



Universidade de Aveiro

2021

**Andreia Catarina  
Cirne Silva**

**Desenvolvimento de Mecanismos de Encapsulamento  
e de Liberação Controlada de Nanofertilizantes em  
Agricultura de Precisão**





**Andreia Catarina  
Cirne Silva**

**Desenvolvimento de Mecanismos de Encapsulamento  
e de Libertação Controlada de Nanofertilizantes em  
Agricultura de Precisão**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia do Ambiente, realizada sob a orientação científica da Prof<sup>a</sup>. Doutora Sónia Morais Rodrigues, Professora Auxiliar do Departamento de Ambiente e Ordenamento da Universidade de Aveiro e coorientação do Doutor Matheus Carlos Romeiro Miranda, Investigador Doutoramento do Departamento de Química da Universidade de Aveiro vinculado ao CESAM.

***Este trabalho é financiado por fundos nacionais através da FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia, I.P. e cofinanciada pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER), no âmbito do projeto AgriTarget (POCI-01-0145-FEDER-029258 e PTDC/BAA-AGR/29258/2017)***

"Para vencer na vida exija muito de si e pouco dos outros"

Augusto Cury

**o júri**

presidente

**Professora Doutora Maria Isabel da Silva Nunes**

Professora Auxiliar do Departamento de Ambiente e Ordenamento da Universidade de Aveiro

**Doutora Astrid Avellan**

Investigadora Doutorada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

**Professora Doutora Sónia Alexandra Morais Rodrigues**

Professora Auxiliar do Departamento de Ambiente e Ordenamento da Universidade de Aveiro  
(Orientadora)

## **agradecimentos**

Aos meus pais. O meu mais íntimo obrigada por me acompanharem sempre em cada passo desta etapa, pelos pilares fortes que são na minha vida e por todos os ensinamentos que ainda hoje me continuam a transmitir. Uma infinita gratidão por todos os dias se levantarem e entregarem-se de alma às profissões e pela oportunidade desta formação para aquisição do conhecimento, ou seja, da liberdade. Tenho o maior orgulho em vocês e levo o vosso exemplo de humildade, resiliência e persistência no caminho para ser uma líder na minha vida. Dedico-vos este trabalho e também aos avós.

Ao meu querido Rogério que me incentiva a cada dia a fazer mais e melhor, pelo apoio incondicional, por estar em todos os momentos ao meu lado, pelo conhecimento que partilha e por confiar que estou sempre preparada para os desafios.

À minha orientadora Sónia e ao meu coorientador Matheus pelas aprendizagens, pelas suas excelências e pelo constante acompanhamento. Foi muito gratificante trabalhar na vossa equipa.

À minha incomparável amiga Joana que sempre acreditou em mim, deu-me força e apoiou nos momentos menos sorridentes. O caminho foi plano e reluzente a teu lado.

Às minhas amigas Bruna, Cláudia, Daniela, Gabriela, Helena, Isabel, Maria João, Patrícia e Sara pela grandiosa amizade e companheirismo, não teria sido melhor sem a vossa presença.

A todos os professores, colegas e pessoal não docente que se cruzaram comigo nesta jornada, cada um de vós foi essencial para o meu desenvolvimento.



## palavras-chave

“Seedpriming”, Nanopartículas de óxido de zinco, Mucilagem da semente de manjerição, Biodisponibilidade de micronutrientes, Bioadesividade, *Solanum lycopersicum* L.

## resumo

O aumento da população mundial intensifica a procura de alimentos. No entanto, as práticas de agricultura intensiva têm danos ambientais colaterais tais como a degradação do solo e a contaminação das águas subterrâneas. Por isso, é necessário encontrar estratégias para aumentar a produção agrícola de forma ambientalmente sustentável. A utilização de nanomateriais na aplicação de fertilizantes pode contribuir para a sustentabilidade na agricultura. Os nanomateriais podem ser utilizados por exemplo em práticas de “priming” de sementes, ou seja, “seedpriming”.

O principal objetivo da presente dissertação foi avaliar se a aplicação de nanopartículas de ZnO (NPs ZnO) diretamente na semente antes da germinação, através de “seedpriming”, pode ter benefícios em termos da taxa de germinação da semente e do crescimento da planta. A aplicação de NPs ZnO foi comparada com a aplicação de Zn na forma iónica (ZnSO<sub>4</sub>), ou seja, o método de fertilização convencional. Foi ainda avaliado se o revestimento das NPs ZnO com mucilagem de sementes de manjerição (NPs ZnO M) poderia contribuir para aumentar a adesividade das NPs ao revestimento da semente e desta forma aumentar a biodisponibilidade do Zn aplicado para ser absorvido pela semente.

Realizaram-se ensaios de “seedpriming” com concentrações de 0.5 e 120 mg/L de Zn na forma de ZnSO<sub>4</sub>, NPs ZnO e NPs ZnO M aplicados em sementes de tomate cereja da espécie *Solanum lycopersicum* L. foi utilizada água destilada como controlo.

Os resultados obtidos mostram que a aplicação de Zn na forma de NPs ZnO (120 mg/L) promoveu um aumento de cerca de 8 % na taxa de germinação das sementes comparado com o controlo com água; e, uma concentração de Zn retido na semente cerca de 25 vezes maior do que o tratamento com água, e 3.7 vezes maior do que as sementes tratadas com ZnSO<sub>4</sub>. O “seedpriming” com NPs ZnO M (120 mg/L) contribuiu para um aumento de 4 vezes no valor de biomassa seca das raízes e de 5 vezes de biomassa seca da parte aérea da planta comparativamente ao controlo com água. Este tratamento com NPs ZnO M promoveu ainda um aumento médio do comprimento da parte aérea da plantas em aproximadamente 7.8 cm em comparação com o tratamento com água.

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que o tratamento das sementes com NPs ZnO M (120 mg/L) foi o que contribuiu para o melhor desenvolvimento da planta. De notar que, ambos os tratamentos de 120 mg/L de Zn na forma de NPs ZnO (com ou sem mucilagem) contribuíram para uma maior retenção de Zn quer nas sementes quer nas plântulas comparativamente ao controlo com água ou ao controlo iónico, promovendo assim uma maior disponibilidade de Zn para o desenvolvimento da planta.

**keywords**

"Seedpriming", Zinc oxide nanoparticles, Basil seed mucilage, Micronutrients bioavailability, Bioadhesion, *Solanum lycopersicum L*

**abstract**

The increasing world population intensifies the demand for food. However, intensive farming practices have collateral environmental damages such as soil degradation and groundwater contamination. Therefore, it is necessary to find strategies to increase agricultural production in an environmentally sustainable way. The use of nanomaterials in fertilizer application can contribute to sustainability in agriculture. Nanomaterials can be used for example in seed "*priming*" practices, that is, "*seedpriming*".

The main objective of the present dissertation was to evaluate whether the application of ZnO nanoparticles (ZnO NPs) directly to the seed prior to germination, through "*seedpriming*", can have benefits in terms of seed germination rate and plant growth. The application of ZnO NPs was compared with the application of Zn in ionic form (ZnSO<sub>4</sub>), that is, the conventional fertilization method. It was further evaluated whether coating the ZnO NPs with basil seed mucilage (ZnO M NPs) could contribute to increase the adhesiveness of the NPs to the seed coat and thus increase the bioavailability of the applied Zn to be absorbed by the seed.

"*Seedpriming*" trials were conducted with concentrations of 0.5 and 120 mg/L of Zn in the form of ZnSO<sub>4</sub>, ZnO NPs and ZnO M NPs applied to cherry tomato seeds of the species *Solanum lycopersicum L*. distilled water was used as control.

The results obtained show that the application of Zn in the form of ZnO NPs (120 mg/L) promoted an increase of about 8 % in seed germination rate compared to the water control; and a concentration of Zn retained in the seed about 25 times higher than the water treatment, and 3.7 times higher than the ZnSO<sub>4</sub> treated seeds. "*Seedpriming*" with ZnO M NPs (120 mg/L) contributed to a 4-fold increase in root dry biomass value and a 5-fold increase in plant aboveground dry biomass compared to the water control. This treatment with ZnO M NPs also promoted an average increase in plant aboveground length by approximately 7.8 cm compared to the water treatment.

The results obtained in this work suggest that the seed treatment with ZnO M NPs (120 mg/L) was the one that contributed to the best plant development. Note that both treatments of 120 mg/L of Zn in the form of ZnO NPs (with or without mucilage) contributed to a greater retention of Zn in both seeds and seedlings compared to the water control or the ionic control, thus promoting a greater availability of Zn for plant development.



## Índice

Índice de Figuras .....	iii
Índice de Tabelas .....	v
Lista de abreviaturas .....	vi
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. IMPORTÂNCIA DO SOLO PARA A SAÚDE HUMANA .....	2
1.2. MICRONUTRIENTE ZINCO .....	4
1.2.1 PLANTAS .....	4
1.3. DEFICIÊNCIA DE ZINCO NOS SOLOS E NAS PLANTAS .....	5
1.4. PRÁTICAS INOVADORAS NA FERTILIZAÇÃO DAS CULTURAS AGRÍCOLAS .....	5
1.5. POTENCIAL DE UTILIZAÇÃO DE NANOMATERIAIS PARA “SEEDPRIMING” .....	8
1.6. POTENCIAIS RISCOS AMBIENTAIS ASSOCIADOS AO USO DE NANOMATERIAIS NA AGRICULTURA .....	10
1.7. REVESTIMENTO DAS NPs ZnO COM MUCILAGEM DE SEMENTES DE MANJERICÃO .....	11
1.8. PRINCIPAIS QUESTÕES DE INVESTIGAÇÃO SUBJACENTES AO TRABALHO DESENVOLVIDO.....	12
1.9. OBJETIVOS DE ESTUDO.....	12
2. MATERIAIS E METODOLOGIA.....	14
2.1. PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MATERIAIS.....	14
2.1.1 REAGENTES E MATERIAIS.....	14
2.1.2 SÍNTESE DAS NPs ZnO M.....	14
2.1.3 EXTRAÇÃO DA MUCILAGEM.....	14
2.1.4 REVESTIMENTO PARA OBTENÇÃO DA NP ZnO M.....	15
2.1.5 MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS.....	15
2.1.5.1 MICROSCOPIA ELETRÓNICA DE TRANSMISSÃO (TEM) ACOPLADA A UM ESPECTRÓMETRO DE ENERGIA DISPERSIVA (EDS).....	15
2.1.5.2 POTENCIAL ZETA DAS NANOPARTÍCULAS.....	16
2.1.5.3 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHOS DE REFLEXÃO TOTAL ATENUADA (ATR-FTIR) .....	16
2.1.5.4 ANÁLISE DE DIFRAÇÃO DE RAIOS X (XRD) .....	16
2.1.5.5 ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO DE Zn NAS NPs ZnO M POR ICP-MS.....	16
2.2. TESTES DE “SEEDPRIMING”, GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO .....	17
2.2.1 MÉTODO USADO PARA O “SEEDPRIMING”.....	17
2.2.2 PREPARAÇÃO DAS SEMENTES PARA O “SEEDPRIMING”.....	17
2.2.3 ANÁLISE DA SUPERFÍCIE DAS SEMENTES .....	17
2.2.4 APLICAÇÃO DO “SEEDPRIMING” NAS SEMENTES.....	17
2.2.5 MÉTODO DO TESTE DE GERMINAÇÃO .....	18

2.2.6	MÉTODO DO TESTE DE CRESCIMENTO DAS PLANTAS .....	19
2.2.7	LAVAGEM DA AREIA.....	19
2.2.8	ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO DE Z <sub>N</sub> NAS SEMENTES, PLÂNTULAS E PLANTAS POR ICP-MS.....	20
2.3.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	20
3.	APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS.....	22
3.1.	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS .....	22
3.1.1	CARACTERIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE DAS NANOPARTÍCULAS ATRAVÉS DAS TÉCNICAS DE TEM-EDS E POTENCIAL ZETA.....	22
3.2.	RESULTADOS DO "SEEDPRIMING" NAS SEMENTES E PLÂNTULAS .....	25
3.2.1	ABSORÇÃO DE Zn PELA SEMENTE APÓS O "SEEDPRIMING" - BIOMASSA, % ÁGUA, [Zn] NAS SEMENTES .....	25
3.2.2	GERMINAÇÃO E VIGOR DAS SEMENTES.....	30
3.2.3	BIOMASSA SECA, PERCENTAGEM DE ÁGUA E CONCENTRAÇÃO DE ZN NAS PLÂNTULAS.....	33
3.3.	CRESCIMENTO DAS PLANTAS.....	35
3.3.1	BIOMASSA SECA E CONCENTRAÇÃO DE ZINCO NAS RAÍZES .....	35
3.3.2	BIOMASSA SECA, PERCENTAGEM DE ÁGUA, COMPRIMENTOS E CONCENTRAÇÃO DE ZINCO NA PARTE AÉREA.....	36
4.	DISCUSSÃO.....	40
4.1.	Vantagens da utilização de Zn na forma de nanopartículas (NPs ZnO) em "seedpriming", comparativamente com a aplicação de Zn na forma iônica (ZnSO <sub>4</sub> ) .....	40
4.2.	Efeito do revestimento das nanopartículas de Zn (NPs ZnO) com mucilagem da semente do manjeriço.....	41
4.3.	Efeito do "seedpriming" com NPs ZnO e NPs ZnO M na absorção de Zn pela semente ao longo do tempo e no crescimento da planta .....	42
5.	CONCLUSÕES.....	44
5.1.	SUGESTÕES PARA TRABALHO FUTURO .....	45
	Referências bibliográficas .....	46
	Anexo A – Cálculos para obtenção das concentrações de Zn em estudo .....	52
	Anexo B – Resultados da espectroscopia de infravermelhos de reflexão total atenuada (ATR-FTIR) .....	54
	Anexo C– Análise de difração de raios X (XRD).....	55

## Índice de Figuras

Figura 1.1 – Distribuição global de deficiência de zinco no solo. O mapa de deficiência de zinco no solo tem sido ligeiramente modificado por Alloway (2008). Adaptado de Cakmak et al., 2017.	3
Figura 1.2 – Distribuição global de deficiência de zinco na população. O mapa tem sido ligeiramente modificados por Wessells and Brown (2012). Adaptado de (Cakmak et al., 2017).....	3
Figura 1.3 - Vantagens na utilização de nanomateriais na formulação de fertilizantes. Adaptado de Kah et al., 2018 .....	6
Figura 1.4 – Potencial aplicação da nanotecnologia na agricultura vegetal. Crédito: A. Desaulniers, Orcéine, Montreal, Canadá. Adaptado de Hofmann et al., 2020. ....	8
Figura 1.5 - Fenómeno geral do seedpriming. Adaptado de Waqas et al., 2019. ....	10
Figura 2.1 - Tratamentos aplicados nas sementes de tomate cereja da espécie <i>Solanum lycopersicum L.</i> e respetivas concentrações. ....	18
Figura 3.1 - Micrografia de TEM das NPs ZnO puras.....	22
Figura 3.2 - Micrografias de TEM das NPs ZnO M em modo de captura de imagem.....	23
Figura 3.3 - Análise da NP ZnO M: A) Espectrograma EDS da NP ZnO e NP ZnO M B) Mapeamento EDS para o elemento Zn (Zn- vermelho); C) Mapeamento EDS para os elementos Zn e C (Zn- vermelho e C verde). ....	24
Figura 3.4–Biomassa seca das sementes após 24h de “seedpriming”. Nos resultados são apresentados os valores médios (n = 8). As barras de erro representam o desvio padrão. A concentração de zinco nos diferentes tratamentos é apresentada em mg/L. m.s=massa seca. ....	26
Figura 3.5 – Percentagem de água nas sementes em 24h de “seedpriming”. As barras de erro representam o desvio padrão. n = 8. A concentração de zinco nos diferentes tratamentos é apresentada em mg/L. ....	26
Figura 3.6 - Média da concentração de Zn nas sementes após 24h de “seedpriming”. As barras de erro representam o desvio padrão. n = 2. A concentração de zinco nos diferentes tratamentos é apresentada em mg/L. Os dados indicados pelas letras distintas são significativamente diferentes a p <0,05 de acordo com a Anova, teste estatístico de fator único. ....	27
Figura 3.7 - Microfotografias de SEM da semente após o processo de “seedpriming” com as NPs ZnO (A e B) e as NPs ZnO M (C e D) na concentração de 120 mg/L. A e C – Imagens panorâmicas da superfície da semente com aumento de 50 x; B e D - Ampliação da superfície da semente com um aumento 15k x. Os círculos brancos representam supostos agregados de NPs de ZnO e de NPs ZnO M (Tantiwatcharothai e Prachayawarakorn, 2019). ....	28
Figura 3.8 –Espectrograma de EDS das sementes após o processo de “seedpriming” com ZnSO <sub>4</sub> , NP ZnO, NP ZnO M com concentrações 0.5 e 120 mg/L.....	30
Figura 3.9 – Impacto do ZnSO <sub>4</sub> (A); NPs ZnO (B) e NPs ZnO M (C) na germinação das 25 sementes entre os dias 0 e 6. A concentração de zinco nos diferentes tratamentos é apresentada em mg/L.....	31

Figura 3.10 - Impacto do ZnSO <sub>4</sub> (A); NPs ZnO (B) e NPs ZnO M (C) no vigor das 25 sementes nos dias 0 e 1 da germinação. A concentração de zinco nos diferentes tratamentos é apresentada em mg/L.....	32
Figura 3.11 – Impacto dos tratamentos sob a biomassa seca nas plântulas após 6 dias de germinação. As barras de erro representam o desvio padrão. n = 5. A concentração de zinco nos diferentes tratamentos é apresentada em mg/L. m. s=massa seca .....	33
Figura 3.12 – Média da percentagem de água nas plântulas após 6 dias de germinação. As barras de erro representam o desvio padrão. n = 5. A concentração de zinco nos diferentes tratamentos é apresentada em mg/L. ....	34
Figura 3.13 - Média da concentração de Zn nas plântulas após 6 dias de germinação. As barras de erro representam o desvio padrão. n = 3. A concentração de zinco nos diferentes tratamentos é apresentada em mg/L.....	34
Figura 3.14- Impacto dos tratamentos sob a biomassa seca nas raízes após 35 dias de crescimento. As barras de erro representam o desvio padrão. n = 4 para água e n=3 para os restantes tratamentos. A concentração de zinco nos diferentes tratamentos é apresentada em mg/L. m.s=massa seca.....	35
Figura 3.15 - Média da concentração de Zn nas raízes das plantas após 35 dias de crescimento. As barras de erro representam o desvio padrão. n=4 para água e n = 3 para os restantes . A concentração de zinco nos diferentes tratamentos é apresentada em mg/L. ....	36
Figura 3.16 - Média da biomassa seca da parte aérea da planta. As barras de erro representam o desvio padrão. n = 4 para água e n=3 para os restantes tratamentos. A concentração de zinco nos diferentes tratamentos é apresentada em mg/L.....	37
Figura 3.17 – Média da percentagem de água na parte aérea da planta. As barras de erro representam o desvio padrão. n = 4 para água e n=3 para os restantes tratamentos. A concentração de zinco nos diferentes tratamentos é apresentada em mg/L. ....	38
Figura 3.18– Média dos comprimentos da parte aérea da planta. As barras de erro representam o desvio padrão. n = 4 para água e n=3 para os restantes tratamentos. A concentração de zinco nos diferentes tratamentos é apresentada em mg/L.....	38
Figura 3.19 - Média da concentração de Zn na parte aérea das plantas após 35 dias de crescimento. As barras de erro representam o desvio padrão. n=4 para água e n = 3 para os restantes. A concentração de zinco nos diferentes tratamentos é apresentada em mg/L. ....	40
Figura 20 - Espectro FTIR de Mucilagem da NP ZnO e NP ZnO M. ....	54
Figura 21 – Difractogramas de: A) NP ZnO M; B) NP ZnO; C) Mucilagem de sementes de manjerição. ....	55

## Índice de Tabelas

Tabela 2.1 - Resumo do plano experimental com os tratamentos ZnSO<sub>4</sub>, NP ZnO e NP ZnO M (concentração de exposição 0.5 e 120 mg/L). Adaptado de Raliya et al., 2015. .... 21

## Lista de abreviaturas

<b>ATR-FTIR</b>	Espectroscopia de infravermelhos de reflexão total atenuada
<b>C</b>	Carbono
<b>cm</b>	centímetros
<b>Dr.</b>	Doutor
<b>h</b>	Horas
<b>L</b>	Litro
<b>mg</b>	Miligramas
<b>mV</b>	Milivolts
<b>MVE</b>	Módulo de Análise Integrante do Equipamento de TEM
<b>nm</b>	Nanómetros
<b>NP ZnO M</b>	Nanopartícula de óxido de zinco revestida com mucilagem de sementes de manjerição
<b>NP ZnO</b>	Nanopartícula de óxido de zinco
<b>NP</b>	Nanopartícula
<b>NPs</b>	Nanopartículas
<b>SEM</b>	Microscopia Eletrónica de varrimento
<b>TEM</b>	Microscopia Eletrónica de Transmissão
<b>UP</b>	Ultra pura
<b>XRD</b>	Difração de raios X
<b>Zn</b>	Zinco
<b>ZnO</b>	Óxido de zinco

## 1. INTRODUÇÃO

A presente dissertação foi desenvolvida no âmbito do Projeto AgriTarget (2018/2022) - "Desenvolvimento e teste de sistemas de libertação localizada, controlada e segura de produtos agroquímicos com base em nano e microengenharia".

