas propriedades físico-químicas e amplo potencial de aplicação, oferecem diversas oportunidades de inovação para os setores materiais, eletrônica e biotecnologia.

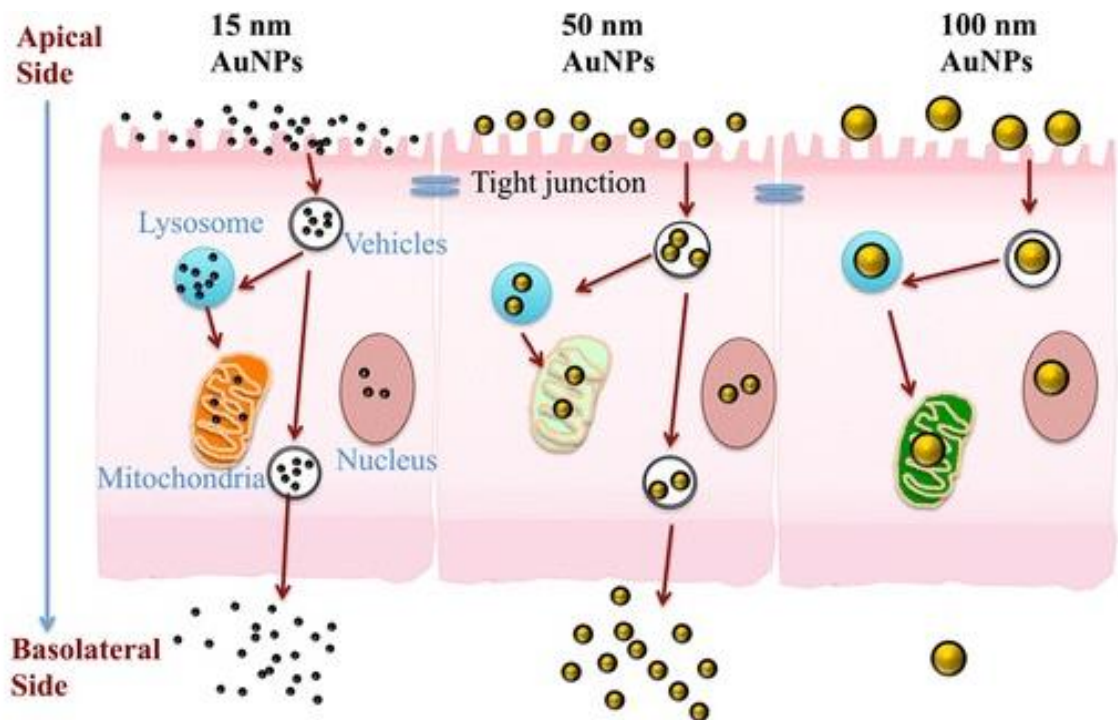
As propriedades óticas e químicas das nanopartículas são consequências dos confinamentos eletrônicos, vacâncias, fótons e campo elétrico em torno destas e a razão entre área superficial e o volume. O termo plasmon trata-se uma das características das propriedades óticas das Nps metálicas que excitam pela manipulação luminosa em escala nanométrica, pela radiação eletromagnéticas na região do ultravioleta quanto na do visível. Esta absorção é denominada banda de ressonância plasmônica superficial.

A maior dificuldade da escolha da metodologia para o desenvolvimento das Nps pelo método químico, reside na redução, nas suas formações e no controle da aglutinação durante a formação destas e que fazem cessar o crescimento pelos agentes estabilizantes (citrato de sódio, polivinilpirrolidona, ácido cítrico, etc). Logo, os tamanhos e a morfologias são influenciados pelos estabilizantes e pelos redutores (DONG *et al.* 2012). Desta maneira, as finalidades de uso das Nps são essenciais para essas escolhas para as reações.

As nanopartículas podem ser isotrópicas como as formas esféricas ou anisotrópicas, de formas triangulares, de bastões, hexaedros, decaedros, etc. As isotrópicas apresentam suas propriedades iguais independentemente do comprimento, porém as anisotrópicas mostram propriedades físicas e químicas influenciadas pelos seus tamanhos e das suas morfologias.

As entradas naturais para as nanopartículas (Nps) nas células vivas são complexos de proteínas como poros e porinas dos núcleos, das mitocôndrias e das membranas. Essas são influenciadas pelos tamanhos das nanopartículas como foi constatando com o teste em células epiteliais do intestino (figura 03) em que o acúmulo destas causou citotoxicidade e evidenciando despolarização das membranas mitocondriais pelas AuNps de 15 nm em 30 min e após 24 horas estavam presentes nos núcleos (YAO *et al.* 2015).

Figura 03: Penetrações de três tamanhos de AuNps em células epiteliais intestinais durante quatro intervalos de tempos (0,5, 1, 2 e 24 horas).



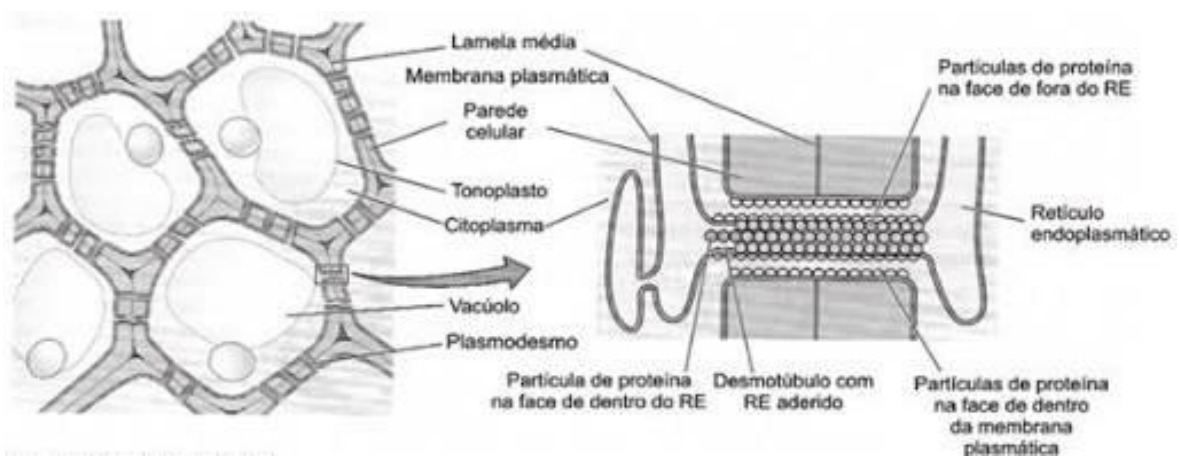
Fonte: YAO *et al.* (2015)

São entradas em célula vegetal, os plasmodesmos com dimensão de 40 nm de diâmetro nas paredes primárias e secundárias (TAIZ; ZAIGER, 2004) ou em

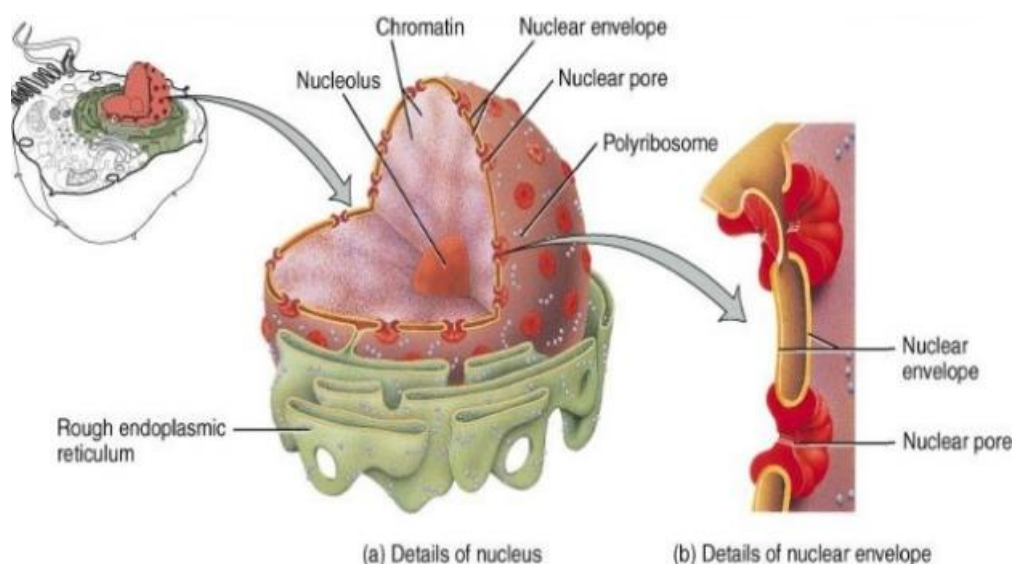
organelas como núcleo pelos complexos de poros das cariotecas (figura 04) com 10 nm de diâmetro nas partes internas das estruturas, nas membranas permeáveis mitocondriais e membranas externas dos cloroplastos, pelas presenças de porinas que desejam passar as pequenas moléculas de massa menores que a 13,0 dáltons (JUNQUEIRA *et al.*, 2000).

Figura 04: **(A)** O plasmodesmo de uma célula vegetal e **(B)** a carioteca com poros nucleares são as entradas para nanopartículas.

**Figura: A**



**Figura: B**



Fonte: Taiz; Zaiger (2004)

Todos os materiais nanométricos devem ser controlados e mantidos em um limite para evitar escapes e danos ao ambiente. A periculosidade das Nps é a capacidade destas em penetrar pelos poros e interferir na força motriz de prótons, na geração de ATP, na permeabilidade da membrana (CUMBERLAND; LEAD, 2009).

As grandes exigências do mercado atual fazem com que a agroindústria brasileira esteja sempre na busca por melhorias dos processos com vistas ao aumento da produtividade, qualidade e competitividade. Com isso, novos métodos surgem para suprir estas demandas, e uma destas inovações, é o uso de nanopartículas metálicas como agente antimicrobiano. Como exemplo, a utilização de AgNps (80 nm) que mostrou um efeito eficaz em córtex dos tecidos vegetais *in vitro* de *Theobroma cacao* (VILLAMIZAR-GALLARDO *et al.* 2016).

