UNIVERSIDADE DE SOROCABA
PRÓ-REITORIA ACADÊMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Ricardo Nery de Castro

BIOSSÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE FERRO UTILIZANDO *Trichoderma harzianum* PARA APLICAÇÃO EM CULTIVOS HIDROPÔNICOS

Sorocaba/SP
2018

Ricardo Nery de Castro

BIOSSÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE FERRO UTILIZANDO *Trichoderma harzianum* PARA APLICAÇÃO EM CULTIVOS HIDROPÔNICOS

Dissertação apresentada à Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba, como exigência parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Renata de Lima

Sorocaba/SP
2018

Ficha Catalográfica

Castro, Ricardo Nery de

C353b Biossíntese de nanopartículas de ferro utilizando Trichoderma harzianum para aplicação em cultivos hidropônicos / Ricardo Nery de Castro. – 2019.

50 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Renata de Lima

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de Sorocaba, Sorocaba, SP, 2019.

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação a toda a minha família, a meu pai e minha mãe por sempre me darem condições para que eu pudesse desenvolver meus estudos, meus irmãos por sempre me incentivarem a estudar, a meu sogro, minha sogra e meus cunhados e cunhadas que me incentivaram ainda mais a estudar.

Dedico especialmente a minha esposa Bertha, que sempre me incentivou em meus projetos, por mais loucos que fossem, e sempre esteve do meu lado para que eu nunca desistisse deles, não importa a situação.

Dedico aos meus filhos Gabriel e Maria Eduarda, que sempre respeitaram meu tempo de trabalho, por mais que isso tomasse o tempo que era deles por direito.

A todos a quem dedico, amo vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço de coração a todos aqueles que estiveram envolvidos, direta ou indiretamente nesta dissertação, desde os seguranças do NEAS que pacientemente abriam o portão aos domingos para que eu pudesse realizar as medições no experimento, até aos meus cães fiéis companheiros de madrugadas a escrever, Guinness e Ônix.

À minha esposa Bertha agradeço por me incentivar sempre, no mestrado e na vida, por me ajudar com tudo, possibilitando esta dissertação, sem sua presença não haveria nada.

Aos meus filhos Gabriel e Maria Eduarda, que por muitas vezes deixaram de fazer algo mais divertido para me acompanhar na estufa, agradeço por toda compreensão que demonstraram.

À UNISO agradeço a oportunidade e todo o suporte dado para que esta dissertação se tornasse uma realidade, e ao PPGCF pelo acolhimento no programa.

Agradeço à minha orientadora, Profa. Dra. Renata de Lima, pelo suporte, discussões, conversas, orientação, conselhos e paciência.

Agradeço à UNESP de Sorocaba e ao Prof. Dr. Leonardo Fraceto pela utilização do laboratório de Nanomateriais.

Agradeço à ESALQ/USP, escola de minha graduação, e a Dra. Salete Gaziola pelo empréstimo de equipamentos para a mensuração de Clorofila.

Aos meus alunos da Engenharia Agronômica Bruno e Guilherme e de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia Mariane e Sérgio pelo empenho nos trabalhos realizados, tanto no laboratório quanto a campo e pelo companheirismo nas manhãs, tardes, e as vezes noites.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas agradeço o conhecimento, os conselhos e o tempo dispensado.

Ao pessoal do Labiton, agradeço a ajuda dispensada muitas vezes.

Aos colegas de Pós-Graduação, agradeço a amizade, que fez com que tudo passasse mais depressa.

A todos meu muito obrigado.

Aquele que se enamora da prática

sem conhecimento científico

é como o marinheiro que entra em um navio

sem timão nem bússola

e não tem certeza para onde vai.

Leonardo da Vinci (1942-1519)

RESUMO

A síntese biogênica de nanopartículas, a qual utiliza organismos vivos ou metabolitos para a síntese, traz inovação para diversas áreas do conhecimento humano, assim como vantagens econômicas e ambientais. Na área agrícola a utilidade das nanopartículas vai desde a sua utilização no controle de doenças até a produção de novos fertilizantes. Desta maneira, foram sintetizadas nanopartículas biogênicas de ferro utilizando *Trichoderma harzianum* como agente redutor para a avaliação de sua utilização no fornecimento de ferro para plantas em cultivo hidropônico. Os resultados da caracterização físico-química mostraram nanopartículas com diâmetro de 439,77±12,06 nm, PDI de 0,246±0,005, potencial zeta de 15,23±0,68 mV, a concentração da solução final foi de $2,5x10^{10}$ NPs/mL. A toxicidade foi avaliada utilizando teste de *Allium cepa* com exposição das nanopartículas em suas respectivas concentrações estoque $2,5x10^{10}$ NPs/mL. As nanopartículas foram aplicadas em cultivos de alface e tomate em um delineamento estatístico inteiramente casual em nas quantidades de 5,37 mL e 8,36 mL da solução contendo 2,5x1010 NPs/mL, respectivamente. Os resultados mostraram baixa toxicidade das nanopartículas e quanto ao fornecimento de ferro foi possível observar que, nas concentrações aplicadas, a nanopartícula não forneceu íons ferro para as plantas, evidenciado pelo aparecimento de deficiência de ferro e morte das plantas, entretanto nos tratamentos nos quais a nanopartícula esteve em conjunto com o Fe-EDTA não houve inibição do desenvolvimento das plantas que se comportaram como o tratamento controle sem diferença estatística entre eles pelo teste de ANOVA-Tukey com $p<0,05$. Esses resultados demonstram que provavelmente a via de entrada da nanopartícula na planta é diferenciada da via de absorção do íon ferro. Também é sabido que a ação da nanopartícula na planta depende de vários fatores principalmente tamanho, concentração, tempo de exposição e modalidade de aplicação, além do tipo de planta utilizada.

Palavras Chave: Nanopartícula. Hidroponia. *Trichoderma*. Ferro.

ABSTRACT

Green nanotechnology, or biosynthesis of nanoparticles by living organisms brings innovation to those sectors, with economic and environmental advantages. In agriculture the nanoparticles can be used in the disease control and new fertilizers development. Biogenic iron nanoparticles ware synthetized using *Trichoderma harzianum* as redactor agent for possibly iron supply for hydroponics. The physic-chemical characterization showed nanoparticles with 439,77±12,06 nm of average size, PDI of 0,246±0,005, zeta potential of 15,23±0,68 mV and $2,5x10^{10}$ NPs/mL concentration. The toxicity was evaluated using the *Allium cepa* test with the exposure to the nanoparticle on its original concentration, resulting on low toxicity. To evaluate the capacity of iron supply in hydroponics by the nanoparticle, those was applied on a lettuce and on tomato. The results showed low nanoparticles toxicity, and, in the applied concentrations, the nanoparticles didn't supplied iron ions to the crops, evidenced by the appearance of iron deficiency and plant death, however in the treatments that the nanoparticles were together with the Fe-EDTA, inhibition of plants development was not observed, behaved as control treatment plants with no statistical difference between them by the ANOVA-Tukey with $p<0.05$. The results also showed that the iron biogenic nanoparticle absorption is different from the iron ion, which results in a differentiated action. It is also known that the interaction between nanoparticles and plants depends of several factors, mainly size, concentration, exposure time, application method and plant species.
Keywords: Nanoparticle. Hydroponics. *Trichoderma*. Iron.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Solução nutritiva para alface proposta por Furlani e solução nutritiva para tomate proposta por Hochmuth. 17

Tabela 2 - Tratamentos utilizados no experimento de alface (mg/l). 24

Tabela 3 - Tratamentos utilizados no experimento de tomate (mg/l). 27

Tabela 4 - Leituras de dispersão de tamanho hidrodinâmico (Z-médio), índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta por DLS. 28

Tabela 5 - Parâmetros agronômicos nos tratamentos de alface. 37

Tabela 6 - Parâmetros agronômicos nos tratamentos de tomate. 38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Imagens por microscopia fluorescente de três de diferentes órgãos da planta de soja, com 5 dias de exposição aos SPIONs (Nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro). Setas indicam a acumulação de SPIONs (coloração mais escura) nos diferentes tecidos da planta. 14

Figura 2 - Publicações anuais no PubMed com as palavras chave: "biogenic nanoparticle" e "iron biogenic nanoparticle", por ano desde 2013 até novembro de 2018. 15

Figura 3 - Esquema de funcionamento de um sistema de hidroponia NFT. 16

Figura 4 - Modelo proposto para a absorção do ferro pela planta. 18

Figura 5 - Representação da ferritina, com armazenamento de ferro. 19

Figura 6 - Local dos experimentos. A – Casa de vegetação tipo arco do neas. B – Sistema hidropônico de alface. 24

Figura 7 - Sistema hidropônico de tomate. 26

Figura 8 - Índice de mitótico (IM) e índice de dano (ID) da Fe-NP pelo Allium cepa a concentração 2,5x1010. IM-C: Índice mitótico controle; ID-C: Índice de dano controle; IM-NP: Índice mitótico da NP; ID-NP: Índice de dano da NP. 29

Figura 9 - Variação da condutividade elétrica das soluções nutritivas dos cultivos. Em A) Alface e em B) Tomate. 31

Figura 10 - Variação da temperatura do ambiente e das soluções nutritivas dos cultivos. Em A) Alface e em B) Tomate. 32

Figura 11 - Desenvolvimento das plantas de alface nas medições de 21, 28 e 35 DAS (Dias após a semeadura). 33

Figura 12 - Desenvolvimento das plantas de tomate nas medições de 45, 52, 66, 73, 80 e 87 DAS (Dias após a semeadura). 34

Figura 13 - Plantas de alface e tomate normais e com sintomas de deficiência de ferro. Em A) Alface: 1 – Alface com desenvolvimento normal aos 35 DAS e 2 – alface com deficiência de ferro aos 35 DAS. Em B) Tomate: 1 – Tomateiro com desenvolvimento normal aos 66 DAS; 2 – tomateiro com deficiência de ferro aos 66 DAS. 35

Figura 14 – Índice spad em alface. 36

Figura 15 – Medição do índice spad em uma planta com desenvolvimento normal (A) e com deficiência de ferro (B). 37

Figura 16 – Cultura de alface em diferentes tratamentos. T1 e T2 ao centro correspondem aos controles, sendo T2 controle negativo (Fe0/NP0) e T1(fe100/np0) controle do tratamento utilizado sistema com parâmetros convencionais. As indicações correspondem a T3(Fe50/NP50) e t4 (Fe0/NP100). 40

LISTA DE ABREVIATURAS

Fe – ferro

Fe (II) – Ferro II ou Ferroso

Ferro (III) – Ferro III ou Férrico

IRT1 – Transportador de ferro 1

Fe-S – Ferro-enxofre

NP – Nanopartícula

NPs – Nanopartículas

Labiton – Laboratório de avaliação de bioatividade e toxicologia de nanomateriais

NEAS – Núcleo de estudos ambientais

AgNPs – Nanopartículas de prata

Fe-EDTA – Ferro quelato com ácido etilenodiamino tetra-acético

Fe-NP – Nanopartícula biogênica de ferro.

NFT – Nutrient film technique (técnica do filme de nutrientes)

DAS – Dias após a semeadura

SPAD – Soil plant analysis development)

SPION – Nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 9

2 REVISÃO 10

2.1 NANOTECNOLOGIA 10
2.1.1 NANOPARTÍCULAS METÁLICAS BIOGÊNICAS 11
2.1.2 NANOPARTÍCULAS METÁLICAS BIOGÊNICAS DE FUNGOS 13
2.1.3 NANOPARTÍCULAS BIOGÊNICAS DE FERRO 13
2.2 HIDROPONIA 15
2.2.1 TÉCNICA NFT 16
2.2.2 SOLUÇÃO NUTRITIVA 16
2.2.3 O FERRO NA PLANTA 17

3 OBJETIVOS 20

3.1 OBJETIVO GERAL 20
3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO 20

4 MATERIAIS E MÉTODOS 21

4.1 SÍNTESE DA NANOPARTÍCULA BIOGÊNICA DE FERRO 21
4.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA NANOPARTÍCULA BIOGÊNICA DE FERRO 21
4.3 AVALIAÇÃO DE GENOTOXICIDADE DA NANOPARTÍCULA BIOGÊNICA DE FERRO 22
4.4 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DAS NANOPARTÍCULAS BIOGÊNICAS DE FERRO EM HIDROPONIA 23
4.4.1 AVALIAÇÃO EM HIDROPONIA DE ALFACE 23
4.4.2 AVALIAÇÃO EM HIDROPONIA DE TOMATE 26

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 28

5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA NANOPARTÍCULA BIOGÊNICA DE 28
5.2 AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE. 29
5.3 AVALIAÇÃO DA FE-NP EM HIDROPONIA. 30
5.3.1 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS 30
5.3.2 CRESCIMENTO DAS PLANTAS 33
5.3.2 ÍNDICE SPAD DE CLOROFILA NAS PLANTAS 36
5.3.3 PARÂMETROS AGRONÔMICOS 37

6 CONCLUSÕES 42

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 43

1 INTRODUÇÃO

A nanotecnologia é conhecida como a ciência que manipula e estuda o comportamento físico e químico dos materiais em escala nanométrica. Em escalas tão diminutas, a matéria apresenta características distintas quando comparadas com grandes escalas, tornando essa ciência de alto interesse para o desenvolvimento de novas tecnologias para as diferentes áreas, entre elas a agropecuária.