O rápido crescimento populacional global, as mudanças climáticas e o declínio da qualidade do solo estão a colocar uma enorme pressão sobre a nossa capacidade de fornecer alimentos para a sociedade de maneira equitativa.

Estima-se que devido ao crescimento demográfico a produção global de alimentos terá que aumentar de 70 a 100% até 2050 (Mahakham et al., 2017). Em virtude disto, torna-se imperativo produzir alimentos em quantidade, mas também com qualidade nutritiva suficiente para satisfazer a população mundial sem degradar a qualidade do solo e dos ecossistemas utilizando uma estratégia de produção agrícola ambientalmente sustentável (Cakmak et al., 2017).

É de extrema importância produzirmos vegetais ricos em minerais e nutrientes essenciais à nutrição humana. Estes minerais estão amplamente divididos em macro e micro nutrientes.

Os macronutrientes incluem o cálcio (Ca), magnésio (Mg), potássio (K), sódio (Na), cloreto (Cl), fósforo (P) e enxofre (S), enquanto os micronutrientes abarcam o iodo (I), zinco (Zn), selénio (Se), ferro (Fe), manganês (Mn), cobre (Cu), cobalto (Co), molibdénio (Mo), flúor (F), crómio (Cr) e boro (B) (Gharibzahedi e Jafari, 2017).

Alguns macro e micronutrientes são essenciais para a saúde humana: encontram-se na estrutura dos dentes (Ca, P e F) e ossos (Ca, Mg, Mn, P, B e F); a maioria dos micronutrientes (Cu, Fe, Mn, Mg, Se e Zn) tem um papel vital como parte estrutural em muitas enzimas (transmissão e sinalização); o Co, I e Fe têm papéis-chave na formação das células eritrócitos; o Cr na regulação da glicose; o Mo na proteção através da ativação de enzimas antioxidantes; o Ca, Mg, Cu, Se e Zn têm um papel ao nível da imunidade e o Cr e Mn nos sistemas cerebrais (Gharibzahedi e Jafari, 2017).

A deficiência de micronutrientes no solo resulta também em reduções significativas de rendimento e da qualidade das culturas agrícolas. Embora as plantas precisem deles em pequenas quantidades, micronutrientes como B, Mn, Mo ou Zn têm papéis importantes na saúde e nutrição das plantas (White e Brown, 2010). Esses elementos estão envolvidos em vários processos metabólicos e fisiológicos da planta, como fotossíntese, respiração

ou assimilação de azoto, são necessários para a atividade de muitas enzimas, para translocação de açúcar, ácidos nucleicos e hormonas vegetais, e têm um efeito significativo no crescimento reprodutivo da planta, retenção de flores e na frutificação e produção (White e Brown, 2010). Uma gestão precisa da absorção e biodisponibilidade de micronutrientes pelas plantas é, portanto, essencial para a saúde e o crescimento das plantas ao mesmo tempo que a concentração desses micronutrientes nos tecidos vegetais comestíveis é de fundamental importância para a nutrição humana (White e Brown, 2010).

Apesar desta necessidade, a incidência de deficiências de micronutrientes em muitas culturas agrícolas aumentou acentuadamente nos últimos anos devido a práticas de agricultura intensiva, erosão do solo, perdas de nutrientes por lixiviação, ou aplicação desequilibrada de azoto, fósforo e potássio.

A nanotecnologia oferece a oportunidade de produzir novos tipos de fertilizantes, com absorção e eficácia altamente melhoradas em comparação com seus análogos convencionais (Raliya et al., 2015). Durante a última década, foram desenvolvidas várias patentes e produtos incorporando nanopartículas (NPs) artificiais em práticas agrícolas, por exemplo, nanopesticidas, nanofertilizantes e nanosensores, cujo objetivo global é de promover a eficiência e a sustentabilidade das práticas agrícolas requerendo menos recursos e gerando menos resíduos do que os produtos e abordagens convencionais (Mahakham et al., 2017).

Os resultados preliminares do aumento da utilização da nanotecnologia na agricultura por países densamente povoados como a China e a Índia indicam que esta tecnologia pode ter um impacto positivo no aumento da produtividade agrícola e assim contribuir para a redução da fome, da desnutrição e da mortalidade infantil (Raliya et al., 2015). Estes aspetos são abordados em maior detalhe na secção seguinte.

## **1.1. IMPORTÂNCIA DO SOLO PARA A SAÚDE HUMANA**

Mundialmente as zonas agrícolas enfrentam um largo espectro de pressões, tais como a estagnação do rendimento das culturas, a baixa eficiência no uso de nutrientes, diminuição da matéria orgânica do solo, deficiências de vários nutrientes, diminuição da terra arável, disponibilidade de água e escassez de mão-de-obra em resultado de um êxodo das pessoas na agricultura (Raliya et al., 2018).

Estima-se que cerca de um terço dos solos cultivados a nível mundial contêm baixas concentrações de Zn disponíveis, o que resulta numa produção agrícola de baixo

rendimento e também em baixa qualidade nutricional das colheitas (Figura 1.1) (Hacisalihoglu, 2020).



Figura 1.1 – Distribuição global de deficiência de zinco no solo. O mapa de deficiência de zinco no solo tem sido ligeiramente modificado por Alloway (2008). Adaptado de Cakmak et al., 2017.

É esperado que exista uma sobreposição geográfica entre a deficiência Zn do solo e a deficiência Zn humana, especialmente nos países em desenvolvimento, como apresentado na Figura 1.2.

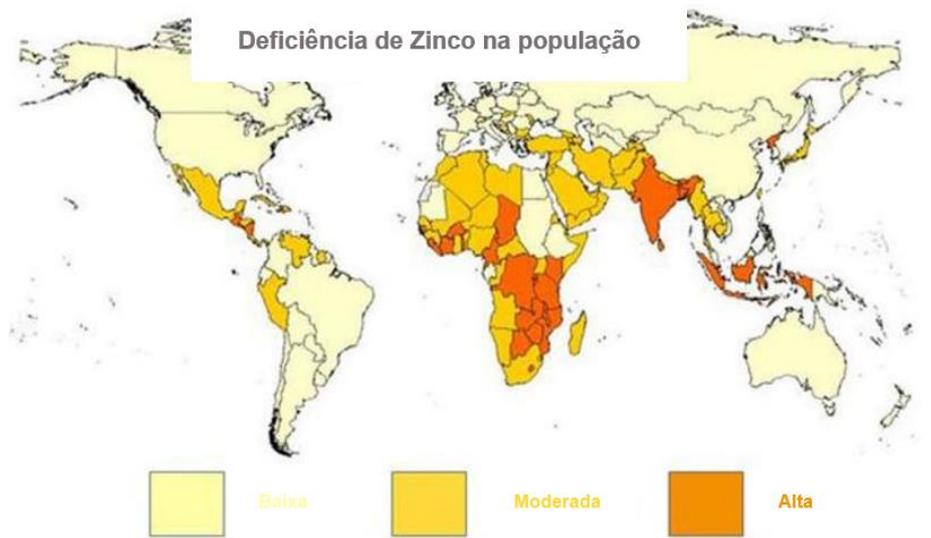


Figura 1.3 – Distribuição global de deficiência de zinco na população. O mapa tem sido ligeiramente modificado por Wessells and Brown (2012). Adaptado de (Cakmak et al., 2017)

As condições do solo, juntamente com as condições ambientais das localizações geográficas, pode ter impacto no conteúdo de micronutrientes, tais como a quantidade de Zn nas sementes e plantas (Hacisalihoglu, 2020). A fertilização foliar de Zn torna-se assim muitas vezes necessária para manter uma concentração das plantas durante as suas fases de crescimento (Cakmak,2008).

## **1.2. MICRONUTRIENTE ZINCO**

O zinco (Zn) é o segundo metal de transição mais abundante em organismos depois do ferro e está representado em todas as seis classes de enzimas (oxidoreductases, transferases, hidrolases, lyases, isomerases, e ligases) (Auld, 2001). O Zn é um micronutriente essencial para os seres humanos, animais e plantas (Mahdieh et al., 2018).

A eficiência de absorção de Zn pela planta envolve a absorção, o transporte e a utilização do Zn; plantas com alta eficiência na absorção de Zn exibem alto rendimento e crescimento significativo, sendo a sua aplicação essencial na produção de muitas culturas, como arroz, feijão, trigo, soja e milho (Hacisalihoglu, 2020).

### **1.2.1 PLANTAS**

Os nutrientes essenciais das plantas incluem azoto, fosfato, potássio e cálcio (macronutrientes) e ferro, Zn e cobre (micronutrientes) (Martins et al., 2020). As plantas superiores absorvem geralmente o Zn como um catião divalente ( $Zn^{2+}$ ), que atua como o componente metálico de enzimas ou como componente estrutural funcional ou um fator de co-regulação de um grande número de enzimas (Mahdieh et al.,2018).

O Zn é um dos 17 nutrientes minerais essenciais e desempenha um papel importante no crescimento das plantas, participa numa vasta gama de processos bioquímicos, na fotossíntese, desenvolvimento de pólen, transformação de açúcares, síntese de proteínas, permeabilidade de membranas celulares, transdução de sinal e metabolismo da auxina (Hacisalihoglu, 2020; Martins et al., 2020). Também desempenha um papel vital na síntese de clorofila, na regulação das hormonas de crescimento das plantas, na manutenção de sistemas radiculares saudáveis, na ativação de enzimas e a desintoxicação dos radicais livres e na preservação da tolerância aos fatores de stress das plantas (Hacisalihoglu, 2020).

### **1.3. DEFICIÊNCIA DE ZINCO NOS SOLOS E NAS PLANTAS**

A deficiência Zn é um problema generalizado afetando culturas em todo o mundo) (Martins et al., 2020). Com base na análise de 298 amostras de solo recolhidas de diferentes países do mundo, verificou-se que a deficiência de Zn é a deficiência de micronutriente mais generalizada. Muitos solos agrícolas, particularmente os solos calcários (pH>7), são incapazes de suprir as necessidades de Zn nas plantas cultivadas, fazendo com que a deficiência de Zn um problema mundial generalizado (Hacisalihoglu, 2020).

O ião Zn é agora considerado o quarto nutriente limitante de rendimento mais importante após azoto (N), fósforo (P), e potássio (K). Só na Índia, 50% dos solos em que o amendoim é cultivado apresentam deficiência de Zn, estando a causar uma considerável perda de rendimento. Metade dos solos cultivados na Turquia têm deficiência de Zn. Aumentos consideráveis no rendimento de grãos por aplicação Zn também foram demonstrados na Índia e na Austrália (Mahdieh et al., 2018). A deficiência de Zn leva à redução de vários processos metabólicos, tais como, o crescimento e, conseqüentemente à diminuição do rendimento (Faizan et al.,2021).

Além disso, estudos mostram que 17,3% das pessoas em todo o mundo estão em risco de deficiência de Zn (Wessells e Brown, 2012).

### **1.4. PRÁTICAS INOVADORAS NA FERTILIZAÇÃO DAS CULTURAS AGRÍCOLAS**

Nas últimas décadas, a nanotecnologia tem alcançado grandes progressos e diversos nanomateriais têm sido aplicados com sucesso em vários campos tais como eletrônica, energia, engenharia ambiental e medicina. As aplicações da nanotecnologia na agricultura começam também a ser exploradas. A nanotecnologia utiliza nanomateriais (com dimensões inferiores a 100 nm) e tem um papel promissor na transformação da produção alimentar e agricultura (Fraceto et al., 2016). De facto, existem já alguns exemplos na literatura que mostram o potencial dos nanomateriais na melhoria da libertação controlada dos agroquímicos na germinação das sementes, crescimento e proteção de plantas, deteção de agentes patogénicos e deteção de resíduos de pesticidas (Martins et al., 2020).

A estratégia atual utilizada passa pela utilização da nanotecnologia que é aplicada no sector da nutrição vegetal com o objetivo de aumentar a eficácia da utilização dos fertilizantes atuais, quer melhorando o fornecimento de elementos pouco bio disponíveis

(por exemplo, fósforo e zinco) e/ou limitando as perdas de nutrientes móveis por lixiviação para solos e águas (por exemplo, na forma de nitrato) (Kah et al., 2018).

Recentemente, os nanomateriais foram utilizados na produção agrícola para mitigar os problemas ambientais causados pela aplicação intensiva dos fertilizantes convencionais. Devido à falta de sincronização entre a libertação de minerais (muitas vezes longe a partir das raízes) de fertilizantes iónicos a granel e a absorção pelas plantas, apenas uma pequena parte dos fertilizantes aplicados nos solos são efetivamente utilizados pelas plantas (30-50%). O restante zinco (Zn) aplicado dá origem a complexos não bio disponíveis nos solos ou é removido por lixiviação ou escoamento provocando impactos ambientais (Martins et al., 2020).

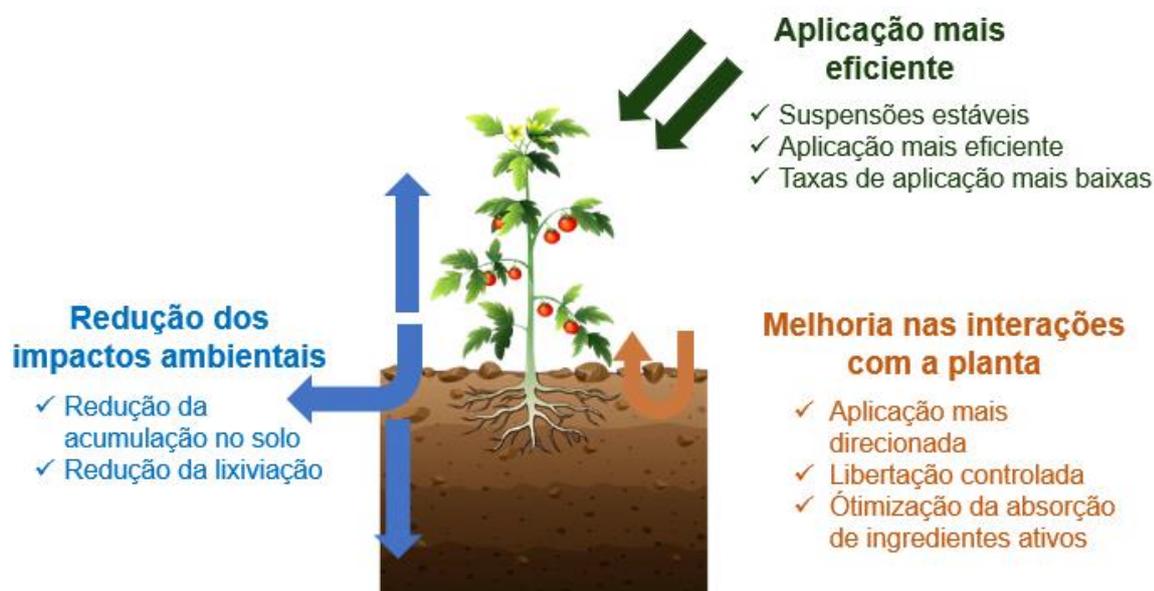


Figura 1.3 - Vantagens na utilização de nanomateriais na formulação de fertilizantes. Adaptado de Kah et al., 2018

Por outro lado, a nanotecnologia pode ser utilizada para aplicar nutrientes e melhorar o processo de germinação. Tal é possível através da aplicação das nanoformulações de micronutrientes diretamente na semente, designado por “*seedpriming*”. O “*seedpriming*” envolve uma técnica utilizada para hidratar sementes com uma cobertura de modo a desencadear processos metabólicos para iniciar a germinação sem o surgimento da radícula (Younis et al., 2019). Para além da aplicação dos nanomateriais na semente, também é feita nas raízes e a nível foliar, como exemplificado na Figura 1.3 (Hofmann et al., 2020).

O “*seedpriming*” é uma técnica que promove a germinação das sementes e o estabelecimento das plantas com base na preparação preliminar das sementes antes de as semear. É, geralmente, uma metodologia à base de água, pela qual as sementes são hidratadas e seguidas de secagem ou são aplicados alguns métodos físicos como o “*priming*” de luz ultravioleta (UV) (Pereira et al., 2021). Há uma diferença importante entre o “*seedpriming*” e o “*seedpriming*” com nanopartículas, uma vez que o “*seedpriming*” envolve principalmente água (hidrocobertura) ou soluções contendo substâncias (nutrientes, hormonas ou bio polímeros) que adsorvem na semente e podem resultar em revestimento (ou curativo) de sementes, o que confere menor potencial (Pereira et al., 2021).

O “*seedpriming*” com nanopartículas é uma tecnologia recente que utiliza nanomateriais, principalmente nanopartículas, para a aplicação nas sementes.

Os meios utilizados no “*seedpriming*” são a aplicação de suspensões de nanopartículas ou nanoformulações. Após a sua aplicação, a maior parte das nanopartículas é retida na superfície da semente como revestimento (adsorção). Tal revestimento das sementes pode ser utilizado como fungicidas ou bactericidas para proteger contra agentes patogénicos no campo ou durante o armazenamento (Pereira et al., 2021). As nanopartículas adsorvidas à superfície da semente poderão potencialmente ser posteriormente absorvidas pelas sementes.

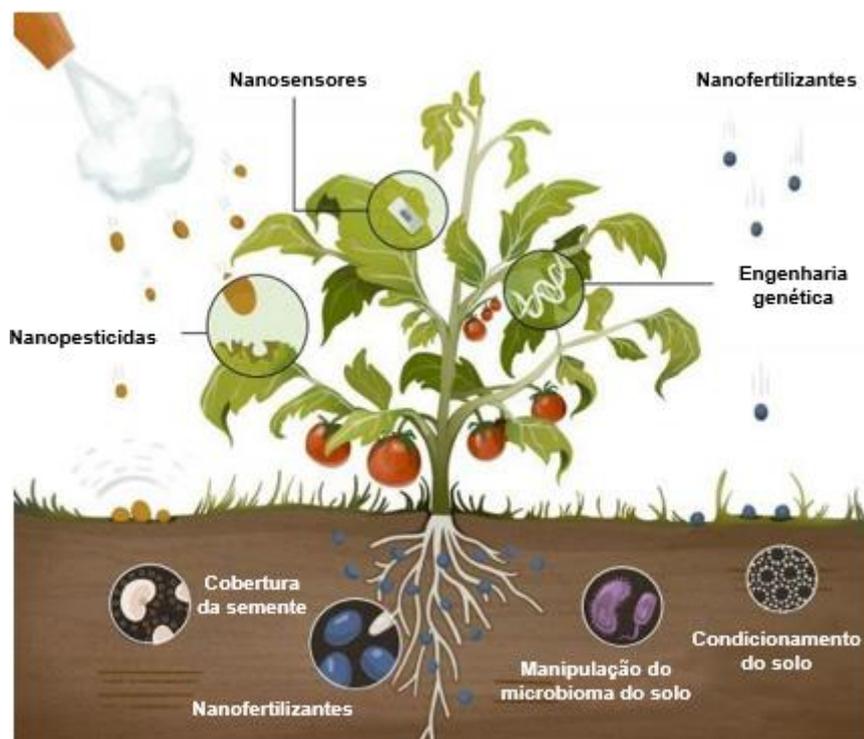


Figura 1.4 – Potencial aplicação da nanotecnologia na agricultura vegetal. Crédito: A. Desaulniers, Orcéine, Montreal, Canadá. Adaptado de Hofmann et al., 2020.