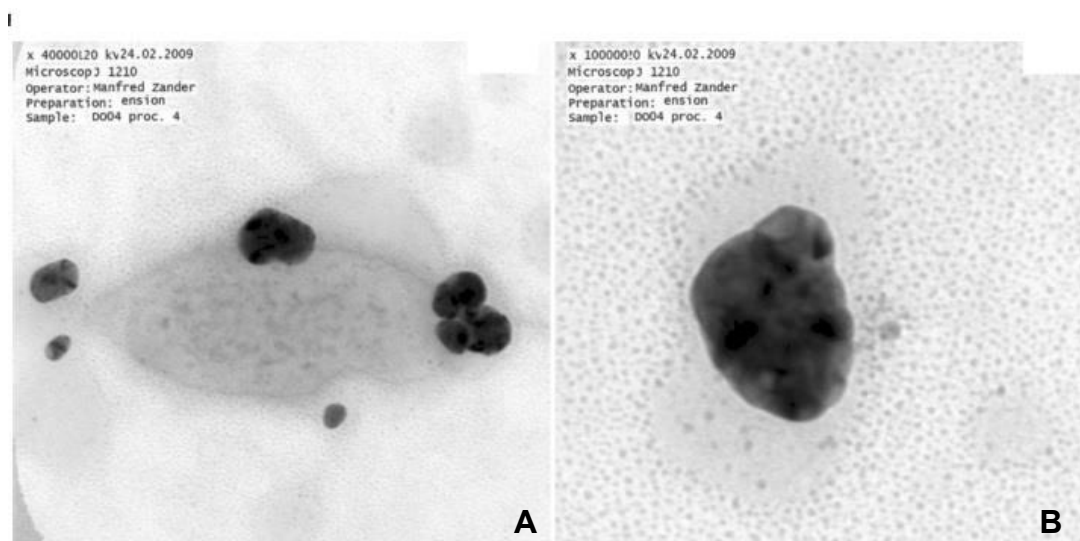
Uma característica de metais nobres sob a forma de nanopartículas é a forte coloração de suas dispersões coloidais que é causada pela absorção de plasmon de superfície. Soluções coloidais de metais como prata e ouro são sistemas em nanoescala particularmente interessantes, devido à facilidade com que podem ser preparadas e modificadas quimicamente.

## **NANOPARTÍCULAS DE PRATA**

As nanopartículas de prata têm sido estudadas vastamente, em grande parte, devido aos seus efeitos antimicrobianos (SONDI, 2004; CHOI *et al.*, 2008), o efeito biocida é proporcional à concentração de íons Ag<sup>+</sup>, assim, quanto maior a concentração da prata, maior seu efeito antimicrobiano. Isto facilita a microscopia eletrônica que permite a visualização das partículas de prata (figura 05). Estas também podem ser caracterizadas pela espectroscopia de UV-visível com picos de absorção ao redor de 400 nm. Devido ao tamanho das nanopartículas de prata, a sua utilização deve ser limitada, pois se uma partícula for muito menor poderá penetrar nos poros e núcleos de células vegetais.



Figura 05: (A) Pequenas nanopartículas de prata confeccionadas com citrato de sódio. (B) Grande nanopartículas de prata confeccionadas com citrato de sódio.



Fonte: Van Dong *et al.* (2012).

Atualmente, as AgNps têm sido utilizadas em curativos, cateteres (HEILMAN, 2015), tubos traqueais, tecidos biocidas, embalagens alimentícias e sanitização de legumes (ARAÚJO *et al.*, 2015).

## NANOPARTÍCULAS DE OURO

O ouro é um metal nobre, e sempre teve reconhecimento pelo seu valor. Diversos usos para este metal estão sendo descobertos, e um recurso inovador para o uso do ouro é a utilização de nanopartículas como agente controlador de contaminação e carreadores de fármacos para aplicações biomédicas como câncer, osteoartrite, contra tumores mamários, terapia oncológica com nanossondas de AuNps e nanocirurgia ativada por nanobolhas plasmônicas através do laser infravermelho em intra-operatórios simples em câncer mamário (CAMPOS, 2017; LUKIONOVA-HLEB, *et al.* 2016; COELHO, 2015; NETTO-FERREIRA, 2015; SILVA-OLIVEIRA, 2014). O tamanho das partículas de ouro difere do tamanho de partículas de prata, o que se faz limitar o uso em algumas técnicas.

Dentre vários métodos, os de Turkevich para as sínteses de nanopartículas de prata e de ouro foram baseados nas reduções e nas estabilizações das nanopartículas pelo íon citrato, que resultam em nanopartículas com tamanhos de 50 a 100 nm para as de prata e 20 a 30 nm para as de ouro (TURKEVICH *et al.*, 1951).

### ***Eugenia involucrata* DC.**

A família Myrtaceae possui 130 gêneros com 4000 espécies de arbustos e árvores (SOUZA, LORENZI, 2005); predominantemente de regiões tropicais e poucas distribuídas nas subtropicais (BARROSO, 1999). Esta possui uma vasta diversidade de árvores frutíferas no Brasil, algumas espécies, são nativas do Rio Grande do Sul e de grande potencial econômico, o que visa a necessidade de mais estudos para maior conhecimento destas espécies.

As mirtáceas que ocorrem no Brasil compreendem diversos gêneros de árvores e arbustos que podem ser utilizados em paisagismo, como planta ornamental, ou na produção de frutos. Mesmo possuindo diversos usos, algumas espécies são pouco conhecidas e estudadas, como é o caso da *Eugenia involucrata* DC. (figura 06), popularmente conhecida como cereja-do-Rio Grande. As frutas desta espécie, além de ser consumidas *in natura*, podem ser consumidas na forma de doces, sucos e geléias (LORENZI *et al.*, 2002). Os frutos de *Eugenia involucrata* apresentam coloração negro-violácea (figura 07), são doces e delicados e muito apreciados pela avifauna da região. Essa espécie possui propriedades farmacêuticas que quando utilizadas na forma de chá serve para o alívio de dores estomacais e na questão ecológica pode ser utilizada na recuperação de áreas degradadas e na silvicultura, apresenta uma ótima qualidade e durabilidade de sua madeira (LORENZI, 2008). A cereja-do-Rio Grande possui diversos atributos que a tornam uma espécie com grande potencial para sua utilização, mas, no entanto, ainda é pouco explorada devido às dificuldades na propagação e às sementes recalcitrantes.

Há a necessidade de alternativas para produção em larga escala como o cultivo *in vitro*. Esta técnica apresenta importância para áreas agrícolas e florestais e também para a área científica, onde aparece como uma das técnicas mais

polivalentes. Baseia-se principalmente no aproveitamento da totipotência das células vegetais, ou seja, na capacidade de produzir brotos ou raízes que regeneram uma planta completa em um meio de cultivo favorável.

Figura 06: Árvore de *Eugenia involucrata* DC. no bioma Pampa



Fonte: Fernanda Illamas Gallon (2017)

Figura 07: Aspectos dos frutos de *Eugenia involucrata*



Fonte: Maria Fernanda Trientini (2017)

## OBJETIVO GERAL

Desenvolver desinfestação e micropropagação de *Eugenia involucrata* utilizando nanopartículas de prata e nanopartículas de ouro, comparativamente com tratamentos utilizando o álcool 70° GL e hipoclorito de sódio, dicloroisocianurato de sódio e antibiótico como agentes desinfetantes.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a contaminação bacteriana de *Eugenia involucrata* em explantes;
- Verificar a existência de nanopartículas de prata nos meio de cultura;
- Analisar a sobrevivência de plantas;
- Examinar os tamanhos de ápices; tamanho das gemas e os números de gemas;
- Examinar dos tamanhos das raízes e dos números das raízes;
- Analisar os índices de clorofila;
- Verificar a integridade de DNA nuclear das plântulas.

## **METODOLOGIA**

### **Obtenção e caracterização do material vegetal**

Os experimentos foram realizados no Núcleo de Cultura de Tecidos Vegetais do Centro Interdisciplinar de Pesquisas em Biotecnologia da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), Campus São Gabriel.

A coleta de frutos (drupas) de *Eugenia involucrata*, foi realizada durante a primavera do ano de 2015, a partir de quatro indivíduos previamente selecionados em quatro pontos do perímetro urbano da cidade de São Gabriel, Rio Grande do Sul, Brasil (30°20'S, 54°19'W), domínio do bioma Pampa. Estes foram levados ao laboratório, onde passaram pelo processo de limpeza e desinfestação.

### **Desinfestação das sementes e germinação *in vitro***

Um total de 600 drupas foram lavadas em água corrente e após foram despulpadas, sendo utilizadas apenas suas sementes. Estas foram lavadas com água destilada e ficaram em um banho de álcool 70° GL por três minutos, após em solução de 1,25% de hipoclorito de sódio durante 01 minuto (SILVA, P.R.D. *et al.* 2014).

O substrato utilizado para o plantio das cerejas-do-Rio Grande foi de 50% de vermiculita e 50% de areia que passaram por processo de autoclavagem, para evitar contaminação.

As sementes foram plantadas em oito bandejas de plástico e regadas com água destilada diariamente e quinzenalmente com solução de 1/4 meio de cultura MS. As bandejas foram mantidas no Centro Interdisciplinar de Pesquisas de Biotecnologia, na sala do Núcleo de cultura de tecidos vegetais (NCTV) por cerca de 100 dias, até atingirem o tamanho aproximado de 10 cm, quando foram preparados os explantes (Figura 08).

Figura 08: Desinfestação de explantes de *Eugenia involucrata*, em câmara de fluxo laminar, utilizados os tratamentos T1 (controle), T2 (dicloro), T3 (antibiótico), T4 (AgNps) e T5 (AuNps).



Fonte: Fernanda Illamas Gallon (2017)

### **Síntese de nanopartículas de prata (AgNps)**

As nanopartículas de prata (AgNps) foram sintetizadas através do método de Turkevich (1951), sendo utilizado o método quente. Foram pesados 0,017g de nitrato de prata e 0,1g de citrato de sódio adicionados em 100 mL de água ultra pura e levados à banho-maria até atingir 90°C.

As nanopartículas de prata (AgNps) são caracterizadas pela coloração amarelada (figura 09), e sua absorção UV-Vis na faixa de 420-440 nm (Figura 10), porém a escolha do agente redutor é essencial para formação do tamanho e da morfologia das AgNps, que afeta na absorbância destas. A utilização do redutor boroidreto de sódio forma nanopartículas mais homogêneas, arredondadas e de tamanho menores, enquanto as de citrato de sódio apresentam morfologia irregular ou amorfa. Entretanto, não afetam, a coloração para as AgNps (MELO Jr. *et al.* 2012; TURKEVICH, 1951). As Nps devem ter dimensões entre 20 e 70 nm para

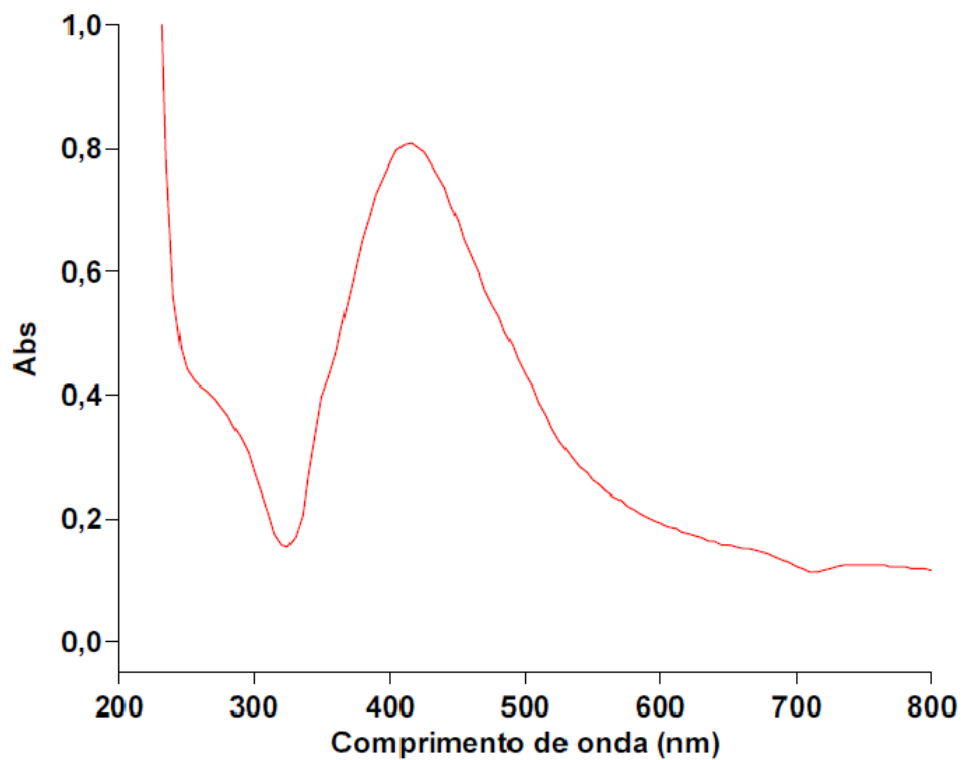
evitar as passagens destas que não interagem com proteínas e DNAs através dos poros nucleares e das membranas permeáveis mitocondriais e membranas externas dos cloroplastos.