Com o crescimento da população mundial e a previsão de que em 2030 seremos 9 bilhões de pessoas no mundo, a produção de alimentos se tornou um dos grandes desafios do nosso século, pois não é necessário apenas produzir, mas produzir de maneira mais eficiente, ou seja, produzir uma maior quantidade de alimentos utilizando cada vez menos recursos, como água, fertilizantes e defensivos. Neste contexto a nanotecnologia se une à agropecuária com a intensão de melhorar a produção de alimentos, aumentando a sua produtividade e diminuindo o uso de fertilizantes e defensivos.

O cultivo protegido é uma das técnicas empregadas para o aumento da produtividade, sobretudo de hortaliças, graças a possibilidade de controlar variáveis difíceis de serem controladas em culturas a campo, como a temperatura, humidade relativa do ar, incidência luminosa e água. Entre diferentes cultivos protegidos podemos citar a técnica da hidroponia como o máximo de controle que se consegue obter das variáveis de ligadas à nutrição de plantas.

Em relação aos nutrientes um dos micronutrientes mais importantes para as plantas em hidroponia é o ferro, pois este elemento participa de processos fisiológicos da planta onde há uma cadeia transportadora de elétrons, além de participar na síntese da clorofila. Nos cultivos convencionais não há esta preocupação em relação ao nutriente ferro devido a presença do mesmo no solo, sendo o quarto elemento mais abundante na crosta terrestre, estando disponível para as plantas. Já na hidroponia a ferro é um nutriente que deve ser fornecido a planta, sendo o uso de quelatos uma das maneiras mais comuns de se realizar essa suplementação, o Ferro EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) e o Ferro EDDHA (ácido etilenodiamino di-2-hidroxifenilacético) são adicionados a solução nutritiva (TAIZ, L; ZEIGER, E, 2013).

Desta maneira o objetivo principal deste trabalho foi verificar se a nanopartícula de ferro (Fe-NP, utilizando o fungo *Trichoderma harzianum* como agente redutor) pode ser utilizada como fornecedor de ferro para as plantas, em substituição ao ferro quelato, funcionando assim como um nano fertilizante.

2 REVISÃO

2.1 Nanotecnologia

Segundo Schulz (2005), o prefixo nano possui origem grega e significa um bilionésimo (0,000000001; 10^{-9}) em uma unidade de medida, como tempo, comprimento e massa, sendo o estudo da manipulação e aplicação de estruturas em escala nano denominada Nanotecnologia. Este termo foi criado por Norio Taniguchi em 1974 e popularizado por Eric Dexter em 1985 com a publicação do livro “Engines of Creation” (ALVES, 2004).

Em 2003 a nanotecnologia foi definida na 21st Century Nanotechnology Reasearch and Development Act como “A tecnologia que permite compreender, medir, manipular e produzir a nível atômico, molecular e supramolecular visando a criação de materiais, dispositivos e sistemas com nova organização molecular, propriedades e funções”, sendo esta definição ampliada em 2004 pelo Swiss Re Group, que entendeu que o termo nanotecnologia abrange uma gama de tecnologias sendo assim, um termo genérico para o grande número de aplicações e produtos que são desenvolvidos com o uso dessa tecnologia (CARNIEL, 2013).

Segundo Ghazinoory et al (2010), hoje têm-se um consenso de que a nanotecnologia compreende a integração de tecnologias em escala nanométrica, até 100 nanômetros (nm), podendo ainda ser divididos em Nanomateriais estruturados (nanocompósitos), Nanobjetos (nanotubos e nanopartículas), Nanomateriais semicondutores (micro filme), Revestimentos nanoestruturados (filmes finos), Nanomateriais funcionais (Sistemas auto-organizados), porém estas denominações estão em desuso, sendo a maior preocupação com o estado do material e sua atividade (MAYNARD, 2011).

De acordo com a organização "National Science Foundation", alguns tipos de nanopartículas podem ter tamanho acima de 100 nm. O tamanho das partículas de <100 nm (ou até 100 nm) usado em várias definições é um limite aproximado que se refere à nano-escala onde as propriedades do material podem ser consideradas diferentes dos equivalentes em massa. De acordo com Kah e Hoffman (2014), não há uma definição para esses sistemas, pois a definição dada pela União Europeia (<100nm), acaba por excluir muitas formulações. Devido a esta dificuldade na definição desses sistemas algumas instituições como a Organização para a Alimentação e Agricultura dos Estados Unidos, a Organização Mundial de Saúde e a União Internacional de Puros e Aplicados estão buscando uma nomenclatura padrão. Como não há definição para este tipo de nanomaterial algumas organizações e definições consideram nanopartículas acima de 100 nm, preferimos manter o termo nano na nomenclatura (RAUSCHER et al., 2017).

A nanotecnologia é reconhecida pela Comissão Europeia como uma das seis tecnologias essenciais consideradas promissoras para o desenvolvimento de inovações em todo o setor industrial de forma ambientalmente e socialmente sustentável. Entretanto são necessários estudos que identifiquem e possibilitem previsões das possíveis consequências da nanotecnologia para os seres vivos e para o ambiente (MELO; PIMENTA, 2004). A Organização das Nações Unidas colocou a nanotecnologia como uma das tecnologias mais importantes para cumprir com as metas de desenvolvimento do milênio estipuladas no início do século 21, assim no ano 2000, países como Estados Unidos e Brasil lançaram frentes de pesquisa e desenvolvimento em nanotecnologia (INÁCIO, 2017).

As pesquisas recentes na área da nanotecnologia têm aumentado devido a revolução que pode trazer a diversas áreas do conhecimento humano. Logo a área agrícola é uma das que apresentam potencial em relação a utilização de nanopartículas metálicas, devido a sua aplicação no controle de bactérias e fungos patogênicos que atingem diversas culturas de importância econômica. Entretanto, as mesmas podem vir a apresentar toxicidade ou efeitos adversos para a microbiota do solo, podendo interferir no desenvolvimento das plantas (FRACETO et al., 2016).

A obtenção de materiais em escala nanométrica pode ser realizada de duas formas distintas, a primeira chamada de “bottom-up”, ou de “baixo para cima”, onde pode-se obter um nanomaterial a partir da agregação de seus componentes básicos. A segunda forma é chamada de “top-down”, ou de “cima para baixo”, onde a NP é sintetizada a partir da eliminação do excesso de material, realizando-se uma corrosão de um material, preparando o material nano a partir de um bloco macroscópico (MELO; PIMENTA, 2004).

Nanopartículas de materiais metálicos podem ser sintetizadas utilizando processos biológicos e químicos, como por exemplo as nanopartículas de prata, que são obtidas por reações químicas em meios aquosos, nas quais os átomos de prata dissolvidos na solução se juntam para formar agregados de tamanho nanométrico, são obtidas através de processos “bottom-up” (PATTEKARI et al. 2011), ou as nanopartículas de prata que são sintetizadas utilizando organismos vivos e/ou seus metabólitos (DURÁN et al., 2011)

2.1.1 Nanopartículas Metálicas Biogênicas

Apesar da grande aplicação de nanopartículas (NP) metálicas em diferentes produtos que entram em contato direto com o organismo humano, como itens de higiene pessoal, itens médicos, farmacêuticos e equipamentos de cozinhas, há a necessidade em se desenvolver

nanopartículas que sejam menos tóxicas e que apresentem uma menor contaminação ambiental (ANKANA et al., 2010).

Em busca de metodologias para a produção de NP, iniciou-se estudos em relação a chamada síntese verde, ou biossíntese de NP metálicas, Esta metodologia mostra que podemos ter mais vantagens que desvantagens neste tipo de tecnologia, já que a biossíntese de NP inorgânicas tem se mostrado uma área de pesquisas limpa, não-tóxica, mais barata e menos agressiva ao meio ambiente (SEABRA; HADDAD; DURAN, 2013).

Em geral, a síntese biogênica de NP metálicas leva à formação de NP com uma capa proveniente de metabolitos do organismo vivo utilizado como agente redutor. Esta capa, chamada também de "capping" apresenta a função principal de evitar a agregação das NP, promovendo a estabilização do sistema (DURÁN et al., 2011), também foi verificado que estas proteínas que promovem a estabilização agem em sinergia com a NP, aumentando a sua eficiência (MITTAL; CHISTI; BANERJEE, 2013).

Exemplos de biossíntese de NP utilizando-se bactérias foram obtidas por Nair e Pradeep (2002), onde foram sintetizadas nanopartículas de prata e ouro com cepas de *Lactobacillus*, em SAIFUDDIN et al (2009) a síntese de NP de prata foi realizada utilizando-se sobrenadante de cultura *Bacillus subtilis* e em HAZRA et al. (2013) onde *Pseudomonas aeruginosa* BS01 foram utilizadas como agentes estabilizantes na biossíntese de NP de sulfeto de zinco.

Nanopartículas metálicas biogênicas podem ser sintetizadas a partir de uma grande gama de organismos como bactérias, leveduras, fermentos e plantas (MANIMARAN; KANNABIRAN, 2016; ANKANA et al., 2010).

Em relação a utilização de fungos na biossíntese de NP, alguns exemplos relevantes são a síntese de NP de ouro sintetizada a partir de *Fusarium oxysporum* (MUKHERJEE et al., 2002), NP de prata baseada em *Verticillium sp.* (MUKHERJEE et al., 2001) e NP de prata utilizando *Trichoderma harzianum* (GUILGER et al., 2017).

Nanopartículas sintetizadas através de leveduras como agentes redutores podem ser utilizadas em sua grande maioria como nanoantibióticos (MANIMARAN; KANNABIRAN, 2016), com ação potencializada quando utilizada prata na síntese da NP. Os gêneros mais promissores são o *Streptomyces* (ABD-ELNABY et al., 2016), *Actinomycetes* (SUNITHA et al., 2013) e *Rhodococcus* (SUNKANYA, 2013).

Extratos e chás de plantas também podem ser utilizados na síntese biogênica de NP, sendo normalmente escolhidas devido a propriedades terapêuticas ou medicinais, a qual pode trabalhar em sinergia com a NP metálica, normalmente são sintetizadas utilizando prata ou ouro (ANKANA et al., 2010). Entre as plantas utilizadas neste intuito, temos o coentro

(NARAYANAN; SAKTHIVEL, 2008) a canforeira (HUANG et al., 2007), a *Boswellia ovalifoliolata* (ANKANA et al., 2010) e o caqui (SONG; KIM, 2008).

2.1.2 Nanopartículas Metálicas Biogênicas de Fungos

Dentre as diferentes formas de síntese biogênica de NP, a miconanotecnologia (mico = fungo) ganha destaque pelas qualidades apresentadas por este organismo (RAI et al., 2009). Fungos filamentosos possuem boa capacidade de crescimento em meios comuns de cultivo, produzindo uma vasta gama de metabólitos que apresentam interesse de uso comercial, sendo considerados verdadeiras nano-fábricas de NP (DHILLON et al., 2012). Ademais eles têm sido preferidos para a síntese biogênica de NP pois apresentam grande produção de enzimas, fácil produção em laboratório, possuem alta resistência a condições adversas, resistência à presença de metais, além de a síntese de nanopartículas ser realizada de forma extracelular, o que facilita a sua purificação. Entretanto a síntese é afetada diretamente por fatores de incubação como temperatura, pH, tempo de incubação, a natureza das espécies metálicas, a concentração de biomassa das espécies de fungos utilizadas e as interações das condições coloidais, que controlam o tamanho, a forma e a polidispersão das NP formadas (MOUSA et al., 2015).

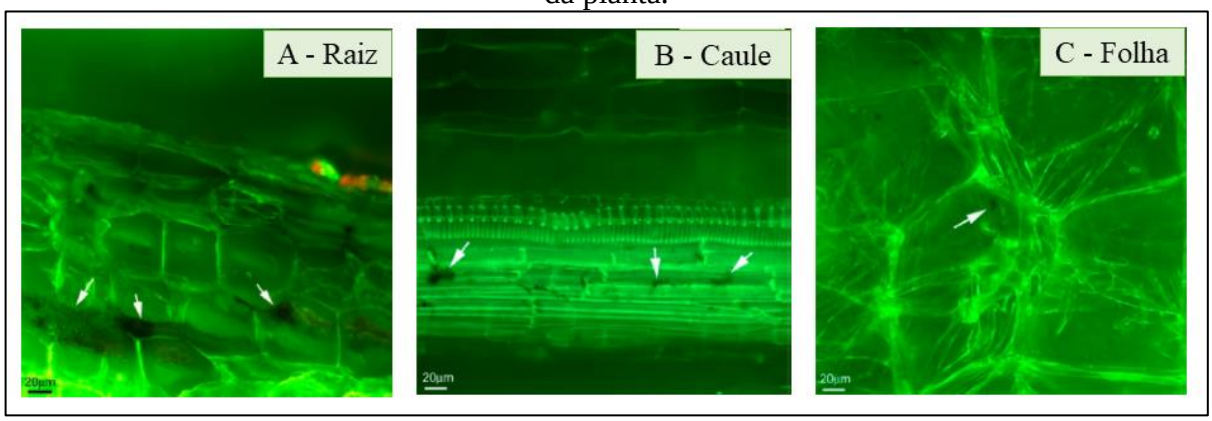
Diferentes cepas de fungos têm sido utilizadas como nano-fábricas, como por exemplo os dos gêneros, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Verticillium*, *Penicillium* e *Trichoderma* (MOUSA et al., 2015; GUILGER et al., 2017).