A Figura 1.4 ilustra como as nanopartículas têm uma eficácia potencialmente mais elevada e podem ajudar a prevenir o escoamento dos nutrientes aplicados no “*seedpriming*” para águas de superfície e águas subterrâneas.

Desta forma, o uso excessivo de fertilizantes químicos pode ser reduzido (Upadhyaya et al., 2017). A aplicação dos nanomateriais poderá também ter um impacto positivo no desenvolvimento da atividade das sementes e acelera os seus processos metabólicos por forma a potenciar o crescimento e desenvolvimento das plantas (Bayat et al., 2020). Neste contexto, tem sido relatado que a preparação de sementes com nanopartículas melhora a germinação e o vigor das sementes em muitas culturas (Waqas et al., 2019).

### 1.5. POTENCIAL DE UTILIZAÇÃO DE NANOMATERIAIS PARA “SEEDPRIMING”

Na literatura existem alguns exemplos que mostram o potencial dos nanomateriais nomeadamente para melhorar a libertação dos fertilizantes, germinação das sementes, crescimento e proteção das plantas (Martins et al., 2020). A preparação de nanopartículas para aplicação em sementes pode ser utilizada em diferentes estratégias, como por

exemplo, proteção de sementes, bio fortificação, resistência das plantas contra pragas e stress abiótico, ou mesmo a mistura destes efeitos (Pereira et al., 2021). O revestimento das sementes com nanomateriais pode melhorar a qualidade das sementes (Hofmann et al., 2020).

A preparação de sementes com NPs minerais pode aumentar o conteúdo de micronutrientes nas sementes, influenciando o seu crescimento, e qualidade das plantas uma vez que a germinação de sementes e o desenvolvimento de plântulas são muito importantes para o crescimento de plantas que são influenciadas sob forte stress de metais (Rizwan et al., 2019).

Os tratamentos das sementes requerem a utilização de nanomateriais em menores quantidades em comparação com a sua aplicação foliar ou no solo. Outro ponto positivo são as baixas concentrações de nanopartículas utilizadas para a preparação de sementes, que pode ser feita de uma forma controlada pelas fábricas, evitando libertação destes materiais no ambiente (Pereira et al., 2021).

As nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) atuam como fertilizante nanoestruturado e são uma alternativa promissora para substituir os fertilizantes convencionais uma vez que apresentam inúmeras vantagens, dentre elas, regular a liberação de nutrientes, além de serem mais eficientes que os adubos convencionais, amenizarem a produção de resíduos, e conseqüentemente os custos de proteção ambiental (Tarafdar et al., 2013).

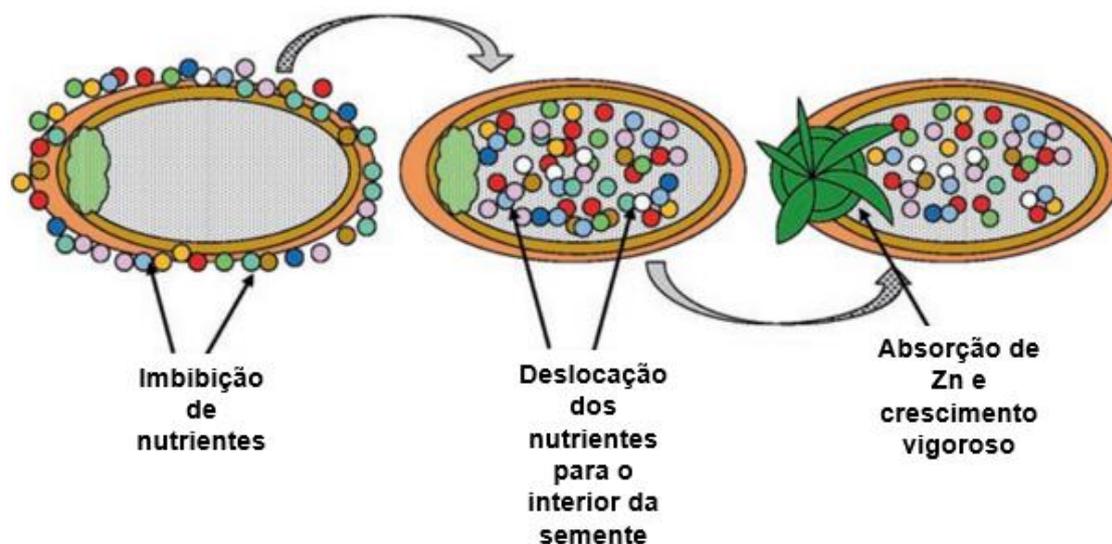


Figura 1.5 - Fenómeno geral do seedpriming. Adaptado de Waqas et al., 2019.

A literatura sugere também que pode haver vantagens em adicionar polímeros adesivos às formulações de nanopartículas a ser utilizadas para revestimento da semente em práticas de “*seedpriming*” (Baroni e Vieira, 2020). Para este efeito podem ser utilizados polímeros orgânicos adesivos que formem uma fina camada aderente à superfície da semente, aumentando a adesividade e potencial para adsorção das nanopartículas à superfície da semente e reduzindo as perdas durante e após a sua aplicação (Baroni e Vieira, 2020).

Estudos recentes sugerem que a mucilagem das plantas e de algumas sementes pode ser utilizada como revestimento de nanopartículas a assim aumentar a sua adesividade a diferentes superfícies (Tosif et al 2021). A mucilagem é uma substância espessa e pegajosa produzida por quase todas as plantas e alguns microrganismos, e que desempenha um papel importante no armazenamento de água e alimentos, na germinação das sementes e no espessamento das membranas. As mucilagens vegetais são caracterizadas como hidrogéis hidrofílicos ricos em polissacarídeos vegetais (polímeros pécnicos, celulósicos e não celulósicos) com uma componente proteica menor e têm evoluído em diversas funções (Phan e Burton, 2018). Salienta-se que a composição das mucilagens vegetais em geral, é muito variável, diferindo entre espécies e o tipo de tecidos das espécies. Das diferentes mucilagens, as mucilagens extraídas de sementes são as mais caracterizadas (Phan e Burton, 2018).

## **1.6. POTENCIAIS RISCOS AMBIENTAIS ASSOCIADOS AO USO DE NANOMATERIAIS NA AGRICULTURA**

A utilização de nanomateriais na agricultura poderá também ter impactos indesejáveis nos ecossistemas e na biodiversidade. Por conseguinte, é crucial compreender os mecanismos de ação de nanomateriais para uso na agricultura e desenvolver nanopartículas que apresentem um baixo risco ambiental (Pereira et al., 2021).

Com o crescimento da investigação e atividades industriais relacionadas aos nanomateriais surgiu a preocupação sobre a possibilidade da entrada destes materiais no meio ambiente, ocasionando impacto final para a biota. Quando libertados no ambiente natural, os nanomateriais sofrem alterações no tamanho das partículas, na forma, na carga de superfície que afetam a sua biodisponibilidade (E. Batley et al., 2019). Em particular, a forma, composição, concentrações, solubilidade e maior área superficial influenciam a toxicidade de nanopartículas para os organismos vivos (Guzmán et al., 2006).

Embora as nanopartículas tenham potencial para utilização na preparação de sementes ou no seu revestimento, deve assegurar-se que a aplicação de nanomateriais não representa um risco ambiental. A utilização segura destes sistemas exige o desenvolvimento de regulamentos apropriados baseados em resultados de investigação, não só na agricultura, mas também em muitos outros sectores industriais. Os quadros legais são necessários para a produção industrial de nanomateriais, tratamento de resíduos industriais, e aplicações agrícolas, juntamente com a avaliação dos destinos destas nanopartículas no ambiente, considerando a sua possível ecotoxicidade (Pereira et al., 2021).

É essencial compreender como as propriedades físico-químicas das nanopartículas afetam as sementes e outros organismos associados, a fim de poder conceber nanopartículas que são simultaneamente eficazes e apresentam efeitos tóxicos mínimos (Pereira et al., 2021).

Antes do tratamento de sementes, é necessário avaliar as condições definidas para o “*seedpriming*”, considerando o tamanho e concentração das nanopartículas e a duração de exposição, uma vez que estes fatores quando não devidamente controlados podem também causar efeitos secundários, tais como a inibição da germinação, a redução do desenvolvimento vegetal, alterações prejudiciais do metabolismo e da estrutura celular e modificação das interações raiz-microbioma (Pereira et al., 2021).

### **1.7. REVESTIMENTO DAS NPs ZnO COM MUCILAGEM DE SEMENTES DE MANJERICÃO**

Neste trabalho foram utilizadas as sementes de manjeriço com o objetivo de extrair a sua mucilagem e cobrir as NPs de óxido de zinco para posteriormente aplicação nas sementes de tomate cereja durante o “*seedpriming*”. A semente de manjeriço tem cor preta e é uma minúscula semente elipsoide com uma incrível capacidade de hidratação que é atribuída à aderência da mucilagem na semente (Nazir et al., 2017).

As estruturas das sementes de manjeriço quando mergulhadas em água, desdobram-se a partir do pericarpo (parte externa da semente) e seguram a mucilagem firmemente até à superfície do núcleo da semente, desta forma, a camada porosa da mucilagem exsudada permanece bem aderida e agarrada ao núcleo durante todo o processo de imbibição da água. Assim é possível extrair uma massa gelatinosa designada por mucilagem, que é constituída por polissacarídeos, principalmente de glucomananas (43%) e xilana ligada a 1,4 (24,3%) (Song e Kim, 2019; Nazir et al., 2017).

Existem mucilagens de sementes que estão contidas no interior das células da casca da semente, ou seja, podem estar localizadas nos tecidos do embrião e as mucilagens que são extraídas da casca da semente (Phan e Burton, 2018). Este último foi o método aplicado ao presente estudo.

Após aplicação em sementes de tomate, a mucilagem atua como um reservatório para a água com alto potencial hídrico durante a germinação das sementes de tomate e o desenvolvimento precoce das respectivas plântulas (Nazir et al., 2017).

## **1.8. PRINCIPAIS QUESTÕES DE INVESTIGAÇÃO SUBJACENTES AO TRABALHO DESENVOLVIDO**

A revisão da literatura acima descrita permitiu identificar os seguintes aspetos relacionados com a utilização de nanomateriais em “*seedpriming*” que carecem de investigação científica e que estão subjacentes ao desenvolvimento deste trabalho:

1. Será que a aplicação de Zn na forma iónica ( $ZnSO_4$ ) diretamente na semente (“*seedpriming*”) antes da germinação tem benefícios na eficiência de germinação e crescimento da planta? Será a utilização de Zn na forma de nanopartículas (NPs ZnO) é mais eficaz na aplicação de Zn diretamente na semente, comparativamente com a aplicação de Zn na forma iónica ( $ZnSO_4$ )?
2. Será que o revestimento das nanopartículas de Zn (NPs ZnO) com mucilagem da semente do manjeriço aumenta a adesividade das NPs ao revestimento da semente em comparação com o sal ( $ZnSO_4$ ) e com as NPs ZnO?
3. Será que a cobertura de mucilagem sobre as nanopartículas permite aumentar a adesividade e a adsorção das nanopartículas à superfície das sementes e/ou controlar a sua dissolução de forma que o Zn esteja disponível para ser absorvido em maior quantidade pela semente ao longo do tempo?

## **1.9. OBJETIVOS DE ESTUDO**

Tendo o que está acima descrito, os objetivos deste trabalho foram:

1. Avaliar se a aplicação de Zn diretamente na semente antes da germinação através de “*seedpriming*” pode ter benefícios em termos da eficiência de germinação e crescimento da planta.
2. Avaliar se a aplicação de Zn na forma de nanopartículas (NPs ZnO) é vantajosa em termos da aplicação de Zn diretamente na semente, comparativamente com a aplicação de Zn na forma iónica ( $ZnSO_4$ ), ou seja, o método de fertilização convencional.

3. Avaliar se o revestimento das nanopartículas de ZnO (NPs ZnO) com mucilagem de sementes de manjeriço aumenta a adesividade das NPs ao revestimento da semente e por conseguinte aumenta a capacidade de utilização do Zn aplicado na germinação da semente que privilegia o desenvolvimento da plântula e portanto, o crescimento da planta.

De notar que a planta escolhida para este estudo foi o tomate cereja. O tomate é uma importante planta agrícola e medicinal, cultivada em todo o mundo e consumida de diversas formas. O fruto é rico em licopeno, um dos mais poderosos antioxidantes naturais, que protege contra danos oxidativos epidemiológicos e várias doenças crónicas, incluindo o cancro (Raliya et al., 2015). Além disto, o tomate é uma cultura em que é muitas vezes observada a deficiência em Zn (Kaya e Higgs, 2002).

Neste trabalho foi também utilizada a mucilagem das sementes de manjeriço como revestimento de nanopartículas de ZnO (NPs ZnO) para avaliar os possíveis benefícios da utilização de um revestimento com capacidade adesiva em “*seedpriming*”.

## **2. MATERIAIS E METODOLOGIA**

A experiência foi realizada nos laboratórios do Centro de Estudos do Ambiente e do Mar (CESAM) em conjunto com o Departamento de Química na Universidade de Aveiro durante os primeiros seis meses do ano 2021.

### **2.1. PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MATERIAIS**

#### *2.1.1 REAGENTES E MATERIAIS*

As sementes em estudo são de tomate cereja da espécie *Solanum lycopersicum* L. da empresa Germisem Semente Lda., localizada na zona industrial, lote 16, código postal 3400-060 em Oliveira do Hospital, Portugal (<https://www.germisem.com/>). Humedeceram-se com água ultra pura, por forma a entender quais as sementes que estariam danificadas, isto é, verificar que continham ar no seu interior.

O sulfato de zinco heptahidratado ( $ZnSO_4 \cdot 7(H_2O)$ ) foi adquirido à Sigma Aldrich. As nanopartículas de óxido de zinco (NPs ZnO) são comerciais e pertencem à Nanostructured e Amorphous materials, Houston, Texas. As concentrações em estudo para cada tratamento foram 0,5 mg/L que corresponde à concentração mínima para o desenvolvimento da planta e de 120 mg/L que é considerada suficiente, isto é, eficaz. Os cálculos relativos a estes valores podem ser consultados no Anexo A.

#### *2.1.2 SÍNTESE DAS NPs ZnO M*

As NPs ZnO M foram as únicas produzidas no nosso laboratório pelo investigador Dr. Matheus Miranda. De seguida, é apresentado o método para a sua obtenção.

#### *2.1.3 EXTRAÇÃO DA MUCILAGEM*

A mucilagem das sementes de manjeriço foi preparada por hidratação. As sementes de manjeriço foram embebidas em água destilada numa razão semente:água de 1:30 durante 1 h à temperatura ambiente. Seguidamente, a mucilagem foi raspada da superfície das sementes dilatadas num misturador durante 1 minuto. Posteriormente, a mucilagem foi separada das sementes dilatadas, filtrando a mistura com um pano de queijo e centrifugada a 5000 rpm no tempo de 5 minutos para remover os resíduos das sementes.

A mucilagem resultante foi refrigerada a  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  num período de 24 h num congelador, seguida de liofilização a  $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 24 h com um liofilizador para obter a mucilagem seca (Tantiwatcharothai e Prachayawarakorn, 2019).

#### 2.1.4 REVESTIMENTO PARA OBTENÇÃO DA NP ZnO M

No revestimento das nanopartículas de ZnO com mucilagem, neste trabalho foi utilizada a proporção da NP ZnO M de 1:1, tendo sido desenvolvido com base na interação eletrostática entre as cargas positivas das NPs ZnO e com as cargas negativas dos componentes da mucilagem (glucomanano, (1, 4) -linked xylan e 6% de ácido urónico) (Tantiwatcharothai e Prachayawarakorn, 2019; Jayakumar et al., 2006).

O revestimento foi iniciado com a produção de uma solução mucilagínosa (1mg/mL) filtrada com uma membrana de 0,45  $\mu\text{m}$  de porosidade. Foi também produzida uma dispersão de nanopartículas de ZnO com uma concentração de 1 mg/mL e 0,5 mg/mL (concentração dependente das NPs ZnO com razão 1:1).

Na preparação da dispersão das nanopartículas de ZnO, foi utilizado um banho ultrassónico (com placa de gelo) durante 20 minutos para inibir a agregação das nanopartículas. Foram adicionados 100 mL da solução mucilagínosa gota a gota sobre 100 mL de dispersão de nanopartículas de ZnO.

Após adicionar a solução mucilagínosa, a agitação foi continuada durante 30 minutos. A solução resultante da síntese foi centrifugada durante 15 minutos a 4000 rpm e lavada duas vezes com água ultra pura.

#### 2.1.5 MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS

##### 2.1.5.1 MICROSCOPIA ELETRÓNICA DE TRANSMISSÃO (TEM) ACOPLADA A UM ESPECTRÓMETRO DE ENERGIA DISPERSIVA (EDS)

A análise TEM visa provar a eficiência do processo de revestimento das nanopartículas com mucilagem. As nanopartículas (NPs) foram dispersas com água ultrapura e depositadas sobre a rede dourada de película de carbono. As amostras foram então observadas por microscopia eletrónica de transmissão de emissões de campo (TEM, HT22700B, HITACHI, Japão) a uma tensão acelerada de elétrões de 80 kV. Os tamanhos das NPs foram avaliados usando o software Image J.

#### 2.1.5.2 POTENCIAL ZETA DAS NANOPARTÍCULAS

A carga superficial de nanopartículas a diferentes pHs foi determinada medindo os potenciais zeta de partículas utilizando um Nano-ZS90 Zetasizer (Malvem Instruments, UK). Em resumo, 1 mg de amostras foram misturadas com 10 mL de água ultra pura (pH 6.8) e foram submetidas a 10 minutos de banho ultrassônico. 1 mL da suspensão foi então transferida para uma cuvette de potencial zeta para medição a 25°C e expresso com uma média de 10 leituras (Silva et al., 2011; Li et al., 2018).

#### 2.1.5.3 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHOS DE REFLEXÃO TOTAL ATENUADA (ATR-FTIR)

A espectroscopia FTIR foi realizada para analisar a superfície das nanopartículas. Cada uma das amostras foi colocada na janela ATR diamantada de um espectrómetro Avatar 360 Thermo Nicolet e digitalizada no intervalo de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$  com uma resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$  em modo de transmissão e expressa como uma média de 64 leituras.

#### 2.1.5.4 ANÁLISE DE DIFRAÇÃO DE RAIOS X (XRD)

As normas XRD foram obtidas com radiação Cu-K $\alpha$  utilizando um difractorómetro Empyrean (PANalytical, Países Baixos). As medições foram feitas utilizando um programa de varrimento por passos com 0,02° por passo e um tempo de aquisição de 5 segundos que foi de 10° a 80°. Os dados XRD foram analisados utilizando o Match 3 (PANalytical BV Almelo, Holanda) para a identificação de fases cristalinas (Padil e Černík, 2013). O estudo XRD realizou-se para confirmar a pureza, fase e natureza cristalina das nanopartículas de ZnO e ZnO M (Itroutwar et al., 2020).

#### 2.1.5.5 ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO DE Zn NAS NPs ZnO M POR ICP-MS

Esta análise foi realizada para avaliar a concentração de Zn na NP ZnO M. O conteúdo total de zinco em pós liofilizados foi determinado por Espectrometria de massa de plasma acoplado indutivamente (ICP-MS, série Thermo-X). Antes da análise ICP-MS as amostras foram digeridas em micro-ondas (Speedwave 4, Berghof). 1 mg de amostra foi tratado com 1.5 mL de HNO<sub>3</sub>.

O programa de aquecimento utilizado para a digestão ácida foi: TMAX = 180 °C, tempo de rampa = 5 min, tempo de espera = 15 min, potência = 90 W.

Em seguida, as amostras foram arrefecidas durante 30 min à temperatura ambiente e o volume foi perfeito até 25 mL de água ultra pura. As medições foram realizadas em duplicado para as sementes, triplicado para as plântulas e plantas (Martins et al., 2020).