Figura 09: Nanopartículas de Prata (AgNps)



Fonte: Fernanda Illamas Gallon (2017)

Figura 10: Espectrometria de UV-Vis – característica de presença de nanopartículas de prata.

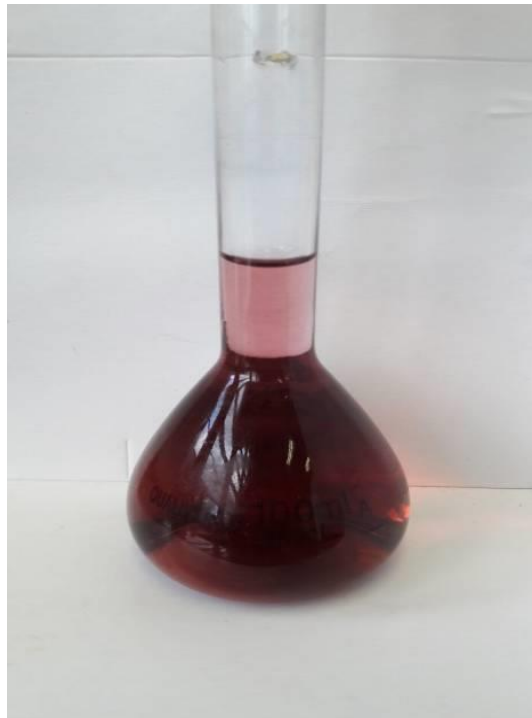




### Síntese de nanopartículas de ouro (AuNps)

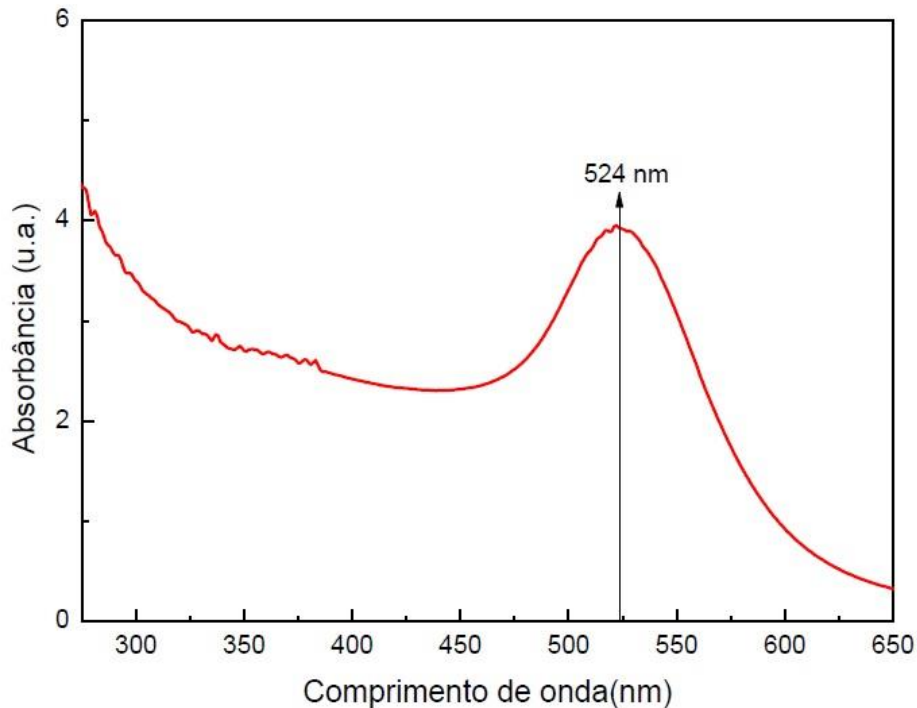
As nanopartículas de ouro foram sintetizadas a partir do método de Turkevich (1951). Foi utilizada 100 mL de solução de ácido tetracloroáurico, mantido em chapa de aquecimento a temperatura de 90°C com agitação e acrescida de 01 mL de solução de citrato de sódio (1%). As nanopartículas de ouro (AuNps), foram caracterizadas pela coloração roxo (figura 11) e sua absorção UV-Vis na faixa de 500- 600 nm (Figura 12).

Figura 11: Nanopartículas de Ouro (AuNps)



Fonte: Fernanda Illamas Gallon (2017)

Figura 12: Espectrometria de UV-Vis – característica de presença de nanopartícula de ouro.



### Desinfestação dos explantes

O experimento foi composto por cinco tratamentos, cada tratamento com doze tubos de ensaio e quatro repetições, sendo quarenta e oito tubos de ensaio por tratamento. Para cada tubo, dois explantes foram inoculados e totalizando 240 tubos de ensaio e 480 explantes.

Estes foram constituídos dos seguintes tratamentos de desinfestação:

- T1 = Imersão de 1 minuto de álcool 70%, de solução de 1,25% de hipoclorito de sódio durante 15 minutos e três imersões de água destilada autoclavada (controle);

- T2 = o controle e mais uma imersão de Dicloroisocianurato de Sódio (dicloro), 2 g L<sup>-1</sup> de água destilada, durante 10 minutos;

- T3 = o controle e mais uma imersão de 50 mL de solução aquosa com 10 $\mu$ L de cloranfenicol (antibiótico) durante 10 minutos;
- T4 = o controle e mais uma imersão de 10 mL de nanopartículas de prata (AgNps), durante 10 minutos;
- T5 = o controle e mais uma imersão 10 mL de nanopartículas de ouro (AuNps), durante 10 minutos;

Decorridos 45 dias da germinação *in vitro*, as plântulas foram incisadas em ápices caulinares e segmentos nodais, cada explante com mínimo de 1,5 cm para inoculação nos tubos de ensaio.

### **Cultivo *in vitro* dos explantes**

Para inoculação dos explantes, foi confeccionado o meio de cultura MS com a metade da composição de sais e as vitaminas conforme relatados por Murashige e Skoog (1962) (anexo 01), 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ácido indolbutírico (AIB) e 0,2 mg L<sup>-1</sup> de 6-benzilaminopurina (BAP) e o pH ajustado para 5,8 (SILVA *et al.*, 2014) e posteriormente autoclavados por 20min.

Os tubos de ensaio foram mantidos na incubadora de crescimento em condições de temperatura de 25  $\pm$  2<sup>o</sup> C e o fotoperíodo de 16 horas de luz, com intensidade luminosa de 100 W m<sup>-2</sup> e de 1500  $\pm$  150 Lux proveniente de lâmpadas LED branca.

Os explantes de *Eugenia involucrata* foram trocados do seu meio nutritivo ½ MS duas vezes, para que pudessem se desenvolver e posteriormente levados para a aclimatação.

### **Teste de trifeniltetrazólio (TTZ) para verificação de microrganismos**

Para verificação de contaminações bacterianas oriundas dos explantes, de cada tratamento, foram retiradas três amostras de meio de cultura de 0,02 g cada, próximo das bases dos explantes e das superfícies, com alça de platina estéril e inoculadas com 1 mL de solução aquosa contendo 10  $\mu$ L tween 20, 50  $\mu$ L dimetilsulfóxido e 20  $\mu$ L de 1% 2,3,5 trifeniltetrazólio, em tubos Falcon de 15 mL. Os

tubos foram mantidos no escuro à temperatura de 25°C durante duas horas. Estas amostras foram analisadas e quantificadas para coloração rosa ou roxo, no Laboratório Estresse Oxidativo e Sinalização Celular (GPEOSCEL) da UNIPAMPA (São Gabriel – RS), através da leitura de densidade ótica em 325 nm em um espectrofotômetro Cary 60 UV-Vis (Agilent Technologies®).

### **Teste para verificação de escape de AgNps no meio de cultura**

Para analisar um possível escape de nanopartículas de prata dos explantes para os meios de cultura, foram retiradas três amostras com 0,02 g de cada tratamento, próximo das bases dos explantes e das superfícies dos meios de cultura dos tratamentos (T1 e T4), com alça de platina estéril. Estas foram inoculadas com 1 mL de solução aquosa contendo 10 µL de tween 20 em tubos de 2 mL. Os tubos foram mantidos no escuro à temperatura de 25°C durante duas horas. Amostras foram analisadas e quantificadas no Laboratório Estresse Oxidativo e Sinalização Celular (GPEOSCEL) da UNIPAMPA (São Gabriel – RS), através da leitura de densidade ótica em 365 nm em um espectrofotômetro Cary 60 UV-Vis (Agilent Technologies®).

### **Índice de clorofila Falker (ICF)**

Visando avaliar o índice de clorofila Falker, foram coletadas as últimas folhas completamente desenvolvidas de cada explante dos tratamentos após 30 dias de cultivo. Imediatamente foram realizadas as medidas de ICF entre 09h à 11h, com o medidor eletrônico de teor clorofila (ClorofiLog), marca Falker® modelo CFL 1030 (figura 13) e foram registradas três medições para cada folha a intervalos de 10 a 15s (FALKER, 2008).

Figura13: Medição de Índice de clorofila Falker dos tratamentos T4 (AgNps) e das plantas *ex vitro*



Fonte: Fernanda Illamas Gallon (2017)

### Verificação da Integridade do DNA

Considerando a possibilidade de que nanopartículas podem degradar o DNA das plantas caso entrem no núcleo ou nas mitocôndrias e cloroplastos, realizou-se um teste para a verificação de integridade do DNA das plântulas tratadas com AgNps.