O gênero *Trichoderma* é utilizado principalmente na biossíntese de NP de prata, sendo produzidos com sucesso NP de forma esférica e uniforme com diâmetro variando de 8-60 nm de cinco espécies de *Trichoderma*, *T. asperellum*, *T. harzianum*, *T. longibrachatum*, *T. pseudoconingii* e *T. virens* (DEVI et al., 2013).

2.1.3 Nanopartículas Biogênicas de Ferro

O ferro o quarto elemento mais comum na crosta terrestre, e um micronutriente para as plantas (BECKER; ASCH, 2005), desta forma, é possível inferir que uma nanopartícula de ferro pode ser utilizada como carreador de ferro e outros nutrientes para a planta. Estudos relatam que as NP de ferro conseguem ser transportadas pelo tecido vegetal (CORREDOR, et al., 2009; CIFUENTES, et al., 2010; GHAFARIYAN, et al., 2013; GRILLO et al., 2016), como as nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro (SPIONs) recobertas com carbono, fornecidas via solução nutritiva por hidroponia para diversas espécies (soja, ervilha, tomate, trigo, girassol e pepino) as quais foram transportadas via xilema da raiz para os demais órgãos da planta, como caule e raiz (Figura 1).

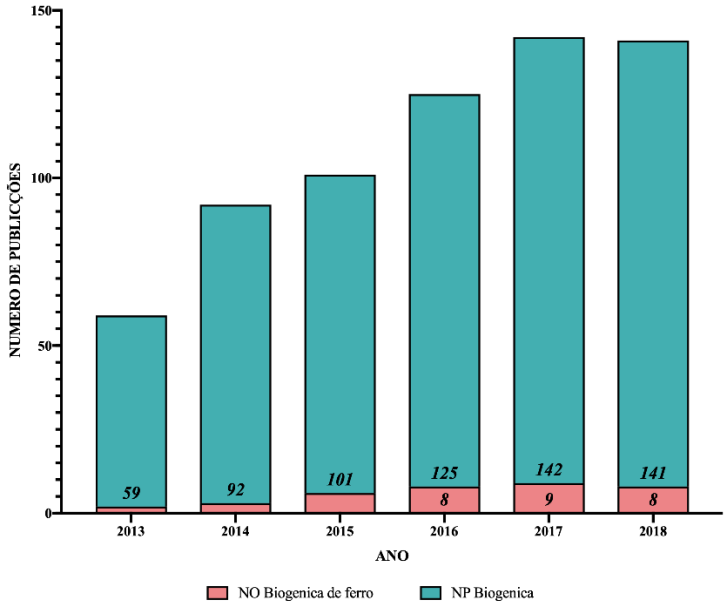
Figura 1- Imagens por microscopia fluorescente de três de diferentes órgãos da planta de soja, com 5 dias de exposição aos SPIONs (Nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro). Setas indicam a acumulação de SPIONs (coloração mais escura) nos diferentes tecidos da planta.



Fonte: Adaptado de Ghafariyan et al. (2013).

Dentre as inovações que a nanotecnologia pode trazer à agricultura está a possibilidade de poder carrear fertilizantes e pesticidas (FRACETO et al., 2016), como exemplos temos a NP de Magnetita sintetizada a partir de *Fusarium oxysporum* e *Verticillium sp.* (BHARDE; RAUTARAY; BANSAL, 2006), NP de Greigita utilizando *Actinobacter sp.* como agente redutor (BHARDE; PARIKH; BAIDAKOVA, 2008), NP de Magnetita utilizando *Geobacter sulfurreducens* como agente redutor (BYRNE et al., 2011). Embora existam publicações sobre NP biogênicas de ferro, o volume de informação existentes ainda é escasso, com 9 publicações anuais, em comparação com outras NP, biogênicas com 133 publicações anuais ou não biogênicas com 21.733 publicações anuais (Figura 2), o que dificulta o desenvolvimento de novas tecnologias nessa área.

Figura 2 - Publicações anuais no PubMed com as palavras chave: “biogenic nanoparticle” e “iron biogenic nanoparticle”, por ano desde 2013 até novembro de 2018.



Fonte: Elaboração própria.

2.2 Hidroponia

O termo hidroponia é de origem grega e quer dizer trabalho em água, sendo definida por Pinto et al. (2015) como uma técnica que cultiva plantas sem a utilização de solo, nutridas por uma solução de água e sais minerais. A hidroponia vem crescendo em todo país e está presente em quase todos os estados e tem como principal cultura a alface, pois esta possui ciclo curto, o que garante rápido retorno de investimento e também pelo fato de poder ser produzida na entressafra (MENEGAES et al., 2015).

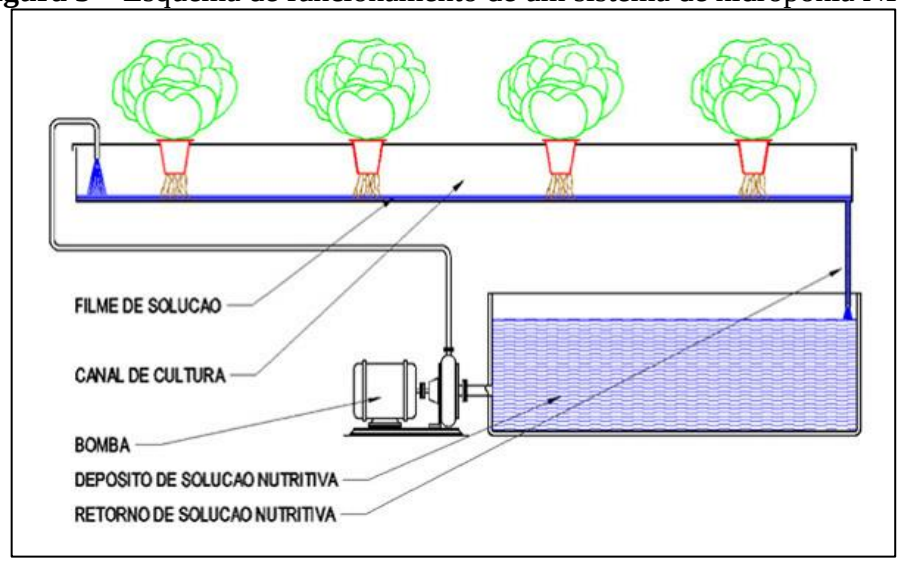
Exemplos de hidroponia ao longo da história da humanidade podem ser encontrados desde os jardins suspensos da Babilônia aos Jardins Flutuantes da China antiga, porém as pesquisas em hidroponia tiveram início nos anos 30 na Universidade de Califórnia (COMETTI, 2008). Com o passar dos anos a técnica hidropônica foi sofrendo alterações por produtores de diversas regiões a fim de adaptar a diferentes regiões climáticas, substituindo materiais pouco disponíveis. Estas adaptações deram origem a muitas técnicas que são utilizadas para fornecer os nutrientes às plantas (ARAÚJO NETO; RIBEIRO, et al., 1999).

Basicamente estas técnicas se diferenciam quanto à forma de sustentação da planta, o método de fornecimento da solução nutritiva e quanto à reutilização da solução hidropônica, sendo algumas delas mais conhecidas, como a técnica de NFT (Técnica de Nutrientes em Filme), DFT (Cultivo em água profunda) e Aeroponia (DAVID; MENEZES; TARSITANO, 2017).

2.2.1 Técnica NFT

O desenvolvimento da técnica NFT ocorreu nos anos 60 e ajudou na consolidação da hidroponia como sistema de produção viável em escala comercial. No sistema NFT (Figura 3), o fornecimento da solução nutritiva é realizado por um conjunto de motobomba e canais onde se cultivam as plantas com inclinação de 2%. O retorno da solução até o reservatório é feito por gravidade. Desta forma o sistema NFT forma um ciclo fechado (FURLANI et al., 1999).

Figura 3 – Esquema de funcionamento de um sistema de hidroponia NFT.



Fonte: Adaptado de hydor.eng.br.

Segundo Factor (2007), os componentes básicos para a formação do sistema NFT são: Canais paralelos onde se cultivam as plantas com inclinação para que ocorra a passagem da solução por gravidade; tanque coletor para o armazenamento da solução; bomba para impulsionar a solução até os canais; canos coletores para conduzir a solução de volta ao tanque. Os reservatórios ou tanques têm por finalidade armazenar a solução nutritiva em condições adequadas para que não liberem substâncias que podem interferir na solução hidropônica e que não podem ser tóxicas para as plantas.

A forma, o tamanho e a localização dos reservatórios dependem da disponibilidade no mercado e da estrutura do sistema hidropônico adotado (CASTELLANE; ARAÚJO, 1995). Nesse sistema, a planta desenvolve seu sistema radicular de modo que 2/3 permaneça em contato com a solução e 1/3 sem contato com a solução (FOSSATI, 1986).

2.2.2 Solução Nutritiva

Todo sistema hidropônico utiliza uma solução denominada “solução nutritiva”, onde devem estar presentes todos os nutrientes essenciais para a planta, sendo que estes nutrientes

devem estar em proporções adequadas para cada fase do desenvolvimento. Aspectos como a qualidade da água, sais, pH, concentração, temperatura e oxigenação da solução devem ser monitorados diariamente, pois o manejo correto da solução nutritiva refletirá em um bom desenvolvimento da cultura (CARRIJO; MAKISHIMA, 2000).

O controle do pH da solução nutritiva em níveis adequados (5,5 - 6,5) garante uma melhor integridade das células da epiderme do sistema radicular bem como mantem alguns micronutrientes, como o ferro, solubilizados. Da mesma forma, a condutividade elétrica está relacionada com a concentração de íons e a sua absorção pelo sistema radicular. Sugere-se assim a manutenção do seu valor entre 1,5 e 4,0 mS/cm para manter o equilíbrio osmótico da solução. Estes dois fatores são afetados pela temperatura, que deve ser mantida entre 21 e 27ºC (GENÚNCIO et al., 2006).

Diversas fórmulas têm sido utilizadas para o cultivo em sistema hidropônico, sendo utilizada basicamente a solução proposta por Hoagland & Arnon em 1938 (COMETTI, 2008). Como referência, na tabela 1 é mostrada a solução nutritiva proposta por Furlani para a produção de alface (FURLANI, 1999) e solução nutritiva proposta por Hochmuth para a produção de tomate (HOCHMUTH; HOCHMUTH, 2001).

Tabela 1 - Solução nutritiva para alface proposta por Furlani e Solução nutritiva para tomate proposta por Hochmuth.

Nutriente	Alface	Tomate
	Concentração (mg/L)	Concentração (mg/L)
N	198	150
P	39	50
K	183	200
Ca	142	150
Mg	38	50
S	52	60
B	3	0,7
Cu	0,02	0,2
Mn	0,4	0,8
Mo	0,06	0,05
Zn	0,06	0,3
Fe	1,8	2,8

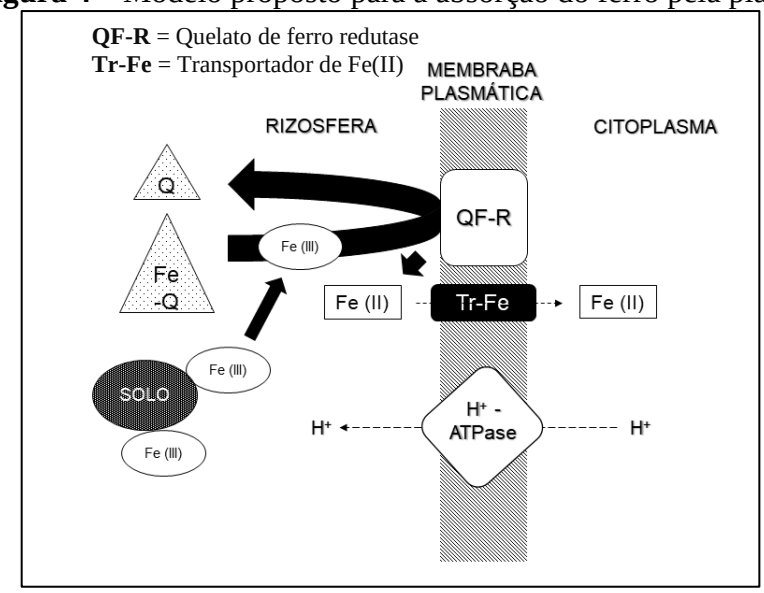
Fonte: Adaptado de FURLANI (1999) e HOCHMUTH, et al. (2001)

2.2.3 O Ferro na Planta

O ferro (Fe) é o 4º elemento mais comum na crosta terrestre, e também um micronutriente essencial ao crescimento das plantas, requerido em concentrações reduzidas

pode limitar a produção (BECKER & ASCH, 2005). Porém o ferro não está prontamente disponível para utilização das plantas, sendo necessário uma ação de redução do mesmo que inclui três processos: 1) acidificação da rizosfera, 2) redução do Fe (III) em Fe (II) e 3) transporte do Fe (II) através da membrana plasmática (Figura 4) (PESTANA et al., 2013).

Figura 4 – Modelo proposto para a absorção do ferro pela planta



Fonte: Modificado de Martins (2017).