## **2.2. TESTES DE "SEEDPRIMING", GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO**

### *2.2.1 MÉTODO USADO PARA O "SEEDPRIMING"*

Com base na literatura realizaram-se os cálculos para determinar os valores das massas de Zn para preparação de uma solução/suspensão com uma concentração de 120 mg/L. Colocaram-se em tubos de centrífuga de 50 mL previamente identificados aos respetivos tratamentos as massas pesadas. Adicionou-se 20 mL de água ultrapura. Dispersou-se em banho de ultra sons com placa de gelo durante 30 minutos. Agitou-se as dispersões de 5 em 5 minutos para garantir que as partículas não se agregavam. Homogeneizou-se a dispersão no vortex breves segundos.

### *2.2.2 PREPARAÇÃO DAS SEMENTES PARA O "SEEDPRIMING"*

Para cada tratamento foram selecionadas 224 sementes de tomate cereja. Esterilizou-se as sementes com hipoclorito de sódio (NaClO) 5% (v/v) durante 5 minutos. De seguida, foram lavadas cuidadosamente três vezes com água ultrapura retirando o máximo de água que sobrou com o auxílio de um coador.

### *2.2.3 ANÁLISE DA SUPERFÍCIE DAS SEMENTES*

As superfícies das sementes caracterizadas por microscopia eletrónica de varredura (SEM). Sementes secas a 70°C foram montadas nos suportes usando fitas adesivas de dupla face condutoras e revestidas por pulverização de Carbono por 30 segundos. As amostras foram examinadas no microscópio eletrónico de varredura S4100 (Hitachi, Tóquio, Japão) em uma tensão de aceleração entre 5–15 kV (Clasen e Kesel, 2019).

### *2.2.4 APLICAÇÃO DO "SEEDPRIMING" NAS SEMENTES*

Colocaram-se 32 sementes em frascos de vidro com capacidade de 25 mL. Em seguida pipetou-se 10 mL das dispersões dos tratamentos com o auxílio da micropipeta. Isolou-se

o frasco da luz com papel de alumínio para simular o escuro. Por fim, colocou no agitador por 24h.

Na Figura 2.1 apresenta-se simplificada os tratamentos do estudo como as suas concentrações.

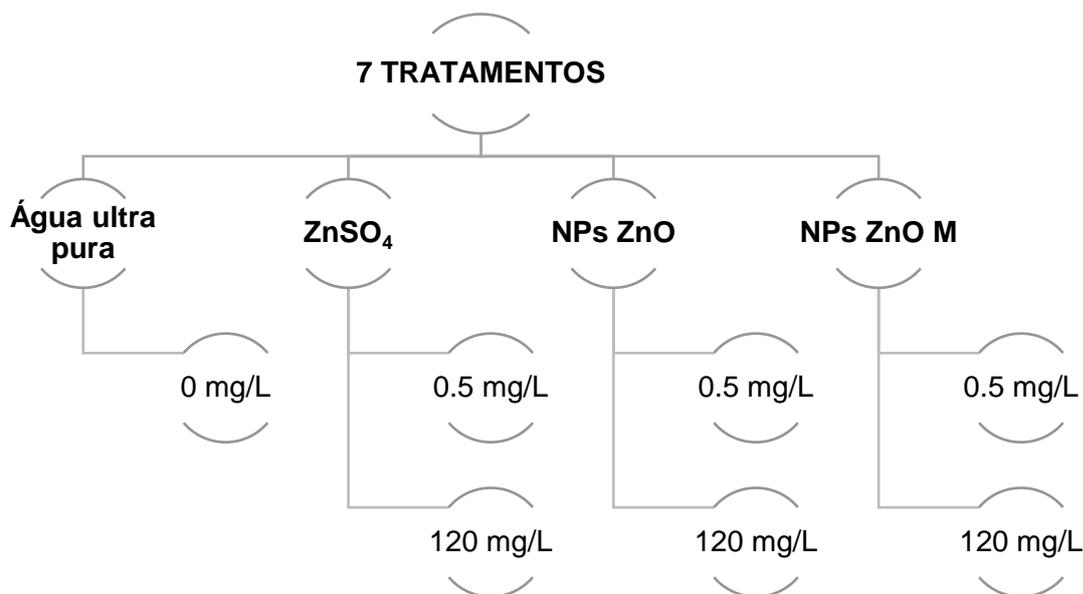


Figura 2.1 - Tratamentos aplicados nas sementes de tomate cereja da espécie *Solanum lycopersicum* L. e respectivas concentrações.

### 2.2.5 MÉTODO DO TESTE DE GERMINAÇÃO

Após as 24h retiraram-se do agitador os frascos de vidro e verteu-se a solução num coador por forma a reter as sementes. Imediatamente foram lavadas três vezes com água ultrapura. Preparou-se 7 tinas de vidro de boro 3.3 da marca VWR com diâmetro de 190 mm e capacidade de 2L colocando duas folhas de papel branco de cozinha onde se humedeceu com 15 mL de água ultra pura fresca. Colocaram-se nas tinas as 25 sementes de cada tratamento distanciadas em filas, cinco colunas e cinco linhas com a parte mais estreita da semente virada para baixo. Isolou-se com película aderente para manter a humidade na tina e evitar a evaporação da água. Considerou-se o dia 0 da germinação das sementes.

Calculou-se diariamente a taxa de germinação que resultou da divisão entre o número de sementes germinadas pelo número de sementes totais. O valor final foi multiplicado por 100. O teste de germinação das sementes foi conduzido num fotoperíodo de 24h.

Mediu-se o comprimento das raízes utilizando o software Image J do dia 0 e 1, por forma a obter o índice de vigor da semente que é o resultado da multiplicação da taxa de germinação pela média do comprimento das raízes.

A biomassa seca foi obtida após colocar as sementes na estufa a 70°C durante 48h, a percentagem de água adveio da subtração da massa húmida com a massa seca a dividir pela massa húmida e multiplicado por 100. Estes parâmetros referem-se ao dia 0.

Por fim, determinou-se a concentração de zinco entre os dias 0 e 6 através da digestão ácida e seguida análise por ICP-MS.

#### 2.2.6 *MÉTODO DO TESTE DE CRESCIMENTO DAS PLANTAS*

As plantas de tomate cereja foram cultivadas durante 35 dias. Foi controlado o fotoperíodo através da lâmpada fluorescente LAMP. FLUOR T5 TL 54W/865 HO G5 com 6500K, 54,1W de potência e um fluxo de 4650 lúmen.

As sementes das plantas foram então expostas durante 6 dias ao sal de sulfato de zinco, às nanopartículas de ZnO e às nanopartículas de ZnO com mucilagem de sementes de manjeriço, sendo posteriormente transplantadas para areia previamente limpa como descrito na secção 2.2.7.

No 35º dia de crescimento, a altura da planta foi medida com suporte do software Image J onde foi possível medir o comprimento da parte aérea da planta.

#### 2.2.7 *LAVAGEM DA AREIA*

Para a sua limpeza, a areia de sílica de 0,7 mm de diâmetro foi lavada com ácido nítrico (5%), seca a 200°C na estufa e posteriormente lavada várias vezes com água ultra pura. A areia foi o meio de cultura escolhido para a transplantação das plântulas do tomateiro, por forma a garantir que não existia outras fontes de Zn e, por conseguinte, as plantas obtidas só tiveram o zinco disponível proveniente da aplicação do “*seed priming*” na semente.

### **2.2.8 ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO DE Z<sub>N</sub> NAS SEMENTES, PLÂNTULAS E PLANTAS POR ICP-MS**

A análise visa a concentração de Zn nas sementes, plântulas, plantas e areia. Primeiramente, separam-se 5 réplicas das sementes, 5 réplicas das plântulas e 3 réplicas das plantas respetivas a cada tratamento e foram colocadas num tubo de eppendorf. Pesou-se e colocou-se na estufa a 70°C por 24h.

De seguida, as amostras das sementes, plântulas e plantas (rebentos e raízes) foram digeridas. 2 sementes e 1 plântula foram tratadas com 1 mL de HNO<sub>3</sub> 65% e 0.5 mL de HCl 37% enquanto as plantas com 1 mL de HNO<sub>3</sub> 70% e 350 µL de HCl 32% durante 12h. Após o esse tempo colocaram-se no micro-ondas (Speedwave 4, Berghef).

O programa de aquecimento utilizado para a digestão ácida foi: TMAX = 190 °C, tempo de rampa = 5 min, tempo de espera = 15 min, potência = 90 W.

Em seguida, as amostras foram arrefecidas durante 30 min à temperatura ambiente e o volume foi perfeito até 25 mL de água ultra pura. As medições foram realizadas em duplicado para as sementes, triplicado para as plântulas e plantas (Martins et al., 2020).

Finalmente, foram analisadas pelo ICP-MS. O teor total de zinco em pós liofilizados foi determinado por Espectrometria de massa de plasma acoplado indutivamente (ICP-MS, série Thermo-X).

### **2.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

A análise da variância unidirecional (ANOVA) foi realizada utilizando o software Microsoft Excel. As diferenças significativas foram testadas usando um modelo linear geral e os tratamentos foram comparados usando o modelo de teste t com o nível de significância de 5% de probabilidade ( $p \leq 0,05$ ). Os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média. O Microsoft Excel foi também utilizado para visualização dos dados e realização dos gráficos.

Na Tabela 2.1 foi elaborado uma síntese com os parâmetros estudados e métodos aplicados nesta dissertação.

Tabela 2.1 - Resumo do plano experimental com os tratamentos ZnSO<sub>4</sub>, NP ZnO e NP ZnO M (concentração de exposição 0.5 e 120 mg/L). Adaptado de Raliya et al., 2015.

<b>Método</b>	<b>Parâmetros quantificados ou técnica usada</b>	<b>Objetivos</b>
Aplicação do sulfato de zinco e das nanopartículas ZnO e ZnO M nas sementes	"Seedpriming"	Retenção ou absorção de Zn na semente (24h).
Germinação das sementes	Índice de germinação; Vigor da semente; Biomassa seca; % de água.	Estudar o impacto da aplicação de NP ZnO e NP ZnO M na germinação da semente.
Estudo fenológico	Altura da planta; Comprimento das raízes; Biomassa seca; % de água.	Estudar o impacto da aplicação de NP ZnO e NP ZnO M no crescimento da plantas.
Avaliação da influência dos diferentes materiais aplicados (ZnO e ZnO M ou de ZnSO <sub>4</sub> ) na absorção e transporte de Zn no interior da planta (entre a raiz e as folhas)	Digestão ácida e análise de Zn por ICP-MS.	Estudo da distribuição de Zn nos tecidos vegetais;

### 3. APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

#### 3.1. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

##### 3.1.1 CARACTERIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE DAS NANOPARTÍCULAS ATRAVÉS DAS TÉCNICAS DE TEM-EDS E POTENCIAL ZETA

A análise do TEM teve como objetivo comprovar a eficiência do processo de revestimento das NPs ZnO com mucilagem. Na micrografia utilizando a captura de imagem no modo TEM (Figura 3.2 A) foi possível observar que a integridade das NPs ZnO foi mantida, assim como a camada de mucilagem na superfície das nanopartículas. Na Figura 3.2 B é possível observar a micrografia no modo MEV (Módulo de Análise Integrante do Equipamento de TEM), onde é mostrada a superfície lisa da mucilagem nas nanopartículas, bem como um ligeiro relevo do ZnO.

O tamanho médio das NPs ZnO puras (Figura 3.1) usadas neste trabalho é  $69.22 \pm 41.32$  nm com uma carga de superfície de  $8.26 \pm 0.552$  mV. Após revestir as nanopartículas com mucilagem, o seu tamanho mudou para  $98.72 \pm 1.15$  nm e sua carga superficial para  $-9.96 \pm 0.304$  mV, o que confirma ainda mais a eficiência do processo de revestimento da mucilagem, uma vez que sua carga negativa vem de grupos hidróxilo dos componentes da mucilagem. A camada de mucilagem tinha um tamanho médio de  $16.05 \pm 2.53$  nm (Hatami et al., 2017).

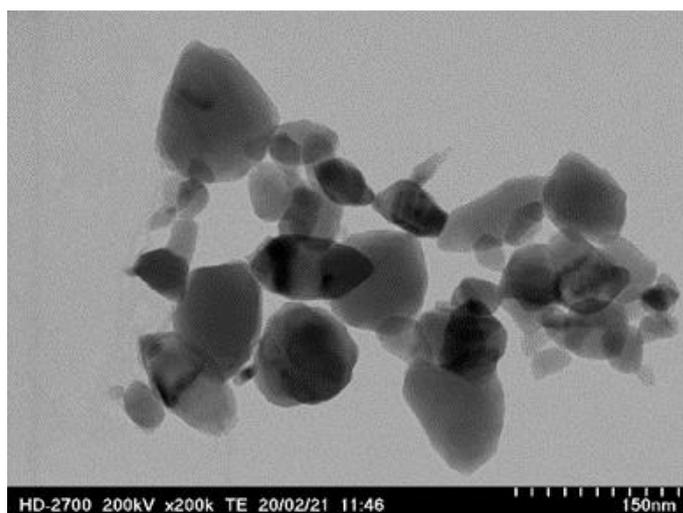


Figura 3.1 - Micrografia de TEM das NPs ZnO puras

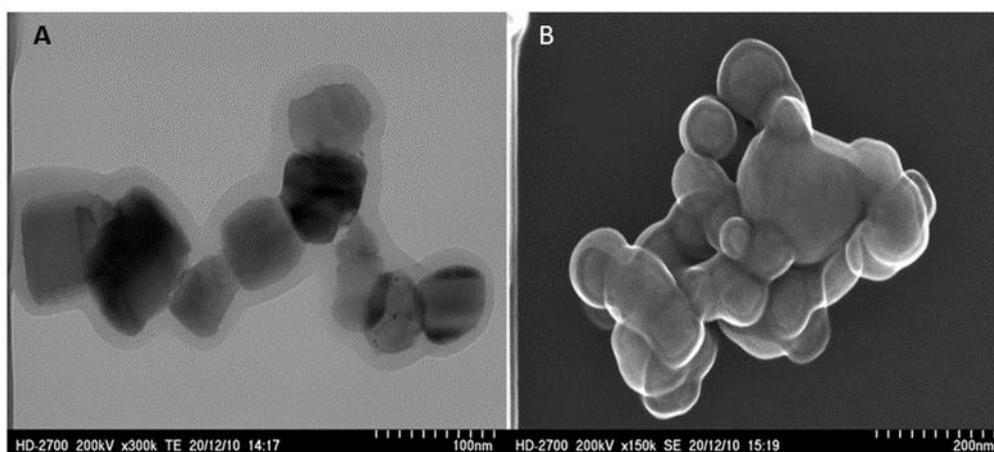


Figura 3.2 – Micrografias TEM das NPs ZnO M em modo de captura de imagem

Através da análise do gráfico EDS (Figura 3.3 A) é possível identificar os mesmos picos contidos das NPs ZnO nas NPs ZnO M, sendo a única diferença o aumento da intensidade dos picos C (carbono) e O (oxigénio) para as nanopartículas cobertas de mucilagem, o que era esperado porque a mucilagem contém hidratos de carbono nos seus componentes causando o aumento da concentração de cadeias de carbono nas nanopartículas. Os picos do zinco são 1.02, 8.63 e 9.72 keV (Tantiwatcharothai e Prachayawarakorn, 2019). Realça-se que os picos característicos de Au (ouro) provêm das grelhas de suporte de ouro utilizadas na análise do TEM.

Na análise do mapeamento de EDS (Figura 3.3 B) é possível identificar em vermelho o Zn pertencente às nanopartículas. Na Figura 3.3 C é possível identificar em verde mais intenso em torno das nanopartículas o C proveniente dos hidratos de carbono mucilaginosos e em vermelho o Zn das nanopartículas (Tantiwatcharothai e Prachayawarakorn, 2019).

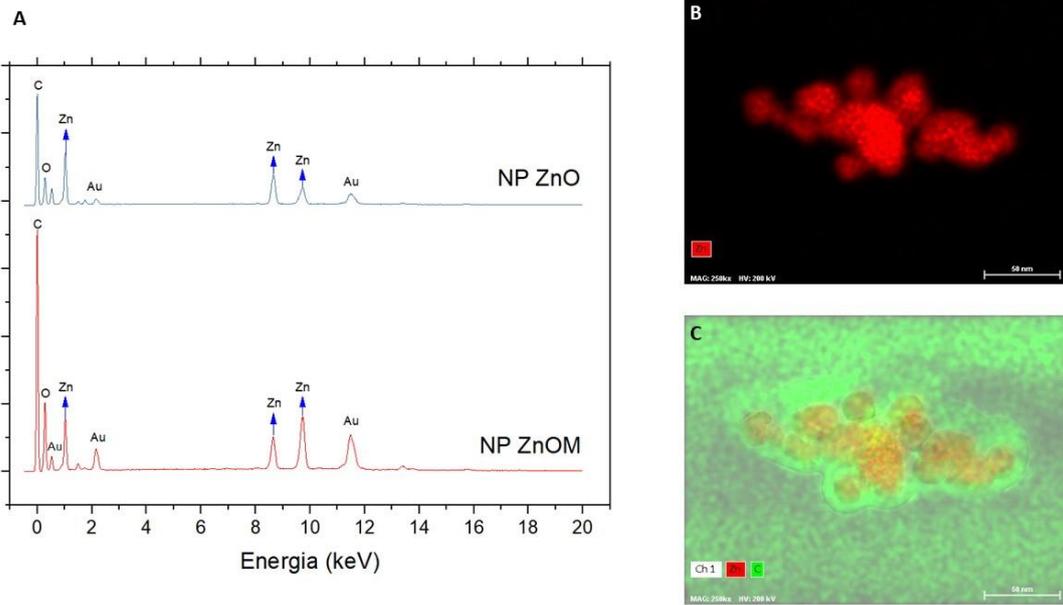


Figura 3.3 - Análise da NP ZnO M: A) Espectrograma EDS da NP ZnO e NP ZnO M B) Mapeamento EDS para o elemento Zn (Zn- vermelho); C) Mapeamento EDS para os elementos Zn e C (Zn- vermelho e C verde).

### 3.2. RESULTADOS DO "SEEDPRIMING" NAS SEMENTES E PLÂNTULAS

#### 3.2.1 ABSORÇÃO DE Zn PELA SEMENTE APÓS O "SEEDPRIMING" - BIOMASSA, % ÁGUA, [Zn] NAS SEMENTES

A Figura 3.4 representa a média da biomassa seca nas sementes. O valor médio de biomassa seca do tratamento controlo, ou seja, a água é aproximadamente  $1.12 \pm 0.197$  mg. Dos três tipos de tratamentos, apenas as NPs de ZnO M com concentração de 120 mg/L ultrapassam o valor do controlo (água) de  $1.15 \pm 0.21$  mg. Contudo, o mesmo tratamento, mas com a concentração de Zn de 0.5 mg/L apresenta um valor de biomassa seca das sementes  $0.909 \pm 0.103$  mg, um resultado ligeiramente mais baixo comparativamente com o controlo. Para estes resultados foi realizada a análise de variância (Anova de fator único) que mostrou as diferenças entre os tratamentos não são estatisticamente significativas para um  $p < 0.05$ . Portanto, estes resultados indicam que nenhum dos tratamentos causou impacto significativo na biomassa seca das sementes após o "seedpriming".

A percentagem de água nas sementes após 24h de "seedpriming" está representada na Figura 3.5. Com base na análise de variância não se observaram diferenças significativas na percentagem de água nas sementes sujeitas aos diferentes tratamentos. Estes resultados sugerem que o tipo de tratamento não influenciou a absorção/retenção de água pela semente.

A concentração de Zn determinado nas sementes depois de 24h de "seedpriming" e após lavagem com água ultra pura, está representada na Figura 3.6. Observa-se que as sementes com tratamento de controlo (água), apresentam uma concentração de Zn mais baixa do que os restantes tratamentos, como expectável. O tratamento com as NPs ZnO de 120 mg/L apresentou a maior concentração de Zn na semente ( $3.70 \pm 0.906$  µg/kg) em comparação com os restantes. O tratamento com NPs ZnO M de 120 mg/L registou ainda que a seguir ao tratamento com NPs ZnO de 120 mg/L um grande conteúdo de Zn na semente, cerca de,  $2.28 \pm 0.210$  µg/kg.