Foram coletadas 3 g de folhas jovens de *Eugenia involucrata* do tratamento T4 (AgNps) e 3 g de folhas jovens das amostras plantadas em três bandejas (*ex vitro*). Para a obtenção do DNA, foi utilizado o protocolo de extração de DNA de plantas CTAB 2% (DOYLE, J.J; DOYLE, J.L., 1987) (anexo 2) e para a eletroforese foi utilizado gel agarose 0,8%, TBE 0,5x e o Ladder 50pb da Ludwig® e visualizados em transiluminador com luz ultravioleta.

## **Aclimação**

Os 63 explantes vivos dos tratamentos após 120 dias foram retirados da câmara de crescimento, lavados, transferidos para recipientes com substrato umedecido de 50% vermiculita e de 50% areia. Estes recipientes foram embalados com sacos plásticos transparentes, fechados e colocados para a primeira semana de aclimação no laboratório e as outras semanas, esses foram conduzidas para local externo que fosse sombreado pelo período da manhã.

## **Avaliações dos Resultados**

As avaliações das contaminações para meios de cultura (bacteriana e de nanopartículas de prata) e de micropropagação foram realizadas após 30 dias de inoculação: (A) verificações de absorbância das nanopartículas de prata nos meios de cultura dos tratamentos, (B) contaminações bacterianas dos tratamentos, (C) sobrevivência de plantas, (D) absorbância das soluções diluídas, (E) tamanho dos ápices, (F) tamanho das gemas por tratamento, (G) número de gemas por tratamento, (H) tamanho das raízes por tratamento, (I) número de raízes por tratamento, (J) taxa de índice de clorofila de Falker por tratamento, (L) verificação da integridade de DNA e (M) números de explantes vivos por tratamentos após 90 dias de aclimação.

## **Análise Estatística**

O delineamento experimental foi constituído de cinco tratamentos com quatro repetições e 48 plântulas por tratamento. Os dados de micropropagação foram submetidos a teste Tukey (1953), à análise de variância e as médias comparadas pelos teste "t" ( $p \leq 0,05$ ) e Qui-quadrado, com a utilização do programa Statistic 7.0. Os resultados foram transformados pela equação  $(X+0,5)^{1/2}$  e, os da porcentagem, pela equação  $\arccos(X/100)^{1/2}$ .

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Sobrevivência dos explantes

Entre os diferentes tratamentos utilizados para a desinfestação dos explantes de *Eugenia involucrata*, os tratamentos controle, com antibiótico e nanopartículas de prata apresentaram, respectivamente 26,04%, 39,58% e 4,17% de contaminação (Tabela 1).

O tratamento T2 (dicloro) foi muito agressivo para os explantes, deixando as folhas murchas logo após o tratamento antes da inoculação no meio de cultura (figura 14). Esse tratamento foi eficaz para evitar a contaminação bacteriana, entretanto não afetou os fungos (Tabela 1), não impedindo os seus crescimentos excessivos e resultaram nas mortes de todos os explantes do tratamento. Esses não tiveram material para posterior análise estatística.

No tratamento T3 (antibiótico), sobreviveram sete plantas. Este tratamento resultou no crescimento de sete ápices e crescimento de gemas, porém não houveram plantas enraizadas.

O tratamento T4 (AgNps) foi o que teve o maior número de indivíduos sobreviventes, com 92 indivíduos (Tabela 2).

Já o tratamento T5 (AuNps) não foi eficaz para a descontaminação, pois todas as plântulas foram contaminadas pelos fungos. As mirtáceas apresentam endomicorrizas com fungos do gênero *Fusarium* que possuem enzimas capazes de produzir AuNps, porém quando existem nanopartículas existe excessivo crescimento dos fungos. Assim, os explantes morreram devido à competição dos nutrientes do meio de cultura e toxinas fúngicas (THAKKER *et al.*, 2013) e as possíveis entradas de AuNps de 15 a 30 nm pelos poros nucleares, pelas membranas mitocondriais e dos cloroplastos, levando os explantes à morte e com uma rápida proliferação fúngica em menos de 48 horas (YAO, *et al.*, 2015).

Figura 14: **(A)** Tratamento T2 (dicloro), anterior à inoculação dos explantes no meio nutritivo MS, **(B)** folhas de *Eugenia involucrata* após tratamento dicloro.

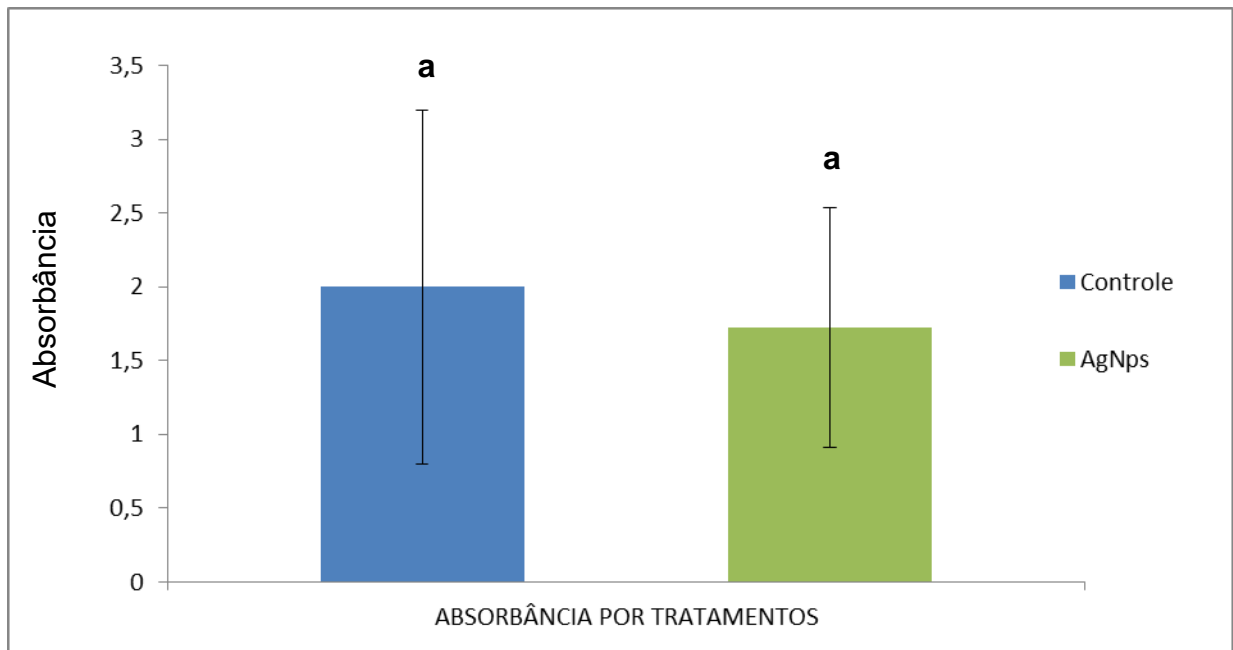


Fonte: Fernanda Illamas Gallon (2017)

Conforme o gráfico 01, as análises das absorvâncias das nanopartículas de prata demonstra que não existiu diferença significativa entre os tratamentos T1 (controle) e T4 (AgNps) ( $p = 0,462$ ), de maneira que as medições provaram que não existiu fuga de AgNps para o meio de cultura e que as nanopartículas aderiram às epidermes dos explantes. Desta maneira, este resultado mostrou que o método é seguro ambientalmente e viável para a espécie.



Gráfico 01: Absorbância entre os tratamentos



A verificação de contagem da contaminação bacteriana dos explantes de *Eugenia involucrata* após 30 dias de inoculação nos cinco tratamentos na Tabela 01 e a sobrevivência das plantas dos tratamentos T1 (controle), T2 (dicloro), T3 (antibiótico), T4 (AgNps) e T5 (AuNps) na Tabela 02, demonstraram as diferenciações significativas entre os tratamentos, principalmente para os tratamentos 01 e 04. Assim, evidenciando que o tratamento T4 com um número maior de plantas sobreviventes e destacando o melhor controle na contagem sobre as bactérias e a inexistência de fuga de nanopartículas de prata para o meio de cultura (Gráfico 01). Estes resultados corroboram com os estudos de Babaei *et al.* (2015) que demonstraram que o aumento de AgNps diminuiu a contaminação de *Dianthus caryophyllus* L. Fakhreshani e colaboradores (2012) demonstraram o controle da contaminação bacteriana com a concentração de 200 ppm de nanopartículas de prata em explantes de *Gerbera capitulume*, Rostani *et al.* (2009) demonstraram que AgNps controlaram as contaminações bacteriana e fúngica para oliveira cultivar "Mission". Apesar de as contagens das contaminações serem feitas a olho nu, a citocinina BAP não favoreceu o crescimento da contaminação bacteriana e não acarretou a redução da sobrevivência e nem do estabelecimento *in vitro* dos segmentos nodais e ápices caulinares. Assim, essas mostraram a eficácia das AgNps nos controles das contaminações bacterianas e do efeito fungicida para o



Para o teste do Qui-quadrado entre T1 e T4 existiu diferença significativa ( $\chi^2=45,46$  e  $t = 3,86$ ). Não houve diferença significativa entre T1 e T3. Nos tratamentos T2 e T5, estes apresentaram 100% de mortalidade dos explantes.

### **Verificação de liberação de bactérias endofíticas por Teste TTZ**

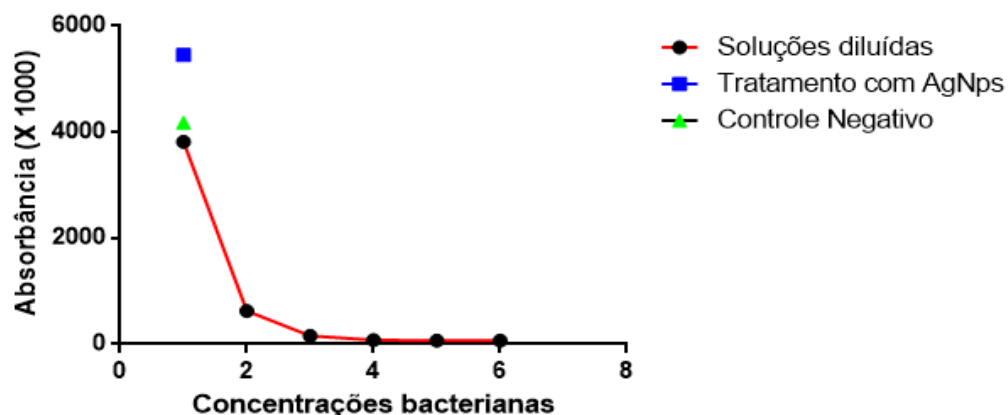
O teste visou verificar a existência de escape bacteriano dos explantes, mesmo que imperceptível visualmente. As soluções foram analisadas pela absorbância, quanto mais alto o valor da curva, menor contaminação apresentava o meio de cultura.

As médias de absorbâncias para TTZ de 4,17 para tratamento T1 (Controle) e de 5,45 para o tratamento T4 (AgNps) estão próximas dos pontos dos meio MS líquido e do meio MS sólido diluído na curva de diluições de meios MS e diluições de bactérias. Assim, o gráfico 02 mostrou a inexistência de crescimento de bactérias endofíticas no meio de cultura do tratamento T4 (AgNps). Porém, a média de T1 comprovou a existência de contaminação bacteriana, mesmo que invisível a olho nu no meio de cultura, desta maneira, esse valor apresentado confirma os trabalhos sobre bactérias endofíticas de Esposito-Polesi (2011) e Esposito-Polesi *et al.* (2015).