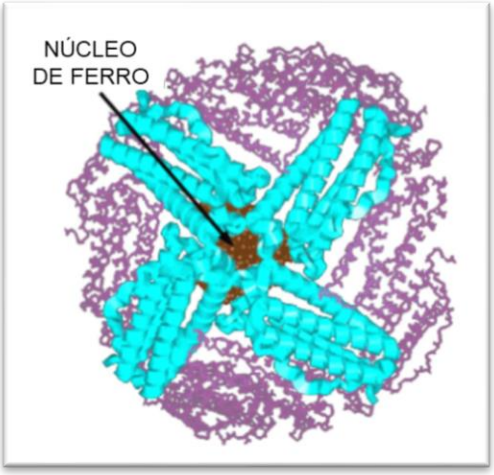
A acidificação da rizosfera ocorre com a liberação de ácidos orgânicos, como os fitosideróforos, que se complexam com o Fe(III) do solo, formando um quelato, e o transportam por fluxo de massa e difusão até a membrana plasmática. Na membrana plasmática ocorre a redução do Fe(III) em Fe(II) e a remoção do ferro do quelato pela quelato de ferro redutase (QF-R) e então é transportado pela membrana pelo transportador de Fe(II) (Tr-Fe) (HOCHMUTH, 2011).

A capacidade do Fe formar complexos e mudar o seu estado de oxidação faz com que este elemento esteja em diversas atividades fisiológicas da planta além de agir como cofator de enzimas redutoras e formar complexos proteicos (MARTINS, 2017). Ao cruzar a membrana plasmática o Fe está disponível para ser translocado pelo IRT1 (*Iron Regulated Transporter 1*) para a parte aérea tanto pelo xilema como pelo floema, tornando-se disponível aos tecidos em formações como os meristemas apicais (SCHMIDT, 2003; BRIAT; CURIE; GAYMARD, 2007).

Nos tecidos o Fe é armazenado pela ferritina (Figura 5), proteína de armazenamento formada por 24 aminoácidos organizados de maneira esférica, podendo conter em seu interior até 4500 átomos de Fe. A ferritina absorve Fe através da oxidação de Fe (II) e precipitação do

Fe (III) no interior da proteína como hidroxifosfato férrico. Ela está localizada nos plastídeos e está disponível para a sua utilização pelas plantas (ARNAUD et. al, 2006).

Figura 5 – Representação da ferritina, com armazenamento de ferro.



Fonte: Casiday et al., 2004.

Graças à sua capacidade de redução, o Fe é essencial para a enzimas dependentes de Fe ou de grupo heme (citocromos) que estão envolvidas em diversos processos fisiológicos. Além dos aglomerados de Fe-S nas mitocôndrias e cloroplastos, sendo essencial para os processos de respiração celular, fotossíntese (ferredoxina), replicação do DNA e fixação de nitrogênio. (BAUER; HELL, 2006).

O ferro é um nutriente considerado imóvel na planta, pois uma vez depositado no tecido não fica mais disponível para utilização em outros locais da planta. Portanto os sintomas de deficiência de ferro ocorrem nos tecidos mais jovens das plantas. Quando em deficiência a sintomatologia consiste em clorose do limbo foliar, chamado também de clorose, devido a não síntese de clorofila (HOCHMUTH, 2011).

A concentração de clorofila em uma folha está positivamente correlacionada com a concentração foliar dos nutrientes relacionados à sua síntese, entre eles o nitrogênio e o ferro. Assim determinando a concentração de clorofila pode-se correlacionar com a concentração de ferro. A clorofila é um citocromo verde, portanto pode-se medir a intensidade da cor verde na folha, medindo as transmissões de luz a 650 nm, onde ocorre a absorção de luz pela clorofila e a 940 nm, onde não ocorre a absorção. Com estes dois valores é possível calcular o Índice SPAD (*Soil Plant Analysis Development*) (PÔRTO, 2011)

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Este projeto teve como objetivo principal avaliar o desempenho das culturas de alface e tomate sob cultivo hidropônico na presença de nanopartículas biogênicas de ferro sintetizadas a partir de *Trichoderma harzianum* como agente redutor visando o potencial de fornecimento de ferro para estas culturas.

3.2 Objetivo específico

Como objetivos específicos o presente projeto visa:

- Verificar a síntese biogênica de nanopartícula de ferro utilizando *Trichoderma harzianum* como agente redutor.
- Caracterizar e definir parâmetros como a distribuição de tamanho, índice de polidispersão, potencial zeta, concentração e morfologia através de análises por espalhamento dinâmico de luz, rastreamento de nanopartículas.
- Avaliar da citotoxidade e genotoxicidade da nanopartícula sintetizada pelo teste do *Allium cepa*.
- Avaliar o comportamento das culturas hidropônicas de alface e tomate na presença das nanopartículas sintetizadas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos em duas etapas, a etapa laboratorial realizada no Laboratório de Avaliação de Bioatividade e Toxicologia de Nanomateriais (LABITON), e a etapa de campo realizada na estufa do Núcleo de Estudos Ambientais (NEAS), ambos da UNISO.

4.1 Síntese da Nanopartícula Biogênica de Ferro

A cultura de *Trichoderma harzianum* foi elaborada a partir do produto comercial Ecotrich® WP (Balagro) na formulação pó molhável $1x10^{10}$ UFC/g. Foram preparadas duas placas com meio Ágar Batata-Dextrose (BDA) autoclavado e a cada uma delas foi adicionado 1 mL da solução de *T. harzianum* na concentração de 200mg/mL. As placas foram mantidas por 6 dias ao abrigo da luz em estufa a aproximadamente 26ºC (temperatura ambiente).

A seguir foi realizada a transferência de quatro discos de micélio de 4 mm de diâmetro do meio BDA para a cultura em 75mL de meio caldo Batata-Dextrose Caldo (BD), que foram acondicionados em erlenmeyer com capacidade para 250 mL, e envoltos com papel alumínio para isolamento da luz, e mantidos sob agitação (150 rpm), a temperatura ambiente, durante 12 dias para crescimento(ÁVILA et al., 2005).

Após o período de crescimento, a biomassa de *Trichoderma harzianum* foi filtrada em papel filtro autoclavado, pesada e transferida para Erlenmeyers contendo água autoclavada em volume dez vezes maior que sua massa. Todo o procedimento foi realizado dentro do fluxo, para evitar contaminação. Em seguida, a solução contendo a biomassa foi mantida sob agitação por 72 horas a 150 rpm isoladas da luz. Após 72 horas a biomassa foi novamente filtrada, utilizando uma bomba a vácuo, e ao filtrado foi adicionado sais para concentração final $FeCl_2$ (0,2 M) e $FeCl_3$ (0,1 M). A solução foi mantida a temperatura ambiente e rotação de 150 rpm por cerca de 24 horas até apresentar uma coloração adequada (marrom escura límpida), que caracteriza a formação das NPs, conforme descrito realizada por Kumar et al. (2013).

4.2 Caracterização Físico-Química da Nanopartícula Biogênica de Ferro

A caracterização das amostras foi realizada por meio da análise dos parâmetros tamanho, índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta com o equipamento *ZetaSizer Nano ZS* 90 (*Malvern)*. As análises de tamanho e PDI foram realizadas pela técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS) e o potencial zeta por mobilidade eletroforética. As amostras foram

sonicadas e diluídas com água ultrapura a 25% para a realização das leituras. Foram realizadas três leituras por amostra a um ângulo fixo de 90º e temperatura de 25ºC (GRILLO et al., 2012).

A análise de concentração e distribuição de tamanho das nanopartículas de ferro foram realizadas por meio da técnica de rastreamento de nanopartículas NTA (*Nanoparticles Tracking Analysis*) utilizando o equipamento *NanoSight LM14* e uma câmera ligada ao software *NanoSight* v.2.3, na diluição de 10% (GRILLO et al., 2012).

4.3 Avaliação de Genotoxicidade da Nanopartícula Biogênica de Ferro

O ensaio de *Allium cepa* foi realizado pela metodologia de Fiskesjö (1985), no qual as raízes foram expostas a água destilada como controle negativo e a uma solução de NP a uma concentração de $2{,}5x10^{10}$ NP/mL, as amostras foram analisadas em triplicata.

As sementes de *Allium cepa* foram colocadas para germinar em duas placas de Petri de 15 cm de diâmetro sobre um disco de papel filtro levemente umedecido e deixadas em um local a temperatura ambiente com pouca incidência de luz por 7 dias, sempre observando para que as raízes não ficassem secas e nem muito úmidas, quando as raízes atingiram aproximadamente 1 cm elas foram colocadas em contato com a solução de NPs ($2{,}5x10^{10}$ NP/mL) por um período de 24 horas.

Após o período de contato as raízes foram fixadas as 13:00 h (horário em que apresentam maior divisão celular) com Carnoy – Álcool etílico e Ácido acético (3:1) que foi preparado na hora do uso. As raízes foram mantidas em geladeira por 24 horas. A seguir as raízes foram submetidas à hidrólise com Ácido Clorídrico (HCl) 1M em banho-maria a 60ºC por 7 minutos. Após a hidrólise as raízes passaram por três banhos de água destilada e coradas com reativo de *Schiff* por duas horas, na ausência de luz. Ao término do período de contato as raízes passaram por mais três banhos de água destilada para retirar o excesso de corante.

As lâminas foram preparadas cortando a região meristemática das raízes, a estas foram adicionados uma gota de Carmim acético 2% seguidas de esmagamento com lamínula. Para as análises foram realizadas a contagem de cerca de 1000 células por raiz considerando as fases da divisão celular e as alterações cromossômicas presentes.

Todas as análises foram realizadas em triplicata e para a obtenção dos Índices Mitótico (IM) (Equação 1), Alterações (IA) (Equações 2) e os respectivos parâmetros relativos (Equações 3 e 4) foram realizados os seguintes cálculos:

$$IM = \frac{Total\ de\ Células\ em\ Divisão}{Total\ de\ Células\ Contadas} \quad (Eq.1);$$

$$IA = \frac{Total\ de\ Alterações\ Encontradas}{Total\ de\ Células\ em\ Divisão} \quad (Eq.2);$$

$$IM\ \boldsymbol{rel} = \frac{IM\ do\ Tratamento}{IM\ do\ Controle\ Negativo} \quad (Eq.3);$$

$$IA\ \boldsymbol{rel} = \frac{IA\ do\ Tratamento}{IA\ do\ Controle\ Negativo} \quad (Eq.4)$$

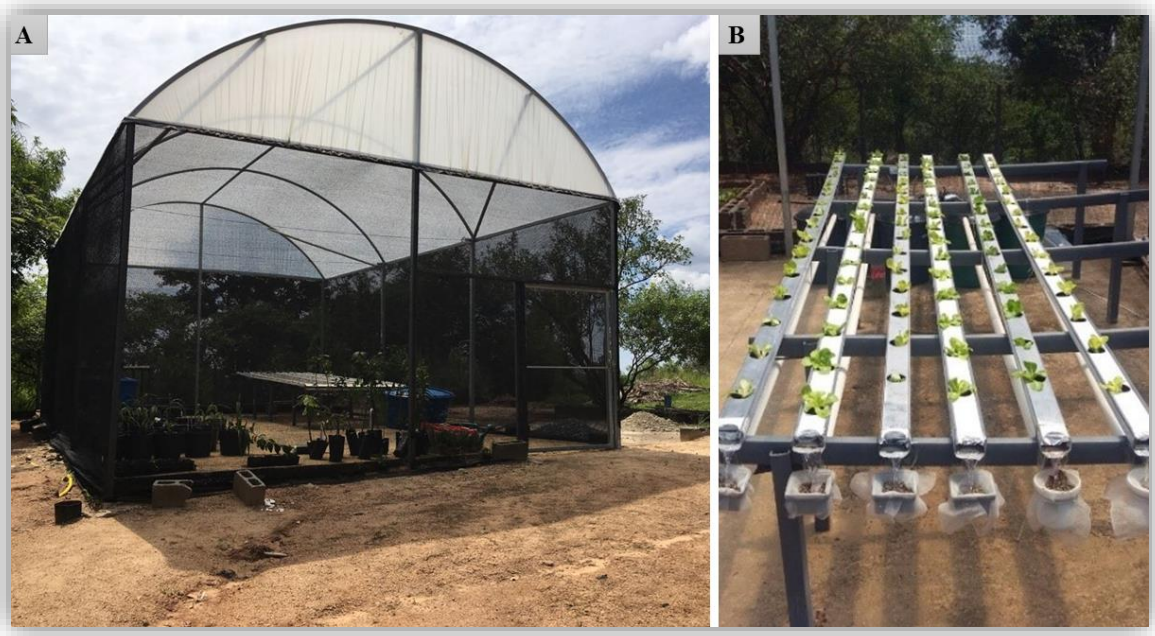
4.4 Avaliação do Desempenho das Nanopartículas Biogênicas de Ferro em Hidroponia

Para avaliar o desempenho das nanopartículas biogênicas de ferro em ambiente hidropônico foram realizados testes de campo com alface (*Lactuta sativa L.*) cultivar ‘Elisa’ e tomate (*Solanum lycopersicum L.*) cultivar ‘Samambaia’.

4.4.1 Avaliação em Hidroponia de Alface

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação do tipo arco, localizada no Núcleo de Estudos Ambientais da Universidade de Sorocaba, latitude: 23°29'51.99"S e longitude: 47°23'16.25"O, no período de setembro a novembro de 2017 (Figura 6A). O sistema hidropônico utilizado foi da marca *Hidrogood* composto por uma bancada e seis perfis para 15 plantas cada, abrigando um tratamento por perfil. Cada tratamento possui ainda uma caixa de armazenamento de solução nutritiva de 50 litros individual, uma bomba submersa, para movimentação da solução pelo perfil, da marca *Sarlo Beter* modelo 1000C e um aerador de solução (Figura 6B).