Os tratamentos com ZnSO<sub>4</sub> 0.5 mg/L, NP ZnO 0.5 mg/L e NP ZnO M 0.5 mg/L comparados com o controlo não apresentam diferenças estatisticamente significativas. Por outro lado, todos os tratamentos com uma concentração de Zn de 120 mg/L apresentam diferenças significativas relativamente ao controlo ( $p < 0.05$ ). O mesmo acontece quando se compara os tratamentos com uma concentração de Zn de 120 mg/L, para os três tipos de materiais,

que apresentam diferenças estatisticamente significativas entre si, sendo que o material NP ZnO foi aquela a que esteve associada a maior concentração de Zn na semente.

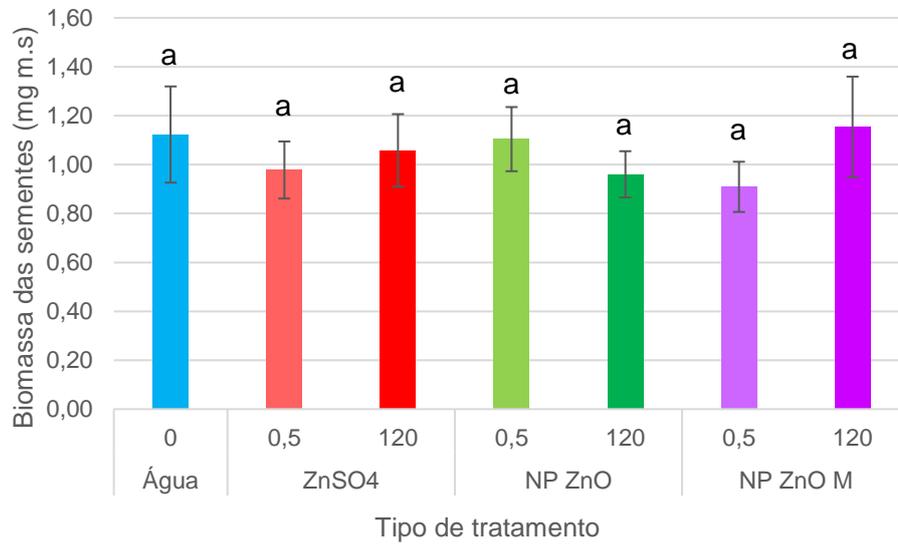


Figura 3.4–Biomassa seca das sementes após 24h de “seedpriming”. Nos resultados são apresentados os valores médios (n = 8). As barras de erro representam o desvio padrão. A concentração de zinco nos diferentes tratamentos é apresentada em mg/L. m.s=massa seca.

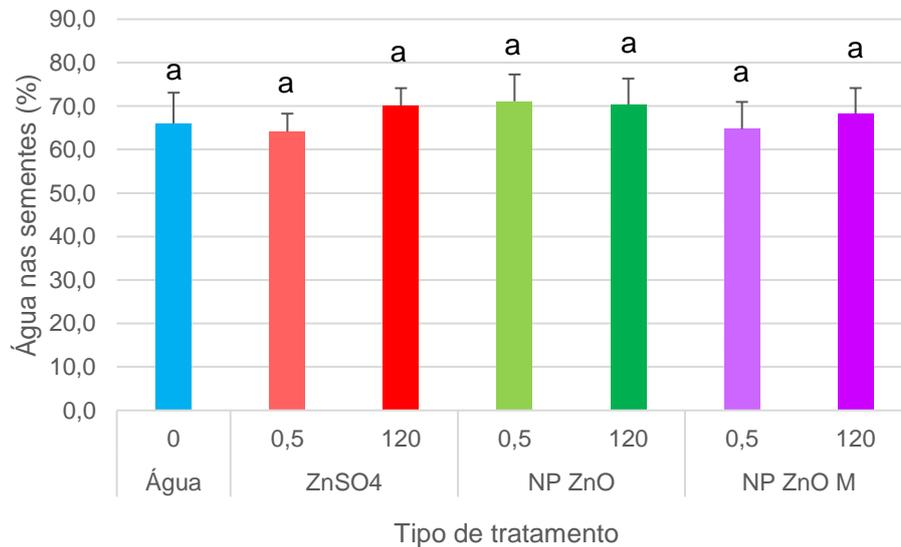


Figura 3.5 – Percentagem de água nas sementes em 24h de “seedpriming”. As barras de erro representam o desvio padrão. n = 8. A concentração de zinco nos diferentes tratamentos é apresentada em mg/L.

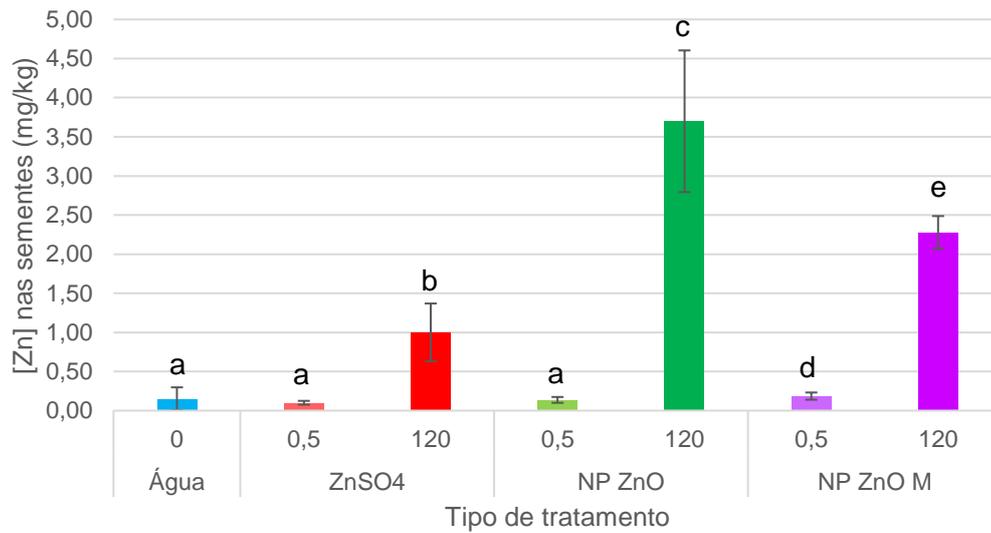


Figura 3.6 - Média da concentração de Zn nas sementes após 24h de “seed priming”. As barras de erro representam o desvio padrão.  $n = 2$ . A concentração de zinco nos diferentes tratamentos é apresentada em mg/L. Os dados indicados pelas letras distintas são significativamente diferentes a  $p < 0,05$  de acordo com a Anova, teste estatístico de fator único.

Na Figura 3.7 observa-se as morfologias das fibras da superfície da semente analisadas para os tratamentos NPs ZnO e NPs ZnO M com concentração de 120 mg/L, resultado obtido através da técnica aplicada para microscopia SEM, ou seja, microscopia eletrónica de transmissão.

A Figura 3.7A e a Figura 3.7C mostram a semente na sua totalidade e a Figura 3.7B e Figura 3.7D são as ampliações a 15k vezes das superfícies das sementes. As estruturas de coloração mais clara sinalizadas com um círculo na Figura 3.7B e Figura 3.7D evidenciam a presença de supostos agregados de NPs na superfície da semente.

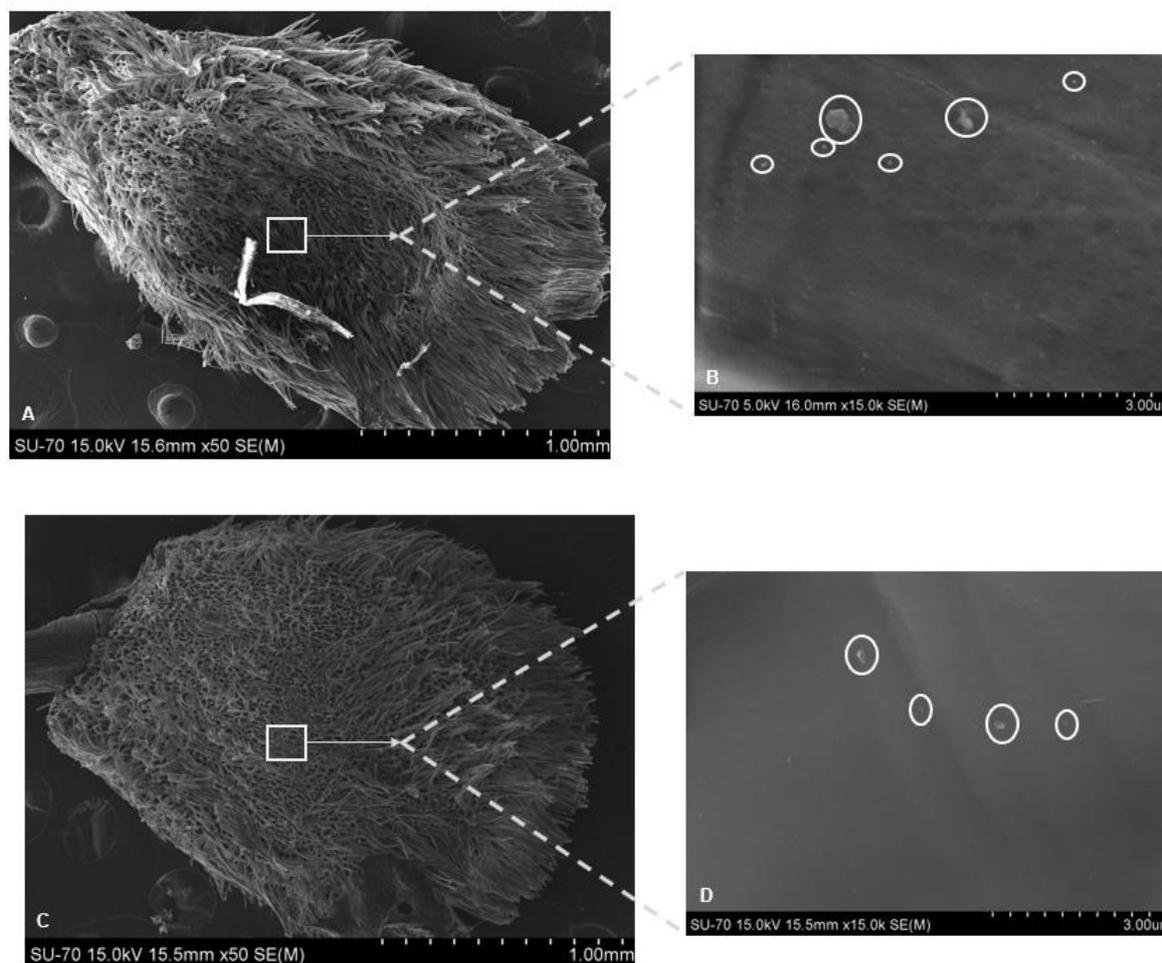


Figura 3.7 - Microfotografias de SEM da semente após o processo de “seedpriming” com as NPs ZnO (A e B) e as NPs ZnO M (C e D) na concentração de 120 mg/L. A e C – Imagens panorâmicas da superfície da semente com aumento de 50 x; B e D - Ampliação da superfície da semente com um aumento 15k x. Os círculos brancos representam supostos agregados de NPs de ZnO e de NPs ZnO M (Tantiwatcharothai e Prachayawarakorn, 2019).

Na Figura 3.8 verifica-se que na superfície da semente no dia 0 da germinação o Zn é detetado somente nos tratamentos com NPs ZnO e de NPs ZnO M de concentração de 120 mg/L. Com a técnica EDS não é visível Zn nos restantes tratamentos, como por exemplo, no sulfato de zinco em que o ião zinco é dissolvido imediatamente. No caso das NPs, a sua dissolução é gradual (Shukla et al., 2019). O espectrograma de EDS valida a confirmação de zinco observado na microscopia SEM.

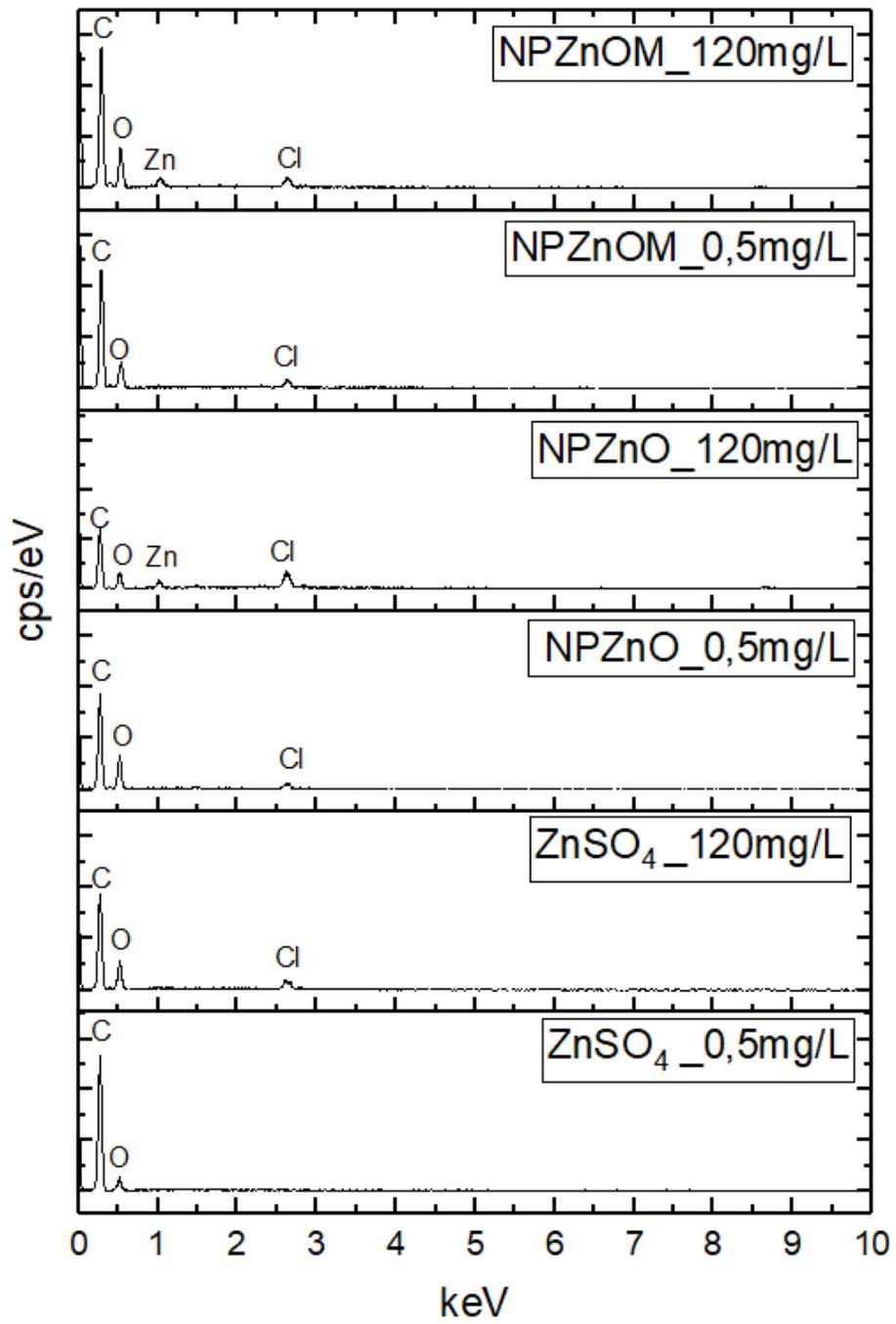


Figura 3.8 –Espectrograma de EDS das sementes após o processo de “seedpriming” com ZnSO<sub>4</sub>, NP ZnO, NP ZnO M com concentrações 0.5 e 120 mg/L

### 3.2.2 GERMINAÇÃO E VIGOR DAS SEMENTES

A Figura 3.9 apresenta os resultados de germinação das sementes anteriormente sujeitas ao “*seedpriming*”. A germinação foi iniciada no dia 0. Nesse mesmo dia foram contabilizadas as sementes que iniciaram o processo de germinação, ou seja, quando já apresentaram uma raiz branca de dimensão muito pequena e durante os 6 dias este processo repetiu-se diariamente.

O gráfico sugere que a taxa de germinação das sementes de tomate cereja poderá ser superior com as nanopartículas de óxido de zinco de 0.5 mg/L (Figura 3.9B). O valor máximo de germinação foi de  $88.0 \pm 12.7\%$  e ocorreu ao dia 6 após tratamento com as NPs ZnO. Verifica-se que a taxa de germinação com as NPs ZnO M 0.5 mg/L ao sexto dia de germinação apresentou um valor mais baixo, mas favorável, nomeadamente  $84.0 \pm 14.4\%$ . As sementes com tratamento de ZnSO<sub>4</sub> demonstraram as taxas mais baixas de germinação ( $80.0 \pm 15.7\%$ ). Como se pode visualizar no gráfico a taxa de germinação com as NPs ZnO foi mais rápida, isto é, ao dia 3 as NPs ZnO 80% das sementes estavam germinadas, enquanto, com o ZnSO<sub>4</sub> esse valor apenas se igualou após dois dias, ou seja, no dia 5.

O índice de vigor das sementes expressa o nível de desempenho e atividade das sementes durante a germinação e emergência das plântulas (Waqas et al., 2019). O índice de vigor das sementes no dia 1 após “*seedpriming*” é aqui apresentado na Figura 3.10. As sementes preparadas ZnSO<sub>4</sub>, com concentração de 0.5 mg/L são as que apresentam o maior índice de vigor em comparação com os restantes tratamentos. Semelhante à taxa de germinação, as sementes preparadas com NPs ZnO M com concentração de 0.5 mg/L apresentam em segundo lugar o índice de vigor mais elevado. Os resultados estatísticos mostraram que estas diferenças não são significativas diferentes entre os tratamentos testados, ou seja, controlo (água), ZnSO<sub>4</sub>, NPs ZnO e NPs ZnO M, na gama de concentrações em estudo.

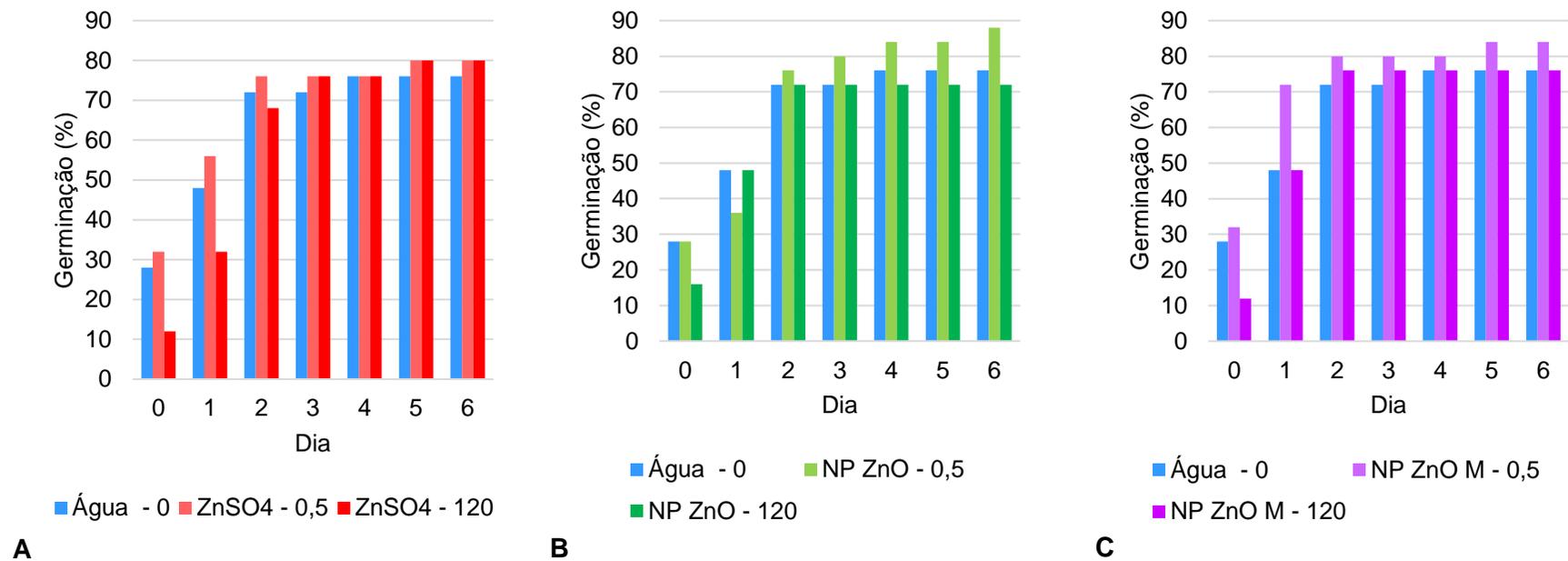


Figura 3.9 – Impacto do ZnSO<sub>4</sub> (A); NPs ZnO (B) e NPs ZnO M (C) na germinação das 25 sementes entre os dias 0 e 6. A concentração de zinco nos diferentes tratamentos é apresentada em mg/L.