Golle *et al.* (2013) reportaram que a desinfestação com 1,5% de hipoclorito de sódio durante 25 minutos, em explantes oriundos de ramos semilenhosos e herbáceos demonstraram 39,35% de colônias bacterianas e não foi eficiente para promover a desinfestação de segmentos nodais lenhosos. Este resultado corroborou com o trabalho de Rostami e Shahsavar, (2009) que apresentaram a concentração baixa de nanopartículas de prata, e, este controlou a contaminação interna de explantes de *Olea europaea* L. em micropropagação em meio 1/2 MS. Fakhrfeshani *et al.* (2012) demonstraram que a concentração de 200 ppm de AgNps controlou a contaminação bacteriana em *Gerbera capitulum*. Desta maneira, a morfologia e os tamanhos das AgNps asseguraram que não existam as bactérias endofíticas ou ao menos que estas não contaminassem o meio de cultura e não atenuassem o desenvolvimento vegetal e nem causassem a citotoxicidade por despolarizações das membranas mitocondriais e dos cloroplastos ou a destruições dos DNA nucleares.

Gráfico 2: Absorvâncias das soluções de MS líquido, MS sólido e diluídas de concentrações bacterianas

### Absorbâncias dos Tratamentos e Soluções bacterianas



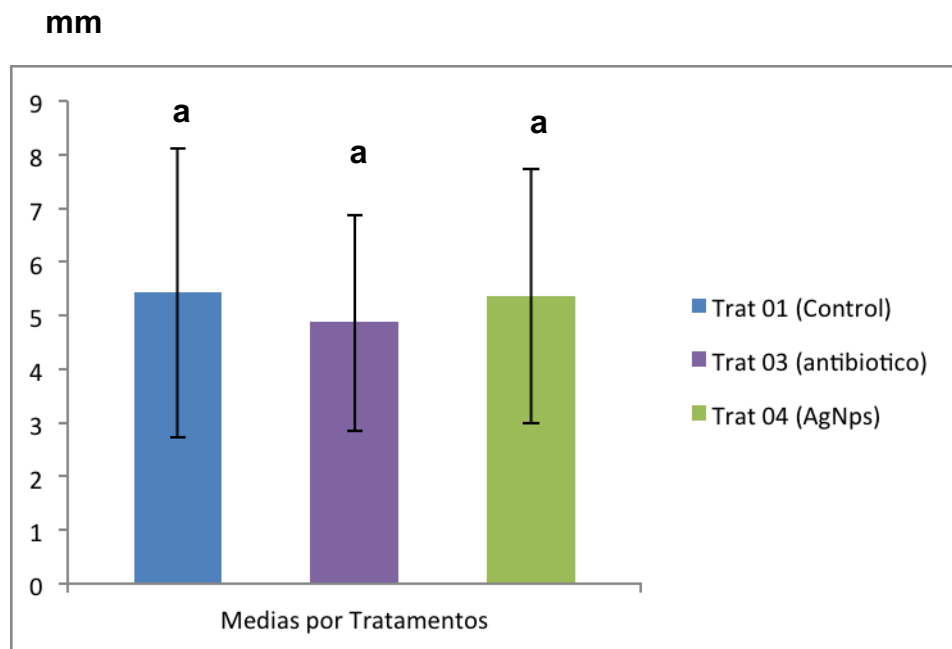
### Desenvolvimento dos explantes

As médias dos tamanhos de ápices mostrou que não existiu diferença significativa entre os tratamentos ( $p = 0,916$ ). Assim, as AgNps não interferiram no desenvolvimento de novas gemas que contrariando o estudo de Shorkri *et al.* (2014) que informaram a diminuição da regeneração mais lenta de gemas em *Rosa hybrida*.

Desta maneira, as AgNps não atrapalharam os crescimentos dos ápices caulinares. Os resultados evidenciaram que os tamanhos de 30 a 70 nm, não apresentaram malefícios celulares, assim não existiram despolarizações das membranas mitocondriais, dos cloroplastos e nem penetrações nos poros nucleares (YAO, *et al.*, 2015).

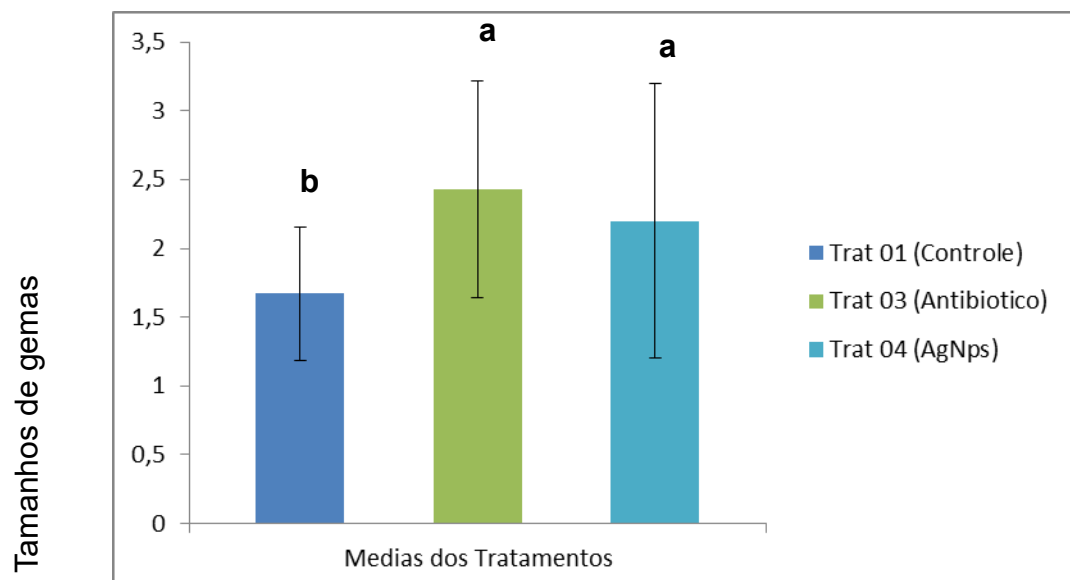
Após 30 dias de cultura, os ápices caulinares cresceram, porém as médias dos tamanhos não diferiram significativamente entre elas (gráfico 03). Estes dados contrapõem os resultados de Shorkri *et al.* (2014) que relataram que o aumento da concentração de AgNps tornou a regeneração dos explantes mais lenta para a espécie *Rosa hybrida*. Babaei *et al.* (2015) reportaram diminuição das médias de regeneração de *Dianthus caryophyllus* L.

Gráfico 03: Tamanho das ápices por tratamento



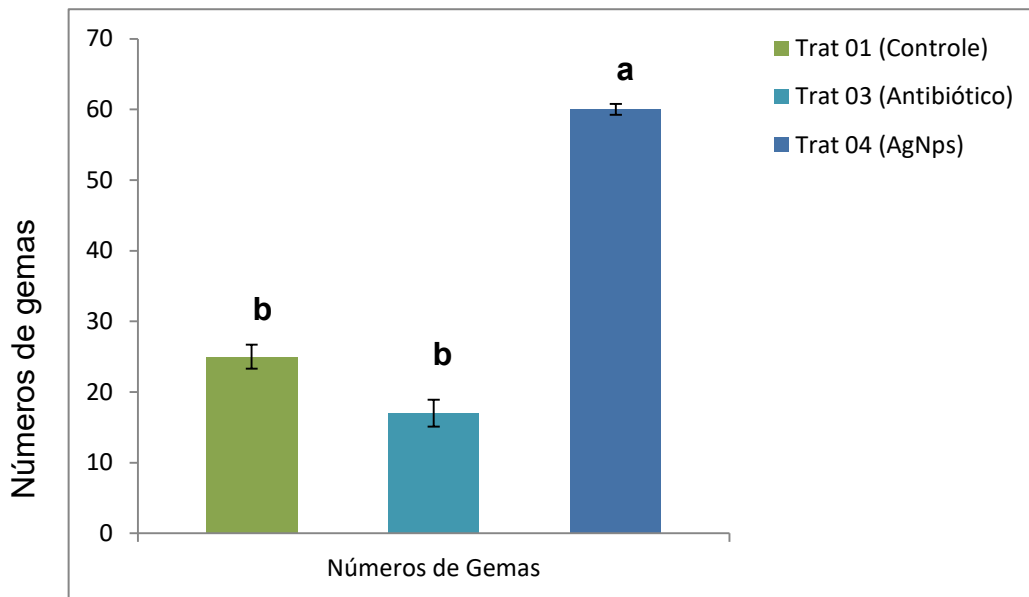
Para os tamanhos de gemas por tratamentos (gráfico 04) existiram diferenças significativas ( $p = 0,719$ ), entre o Tratamento T1 com 1,67 e os demais tratamentos (T3) e (T4), (com 2,43 e com 2,2, respectivamente). Deste modo, as nanopartículas de prata não interferiram nos desenvolvimentos das gemas. Este estudo diferiu de Babaei *et al.* (2015) que apresentaram investigação sobre o aumento na concentração de AgNps, que faz diminuir a regeneração de explantes de *Rosa hybrida* L.

Gráfico 04: Tamanhos de gemas por tratamento



Existiram diferenças significativas entre os tratamentos T1, T3 e T4 (25, 16 e 60 gemas), respectivamente, com o  $p = 0,123$ . Deste modo, no tratamento 04, as nanopartículas de prata não interferiram nos desenvolvimentos das gemas (Gráfico 05).

Gráfico 05: Número de gemas por tratamento



Para o teste de Qui-quadrado não observou-se diferença significativa entre os tratamentos T1 e T4 para a quantidade de raízes (Tabela 03). Assim, as nanopartículas de prata não afetaram a quantidade de raízes dos explantes dos tratamentos. Este resultado sugere a facilidade para aclimação das futuras plântulas.