Figura 6 – Local dos experimentos. A – Casa de vegetação tipo arco do NEAS. B – Sistema hidropônico de alface.



Fonte: Elaboração própria.

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casual, constando de 6 tratamentos com 15 repetições cada totalizando 90 parcelas, com 1 planta em cada parcela experimental, para a análise estatística foi realizada análise de variância utilizando-se o software PAST. Os tratamentos utilizados estão descritos na Tabela 2 tendo como base a solução proposta por Furlani (1999), com alterações na concentração e na fonte de ferro utilizada sendo o T1 o controle positivo e o T2 o controle negativo. As soluções nutritivas utilizadas foram preparadas com fertilizantes comerciais, tanto para macros quanto para os micronutrientes com o pH ajustado para 5,5, sendo:

Tabela 2 - Soluções nutritivas dos tratamentos utilizados no experimento de alface (mg/L).

Solução	**T1 Fe100/NP0**	**T2 Fe0/NP0**	**T3 Fe50/NP50**	**T4 Fe0/NP100**	**T5 Fe50/NP0**	**T6 Fe0/NP50**
Furlani	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Fe-EDTA	30	0	15	0	15	0
Fe-NP (mL)	0	0	2,68	5,37	0	2,68

Fonte: Elaboração própria.

Onde,
T1 (Fe100/NP0) = Solução de Furlani com Fe-EDTA a 100% da dose e com Fe-NP a 0% da dose.
T2 (Fe0/NP0) = Solução de Furlani com Fe-EDTA a 0% da dose e com Fe-NP a 0% da dose.
T3 (Fe50/NP50) = Solução de Furlani com Fe-EDTA a 50% da dose e com Fe-NP a 50% da dose.
T4 (Fe0/NP100) = Solução de Furlani com Fe-EDTA a 0% da dose e com Fe-NP a 100% da dose.
T5 (Fe50/NP0) = Solução de Furlani com Fe-EDTA a 50% da dose e com Fe-NP a 0% da dose.
T6 (Fe0/NP50) = Solução de Furlani com Fe-EDTA a 0% da dose e com Fe-NP a 50% da dose.

Para a dosagem de ferro através da Fe-NP, fez-se o seguinte cálculo:

Quantidade de ferro presente na Fe-NP:

0,2 M $FeCL_2$ = 1,9874 g x 28,09% Fe = 0,5582 g de Fe

0,1 M $FeCL_3$ = 1,3513 g x 20,66% Fe = 0,2789 g de Fe

} 0,8371 g de Fe na Fe-NP

Concentração de Fe na solução de Fe-NP

Quantidade de Fe na Fe-NP = 0,8371 g

ou

Volume final de Fe-NP = 50 mL

} 0,0167438 g Fe/mL

16,7438 mg Fe/mL

Volume de solução de Fe-NP para suprir a necessidade de ferro em 50 L de solução nutritiva.

1,8 mg/L de Fe na Solução Nutritiva (FURLANI, 1999) — 5,37 mL Fe-NP - 100%

16,7438 mg/mL de Fe na Solução de Fe-NP — 2,68 mL Fe-NP – 50%

Sendo o volume de Fe-NP para 100% da dose recomendada de 5,37 mL e para 50% da dose recomendada de 2,68 mL.

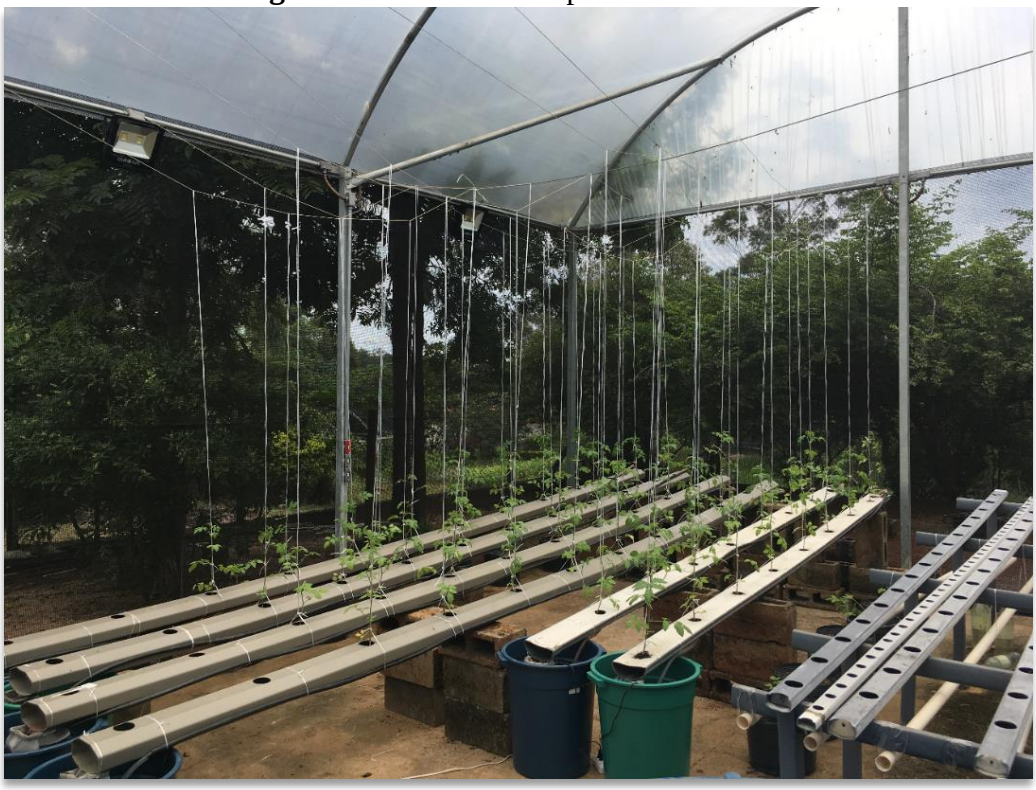
Foram realizadas medições diárias da condutividade elétrica, com condutivímetro portátil marca *Instrutherm* modelo CD-880, e das temperaturas máximas e mínimas da solução e do ambiente, com Termo-higrômetro da marca *Instrutherm* modelo HT-50.

Semanalmente foram coletadas informações sobre a altura das plantas utilizando-se uma régua milimetrada. Na colheita foram medidas a quantidade total de folhas, o índice de clorofila com auxílio do aparelho SPAD (*Soil Plant Analysis Development*) 502, marca *Konica Minolta*, o comprimento do sistema radicular, a massa fresca da parte aérea e a massa fresca do sistema radicular. A parte aérea e o sistema radicular ainda foram secados em estufa a 60ºC por 36 horas e suas respectivas massas secas foram medidas.

4.4.2 Avaliação em Hidroponia de Tomate

Para avaliação de hidroponia em tomates foi utilizado o sistema hidropônico da marca *Dynacs* composta por uma bancada com seis perfis para 8 plantas em cada perfil, abrigando um tratamento em cada perfil. Cada tratamento possui ainda uma caixa de armazenamento da solução nutritiva, de 50 litros, uma bomba submersa da marca *Sarlo Beter* modelo 1000C e um aerador de solução (Figura 7).

Figura 7 – Sistema hidropônico de tomate.



Fonte: Elaboração própria.

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casual, constando de 6 tratamentos com 8 repetições cada, com 1 planta em cada parcela experimental, para a análise estatística foi realizada análise de variância utilizando-se o software PAST. Os tratamentos utilizados constam da tabela 2, tendo como base a solução proposta por Hochmuth (2001), com alterações na concentração e na fonte de ferro utilizada sendo o T1 o controle positivo e o T2 o controle negativo. As soluções nutritivas utilizadas foram preparadas utilizando-se fertilizantes comerciais, tanto para macros quanto para os micronutrientes com o pH ajustado para 5,5 (Tabela 3).

Tabela 3 - Soluções nutritivas dos tratamentos utilizados no experimento de tomate (mg/L).

Solução	**T1 Fe100/NP0**	**T2 Fe0/NP0**	**T3 Fe50/NP50**	**T4 Fe0/NP100**	**T5 Fe50/NP100**	**T6 Fe0/NP50**
Hochmuth	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Fe-EDTA	0,047	0	0,0235	0	0,0235	0
Fe-NP (mL)	0	0	4,18	8,36	0	4,18

Fonte: Elaboração própria .

Onde,

T1 (Fe100/NP0) = Solução de Hochmuth com Fe-EDTA a 100% da dose e com Fe-NP a 0% da dose.
T2 (Fe0/NP0) = Solução de Hochmuth com Fe-EDTA a 0% da dose e com Fe-NP a 0% da dose.
T3 (Fe50/NP50) = Solução de Hochmuth com Fe-EDTA a 50% da dose e com Fe-NP a 50% da dose.
T4 (Fe0/NP100) = Solução de Hochmuth com Fe-EDTA a 0% da dose e com Fe-NP a 100% da dose.
T5 (Fe50/NP0) = Solução de Hochmuth com Fe-EDTA a 50% da dose e com Fe-NP a 0% da dose.
T6 (Fe0/NP50) = Solução de Hochmuth com Fe-EDTA a 0% da dose e com Fe-NP a 50% da dose.

Para a dosagem de ferro através da Fe-NP, fez-se o seguinte cálculo:

O cálculo do volume de solução de Fe-NP para suprir a necessidade de ferro em 50 L de solução nutritiva foram os mesmos descritos no item 4.4.1:

2,8 mg/L de Fe na Solução Nutritiva (HOCHMUTH, 2001) — 8,36 mL Fe-NP - 100%

16,7438 mg/mL de Fe na Solução de Fe-NP — 4,18 mL Fe-NP – 50%

Sendo então o volume de Fe-NP para 100% da dose recomendada de 8,36 mL e para 50% da dose recomendada de 4,18 mL.

Foram realizadas medições diárias da condutividade elétrica com condutivímetro portátil marca *Instrutherm* modelo CD-880 e também das temperaturas máximas e mínimas da solução e do ambiente com Termo-higrômetro da marca *Instrutherm* modelo HT-50.

A cada sete dias foram coletadas informações sobre a altura das plantas com o auxílio de uma fita métrica até a sétima semana, quando foi realizada uma poda apical nas plantas. Na colheita foram medidos a massa fresca dos frutos produzidos, a quantidade de frutos produzidos e o comprimento do sistema radicular.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização Físico-Química da Nanopartícula Biogênica de Ferro.

Os resultados de Diâmetro, Índice de Polidispersão (PDI) e Potencial Zeta utilizando o DLS são mostrados na Tabela 4. A concentração foi medida pela técnica de NTA sendo determinada uma concentração de $2{,}5x10^{10}$ NPs/mL.

Tabela 4 - Leituras de dispersão de tamanho hidrodinâmico (Z-médio), índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta por DLS.

Nanopartícula	Diâmetro (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
Fe-NP	439,77±12,06	0,246±0,005	15,23±0,68

Fonte: Elaboração própria.

Os valores de potencial zeta e índice de polidispersão indicam uma baixa variação do tamanho hidrodinâmico da Fe-NP e boas características físico-químicas conforme descrito nas diretrizes da Nanocomposix (2012). Segundo Iravani (2014), descrevem a utilização de agentes biológicos como estabilizadores na síntese de nanopartículas pode aumentar a estabilidade e a dispersão das nanopartículas.

Em 2010, Cifuentes et al. produziram uma NP com núcleo de aproximadamente 10 nm de diâmetro, não biogênicas de ferro com características magnéticas denominadas SPIONs, assim como Ghafariyan et al. (2013), que sintetizaram NP de ferro semelhante as sintetizadas por Cifuentes et al. (2010), obtiveram NP com núcleo de 9±0,2 nm de diâmetro. Estas foram recobertas com revestimento a base de carbono (dextranos) para anular a sua natureza hidrofóbica e passaram a ter diâmetro de 19,7±0,4 nm. Assim como Hong et al. (2015) as nanopartículas não biogênicas apresentaram diâmetro hidrodinâmico menor que as NP biogênicas em geral, assim como, diâmetro bem menor do que o apresentado neste trabalho.

Mazumdar et al. (2011) demonstraram a síntese de NP biogênicas de ferro, utilizando o fungo *Pleurotus sp.* produziu NP com diâmetro de 226 nm. Porém é possível encontrar na literatura publicações que mostram valores menores de síntese de nanopartículas biogênicas, como as NP de cádmio biosintetizadas com o auxílio de *Schizosaccharomyces pombe* (KOWSHIK et al., 2002), a qual apresentou 1,5 nm, o trabalho de Sastry et al. (2003) que mostraram NP de Sílica biossintetizadas utilizando *Fusarium oxysporum* com 5 nm de diâmetro.

Estudos mostram que Ag-NPs apresentam características bactericidas, sendo reportadas a biossíntese dessas NP com *Boswellia ovalifoliolata*, com diâmetro de 40 nm (ANKANNA et

al., 2010), assim como Guilguer et al. (2017) que sintetizaram NP biogênicas de prata utilizando *Trichoderma harzianum* como agente redutor e que apresentaram diâmetro de 100,7±0,3 nm.