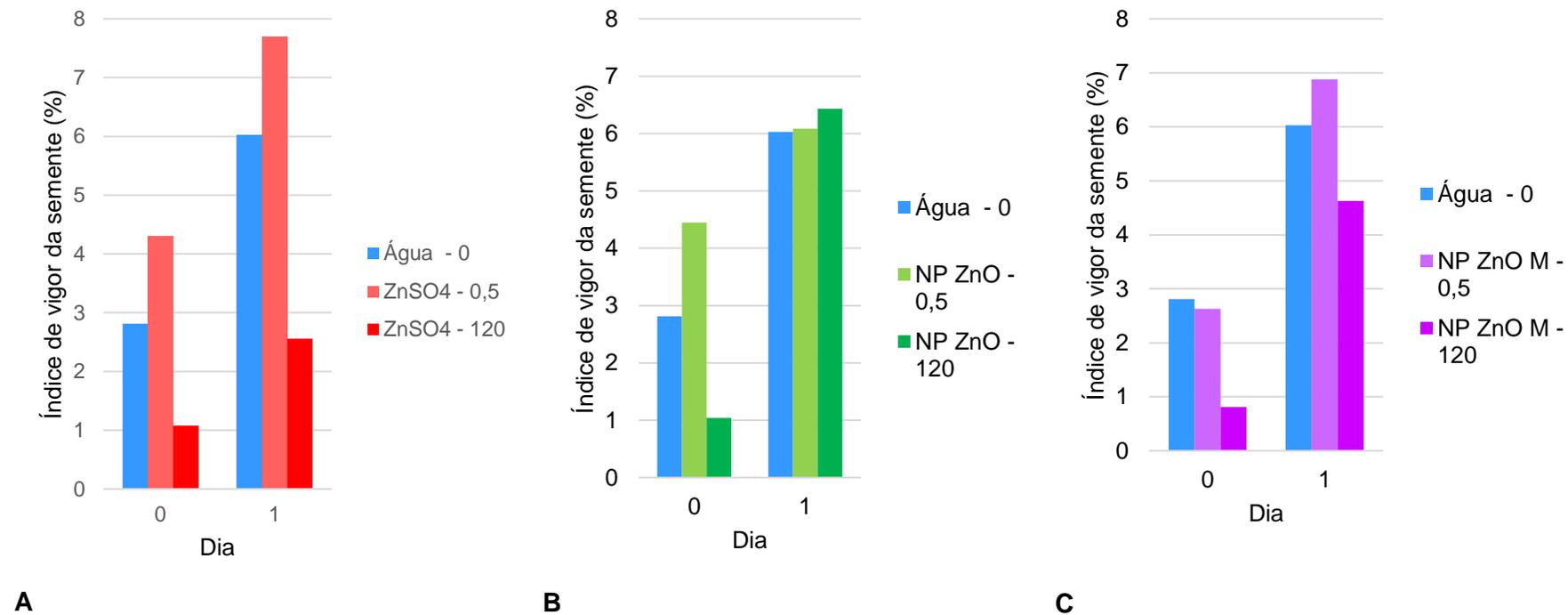


Figura 3.10 - Impacto do ZnSO<sub>4</sub> (A); NPs ZnO (B) e NPs ZnO M (C) no vigor das 25 sementes nos dias 0 e 1 da germinação. A concentração de zinco nos diferentes tratamentos é apresentada em mg/L

### 3.2.3 BIOMASSA SECA, PERCENTAGEM DE ÁGUA E CONCENTRAÇÃO DE ZN NAS PLÂNTULAS

Na Figura 3.11, são apresentados os valores médios da biomassa seca correspondente às plântulas. O ZnSO<sub>4</sub> em ambas concentrações causou valores de biomassa seca das plântulas significativamente ( $p < 0.05$ ) menores do que os restantes tratamentos, incluindo o controlo (água). Para as duas concentrações (0.5 e 120 mg/L) não ocorrem diferenças significativas entre si.

A retenção de água nas plântulas expressa em percentagem é apresentada na Figura 3.12. Através da análise de variância, verificou-se que existem diferenças significativas na retenção de água nas plântulas entre o tratamento de controlo e o tratamento com ZnSO<sub>4</sub> 0.5 mg/L. O tratamento com NPs ZnO reteve a menor percentagem de água, contudo não há diferenças estatisticamente significativas.

A concentração de zinco nas plântulas é apresentada na Figura 3.13. Verificou-se que há diferenças significativas entre o controlo e os tratamentos com a concentração de 120 mg/L com base no teste de variância observa-se que são os valores dos tratamentos são estatisticamente superiores ao valores do controlo (água).

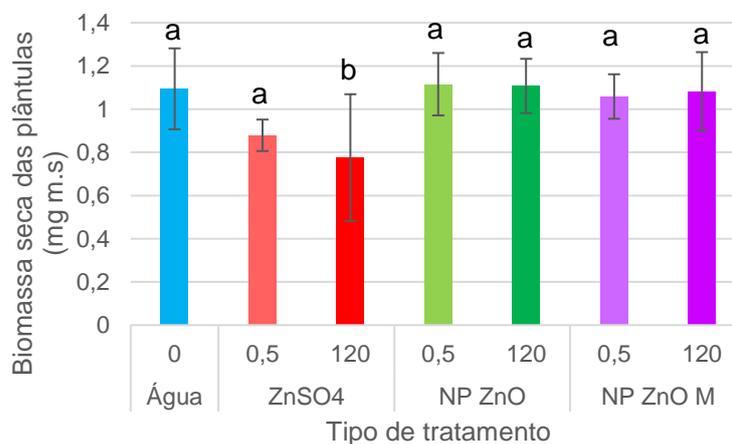


Figura 3.11 – Impacto dos tratamentos sob a biomassa seca nas plântulas após 6 dias de germinação. As barras de erro representam o desvio padrão. n = 5. A concentração de zinco nos diferentes tratamentos é apresentada em mg/L. m. s=massa seca

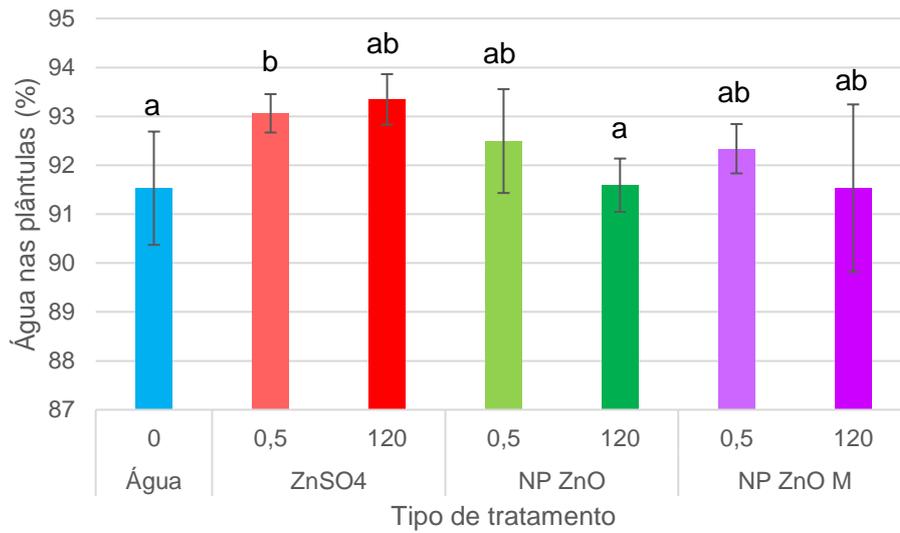


Figura 3.12 – Média da porcentagem de água nas plântulas após 6 dias de germinação. As barras de erro representam o desvio padrão. n = 5. A concentração de zinco nos diferentes tratamentos é apresentada em mg/L.

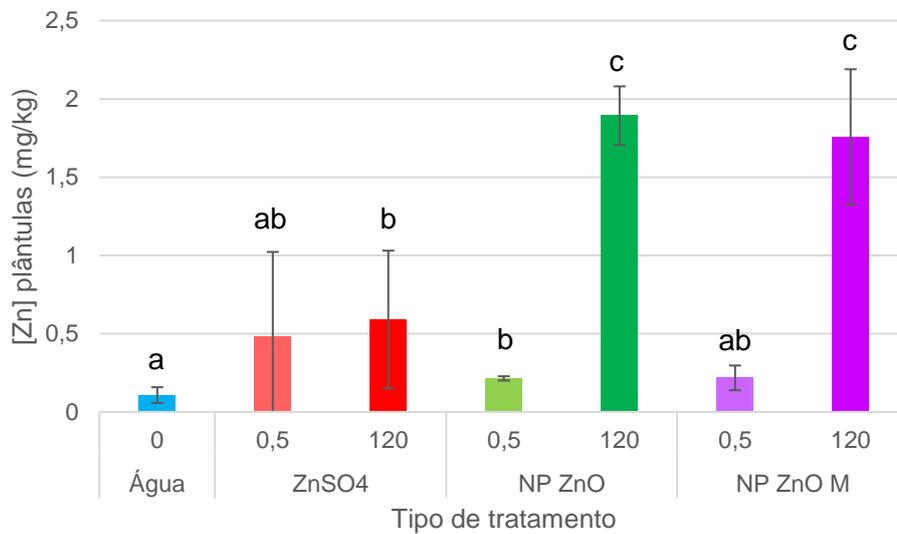


Figura 3.13 - Média da concentração de Zn nas plântulas após 6 dias de germinação. As barras de erro representam o desvio padrão. n = 3. A concentração de zinco nos diferentes tratamentos é apresentada em mg/L.

### 3.3. CRESCIMENTO DAS PLANTAS

#### 3.3.1 BIOMASSA SECA E CONCENTRAÇÃO DE ZINCO NAS RAÍZES

Na Figura 3.14 é representada a média da biomassa seca das raízes após a sua colheita, isto é, ao 35º dia de crescimento. As NPs ZnO M em ambas as concentrações comparadas com o controlo (água) desencadeiam valores de biomassa seca das plântulas significativamente ( $p < 0.05$ ) diferentes. Contudo, o tratamento de 120 mg/L com NPs ZnO M, isto é, nanopartículas de óxido de zinco revestidas com mucilagem de sementes de manjeriço foi o que impulsionou ao maior desenvolvimento da raiz,  $84.1 \pm 23$  mg de massa seca. Para os tratamentos com  $ZnSO_4$ , NPs ZnO e NPs ZnO M com concentração de 0.5 mg/L também há diferenças estatisticamente significativas entre si, no entanto quando comparadas com o controlo não se afirma o mesmo, isto é, há variabilidade nos resultados, mas a média não é significativamente diferente.

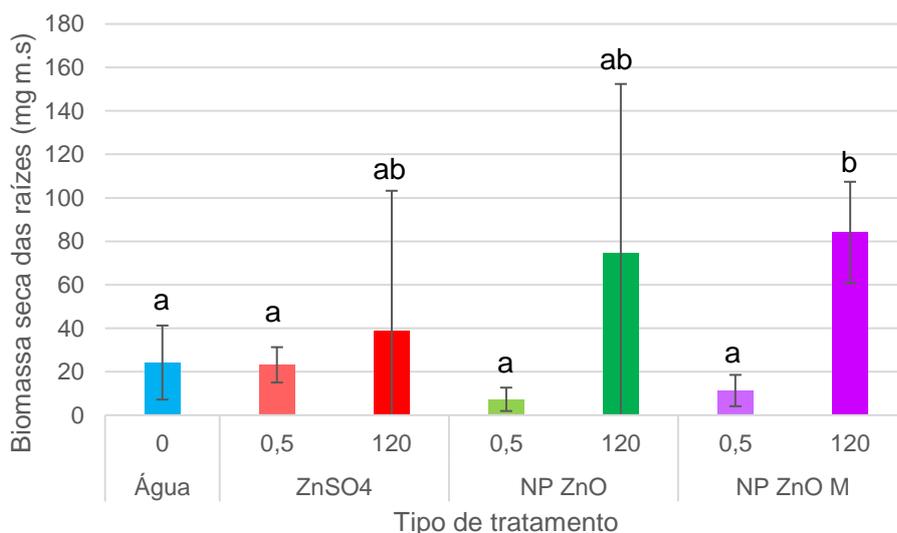


Figura 3.14- Impacto dos tratamentos sob a biomassa seca nas raízes após 35 dias de crescimento. As barras de erro representam o desvio padrão.  $n = 4$  para água e  $n=3$  para os restantes tratamentos. A concentração de zinco nos diferentes tratamentos é apresentada em mg/L. m.s=massa seca.

Seguidamente, na Figura 3.15 está a concentração de zinco nas raízes das plantas após a sua colheita. O tratamento com NPs ZnO M 0.5 mg/L é o que apresenta valor superior em relação aos restantes. Não há significatividade estatística nas diferenças exibidas.

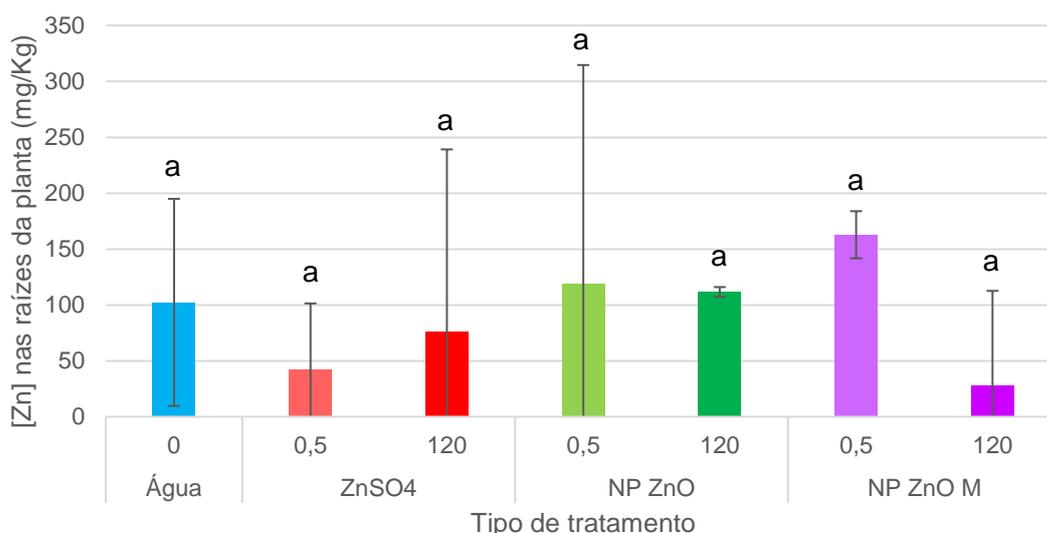


Figura 3.15 - Média da concentração de Zn nas raízes das plantas após 35 dias de crescimento. As barras de erro representam o desvio padrão.  $n=4$  para água e  $n=3$  para os restantes. A concentração de zinco nos diferentes tratamentos é apresentada em mg/L.

### 3.3.2 BIOMASSA SECA, PERCENTAGEM DE ÁGUA, COMPRIMENTOS E CONCENTRAÇÃO DE ZINCO NA PARTE AÉREA

A Figura 3.16 apresenta os valores médios de biomassa seca correspondentes à parte aérea da planta no dia da colheita. Em maior destaque está a parte aérea que foi tratada com NPs ZnO M cuja concentração foi de 120 mg/L, onde foi possível obter  $0.143 \pm 0.062$  g de massa seca. Os valores mais baixos de biomassa seca correspondem aos tratamentos com concentração de 0.5 mg/L para as NPs ZnO e as NPs ZnO M,  $0.024 \pm 0.09$  e  $0.025 \pm 0.004$ , respetivamente. A análise estatística de todos os tratamentos afirma que o controlo (água) em comparação as NPs ZnO 0.5 mg/L e as NPs ZnO M 120 mg/L possuem diferenças com relevância estatística. Por fim, as NPs ZnO M de 0.5 e 120 mg/L são também significativamente diferentes.

A percentagem de retenção de água na parte aérea da planta é possível ser visualizada na Figura 3.17. O tratamento com sulfato,  $ZnSO_4$ , com concentração de 0.5 mg/L registou o maior valor de água retida na parte superior. Não há variabilidade nos resultados pelo que estatisticamente não surgem diferenças significativas.

O comprimento (Figura 3.18) referente à parte aérea da planta calculado em cm colocou o tratamento com NPs ZnO M de concentração 120 mg/L em destaque, ou seja,  $13.5 \pm 4.4$

cm. Por outro lado, este tratamento, mas com concentração 0.5 mg/L correspondeu ao segundo valor mais baixo,  $4.63 \pm 0.69$  cm. Entre estas concentrações existem diferenças estatisticamente significativas.

Na Figura 3.19 são apresentados os valores médios da concentração de zinco na parte aérea da planta. O tratamento com NPs ZnO M de concentração 0.5 mg/L contém a maior massa de zinco, isto é,  $162.8 \pm 21.1$  mg/kg. Há variabilidade nos resultados, ligeiras variações, mas, estatisticamente a média não é significativamente diferente.

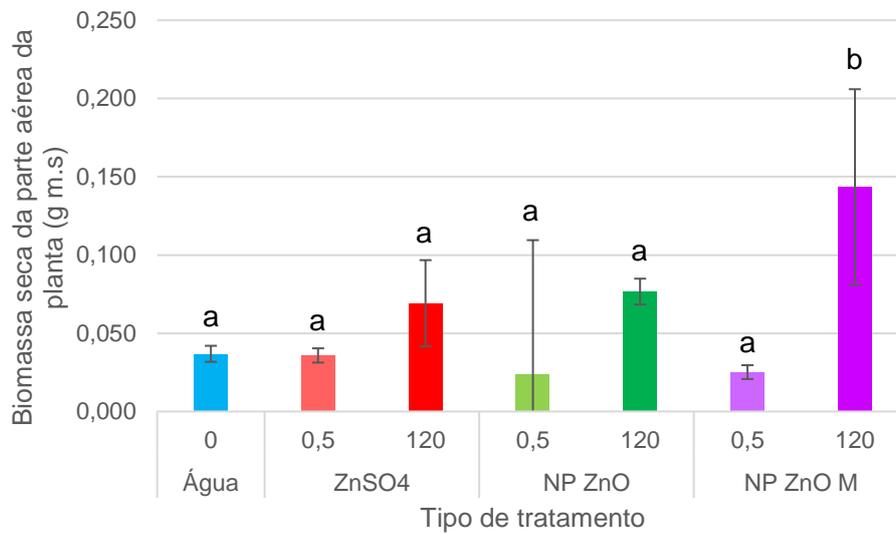


Figura 3.16 - Média da biomassa seca da parte aérea da planta. As barras de erro representam o desvio padrão.  $n = 4$  para água e  $n=3$  para os restantes tratamentos. A concentração de zinco nos diferentes tratamentos é apresentada em mg/L.