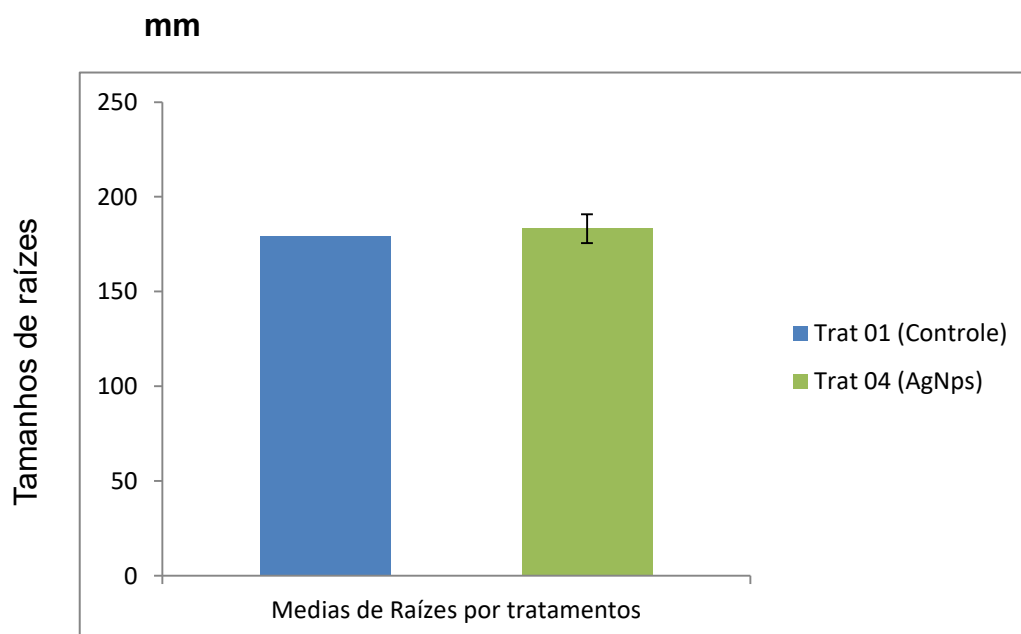
Tabela 3: Quantidade de raízes por tratamento T1 (controle) e T4 (AuNps).

RAÍZES	T1	T4	TOTAL
Possui	01	14	15
Não possui	14	28	42
TOTAL	15	42	57
Para n = 57	$\chi^2 = 2,80$	GI = 1	T = 1

Os tratamentos apresentaram: o Tratamento T1 (Controle) uma única raiz com 11,3 mm, o tratamento T3 (Antibiótico), sem quantidade de raízes e tratamento T4 (AgNps) com média de 15,99 mm (Gráfico 06). Assim, existiu uma diferença significativa entre esses.

Desta maneira, estes resultados divergiu do trabalho de Lin e Xing (2007) que demonstraram que as nanopartículas de zinco (ZnNps) e as de óxidos de zinco (ZnONps) inibiram a germinação e os crescimentos radiculares de seis espécies (rabanete, colza, azevém, alface, milho e pepino), após 2 horas de embebição das sementes.

Gráfico 06: Tamanho das raízes por tratamento

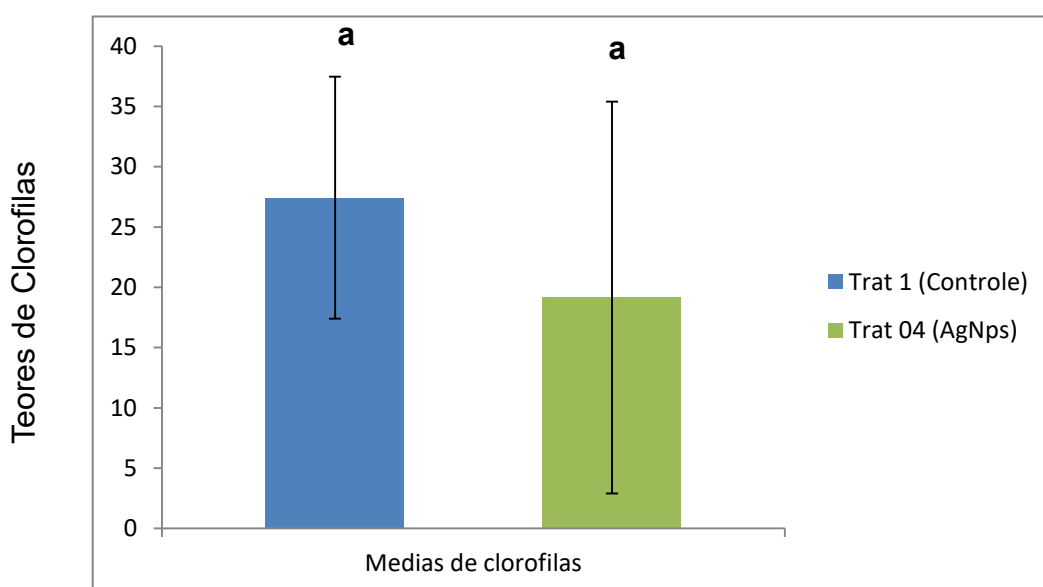


### Índice de Clorofila Falker

Para o índice de clorofila Falker para os tratamentos ( $p = 0,063$ ), que não houveram diferença significativa entre o Tratamento 01 (Controle) e Tratamento 4 (AgNps) conforme o gráfico 07. Desta maneira, as nanopartículas de prata não afetaram os cloroplastos dos explantes do tratamento 04. De modo que a fotossíntese manteve em índice suficiente para manter o crescimento dos explantes.

Assim, este dado corroborou com o estudo de Yang *et al.* (2007) no qual as nanopartículas de óxido de Titânio (TiO<sub>2</sub>Nps) melhoraram a integridade dos cloroplastos (clorofila), auxiliaram na redução N<sub>2</sub> para NH<sub>3</sub>, através da fotoredução e ajudaram no crescimento de plantas de espinafre em cultivo nas soluções deficientes de nitrogênio (N). Mas diferiu do trabalho de Mezacasa (2015) que determinou que as nanopartículas de ouro interferiram no processo de fotossíntese de *Vicia faba*, através das análises de extratos foliares pelo método de separação em coluna cromatográfica.

Gráfico 07: Teor de clorofilas

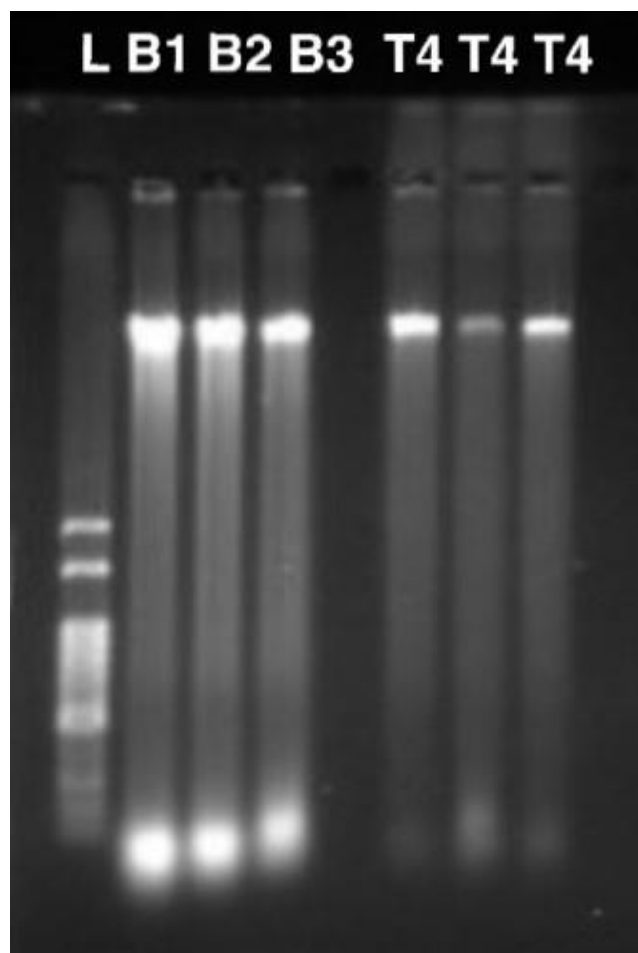


### Integridade do DNA

Relacionado à verificação de integridade do DNA, o procedimento de eletroforese em gel de agarose, em que foram analisadas as folhas de *Eugenia involucrata*, tendo como denominação: L= ladder, B1, B2 e B3 as folhas retiradas de bandejas *ex vitro* e T4= folhas do tratamento AgNps, observa-se a figura que não há degradação de DNA, pois não houve arrasto de banda, de modo que as nanopartículas de prata não influenciaram a degradação do DNA em comparação com demais tratamentos (Figura 15).



Figura 15: Extração de DNA de *Eugenia involucrata*, B1, B2, B3 (plantas *ex vitro*), T4 (AgNps)

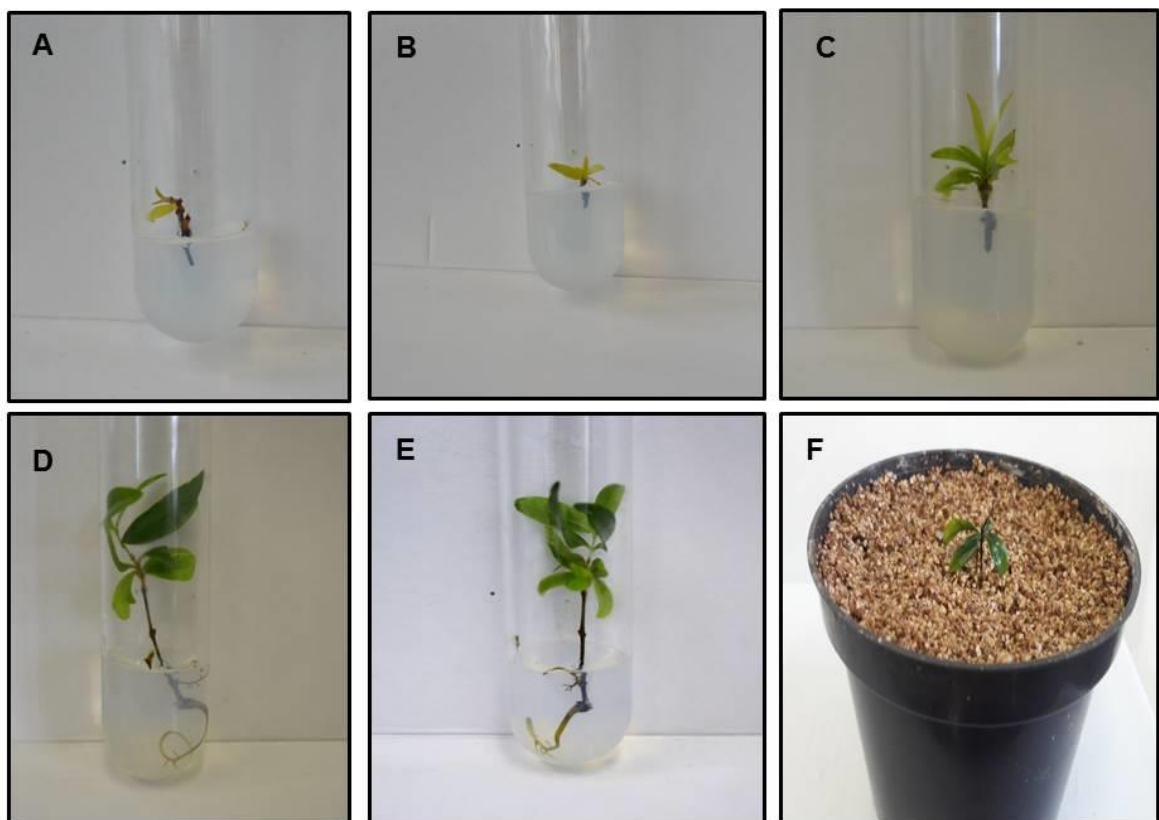


Fonte: Fernanda Illamas Gallon (2017)

### **Aclimação**

A aclimação do material foi realizada após 90 dias depois da 2ª troca de meio de cultura. A figura 16 apresenta todas as fases do cultivo *in vitro* dos explantes tratados com AgNps, desde a inoculação no dia 0 até a aclimatização. Na aclimação a planta estava medindo 17,33 mm.