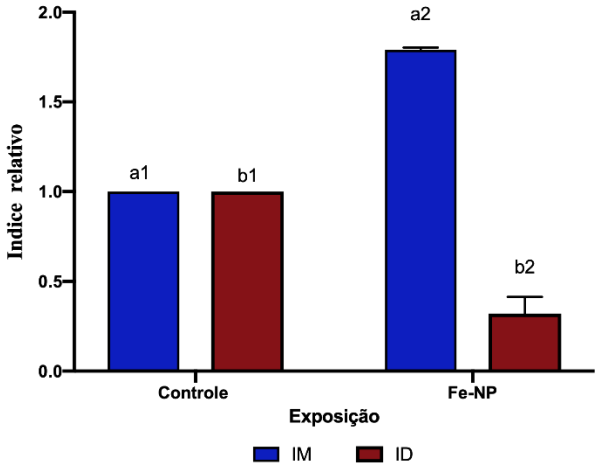
Com relação à NP biogênicas de ferro, Bharde et al. (2006), trabalhando com *Verticillium sp.* e *Fusarium oxysporum* obtiveram nanopartículas com diâmetros que variaram de 20 a 50 nm para *F. oxysporum* e de 100 a 400 nm para *Verticillium sp*.

Estas informações mostram que há uma grande variação no diâmetro das NP biogênicas sintetizadas em pesquisas, causada por diversos fatores como a espécie do organismo utilizado e o sal do metal (IANNONE et al., 2016).

5.2 Avaliação da Genotoxicidade.

Na análise realizada pela técnica de *Allium cepa* com a Fe-NP em concentração de síntese ($2,5x10^{10}$) foi possível observar que esta apresenta baixa toxicidade em relação a NPs encontradas na literatura, com índices relativos de mitose (IM) e de danos (ID) mostrados na Figura 8.

Figura 8 – Índice de mitótico (IM) e índice de dano (ID) da Fe-NP pelo *Allium cepa* a concentração $2,5x10^{10}$. IM-C: Índice mitótico controle; ID-C: Índice de dano controle; IM-NP: Índice mitótico da NP; ID-NP: Índice de dano da NP.



Números diferentes indicam diferença estatística pelo teste de Tukey com $p < 0,05$.
Fonte: Elaboração própria.

Estudos mostram que as nanopartículas se comportam de maneira diferente uma das outras com relação à sua toxicidade, dependendo da forma como foram sintetizadas, o agente redutor utilizado, se biológico ou não, além da concentração e tempo de exposição (KUMARI; MUKHERJEE; CHANDRASEKARAN, 2009; BADU et. al., 2008).

Há uma escassez de trabalhos sobre a toxicidade de nanopartículas de ferro biogênicas, sendo mais comum estudos com nanopartículas de prata, nos quais foram reladas toxicidade da

nanopartículas (PANDA et al., 2011; LIMA et al., 2013; GUILGER et al., 2017; GUILGER et al., 2018).

5.3 Avaliação da Fe-NP em Hidroponia.

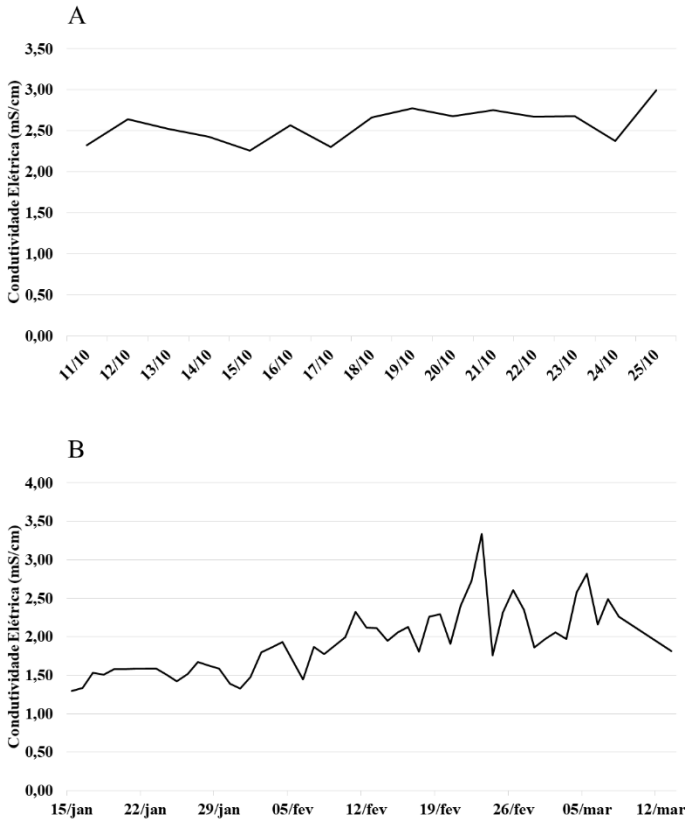
A avaliação das Fe-NPs foi realizada em cultivos hidropônicos de alface e de tomate. O cultivo hidropônico foi escolhido por evidenciar a utilização do ferro como nutriente, uma vez que este deve ser fornecido via solução nutritiva. Nos cultivos convencionais, como o ferro faz parte da estrutura do solo, este não precisa ser suplementado, o que dificultaria a obtenção dos dados.

5.3.1 Parâmetros Físico-Químicos

Apesar da variação da condutividade elétrica (EC) ao longo do tempo, tanto no cultivo de alface apresentado na figura 9A (entre 2,3 e 3,0 mS/cm) quanto no de tomate apresentado na figura 9B (entre 1,3 e 2,8 mS/cm), estão de acordo com o recomendado por Furlani (1999) e Cometti (2008), onde se pode utilizar condutividade elétrica da solução nutritiva entre 1,5 e 3,0 mS/cm para o cultivo do alface, e de 1,4 a 4,0 mS/cm para o cultivo do tomate. Entretanto Soares (2002) estipula uma EC entre 1,6 e 1,8 dS/m para regiões quentes, Cometti et al. (2008) estipularam uma EC de 1,0 dS/m para regiões áridas.

Podemos levar em consideração à recomendação de Helbel Junior et al. (2007), onde a condutividade elétrica ideal de uma solução nutritiva irá depender do clima da região, da espécie e do cultivar utilizado, sendo complementado por Steidle Neto et al. (2005), onde outro fator que deve ser levado em consideração é a temperatura da solução nutritiva.

Figura 9 – Variação da condutividade elétrica das soluções nutritivas dos cultivos. Em A) Alface e em B) Tomate.



Fonte: Elaboração própria

Em relação a cultura de tomate (Figura 9B), notou-se uma maior variação da condutividade elétrica o que resultou em um aumento do consumo da solução nutritiva nas últimas semanas de cultivo, devido a maior evapotranspiração das plantas em estágio máximo de desenvolvimento e maturação dos frutos, porém esta variação não alterou os resultados.

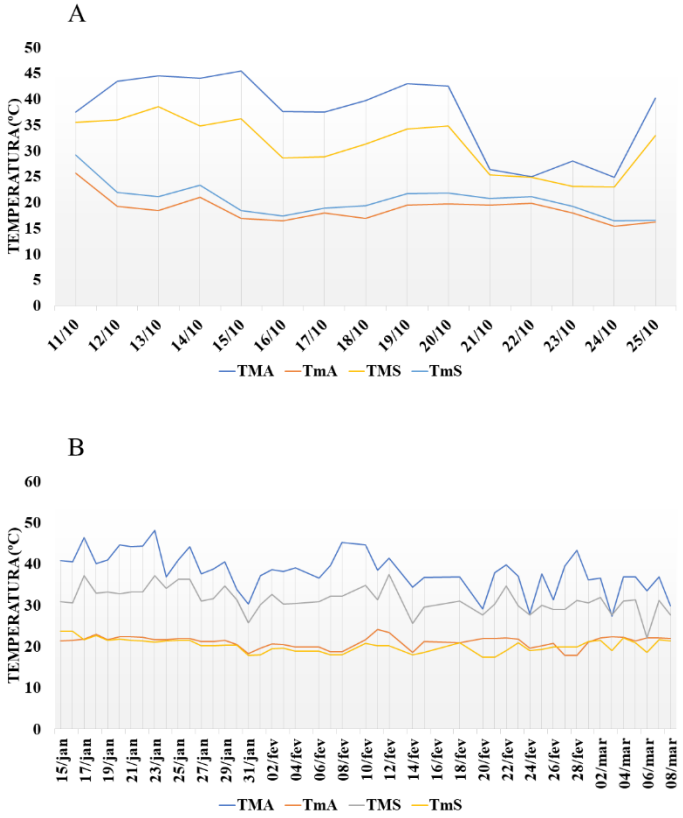
A variação da condutividade elétrica de uma solução nutritiva leva a alterações no mecanismo de abertura e fechamento dos estômatos e crescimento da área foliar, que se relacionam com uma maior eficiência fotossintética e produtividade (COSTA et al., 2001).

Em relação a temperatura, a recomendada por Furlani (1999) para o cultivo hidropônico, tanto para o ambiente como para a solução é de 24 ± 3ºC. Os valores das temperaturas do ambiente e da solução nutritiva ao longo do cultivo, são mostradas na Figura 10. Para a alface (10A), entre 27,9 ºC e 25,8 ºC e o tomate (10B), entre 29,5 ºC e 25,6 ºC. Essa faixa ótima de temperatura entre 21 ºC e 27 ºC assegura uma boa solubilidade e disponibilização dos sais para absorção radicular e do oxigênio dissolvido na água, sem que ocorra a hipoxia do sistema radicular, isto é redução dos níveis de oxigênio na raiz da planta (ANDRIOLO et al., 2004). Com o aumento da temperatura da solução nutritiva, o oxigênio (O_2) diminui a sua solubilidade

e consequentemente a sua concentração, reduzindo assim o crescimento das plantas no cultivo hidropônico (COMETTI et al., 2013).

Wang e Tachibana (1996) e Lee (1994), trabalhando com pepino, relataram que o aumento da temperatura no sistema radicular dessas plantas diminuiu o crescimento da raiz, a taxa de expansão foliar, o teor de água na folha e a atividade fotossintética dessas plantas. Inversamente, Urrestarazu et al. (2008) trabalhando com a mesma espécie relataram que em temperatura abaixo de 18 ºC da solução nutritiva pode ocorrer atrasos na maturação dos frutos para a colheita.

Figura 10 – Variação da temperatura do ambiente e das soluções nutritivas dos cultivos. Em A) Alface e em B) Tomate.

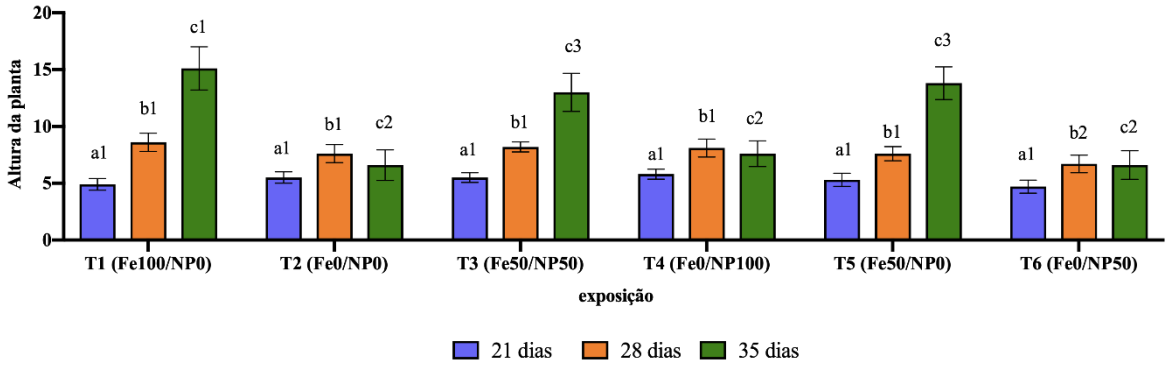


Fonte: Elaboração própria

5.3.2 Crescimento das Plantas

O crescimento das plantas mostrou que as plantas de alface submetidas aos tratamentos sem a adição de Fe-EDTA desenvolvem-se fisiologicamente normais até os 28 dias após a semeadura (DAS). Este cresimento inicial se deve possivelmente ao suprimento de ferro residual existente no substrato de formação das mudas, entretanto após este período inicial o crescimento da planta estabilizou, com a ocorrência de mortes de algumas plantas (Figura 11).

Figura 11 – Crescimento das plantas de alface nas medições de 21, 28 e 35 DAS (Dias após a semeadura).



Números diferentes na linha indicam diferença estatística pelo teste de Tukey com p<0,05.
Fonte: Elaboração própria.