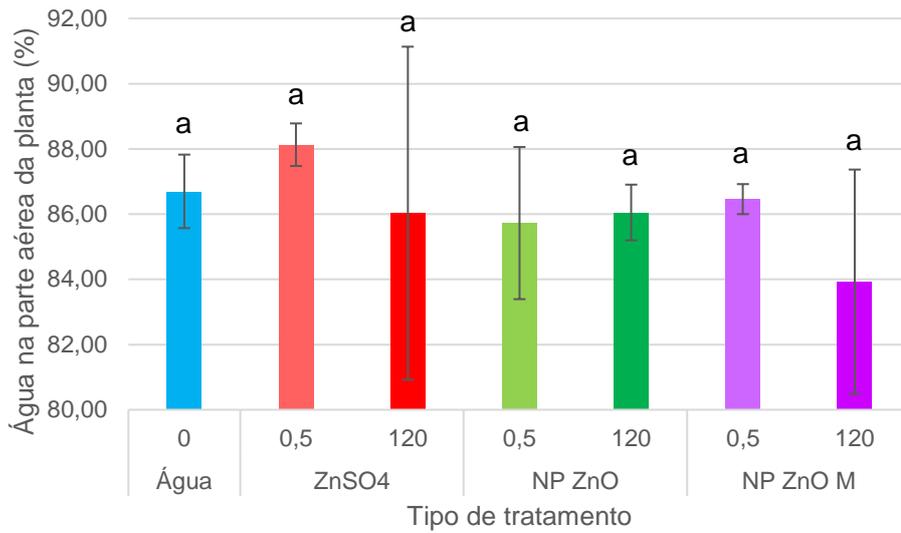


Figura 3.17 – Média da percentagem de água na parte aérea da planta. As barras de erro representam o desvio padrão. n = 4 para água e n=3 para os restantes tratamentos. A concentração de zinco nos diferentes tratamentos é apresentada em mg/L.

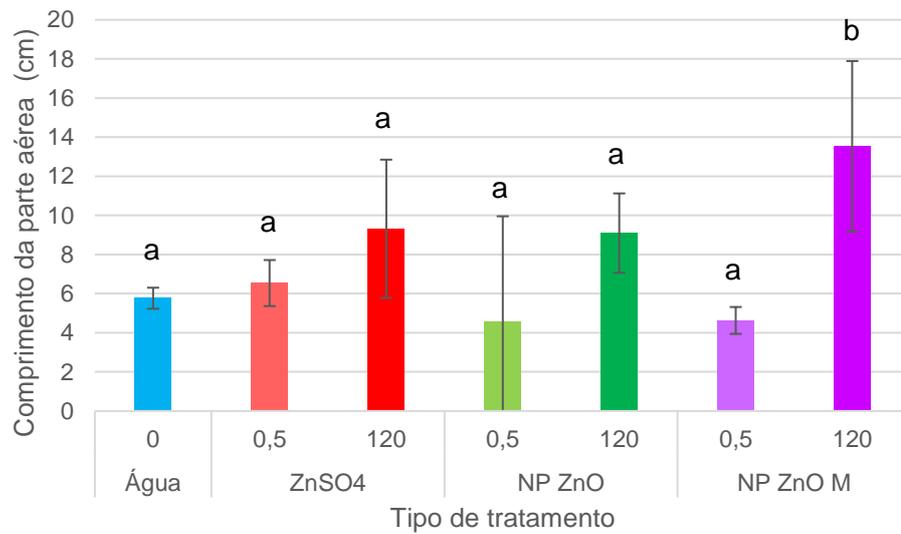


Figura 3.18– Média dos comprimentos da parte aérea da planta. As barras de erro representam o desvio padrão. n = 4 para água e n=3 para os restantes tratamentos. A concentração de zinco nos diferentes tratamentos é apresentada em mg/L.

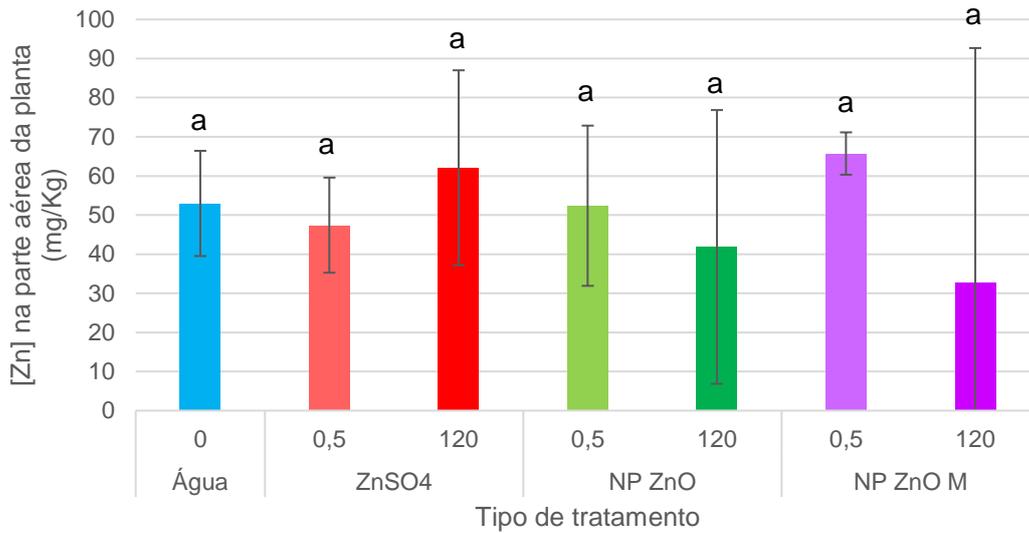


Figura 3.19 - Média da concentração de Zn na parte aérea das plantas após 35 dias de crescimento. As barras de erro representam o desvio padrão. n=4 para água e n = 3 para os restantes. A concentração de zinco nos diferentes tratamentos é apresentada em mg/L.

Os indicadores de crescimento das plantas como a biomassa seca das plântulas, o comprimento da parte aérea da planta e a biomassa seca das raízes secas obtiveram um aumento considerável com os tratamentos NPs ZnO M 120 mg/L, NPs ZnSO<sub>4</sub> 0.5mg/L e NPs ZnO M 120 mg/L respetivamente em comparação com as plantas de controlo (Figura 3.11, Figura 3.18, Figura 3.14).

## 4. DISCUSSÃO

### 4.1. Vantagens da utilização de Zn na forma de nanopartículas (NPs ZnO) em “*seedpriming*”, comparativamente com a aplicação de Zn na forma iónica (ZnSO<sub>4</sub>)

A primeira vantagem da aplicação de NPs ZnO comparativamente ao ZnSO<sub>4</sub>, é o facto da taxa de germinação aumentar em 8%. A concentração de Zn retida na semente foi também significativamente superior, cerca de 3.7 vezes maior do que nas sementes tratadas com ZnSO<sub>4</sub>, sugerindo que, o Zn aplicado na forma de nanopartículas foi retido de forma mais eficiente, podendo assim ser utilizado pela semente na sua germinação e subsequentemente no crescimento da planta. Acharya et al realizaram vários estudos tanto em laboratório, como em estufas, e constataram que os parâmetros de germinação e crescimento das sementes de melancia foram também melhores após o tratamento com nanopartículas, neste caso de prata (Acharya et al., 2020). Este estudo sugeriu que o “*seedpriming*” com NPs contribui para taxas de germinação maiores e crescimento mais vigoroso das plantas, através de um impacto na atividade de enzimas tais como amilases, protéases e lípases que quebram macromoléculas para o crescimento e desenvolvimento do embrião (Acharya et al., 2020).

No tratamento com as nanopartículas houve mais zinco retido na semente, indicando um armazenamento de zinco mais eficiente pela semente que será posteriormente usado nas etapas seguintes para o desenvolvimento da planta. Os autores Elhaj Baddar e Unrine também verificaram que as nanopartículas com óxido de zinco permitem uma maior concentração de zinco associada à semente (Elhaj Baddar e Unrine, 2021). Raliya et al. mostraram que aplicação de NPs de ZnO em sementes a uma concentração de 100 mg/kg aumentaram a produção de fruta e a concentração Zn nos tecidos do tomate (Elhaj Baddar e Unrine, 2021).

Uma vantagem da maior retenção de Zn nas sementes tem a ver com o facto de que quando colocadas num solo pobre em Zn, as sementes preparadas com “*seedpriming*” de NP ZnO, contêm Zn que pode ser utilizado no desenvolvimento da planta, mesmo que este não exista no solo. O “*seedpriming*” alivia assim o stress na fase de germinação e, em última análise, resulta em taxas mais elevadas de emergência de plântulas, pelo que a formação de plântulas é mais bem sucedida (Acharya et al., 2020). No artigo de Elhaj Baddar e Unrine é mencionado que poucos estudos anteriores investigaram o tratamento de sementes com ZnO NPs antes do seu cultivo no solo. É referido pelos mesmo autores

que Taran et al. descobriram que sementes de trigo de Inverno que foram pré embebidas com NPs ZnO em 120 mg Zn/mL continham mais 61% de Zn nas suas folhas em comparação com o controlo (Elhaj Baddar e Unrine, 2021).

Outra vantagem da utilização de nanopartículas são os valores económicos. Acharya et al afirma que o custo comercial das nanopartículas torna este método economicamente viável (Acharya et al., 2020). Os resultados sugerem que quando o Zn foi aplicado na forma de ZnSO<sub>4</sub>, como se verifica pelos valores de concentração de Zn obtidos nos gráficos, uma parte do Zn aplicado foi perdida para as áreas circundantes, nomeadamente o papel, desperdiçando o Zn e como tal, impossibilitou a sua utilização pela semente.

Pereira et al, afirmam que as metodologias com as nanopartículas são mais económicas em comparação com os métodos químicos, para além de aumentar a biocompatibilidade e evitar a utilização de produtos químicos tóxicos (Pereira et al., 2021). Por conseguinte, Acharya et al mencionam também que a preparação de sementes com o “*seedpriming*” associado às nanopartículas pode ser rentável, apoiar o desenvolvimento sustentável da agricultura bem como melhorar o condições socioeconómicas dos agricultores. Este tipo de abordagem pode reduzir a lixiviação de uma grande quantidade de fertilizantes e nutrientes no ambiente e como tal o seu impacto ambiental (Acharya et al., 2020).

#### **4.2. Efeito do revestimento das nanopartículas de Zn (NPs ZnO) com mucilagem da semente do manjeriço**

No presente caso de estudo para além das NPs ZnO fez-se o revestimento com mucilagem das nanopartículas de óxido de zinco uma vez que se esperava que existisse um aumento da sua adesividade à superfície das sementes. No entanto, verificou-se que a retenção de Zn semente foi maior no caso em que apenas se aplicou NPs ZnO, isto é, sem estas estarem revestidas com a mucilagem das sementes de manjeriço, apesar do tratamento com NPs ZNO M ter tido um impacto mais positivo numa fase posterior de desenvolvimento da planta. Toma-se como hipótese que as NPs ZnO melhoraram a absorção de Zn após o “*seedpriming*”. Elhaj Baddar e Unrine mencionam que existem provas que a química da superfície das partículas influencia a absorção das nanopartículas pelas plantas (Elhaj Baddar e Unrine, 2021). A hipótese considerada para este fenómeno é que a mucilagem apesar de aumentar a adesividade à semente, ao mesmo tempo, também reduziu a absorção de Zn para o interior da semente numa fase inicial de germinação.

Por outro lado, na plântula a média da concentração de zinco nos tratamentos com as NPs ZnO e NPs ZnO M é idêntica. Quando se analisa a biomassa da planta da parte aérea toma-se como hipótese que a mucilagem contribuiu para um melhor desenvolvimento da planta, dado que o tratamento com NPs ZnO M de 120 mg/L obteve o maior rendimento.

#### **4.3. Efeito do “seedpriming” com NPs ZnO e NPs ZnO M na absorção de Zn pela semente ao longo do tempo e no crescimento da planta**

No 35º dia de crescimento das plantas, verificou-se que em média ambos os tratamentos com NPs ZnO e NPs ZnO M continham a casca da semente na raiz. É possível que a casca contivesse alguma concentração de zinco que não foi totalmente absorvida pela planta, contudo não é possível usar esta característica como hipótese para o maior desenvolvimento com o tratamento das NPs ZnO M nas plântulas e plantas. Assim, seria importante determinar a concentração de zinco na casca.

O estudo de Khadakovskaya et al sugeriu que as nanopartículas podem induzir alterações morfofisiológicas no comprimento da raiz, comprimento do caule, folha da biomassa fresca, bem como biomassa seca, atributos fotossintéticos e parâmetros bioquímicos dependendo da composição química, tamanho, tensão de contacto, reatividade e mais significativamente a dose de nanopartículas (Faizan et al., 2018).

Estudos anteriores indicam que sementes de tremçoço pré tratadas com suspensões de NPs ZnO com 60 mg Zn/L aumentaram em 39, 60, 40, e 66% o comprimento de raiz e dos rebentos, a biomassa seca de plantas inteiras e concentrações de Zn, respetivamente, em comparação com o controlo (Elhaj Baddar e Unrine, 2021). Isto pode ser particularmente importante em solos ácidos e/ou pobres em Zn. Elhaj Baddar e Unrine constataam que o pH do solo é uma chave determinante da biodisponibilidade Zn no solo. Neste artigo, é referido que tomates (*Solanum lycopersicum*) e o feijões (*Phaseolus vulgaris*) cultivados num solo naturalmente ácido (pH=5,4) tinham cerca de uma ordem de magnitude de Zn mais elevada no tecido foliar em comparação com plantas cultivadas num solo calcário (pH=8,3) (Elhaj Baddar e Unrine, 2021).

Quando analisado o papel da mucilagem este só é notório na fase da plântula e da planta. Coloca-se também a hipótese de que a própria mucilagem pode ter outros fatores que contribuem para um melhor desenvolvimento e crescimento da planta. É, portanto, necessário um estudo mais aprofundado para perceber a razão deste comportamento. Elhaj Baddar e Unrine fundamentam no seu artigo que nos estudos realizados com

rebentos de cevada da espécie *Hordeum vulgare* as concentrações de zinco foram 2,7 vezes superiores às dos controlos quando as sementes de cevada foram pré embebidas (“*seedpriming*”) com NPs ZnO naturais com 80 mg Zn/L. No entanto, concluíram que as NPs de ZnO não potenciaram o crescimento das plantas. (Elhaj Baddar e Unrine, 2021).

A mucilagem é um subgrupo de hidrocolóides contendo monossacarídeos ligados com ácidos orgânicos e estão próximos uns aos outros devido a componentes hidrofílicos e hidrocolóides que originam uma solução pegajosa ou um gel na presença de água (Tosif et al., 2021). Num estudo apresentado no artigo de Tosif et al foi observado que a mucilagem de sementes de manjeriço continha xilana (24.29%), glucano (2.31%) e glucamannan (43%) (Tosif et al., 2021). A composição da mucilagem das sementes de manjeriço no presente estudo aproxima-se à da literatura e estas características dispõem de uma influência nos resultados apresentados no capítulo 3. Pressupõe-se que os componentes hidrofílicos e hidrocolóides em conjunto com a capacidade de libertação progressiva das NPs retenham durante mais tempo e ainda na fase de semente, o ião Zn, disponibilizando-o por mais tempo devido a essa capacidade durante o seu período de vida. A mucilagem tem propriedades antibacterianas e antifúngicas que também pode prevenir ou reduzir o risco de doenças transmitidas por alimentos e deterioração alimentar (Tosif et al., 2021). Esta proteção ainda que, menos sujeita nos testes de laboratório realizados, poderá explicar a obtenção de plantas substancialmente mais vigorosas.

O tratamento com NPs ZnO M (120 mg/L) contribuiu para um aumento de 4 vezes no valor de biomassa seca das raízes e de 5 vezes de biomassa seca da parte aérea da planta comparativamente ao controlo com água. Este tratamento com NPs ZnO M promoveu ainda um aumento médio do comprimento da parte aérea da plantas em aproximadamente 7.8 cm em comparação com o tratamento com água.

Estes resultados sugerem que o tratamento das sementes com NPs ZnO M é o mais eficaz para o desenvolvimento da planta, associado a uma maior biomassa das raízes e das folhas.

## 5. CONCLUSÕES

Neste trabalho através dos ensaios realizados foi possível observar que a aplicação de Zn na forma de NPs ZnO promoveu uma maior taxa de germinação e uma maior retenção de Zn estando disponível nas fases posteriores do desenvolvimento da planta em comparação com as sementes tratadas com ZnSO<sub>4</sub>.

Por outro lado, o *"seedpriming"* das sementes com NPs ZnO M (120 mg/L de Zn) conduziu a maiores valores de biomassa seca das raízes e da parte aérea das plantas comparado sementes tratadas com NPs ZnO. Este tratamento com NPs ZnO M (120 mg/L de Zn) promoveu ainda um aumento médio do comprimento da parte aérea das plantas em aproximadamente, 7.8 cm em comparação com o tratamento com água.

Os resultados aqui obtidos sugerem que os tratamentos com NPs ZnO e NPs ZnO M permitiram reduzir as perdas de Zn aplicado comparativamente à aplicação de Zn na forma iônica (ZnSO<sub>4</sub>), tratamento convencional. A maior retenção de Zn nas sementes com estes tratamentos, em particular para a concentração de Zn aplicada de 120 mg/L permitiu uma maior disponibilidade de Zn na semente para a fase posterior de desenvolvimento da planta.

O *"seedpriming"* com NPs reduz potencialmente a necessidade da fertilização do solo com zinco, diminuindo os efeitos colaterais da poluição do solo e da água, nomeadamente a contaminação das águas subterrâneas e superficiais. A utilização de nanopartículas poderá ser vantajosa para o crescimento de colheitas em solos pobres em Zn.

As NPs ZnO M têm potencial para serem utilizadas como um método mais eficiente de aplicação de Zn em tomateiros comparativamente ao tratamento convencional e, em particular quando aplicado através da metodologia de *"seedpriming"*. Os resultados sugerem que a própria mucilagem poderá ter um impacto positivo no crescimento da planta. De futuro poderão também ser estudadas outras propriedades destes materiais (por exemplo, o impacto na atividade enzimática ou capacidade antifúngica e antimicrobiana) que porventura, também contribuirão para um impacto positivo no crescimento da planta de tomate cereja. Será também importante avaliar o efeitos do *"seedpriming"* com estes materiais de Zn em plantas de outras espécies.

## 5.1. SUGESTÕES PARA TRABALHO FUTURO

Há a necessidade de fortalecer a investigação desta temática e algumas das abordagens de investigação sugeridas para explorar mais a eficiência Zn podem incluir o seguinte:

- Ampliação do estudo até à formação do fruto (tomate cereja) e analisar a sua concentração de Zn;
- Alargar este ensaio a outras culturas que também tenham problemas de deficiência de Zn. Este trabalho só incluiu o estudo de uma planta, ou seja, estas conclusões aplicam-se ao tomate cereja.
- Quantificar a adsorção e a absorção do Zn aplicado nas sementes;
- Avaliar os mecanismos de resposta da planta em termos de absorção de água e de nutrientes pela raiz com e sem “*seedpriming*” para o sulfato de zinco e para as nanopartículas de óxido de zinco;
- Analisar o efeito da aplicação de Zn na forma de NPs em parâmetros fotossintéticos e bioquímicos da planta (Faizan et al., 2021), como atividade das enzimas antioxidantes tais como superóxido dismutase (SOD), peroxidase (POX) e catalase (CAT) (Santos Ortolan, 2015), ou o teor de proteínas nas plantas (Santos Ortolan, 2015);
- Determinar a massa e a concentração de Zn em todos os compartimentos da planta e na areia, junto à raiz das plantas (rizosfera);
- Avaliar a dissolução das NPs ZnO em água e na mucilagem da semente de manjeriço;
- Determinar a concentração ótima de NPs ZnO M para aplicação na semente com o método “*seedpriming*” realizando um ensaio com uma gama mais alargada de doses de Zn aplicadas;
- Compreender o impacto da própria mucilagem durante a germinação das sementes, das plântulas e no crescimento da planta.