Figura 16: Fases do cultivo *in vitro* de *Eugenia involucrata* com o tratamento de AgNps, desde a inoculação até a aclimação da planta micropropagada. A) Explante de *Eugenia involucrata* inoculada no primeiro dia; B) Explante de *Eugenia involucrata* com 30 dias; C) Explante de *Eugenia involucrata* com 45 dias, surgimento de folhas no ápice caulinar; D) Explante de *Eugenia involucrata* com 60 dias, surgimento de raiz e crescimento da ápice caulinar; E) Explante de *Eugenia involucrata* com 90 dias pronto para aclimação; F) *Eugenia involucrata* aclimatada no laboratório de Cultura de Tecidos.



Fonte: Fernanda Illamas Gallon (2017)

## CONCLUSÃO

As novas metodologias estão surgindo visando diminuir os riscos de contaminação. Entre elas, surge como inovação a utilização de nanopartículas como agente desinfestante para explantes na micropropagação de tecidos vegetais.

Para *Eugenia involucrata*, espécie em que a desinfestação tem sido um grande problema na micropropagação, esta metodologia surge como uma importante ferramenta que auxiliará no desenvolvimento de estratégias de conservação de germoplasma, propagação clonal e desenvolvimento de novas cultivares adaptadas aos diferentes ambientes em que a espécie ocorre.

O tratamento com nanopartículas de ouro (AuNps) demonstrou que estas não devem ser utilizadas para desinfestação dos explantes de *Eugenia involucrata*, pois houve 100% de contaminação dos explantes. Da mesma forma o dicloro pode ter sido agressivo para as plantas eliminando todos os explantes e não foi eficaz no controle da contaminação fúngica.

Os resultados do tratamento com nanopartículas de prata (AgNps) sugeriram que este é uma ferramenta eficiente para controle bacteriano na desinfestação dos explantes de *Eugenia involucrata*, não interferindo nos cloroplastos, nas mitocôndrias, nos núcleos celulares, no desenvolvimento vegetal e nem escapando para os meios (cultura e ambiente). Este tratamento demonstrou-se mais eficiente que o tradicional (álcool 70° + hipoclorito) e o uso de antibiótico.

Posteriormente, novos estudos deverão ser realizados para aprimorar a utilização de nanopartículas, a fim de identificar novas morfologias e tamanhos destas para serem utilizadas na desinfestação de outras espécies vegetais do gênero *Eugenia*.

## REFERÊNCIAS

ABREU-TARAZI, M.F.; NAVARRETE, A.A.; ANDREOTE, F.D.; ALMEIDA, C.V.; TSAI, S.M.; ALMEIDA, M. **Endophytic bacteria in long-term in vitro cultivated “axenic” pineapple microplants revealed by PCR-DGGE.** World Journal Microbiology Biotechnology, v.26, p. 555-560, 2010.

ALMEIDA, C.V.; YARA, R.; ALMEIDA, M. **Fungos endofíticos isolados de ápices caulinares de pupunheira cultivada *in vivo* e *in vitro*.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 40, p. 467-470, 2005.

ALMEIDA, C.V.; ANDREOTE, F.D.; YARA, R.; TANAKA, F.A.O.; AZEVEDO, J.L.; ALMEIDA, M. **Bacterio somes in axenic plants: endophytes as stable endosymbionts.** World Journal Microbiology Biotechnology, v.25, p. 1757-1764, 2009.

ALMEIDA, J. R.; MARTINS, C. R.; DUTRA, L. F. **Desinfestação de segmentos nodais de *Eucalyptus dunnii* visando estabelecimento in vitro.** Revista da FZVA, v.15, n.1, p. 54-60, 2008.

ARAÚJO, E. A., RIBEIRO, L.; BERNANDES, P. C.; DORES, M. T. das; JÚNIOR, J. F. Q. F. **Sanitização de cenoura minimamente processada com nanopartículas de prata.** Santa Maria. Ciência Rural. v.45, n.9, 2015.

AUGÉ, R.; BOCCON-GIBOD, J. **Les applications à l'horticulture.** In: AUGÉ, R.; BEAUCHESNE, G.; BOCCON-GIBOD, J.; DECOURTYE, L.; DIGAT, B.; JALOUZOT, R.; MINIER, R.; MORAND, J. C.; REYNOIRD, J. P.; STRULLU, D.G. & VIDALIE, H. La culture *in vitro* applications horticoles. 3. Ed. Ver. Paris: TED & DOC Lavoisier / J.B. Baillière, p. 64-89, 1989.

BABAEI, A.M; SHOKRI, A.R; HESSAMI, S.S.; ARAB, M.M. **Controlling the in vitro contamination of Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) single nodes explante by Nano-Silver.** International Journal of Agriculture and Biosciences, v.4, n.4, p. 167-170, 2015.

BARROSO, G.M.; MORIM, M.P.; PEIXOTO, A.L.; ICHASO, C.L.F. **Frutos e sementes: Morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas**. Viçosa: Editora UFV, 443p, 1999.

BASTOS, L. P.; COSTA, M. A. P. C.; HANSEN, D. S.; MOREIRA, M. J. S.; ROCHA, M. A. C.; SILVA, S. A.; DANTAS, A. C. V. L.; SOUSA, C. S. **Cultivo in vitro de mangabeira (*Hancornia speciosa*)**. *Revista Brasileira de Biociência*. v.5, supl.2, p.1122-1124, 2007. Disponível em: <<[www6.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/888/731](http://www6.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/888/731) Acesso em: 20 junho de 2017.

BATAGIN-PIOTTO, K.D. **Avaliação da atuação da manifestação bacteriana no desenvolvimento in vitro de clones de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cabbage**. Tese (Doutorado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Curso de Pós-graduação em Fisiologia e Bioquímica de Plantas, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, SP, 165f, 2013.

BOTTA, B.; SILVESTRINI, A.; VITOLI, A.; MONACHE, G. D. **Cultura de células vegetais: doze anos de experiência**. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. (Ed.). *Plantas medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna*. Chapecó: Argos, p. 353-377, 2001.

CAMPOS, W. N. da S.; LEITE, A. E. T.; SONEGO, D. A.; ANDRADE, M. A. de; PIZZINATTO, F. D.; MARANGONI, V. S.; ZUCOLOTTO, V.; NAKAZATTO, L.; COLODEL, E. M.; SOUZA, R. L. de . **Synthesis and characterization of gold nanoparticles combined with curcumin and its effects on experimentally induced osteoarthritis**. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.47, n. 07, 2017.

CASANOVA, M. C. R. **Síntese, caracterização e estudo da estabilidade de nanopartículas metálicas estabilizadas com polieletrólitos e tióes**. Dissertação (Mestrado em Química Analítica), Instituto de Química de São Carlos, 87 p., 2010.

CHOI, O.; HU, Z.Q. **Size dependent and reactive oxygen species related nanosilver toxicity to nitrifying bacteria**. Environmental Science and Technology, Washington, v.42, n.12, p. 4583 - 4588, 2008.

CID, L.P. B.; TEIXEIRA, J.B. **Explante, meio nutritivo, luz e temperatura**. In: CID, L.P.B. **Cultivo in vitro de plantas**. Embrapa Informação Tecnológica, p.15 -49, Brasília, DF, p.303, 2010.

COELHO, S. C.; RANGEL, M.; PEREIRA, M. C.; COELHO, M. A. N.; IVANOVA, G. **Structural characterization of functionalized gold nanoparticles for drug delivery in cancer therapy: a NMR based approach**. Physchem. Chem, Phys, v.17, 2015. Disponível em: <<[www.researchgate.net/publication/279312349\\_Structural\\_Characterization\\_of\\_Functionalized\\_Gold\\_Nanoparticles\\_for\\_Drug\\_Delivery\\_in\\_Cancer\\_Therapy\\_a\\_NMR\\_Based\\_Approach](http://www.researchgate.net/publication/279312349_Structural_Characterization_of_Functionalized_Gold_Nanoparticles_for_Drug_Delivery_in_Cancer_Therapy_a_NMR_Based_Approach) . Acesso em: 10 mai 2017.

CUMBERLAND, S. A.; LEAD, J. R. **Particle size distributions of silver nanoparticles at environmentally relevant conditions**. J. Chromatogr. A, Birmingham, v. 1216, p.9099-9105, 2009.

DONG, P. V.; HA, C. H.; BINH, L. T.; KASBOHM, J. **Chemical synthesis and antibacterial activity of novel-shaped silver nanoparticles**. Internacional Nano Letters, v.2, n.9, 2012.

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

ESPOSITO- POLESÍ, N.P. **Investigação da microbiota endofítica onipresente em microplantas “axênicas”**. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, p.120, 2010.

ESPOSITO- POLESÍ, N.P. **Microrganismos endofíticos e a cultura de tecidos vegetais: quebrando paradigmas**. Revista Brasileira de Biociências, Porto Alegre, v.9, n.4, p.533-541, out/dez, 2011.

ESPOSITO- POLES, N.P.; ANDRADE, P. A. M.; ALMEIDA, C.V.; ANDREOTE, F.D.; ALMEIDA, M. **Endophytic bacterial communities associated with to explante sources of *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage**. World J. Microbiol. Biotechnol., v.33, p. 1737- 1746, 2015

FAKHRFESHANI, M.; BAGHERI, A.; SHARIFI, A. **Disinfecting Effects of Nano-Silver fluids in Gerbera (*Gerbera jamesonii*) Capitulum Tissue Culture**. J. Biol. Environmental. Science, v.6, p.121-127, 2012.

FALKER. **Manual do medidor eletrônico de teor de clorofila (ClorofiLOG/ CFL 1030)**. Porto Alegre: Falker Automação Agrícola. 33p, 2008.

FORMIGA, A. L. B. **Nanotecnologia molecular**. XI Encontro da SBQ - Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, p.29 – 31, 2007.

GIRI, C.C.; SHYAMKUMAR, B.; ANJANEYULU, C. **Progress in tissue culture, genetic transformation and applications of biotechnology to trees: an overview**. Tress: Structure and Function, Springer-Verlag, n. 18, p. 115-135, 2004.

GOLLE, D.P.; REINIGER, L.R.S.; BELLÉ, R.A.; CURTI, A.R. **Desinfestação superficial de explantes isolados de ramos semilenhosos e herbáceos de *Eugenia involucrata* DC. (Myrtaceae)**. Cerne, Lavras, v.19, n.1, p.77-82, jan/mar 2013.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. **Micropropagação**. In: TORRES, A. C., L.S. CALDAS; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**.v.1. CNPH- Embrapa, Brasília. p. 183-260. 509 p, 1998.