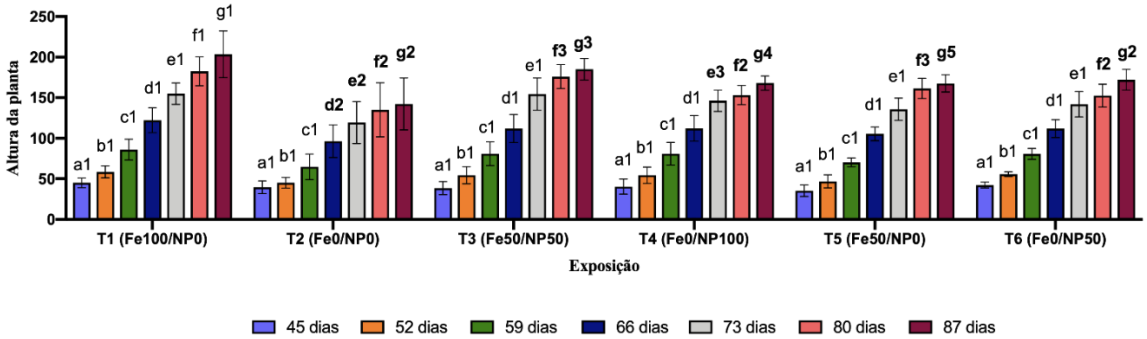
O mesmo comportamento foi observado nas plantas de tomate (Figura 12), onde devido ao maior volume de substrato, as plantas dos tratamentos que não receberam Fe-EDTA apresentaram desenvolvimento igual ao controle positivo até os 66 DAS (Dias após a semeadura), provavelmente pelo suprimento de ferro existente no substrato. Entretanto no período entre 73 DAS e 87 DAS o crescimento das mesmas cessa, porém não foram observadas mortes de plantas como no caso da alface. Sheykhbaglou et al (2010), trabalhando com aplicações foliares de nanopartículas de óxido de ferro em soja, mostraram que o ferro presente nas nanopartículas provavelmente é utilizado pelas plantas em condições de baixa disponibilidade de ferro no solo.

O resultado de Sheykhbalou et al. (2010) é corroborado por Nadi et al (2013) e Elfeky et al (2013) que sugerem que presença da nanopartícula de ferro não inibe a utilização de outras fontes de ferro, conforme sugerido pelos dados da figura 11, comparando os tratamentos Fe50/NP50 e Fe50/NP0, onde a altura da planta foi estatisticamente igual para o mesmo suprimento de ferro, contendo ou não a Fe-NP.

Entretanto para a nanopartículas biogênicas de ferro, onde o diâmetro hidrodinâmico é maior quando comparada com nanopartículas não biogênicas, a liberação do ferro pela nanopartícula pode ser limitado, conforme relata Iannone et al (2016), não substituindo a

utilização de fertilizantes, resultado semelhante aos obtidos no presente estudo, onde os tratamentos que não possuem Fe-EDTA, sendo eles Fe0/NP0, Fe0/NP50 e Fe0/NP100.

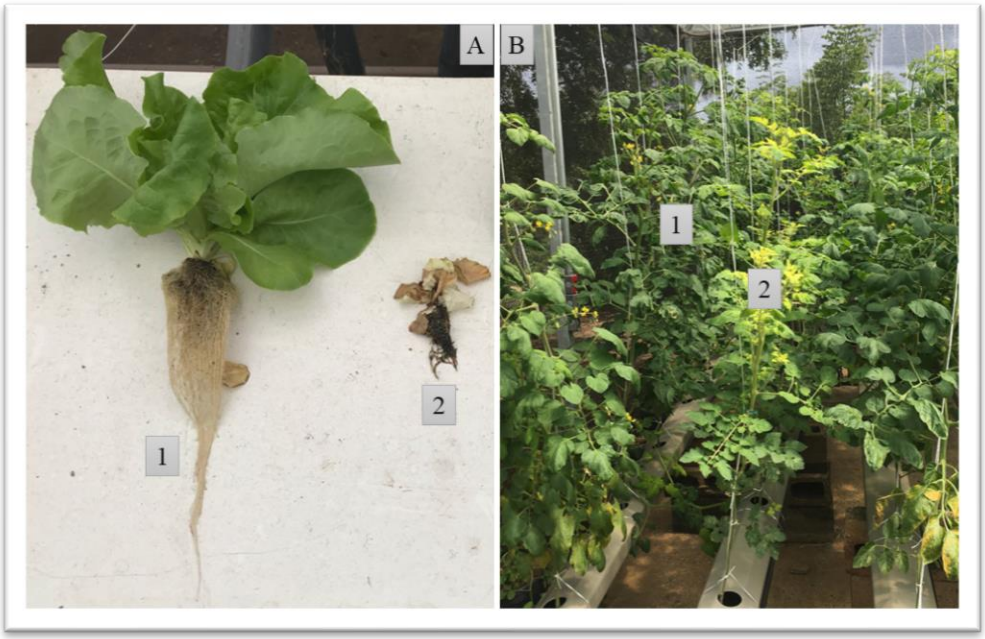
Figura 12 – Desenvolvimento das plantas de tomate nas medições de 45, 52, 66, 73, 80 e 87 DAS (Dias após a semeadura).



Números diferentes na linha indicam diferença estatística pelo teste de Tukey com $p<0,05$.
Fonte: Elaboração própria

Nota-se ainda nas figuras 11 e 12 que há diferença estatística significativa da altura entre as plantas nos tratamentos com ferro quelato, Fe100/NP0 e Fe50/NP50. Além disso houve a presença dos sintomas da deficiência de ferro, identificada como clorose internerval, devido à falta do pigmento clorofila no tecido parenquimático das folhas (Figura 13). Conforme descrito por Hochmuth (2011) o Fe tem um papel essencial na síntese de clorofila, sendo essa caraterística apontada como razão para o aparecimento de clorose internerval nas folhas.

Figura 13 – Plantas de alface e tomate normais e com sintomas de deficiência de ferro. Em A) Alface: 1 – Alface com desenvolvimento normal aos 35 DAS e 2 – Alface com deficiência de ferro aos 35 DAS. Em B) Tomate: 1 – Tomateiro com desenvolvimento normal aos 66 DAS; 2 – Tomateiro com deficiência de ferro aos 66 DAS.



Fonte: Elaboração própria

Na alface é possível observar que as plantas que receberam Fe-EDTA, sendo eles o Fe50/NP50 e o Fe50/NP0, demonstraram um crescimento que não difere estatisticamente entre si, porém diferem do controle Fe100/NP0 pelo teste de Tukey a 5% de significância. Estes resultados sugerem que as plantas destes tratamentos demonstraram uma deficiência deste nutriente, pelo fornecimento da metade da dose recomendada por Furlani (1999), enquanto que os tratamentos que não receberam Fe-EDTA, Fe0/NP100 e Fe0/NP50, demonstraram um crescimento significativamente menor pelo teste de Tukey a 5% de significância do controle Fe100/NP0, sendo estes estatisticamente iguais ao controle negativo pelo mesmo teste, sugerindo que, com a presença ou ausência da Fe-NP, a utilização de Fe-EDTA é imprescindível para um bom crescimento das plantas de alface fornecendo o ferro para o seu metabolismo da planta, não sendo este nutriente suprido em sua totalidade pela Fe-NP.

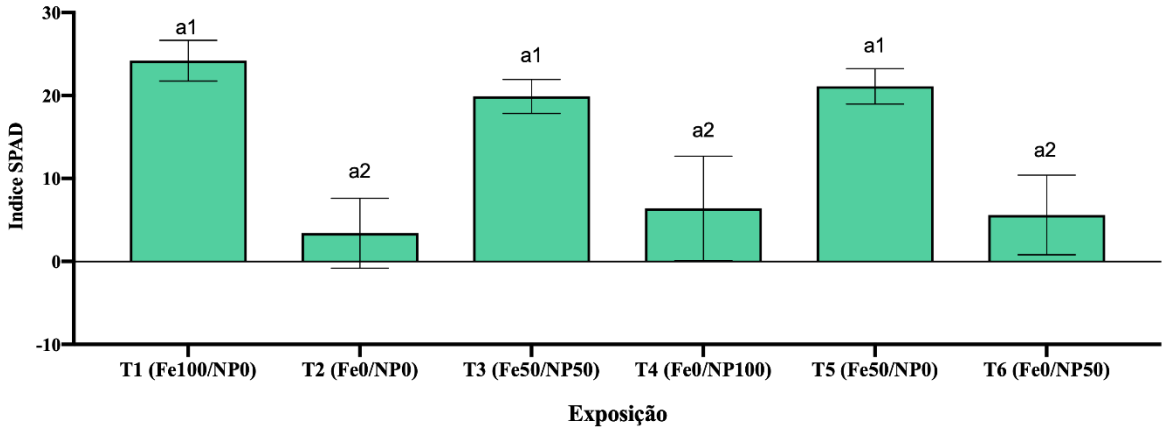
O mesmo comportamento foi observado no cultivo do tomate, onde os tratamentos com metade da dose recomendada de ferro por Hochmuth (2001) Fe50/NP50 e Fe50/NP0, que receberam Fe-EDTA com ou sem a utilização da Fe-NP diferiram significativamente do controle. Porém apresentaram ainda um desenvolvimento significativamente melhor que os tratamentos que não receberam Fe-EDTA, Fe0/NP0, FE0/NP50 e Fe0/NP100, pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Os resultados indicam que a Fe-NP, nas concentrações de $1{,}1x10^6$ NP/mL para a alface e $1{,}26x10^6$ NP/mL para tomate, não inibem a absorção de Fe-EDTA. Esse resultado foi semelhante ao obtido por Iannone et al. (2016), onde as nanopartículas de óxido de ferro (III) não inibiram o crescimento das plantas de trigo em cultivo hidropônico quando foram suplementadas com Fe-EDTA. Isso pode ser um indicativo importante em relação a utilização de nanopartículas de ferro como agente de controle de doenças do sistema radicular, sendo uma das inovações que a nanotecnologia pode trazer à agricultura (FRACETO et al., 2016).

5.3.2 Índice SPAD de Clorofila nas Plantas

Uma vez que o ferro é um micronutriente que age na síntese da clorofila (BAUER; HELL 2006; ARNAUD et al., 2006; HOCHMUTH, 2001; TAIZ; ZEIGER, 2013), foram realizadas medições do índice SPAD nas plantas de alface aos 35 DAS. Os resultados mostraram que nos tratamentos nos quais não há presença do Fe-EDTA, mas somente da Fe-NP ou não há fonte de ferro o índice SPAD de clorofila é semelhante aos resultados obtidos por Almeida et al. (2011), onde em experimento de omissão de nutrientes, obtiveram valores de índice SPAD de 2,43 na omissão de nitrogênio, que causa a mesma deficiência que o ferro na planta. O nitrogênio também é necessário para a síntese da clorofila, sugerindo que houve deficiência do ferro nestes tratamentos (Figura 14).

Figura 14 – Índice de SPAD na cultura de alface.



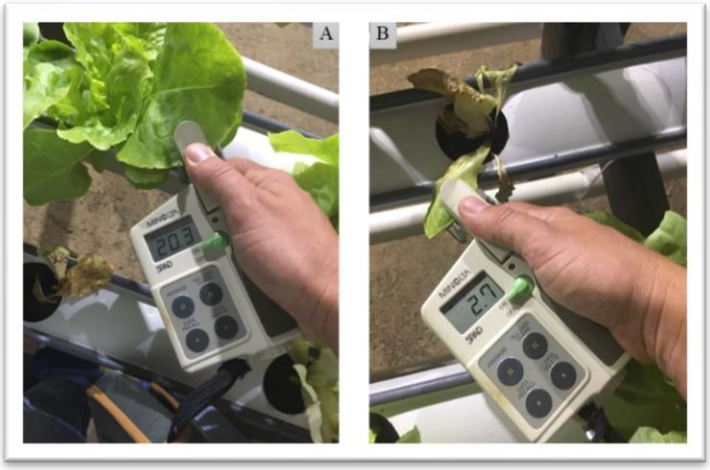
Números diferentes na linha indicam diferença estatística pelo teste de Tukey com $p<0{,}05$.
Fonte: Elaboração própria

Na Figura 15, pode-se visualizar, a medição do índice SPAD em uma planta com desenvolvimentos normal, em uma planta sem deficiência de Fe (Figura 14 A) e outra com deficiência de ferro (Figura 14 B). Em ambientes onde o ferro não é deficiente, como em cultivos a campo, o índice SPAD não é alterado com a aplicação de nanopartículas de ferro, como demonstrado por Nadi et al (2013), onde a aplicação de nanopartículas de ferro quelato

em soja, via solo e foliar, não demonstrou diferença significativa no índice SPAD com relação ao controle.

O método de aplicação da nanopartícula de ferro também pode influenciar a disponibilidade de ferro, Elfeky et al (2013) trabalhando com aplicação via solo e foliar de nanopartículas de ferro em manjericão sugerem que a aplicação via foliar é mais efetiva que a aplicação via solo, demonstrados pelos maiores valores de índice.

Figura 15 – Medição do índice SPAD em uma planta com desenvolvimento normal (A) e com deficiência de ferro (B).



Fonte: Elaboração própria

5.3.3 Parâmetros Agronômicos

Após a colheita aos 35 DAS foram realizadas as medições dos parâmetros de produção em alface, sendo realizada medidas de altura da planta, número de folhas, comprimento de raiz, massa fresca da parte aérea, matéria seca da parte aérea, massa fresca da raiz, matéria seca da raiz (Tabela 5). Aos 110 DAS foram realizadas as medições de produção em tomate realizando medida de comprimento de raiz, massa fresca da raiz e matéria seca da raiz (Tabela 6).

Tabela 5 - Parâmetros agronômicos nos tratamentos de alface.