## Referências bibliográficas

- Acharya, P., Jayaprakasha, G. K., Crosby, K. M., Jifon, J. L., e Patil, B. S. (2020). Nanoparticle-Mediated Seed Priming Improves Germination, Growth, Yield, and Quality of Watermelons (*Citrullus lanatus*) at multi-locations in Texas. *Scientific Reports*, 10(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61696-7>
- Auld, D. S. (2001). Zinc coordination sphere in biochemical zinc sites. In *BioMetals* (Vol. 14, Issues 3–4). <https://doi.org/10.1023/A:1012976615056>
- Baroni, D. F., e Vieira, H. D. (2020). Coating seeds with fertilizer: A promising technique for forage crop seeds.
- Bayat, N., Ghanbari, A. A., e Bayramzade, V. (2020). Nanopriming a method for improving crop plants performance: a case study of red beans. *Journal of Plant Nutrition*, 44(1), 142–151. <https://doi.org/10.1080/01904167.2020.1806304>
- Cakmak, I. (2008). Enrichment of cereal grains with zinc: Agronomic or genetic biofortification? *Plant and Soil*, 302(1–2), 1–17. <https://doi.org/10.1007/s11104-007-9466-3>
- Cakmak, I., McLaughlin, M. J., e White, P. (2017). Zinc for better crop production and human health. *Plant and Soil*, 411(1–2), 1–4. <https://doi.org/10.1007/s11104-016-3166-9>
- Clasen, A., e Kesel, A. B. (2019). Microstructural surface properties of drifting seeds-A model for non-toxic antifouling solutions. *Biomimetics*, 4(2). <https://doi.org/10.3390/biomimetics4020037>
- E. Batley, G., Kirby, J. K., e Mclaughlin, M. J. (2019). Fate and Risks of Nanomaterials in Aquatic and Terrestrial Environments. In *Terrestrial Environments* (Vol. 46, Issue 3). <https://doi.org/10.4324/9780429331183>
- Elhaj Baddar, Z., e Unrine, J. M. (2021). Effects of Soil pH and Coatings on the Efficacy of Polymer coated ZnO Nanoparticulate fertilizers in Wheat (*Triticum aestivum*). In *Environmental Science and Technology*. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c00443>
- Faizan, M., Bhat, J. A., Chen, C., Alyemeni, M. N., Wijaya, L., Ahmad, P., e Yu, F. (2021). Zinc oxide nanoparticles (ZnO-NPs) induce salt tolerance by improving the antioxidant system and photosynthetic machinery in tomato. *Plant Physiology and Biochemistry*, 161(February), 122–130. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.02.002>

Fraceto, L. F., Grillo, R., de Medeiros, G. A., Scognamiglio, V., Rea, G., e Bartolucci, C. (2016). Nanotechnology in agriculture: Which innovation potential does it have? In *Frontiers in Environmental Science* (Vol. 4, Issue MAR). <https://doi.org/10.3389/fenvs.2016.00020>

Germisem. (2000). Germisem - sementes. <https://www.germisem.com/>. Acedido em 20 de maio de 2021.

Gharibzahedi, S. M. T., e Jafari, S. M. (2017). The importance of minerals in human nutrition: Bioavailability, food fortification, processing effects and nanoencapsulation. *Trends in Food Science and Technology*, 62, 119–132. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.02.017>

Guzmán, K. A. D., Taylor, M. R., e Banfield, J. F. (2006). Environmental risks of nanotechnology: National nanotechnology initiative funding, 2000-2004. In *Environmental Science and Technology* (Vol. 40, Issue 5). <https://doi.org/10.1021/es0515708>

Hacisalihoglu, G. (2020). Zinc (Zn): The last nutrient in the alphabet and shedding light on zn efficiency for the future of crop production under suboptimal zn. *Plants*, 9(11), 1–9. <https://doi.org/10.3390/plants9111471>

Hatami, J., Silva, S. G., Oliveira, M. B., Costa, R. R., Reis, R. L., e Mano, J. F. (2017). Multilayered films produced by layer-by-layer assembly of chitosan and alginate as a potential platform for the formation of human adipose-derived stem cell aggregates. *Polymers*, 9(9), 1–13. <https://doi.org/10.3390/polym9090440>

Hofmann, T., Lowry, G. V., Ghoshal, S., Tufenkji, N., Brambilla, D., Dutcher, J. R., Gilbertson, L. M., Giraldo, J. P., Kinsella, J. M., Landry, M. P., Lovell, W., Naccache, R., Paret, M., Pedersen, J. A., Unrine, J. M., White, J. C., e Wilkinson, K. J. (2020). Technology readiness and overcoming barriers to sustainably implement nanotechnology-enabled plant agriculture. *Nature Food*, 1(7), 416–425. <https://doi.org/10.1038/s43016-020-0110-1>

Itrotwar, P. D., Govindaraju, K., Tamilselvan, S., Kannan, M., Raja, K., e Subramanian, K. S. (2020). Seaweed-Based Biogenic ZnO Nanoparticles for Improving Agro-morphological Characteristics of Rice (*Oryza sativa* L.). In *Journal of Plant Growth Regulation* (Vol. 39, Issue 2). Springer US. <https://doi.org/10.1007/s00344-019-10012-3>

Jayakumar, R., Reis, R., e Mano, J. (2006). Phosphorous containing chitosan beads for controlled oral drug delivery. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 21, 327–340.

Kah, M., Kookana, R. S., Gogos, A., e Bucheli, T. D. (2018). A critical evaluation of nanopesticides and nanofertilizers against their conventional analogues. *Nature Nanotechnology*, 13(8), 677–684. <https://doi.org/10.1038/s41565-018-0131-1>

Kaya, C., e Higgs, D. (2002). Response of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) cultivars to foliar application of zinc when grown in sand culture at low zinc. In *Scientia Horticulturae* (Vol. 93, Issue 1). [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(01\)00310-7](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(01)00310-7)

Khan, M., Naqvi, A. H., e Ahmad, M. (2015). Comparative study of the cytotoxic and genotoxic potentials of zinc oxide and titanium dioxide nanoparticles. *Toxicology Reports*, 2, 765–774. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2015.02.004>

Kurd, F., Fathi, M., e Shekarchizadeh, H. (2017). Basil seed mucilage as a new source for electrospinning: Production and physicochemical characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 95, 689–695. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.11.116>

Li, Y., Song, H., Xiong, S., Tian, T., Liu, T., e Sun, Y. (2018). Chitosan-stabilized bovine serum albumin nanoparticles having ability to control the release of NELL-1 protein. *International Journal of Biological Macromolecules*, 109, 672–680. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.12.104>

M., Faizan, A., Faraz, M., Yusuf, T., S., Khan, S., e Hayat. (2018). Zinc oxide nanoparticle-mediated changes in photosynthetic efficiency and antioxidant system of tomato plants. *Photosynthetica*, 56(2), 678–686. <https://doi.org/10.1007/s11099-017-0717-0>

Mahakham, W., Sarmah, A. K., Maensiri, S., e Theerakulpisut, P. (2017). Nanoprimer technology for enhancing germination and starch metabolism of aged rice seeds using phytosynthesized silver nanoparticles. *Scientific Reports*, 7(1), 1–21. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08669-5>

Mahdieh, M., Sangi, M. R., Bamdad, F., e Ghanem, A. (2018). Effect of seed and foliar application of nano-zinc oxide, zinc chelate, and zinc sulphate rates on yield and growth of pinto bean (*Phaseolus vulgaris*) cultivars. *Journal of Plant Nutrition*, 41(18), 2401–2412. <https://doi.org/10.1080/01904167.2018.1510517>

Martins, N. C. T., Avellan, A., Rodrigues, S., Salvador, D., Rodrigues, S. M., e Trindade, T. (2020). Composites of Biopolymers and ZnO NPs for Controlled Release of Zinc in Agricultural Soils and Timed Delivery for Maize. *ACS Applied Nano Materials*. <https://doi.org/10.1021/acsnm.9b01492>

Nazir, S., Wani, I. A., e Masoodi, F. A. (2017). Extraction optimization of mucilage from Basil (*Ocimum basilicum* L.) seeds using response surface methodology. *Journal of Advanced Research*, 8(3), 235–244. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2017.01.003>

Padil, V. V. T., e Černík, M. (2013). Green synthesis of copper oxide nanoparticles using gum karaya as a biotemplate and their antibacterial application. *International Journal of Nanomedicine*, 8, 889–898. <https://doi.org/10.2147/IJN.S40599>

Pereira, A. D. E. S., Oliveira, H. C., Fraceto, L. F., e Santaella, C. (2021). Nanotechnology potential in seed priming for sustainable agriculture. *Nanomaterials*, 11(2), 1–29. <https://doi.org/10.3390/nano11020267>

Phan, J. L., e Burton, R. A. (2018). New Insights into the Composition and Structure of Seed Mucilage. In *Annual Plant Reviews online* (Vol. 1). <https://doi.org/10.1002/9781119312994.apr0606>

Raliya, R., Nair, R., Chavalmane, S., Wang, W. N., e Biswas, P. (2015). Mechanistic evaluation of translocation and physiological impact of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles on the tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plant. *Metallomics*, 7(12), 1584–1594. <https://doi.org/10.1039/c5mt00168d>

Raliya, R., Saharan, V., Dimkpa, C., e Biswas, P. (2018). Nanofertilizer for Precision and Sustainable Agriculture: Current State and Future Perspectives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(26), 6487–6503. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b02178>

Raoufi, D., e Raoufi, T. (2009). The effect of heat treatment on the physical properties of sol-gel derived ZnO thin films. *Applied Surface Science*, 255(11), 5812–5817. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2009.01.010>

Rizwan, M., Ali, S., Ali, B., Adrees, M., Arshad, M., Hussain, A., Zia ur Rehman, M., e Waris, A. A. (2019). Zinc and iron oxide nanoparticles improved the plant growth and reduced the oxidative stress and cadmium concentration in wheat. In *Chemosphere* (Vol. 214). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.09.120>

Santos Ortolan, F. (2015). Priming de sementes de espécies brasileiras visando ao uso potencial para programas de reflorestamento.

Shukla, P., Chaurasia, P., Younis, K., Qadri, O. S., Faridi, S. A., e Srivastava, G. (2019). Nanotechnology in sustainable agriculture: studies from seed priming to post-harvest management. *Nanotechnology for Environmental Engineering*, 4(1), 1–15. <https://doi.org/10.1007/s41204-019-0058-2>

Silva, M. dos S., Cocenza, D. S., Grillo, R., Melo, N. F. S. de, Tonello, P. S., Oliveira, L. C. de, Cassimiro, D. L., Rosa, A. H., e Fraceto, L. F. (2011). Paraquat-loaded alginate/chitosan nanoparticles: Preparation, characterization and soil sorption studies. *Journal of Hazardous Materials*, 190(1–3), 366–374. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.03.057>

Song, K. Y., e Kim, Y. S. (2019). Effect of mucilage extracted from Basil (*Ocimum basilicum* L.) seeds on physicochemical and rheological properties in low-fat milk protein gel. In *Journal of Food Processing and Preservation* (Vol. 43, Issue 11). <https://doi.org/10.1111/jfpp.14191>

Tantiwatcharothai, S., e Prachayawarakorn, J. (2019). Characterization of an antibacterial wound dressing from basil seed (*Ocimum basilicum* L.) mucilage-ZnO nanocomposite. *International Journal of Biological Macromolecules*, 135, 133–140. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.05.118>

Tarafdar, J. C., Sharma, S., e Raliya, R. (2013). Nanotechnology: Interdisciplinary science of applications. In *African Journal of Biotechnology* (Vol. 12, Issue 3). <https://doi.org/10.5897/AJB12>

Tosif, M. M., Najda, A., Bains, A., Kaushik, R., Dhull, S. B., Chawla, P., e Walasek-janusz, M. (2021). *polymers Characterization, Functional Properties, Applications and Its Utilization for Nanocarrier Fabrication*.

Upadhyaya, H., Begum, L., Bishal, D., Nath, P. K., e Panda, S. K. (2017). Impact of Calcium Phosphate Nanoparticles on Rice Plant. In *Journal of Plant Science and Phytopathology* (Vol. 1, Issue 1). <https://doi.org/10.29328/journal.jpssp.1001001>

Waqas, M., Korres, N. E., Khan, M. D., Nizami, A., Deebea, F., Ali, I., e Hussain, H. (2019). Priming and Pretreatment of Seeds and Seedlings. In *Priming and Pretreatment of Seeds and Seedlings* (Issue October). <https://doi.org/10.1007/978-981-13-8625-1>

Wessells, K., e Brown, K. (2012). Estimating the global prevalence of zinc deficiency: results based on zinc availability in national food supplies and the prevalence of stunting. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050568>.

White, P. J., e Brown, P. H. (2010). Plant nutrition for sustainable development and global health. <https://doi.org/10.1093/aob/mcq085>

Younis, M. E., Abdel-Aziz, H. M. M., e Heikal, Y. M. (2019). Nanoprimering technology enhances vigor and mitotic index of aged *Vicia faba* seeds using chemically synthesized

silver nanoparticles. South African Journal of Botany, 125, 393–401.  
<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.08.018>

## Anexo A – Cálculos para obtenção das concentrações de Zn em estudo

- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 
  - Massa molecular ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) = 287.56 g/mol
  - Massa molecular (Zn) = 65.39 g/mol

$$287,56 \text{ g/mol} \text{ ----- } 100 \%$$

$$65,39 \text{ g/mol} \text{ ----- } \alpha$$

$$\alpha = 22,74\%$$

$$1 \text{ g Zn} \text{ ----- } 100 \%$$

$$\beta \text{ ----- } 22,74 \%$$

$$\beta = 0.2274 \text{ g de Zn} \approx 227 \text{ mg Zn/g ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$$

Os cálculos foram realizados para o excesso de 120 mg/L em todos os tratamentos.

$$0,2274 \text{ g Zn} \text{ ----- } 1 \text{ g de ZnSO}_4$$

$$0,120 \text{ g Zn} \text{ ----- } \Theta$$

$$\Theta = 0.529 \text{ g} \approx 520 \text{ mg}$$

Esta massa está para 1 L para 0.02 L qual o valor da massa?

$$520 \text{ mg} \text{ ----- } 1 \text{ L}$$

$$\gamma \text{ ----- } 0,02 \text{ L}$$

$$\gamma = 10,4 \text{ mg}$$

- NP ZnO

- Massa da nanopartícula =  $946.61 \pm 36.5$  mg/g de nanopartículas de ZnO

$$0,9466 \text{ g} \text{ ----- } 1 \text{ g de NP ZnO}$$

$$0,120\text{g} \text{ ----- } \Theta$$

$$\Theta = 0,127 \text{ g} = 127\text{mg}$$

$$127 \text{ mg} \text{ ----- } 1 \text{ L}$$

$$\gamma \text{ ----- } 0,02 \text{ L}$$

$$\gamma = 2,54 \text{ mg}$$

- NP ZnO M

- Massa da nanopartícula =  $951.86 \pm 35.12$  mg de Zn/ g de nanopartículas de ZnO com mucilagem

$$0,9519 \text{ g} \text{ ----- } 1 \text{ g de NP ZnO M}$$

$$0,120\text{g} \text{ ----- } \Theta$$

$$\Theta = 0,126 \text{ g} = 126 \text{ mg}$$

$$126 \text{ mg} \text{ ----- } 1 \text{ L}$$

$$\gamma \text{ ----- } 0.02 \text{ L}$$

$$\gamma = 2,52 \text{ mg}$$

## Anexo B – Resultados da espectroscopia de infravermelhos de reflexão total atenuada (ATR-FTIR)

O espectro da mucilagem indicou bandas de absorção a 3328, 2926, 1635, 1409 e 1383  $\text{cm}^{-1}$  que foram atribuídas a OH (hidróxido), CH<sub>2</sub> (hidrocarbonetos), C=O alongamento assimétrico (carboxilato livre), C=O alongamento simétrico, C-O e alongação C-O-C, respectivamente (Figura 20). Na faixa de absorção a 1041  $\text{cm}^{-1}$ , é atribuído o grupo COO, que confirma a presença de ácido urônico presente na mucilagem do manjericão (Kurd et al., 2017).

O espectro FTIR de nanopartículas de ZnO mostra bandas de absorção características em 1543, 1398, 865 e 469  $\text{cm}^{-1}$  que foram atribuídas a O-H, C=O, dobragem Z-O, alongamento Z-O (Khan et al., 2015).

Pode ser visto no espectro da NP ZnO M que todas as bandas características da NP ZnO estão presentes com a adição da banda atribuída ao grupo C-O-C do ácido urônico, o que prova a presença de mucilagem nas nanopartículas.

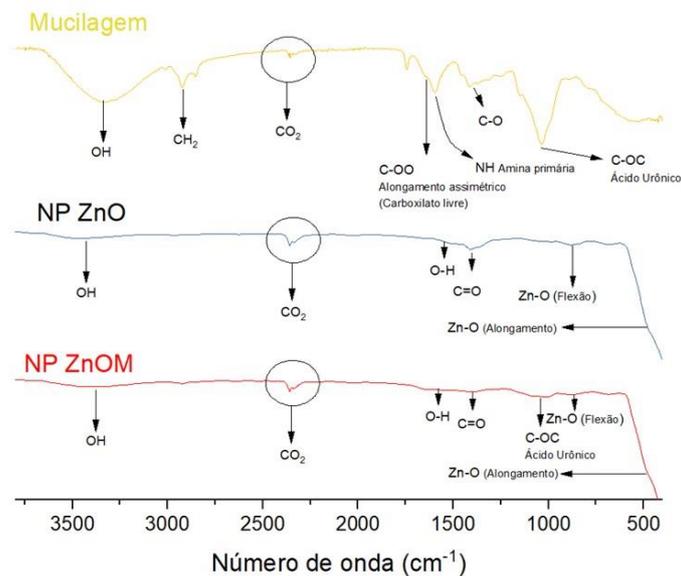


Figura 20 - Espectro FTIR de Mucilagem da NP ZnO e NP ZnO M.

## Anexo C– Análise de difração de raios X (XRD)

Nas análises de raios X da mucilagem mostrou uma estrutura amorfa com muito baixa cristalinidade geral. As regiões cristalinas foram vistas num ângulo ( $2\theta$ ) de 30-31° (Kurd et al., 2017).

Na análise da NP ZnO e da NP ZnO M (Figura 21) foi possível observar os picos de difração localizados em 31.84°, 34.52°, 36.33°, 34.40°, 36.27°, 47.36°, 56.72°, 62.81°, 67.13° e 69.2° que já foram indexados como picos característicos da fase wurtzite hexagonal ZnO (número de cartão JPCDS: 36 -1451) (Raoufi e Raoufi, 2009), e também confirma que o processo de cobertura das nanopartículas não provocou contaminação com outros materiais que apresentam cristalinidade, uma vez que não contém outros picos característicos XRD para além dos picos ZnO.

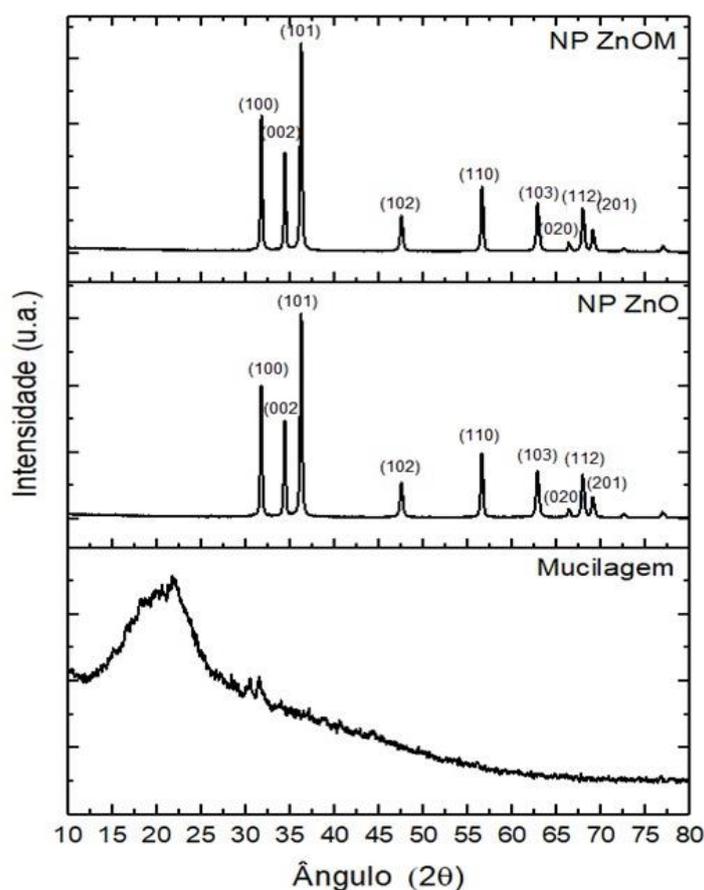


Figura 21 – Difractogramas de: A) NP ZnO M; B) NP ZnO; C) Mucilagem de sementes de manjerição.