HALLMANN, J.; QUADT- HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W.F.; KLOEPPER, J.W. **Bacterial endophytes in agricultural crops**. Canadian Journal of Microbiology, Ottawa, v.43, p.895 -914, 1997.

HEILMAN, S. **Efeito da radiação ionizante nos revestimentos de cateteres de poliuretano com nanopartículas de prata.** Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear - Aplicações), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. São Carlos-SP. 90 p. 2015.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular.** Rio de Janeiro, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 7<sup>o</sup> edição, 2000.

LIN, D.; XING, B. **Phytotoxicity of nanoparticles: Inhibition of seed germination and root growth.** Science Direct, Environmental Pollution, n.150, p.243-250, 2007.

LOPES, P. Z. **Propagação vegetativa e interação com endomicorrizas arbusculares em Mirtáceas nativas do sul do Brasil.** Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 134p, 2009.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil nativas e exóticas.** Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, 2002.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil.** Nova Odessa, v. 01, 5<sup>o</sup> edição, 384p, 2008.

LUKIANOVA - HLEB, E. Y.; KIM, Y. S.; BELATSARKOUSKI, I.; GILLENWATER, A. M.; O'NEIL, B. E.; LAPOTKO, D. O. **Intraoperative diagnostics and elimination of residual microtumours with plasmonic nanobubbles.** Nat Nanotecnol. v.11, ed.6, p. 525-532, 2016.

MEDEIROS, C. P. C. de. **Indução *in vitro* de respostas morfogênicas em explantes nodais de cajazeira (Spondias mombin L.).** Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 79p, 1999.

MELO JR, M.A.; SANTOS, L. S. S.; GONÇALVES, M.C.; NOGUEIRA, A.F. **Preparação de nanopartículas de prata e ouro: Um método simples para a**



**introdução da nanociência em laboratório de ensino.** Química Nova, v.35, n.9, p.1872-1878, 2012.

MEZACASA, A.V. **Interação entre nanopartículas de ouro e extratos foliares da Vicia Faba: Uma análise via espectroscopia óptica.** Dissertação (Química – Mestrado) - Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, 74f. 2015.

MURASHIGE, T. **Plant propagation through tissue culture.** Annual Review of Plant Physiology, v.25, p.135-166, 1974

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. **A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures.** Physiologia Plantarum, v.15, n.3, p. 473-497, 1962.

NETTO - FERREIRA, J. C. **Reações catalíticas empregando o efeito plasmônico de nanopartículas metálicas suportadas.** Ver. Virtual Química, v.7, ed.1, p.165-217, 2015.

PAIM, A.F. **Contribuições para a micropropagação de Eugenia involucrata DC. e Handroanthus chrysotrichus (MART. ex DC) MATTOS.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal), UFSM, RS, 81p, 2011.

PIERIK, R.L.M. **Vegetative propagation.** In: *In vitro* culture of higher plants. [S.l.]: International Association for Plant Tissue Culture, p. 183-230, 1990.

ROSTAMI, A.A.; SHAHSAVAR, A. **Nano-Silver particles eliminate the in vitro contaminations of Olive “Mission” explants.** Asian Journal of Plant Sciences, v.2009, p.1-5, 2009.

SANTOS, T. T.; VARAVALLO, M. A. **Aplicação de microorganismos endofíticos na agricultura e na produção de substâncias de interesse econômico.** Semina: Ciências Biológicas e da Saúde, Londrina, v.32, n.2, p. 199 - 212, jul/dez. 2011.

SHARP, W. R.; LARSEN, P. Q.; PADDOCK, E. F.; RAGHAVAN, V. **Plant cell and tissue culture: principles and applications**. Columbus: The Ohio State University, p. 892, 1979.

SHOKRI, S.; BABAEI, AR.; AHMADIAN, M.; HESSAMI, S.; ARAB, M.M. **The effects of diferente concentrations of Nano-Silver one limination of bacterial contaminations and phenolic exudation of Rose (*Rosa hybrida* L.)*in vitro* culture**. International Journal of Farming and Allied Sciences, v.3, n.1, p.50-54, 2014.

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

SILVA-OLIVEIRA, D. **Nanopartículas biometálicas Co/Pt preparadas em líquidos iônicos e aplicação em processo Fischer Tropsch**. Tese (Instituto de Química) Programa de Pós-Graduação em Química, Laboratório de Catálise Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, p.146, 2013

SONDI, I.; SALOPEK-SONDI, B. **Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E-coli as a model for Gram-negative bacteria**. Journal of Colloid and Interface Science, v. 275, n. 1, p. 177-182, 2004.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática**. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos de Flora, p.640, 2005.

SPRENT, J. I.; JAMES, E. K. **N<sub>2</sub> - fixation by endophytic bacteria: questions of entry and operation**. *In*: FENDRIK, I.; DEL GALLO, M.; VANDERLEY, J.; ZAMAROCZY, M. de (Ed.). Azospirillum VI and related microorganismos. Berlin: Springer Verlag, p.15-30, 1995. (NATO ASI Series G, Ecological Sciencs, 37).

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre: Artmed: 3° ed. p. 719, 2004.

THAKKER, J.N.; DALWADI, P.; DHANDHUKIA, P.C. **Biosynthesis of Gold Nanoparticles using *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* JT1, a Plant Pathogenic Fungus.** ISRN Biotechnology, v.2013, p.1-5, 2013.

THOMAS, P.; PRAKASH, G. S. **Sanitizing long-term micropropagated grapes from covert and endophytic bacteria and preliminary field testing of plants after 8 years *in vitro*.** *In Vitro Cell.Dev.Biol.Plant*, v.40, p.603-607, 2004.

THORPE, T.A.; HARRY, I.S.; KUMAR, P.P. **Application of micropropagation to forestry.** In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. *Micropropagation: technology and application.* Dordrecht: Kluwer Academic Press, p. 311-336, 1991.

TURKEVICH, J.; STEVENSON, P. C.; HILLIER, J. **A study of nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold.** p.55-75, 1951.

VILLAMIZAR- GALLARDO, R.; CRUZ, J.F.O.; RODRIGUEZ- ORTÍZ, O.O. **Fungicidal effect of silver nanoparticles on toxigenic fungi in cocoa.** *Pesquisa agropecuária brasileira.* Brasília, v.51, n.12, p. 1929- 1936, 2016.

XAVIER, A.; OTONI, W.C.; PENCHEL, R.M. **Micropropagação e enxertia *in vitro* de espécies florestais.** In: BORÉM, A. (Ed.). *Biotecnologia florestal.* Viçosa, MG: p. 55-74, UFV, 2007.

YANG, F.; LIU, C.; GAO, F.; SU, M.; WU, X.; ZHENG, L.; HONG, F.; YANG, P. **The Improvement of Spinach Growth by Nano-anatase TiO<sub>2</sub> Treatment is Related to Nitrogen Photoreduction.** *Biological Trace Element Research*, v.119, p.77-88, 2007.

YAO, M.; HE,L.; McCLEMENTS, D.J.; XIÃO,H. **Uptake of Gold Nanoparticles by Intestinal Epithelial Cells: Impact of Particle Size on their Absorption, Accumulation, and Toxicity.***Journal of Agricultural and Food Chemistry.* p. 30, 2015.

## ANEXOS

Anexo 1: Composição do meio de cultura MS ( MURASHIGE; SKOOG, 1962)

Componentes	MS Básico mg L <sup>-1</sup> + Suplementações
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
KNO <sub>3</sub>	1900
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
KI	0,83
Na <sub>2</sub> Mo O <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,25
Co Cl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0,025
Ca Cl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	440
Mg SO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	370
Mn SO <sub>4</sub> 4H <sub>2</sub> O	22,3
Zn SO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	8,6
Cu SO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0,025
Fe SO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	27,8
Na <sub>2</sub> EDTA 2H <sub>2</sub> O	37,3
Tiamina HCl	0,1
Ác. Nicotínico	0,5
Piridoxina HCl	0,5
Glicina	2,0
Inositol	100,0
Sacarose	30000
PVP	250
Ágar	7000

Anexo 2:

### Extração de DNA

#### Protocolo Para Extração de DNA de Plantas – CTAB 2% (DOYLE & DOYLE, 1986)

- 1- Dispor aproximadamente 200mg de matéria vegetal em um gral de porcelana e adicione nitrogênio líquido até cobrir completamente o material;
- 2- Aguardar o congelamento do material e macerem bem, até obter um pó fino;

- 3- Ao pó resultante, acrescentar 2,0mL de tampão de extração CTAB 2% (NaCl 1,4M; EDTA 20Mm; Tris-HCl (ph 8,0) 100mM; PVP -40 2%) e misturar bem;
- 4- Transfiriir o material para dois microtubos de 2mL e manter em banho-maria (60°C) por 40-60min. Homogeinizaro material por inversão a cada 10-15 minutos;
- 5- Deixar o material sobre a bancada até alcançar a temperatura ambiente;
- 6- Acrescentar600 µL de CIA (clorofórmio: álcool isoamílico -24:1) em cada tubo e homogeinizar durante 3 minutos, por inversão;
- 7- Centrifugar a 14.000 RPM por 5 minutos;
- 8- Transfiriir aproximadamente 700 µL da porção aquosa (sobrenadante), para 2 novos microtubos de 2,0mL;
- 9- Adicionar 50 µL de solução de CTAB 10% A 60°C e homogeinizar durante 3 minutos por inversão;
- 10- Acrescentar 600µL de CIA em cada tubo e homogeinizar durante 3 minutos por inversão;
- 11-Centrifugar a 14.000 RPM por 5 minutos;
- 12-Transfiriir aproximadamente 600 µL do sobrenandante para dois novos microtubos de 1,5mL;
- 13- Adicionar 2µL de RNase A (10µg/mL) e incube a 37°C por 30 minutos;
- 14- Adicionar 2/3 do volume de álcool isopropílico gelado (-20°C) e manter o material pelo menos 30 minutos a – 20°C
- 15- Centrifugar a 10.000 RPM por 5 minutos;
- 16-Descartar o álcool com cuidado para não perder o DNA precipitado;
- 17- Acrescentar1mL de álcool etílico 70% a – 20°C e manter por aproximadamente 5 minutos;
- 18- Centrifugar a 14.000 RPM por 5 minutos;
- 19- Descartar o álcool com cuidado para não perder o DNA precipitado;
- 20- Acrescentar 1mL de álcool absoluto a -20°C e manter aproximadamente 3 minutos;
- 21-Descartar o álcool absoluto e deixar o precipitado secar a temperatura ambiente dentro da câmara de fluxo laminar ou no banho seco;
- 22-Diluir o DNA em 100 µL de água ultrapura por um período de 12 a 16horas;

- 23- Armazenar o DNA a  $-20^{\circ}\text{C}$ ;
- 24- Analisar a concentração e pureza do DNA usando eletroforese em gel de agarose 0,8%;
- 25- Diluir as amostras para uma concentração de  $20\text{ng}/\mu\text{L}$  utilizando tampão TE ( Tris- HCl 10mM, Ph 8,0; EDTA 1mM) ;