Parâmetro	T1 Fe100/NP0		T2 Fe0/NP0		T3 Fe50/NP50		T4 Fe0/NP100		T5 Fe50/NP0		T6 FE0/NP50	
	Média	**DP**	**Média**	**DP**	**Média**	**DP**	**Média**	**DP**	**Média**	**DP**	**Média**	**DP**
Altura de planta (cm)	15,1 ^{a1}	1,9	7,5 ^{a2}	1,1	12,9 ^{a1}	1,7	6,5 ^{a2}	1,3	13,7 ^{a1}	1,4	6,6 ^{a2}	1,3
Número de folhas	11,9 ^{b1}	1,1	4,6 ^{b2}	1,2	11,8 ^{b1}	1,5	5,8 ^{b1}	0,7	12,4 ^{b1}	1,3	6,9 ^{b2}	1,8
Comprimento de raiz (cm)	19,5 ^{c1}	3,9	5,0 ^{c2}	0,1	18,9 ^{c1}	3,2	5,5 ^{c2}	0,8	20,6 ^{c1}	3,8	5,0 ^{c2}	0,2
Massa fresca parte aérea (g/planta)	13,1 ^{d1}	3,7	0,6 ^{d2}	0,4	11,5 ^{d1}	4	1,1 ^{d2}	0,4	12,3 ^{d1}	3,2	1,9 ^{d2}	1,1
Matéria seca parte aérea (g/planta)	0,8 ^{e1}	0,2	0,1 ^{e2}	0,1	1,0 ^{e1}	0,2	0,1 ^{e2}	0,1	1,1 ^{e1}	0,1	0,1 ^{e2}	0,1
Massa fresca raiz (g/planta)	7,2 ^{f1}	2,4	1,4 ^{f2}	1,5	9,9 ^{f1}	3,9	5,43 ^{f1}	2,6	9,6 ^{f1}	2,8	6,8 ^{f1}	1,6
Matéria seca raiz (g/planta)	0,7 ^{g1}	0,2	0,3 ^{g1}	0,2	1,4 ^{g2}	0,1	0,6 ^{g1}	0,4	1,2 ^{g2}	0,1	0,8 ^{g1}	0,2

Letras seguidas de números diferentes na linha indicam diferença estatística pelo teste de Tukey com $p<0,05$.
Fonte: Elaboração própria

Tabela 6 - Parâmetros agronômicos nos tratamentos de tomate.

Parâmetro	T1 Fe100/NP0		T2 Fe0/NP0		T3 Fe50/NP50		T4 Fe0/NP100		T5 Fe50/NP0		T6 FE0/NP50	
	Média	**DP**	**Média**	**DP**	**Média**	**DP**	**Média**	**DP**	**Média**	**DP**	**Média**	**DP**
Produção (g/planta)	222,3 ^{a1}	37,5	64,5 ^{a2}	14,7	223,4 ^{a1}	15,5	38,6 ^{a2}	4,2	220,2 ^{a1}	12,0	64,1 ^{a2}	7,2
Comprimento de raiz (cm)	84,25 ^{b1}	19,9	78,87 ^{b1}	20,5	97,00 ^{b1}	16,0	47,12 ^{b2}	13,2	85,14 ^{b1}	24,8	77,12 ^{b1}	25,2
Massa fresca raiz (g)	381,5 ^{c1}	11,2	314,2 ^{c1}	14,3	378,0 ^{c1}	13,1	171,4 ^{c2}	8,2	384,3 ^{c1}	16,3	321,5 ^{c1}	12,5
Matéria seca raiz (g)	85,9 ^{d1}	5,6	76,2 ^{d1}	5,2	75,2 ^{d1}	4,6	40,3 ^{d2}	4,3	78,2 ^{d1}	3,2	72,4 ^{d1}	4,7

Letras seguidas de números diferentes na linha indicam diferença estatística pelo teste de Tukey com $p<0,05$.
Fonte: Elaboração própria

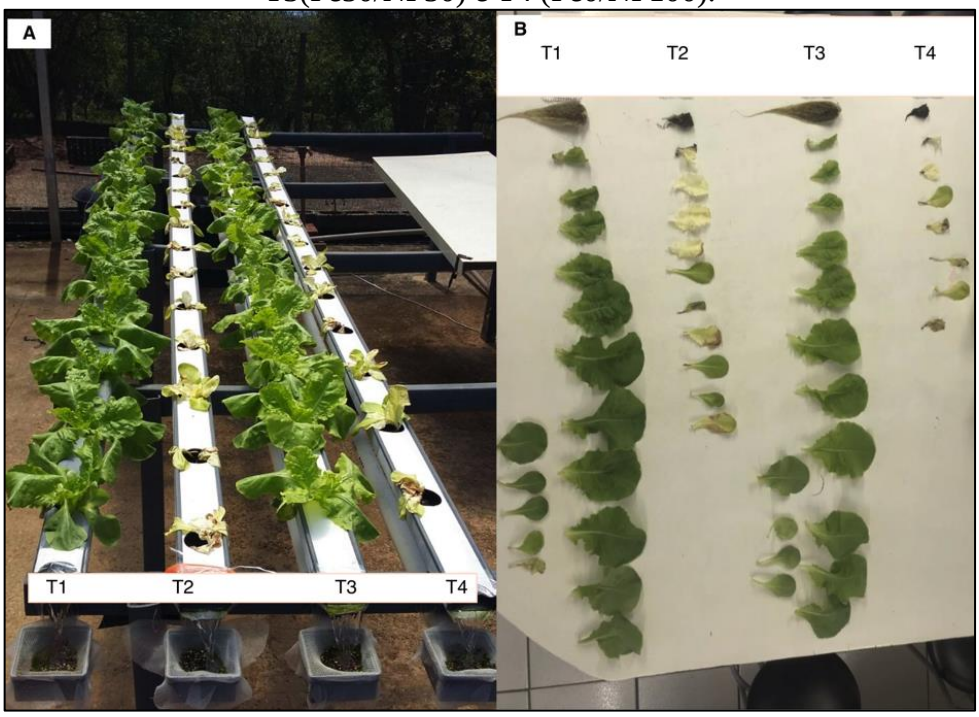
As plantas de alface nos tratamentos Fe50/NP50 e Fe50/NP0, não diferiram significativamente do tratamento controle Fe100/NP0, com 12,9 e 13,7 cm no tamanho de plantas, 11,8 e 12,4 no número de folhas, 18,9 cm e 20,6 cm no comprimento de raiz, 11,5 g e 12,3 g para massa fresca da parte aérea, 1,0 g e 1,1 g para matéria seca da parte aérea, 9,9 g e 9,6 g para massa fresca de raiz (tabela 5).

Em contrapartida, as plantas que receberam Fe-NP como fonte de ferro exclusiva, as Fe0/NP100 e Fe0/NP50, mostraram um baixo desenvolvimento, com 6,5 e 6,6 cm de plantas, 5,8 e 6,9 folhas, 5,5 cm e 5,0 cm de raiz, 1,1 g e 1,9 g de massa fresca da parte aérea, 0,1 g e 0,1 g de matéria seca de parte aérea e 5,4 g e 6,8 g de massa fresca de raiz, sendo estatisticamente igual ao Fe0/NP0.

Os dados de altura da planta e índice SPAD demonstram que apesar da Fe-NP estar presente nos tratamentos Fe0/NP100 e Fe0/NP50, estas plantas não apresentaram desenvolvimento, assim como o índice SPAD de clorofila foram extremamente baixos, semelhantes ao encontrado por Almeida et al. (2011) onde as plantas não apresentavam clorofila, levando algumas das plantas inclusive à morte (Figura 16). Estes resultados sugerem que a presença de Fe-NP não supriu a quantidade de ferro necessária para a planta, não sendo utilizada para a síntese de clorofila.

Em estudo realizado por Ghafariyan et al. (2013), onde utilizaram plantas de soja em hidroponia os autores sugerem que as possíveis influências de que nanopartículas magnéticas de ferro participam doando íons para a síntese de clorofila, porém o ferro proveniente de quelato EDTA é mais eficiente em fornecer estes íons para a síntese de clorofila e mantêm o desenvolvimento da planta normal.

Figura 16 – Cultura de alface em diferentes tratamentos. T1 e T2 ao centro correspondem aos controles, sendo T2 controle negativo (Fe0/NP0) e T1(Fe100/NP0) controle do tratamento utilizado sistema com parâmetros convencionais. As indicações correspondem a T3(Fe50/NP50) e T4 (Fe0/NP100).



Fonte: Elaboração própria

Na cultura de tomate foi observado que a produção de frutos foi fortemente afetada pela fonte de ferro, sendo que os tratamentos que receberam Fe-EDTA T1 (Fe100/NP0), T3 (Fe50/NP50) e T5 (Fe50/NP0), as plantas produziram significativamente mais frutos quando comparadas as plantas que receberam ferro como Fe-NP. Os parâmetros relativos ao sistema radicular não foram afetados, demonstrando que a deficiência de ferro age na parte aérea, com a diminuição do porte da planta, a diminuição da quantidade de clorofila, pois o ferro é um metal constituinte de citocromos e proteínas que agem em reações que envolvem o transporte de elétrons como a fotossíntese e a respiração e consequentemente diminuição da produção (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Em experimentos com alface e alfafa hidropônicas expostas a NP de cobre com tamanhos entre 10 e 100 nm de diâmetro, Hong et. al. (2015) chegam à conclusão de que quanto menor o diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas, maior é a absorção desta nanopartícula pelo sistema radicular da planta. Isso sugere que outro fator que possivelmente influenciou a disponibilidade de ferro para a planta foi o seu diâmetro, já que as Fe-NPs possuem um diâmetro hidrodinâmico médio de 439,77 ±12,06 nm.

Todavia o diâmetro não pode ser o único parâmetro a ser considerado dentre os fatores que afetam a absorção da NP, devendo ser considerados também o tipo de metal, superfície,

entre outros, conforme demonstrado por Iannone et al. (2016) onde sugeriram que não houve absorção de nanopartículas de óxido de ferro revestidas com citrato em trigo cultivado em hidroponia, possivelmente pelo revestimento de citrato existente na NP.

Alguns fatores a serem considerados na disponibilização, absorção e utilização de ferro em nanopartícula pela planta são o tempo e a concentração, conforme demonstrado por Jeyasubramanain et al. (2016) em experimentos realizados com espinafre hidropônico e diferentes concentrações de nanopartículas de óxido de ferro III durante 45 dias. Os resultados mostraram que a produção das plantas foi maior com o aumento da concentração das Fe-NP, porém esta produção foi igual a produção das plantas que receberam suplementação de ferro.

Em complemento aos fatores colocados, Sheykhbaglou et al (2010), Nadi et al (2013) e Elfeky et al (2013) sugerem que a forma de aplicação da nanopartícula de ferro na planta, via solo ou via foliar, influencia em sua absorção e liberação de íons de ferro pela nanopartícula.

Logo neste trabalho, a utilização da Fe-NP tanto no cultivo hidropônico de alface como no cultivo hidropônico de tomate apresentou respostas semelhantes, os tratamentos que continham Fe-EDTA (Fe100/NP0, Fe50/NP0 e Fe50/NP50) responderam de forma semelhante, não mostrando diferença estatística na produção de parte aérea (folhas ou frutos). Enquanto que os tratamentos que continham somente ferro na forma de nanopartícula biogênica de ferro (Fe0/ NP0, Fe0/NP50 e Fe0/NP100) mostraram baixa produção, ou mesmo morte de plantas, demonstrando sinais de deficiência de ferro, onde se sugere que as Fe-NP, apesar de absorvidas pela planta, não liberam íons de ferro para a sua utilização pela planta.

Portanto, vários fatores devem ser levados em consideração na utilização de nanopartículas biogênicas como o desenvolvimento de metodologias de custo baixo e replicáveis, a utilização de nanopartículas com baixa toxicidade, nanopartículas com pequeno diâmetro hidrodinâmico, para assegurar a absorção pelas raízes e a translocação via xilema até os tecidos parenquimáticos clorofilianos da folha, utilização em culturas de ciclo longo que o ferro possa ser liberado pela nanopartícula para a sua utilização como fertilizante, além da utilização em dosagens recomendadas.

6 CONCLUSÕES

Conclui-se que a síntese de nanopartículas a partir de em *Trichoderma harzianum* e que estas mostraram características físico químicas dentro dos parâmetros esperados, sendo uma metodologia simples e menos custosa de ser realizada.

As nanopartículas de ferro não supriram as necessidades de ferro nas culturas, indicando que estas não liberam o íon em quantidade necessário, ou mesmo se absorvidas não participam do metabolismo da planta da mesma forma que o ferro, assim como não ocorreu inibição da absorção do ferro pela planta na presença das nanopartículas de ferro, indicando que esta tecnologia possui um grande potencial podendo ser utilizada como um carreador de fertilizantes.

Espera-se que com este trabalho novas pesquisas possam ser desenvolvidas no âmbito de testar novas NP em cultivos hidropônicos, para avaliar o potencial destas como carreadores de fertilizantes.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD-ELNABY, H. M. et al. Antibacterial and anticancer activity of extracellular synthesized silver nanoparticles from marine *Streptomyces rochei* MHM13. **Egypt. J. Aquatic Res.**, v.42, p.301-312, fev. 2016.

ALMEIDA, T. et al. Avaliação nutricional da alface cultivada em soluções nutritivas suprimidas de macronutrientes. **Biotemas**, v.24, n.2, p.27-36, abr. 2011.

ALVES, O. L. Nanotecnologia, nanociência e nanomateriais: quando a distância entre presente e futuro não é apenas questão de tempo. **Parcerias Estratégicas**, Brasília, v.9, n.18, p.23-40, ago. 2004.

ANDRIOLO, J. L. Cultivo hidropônico da alface empregando substratos: uma alternativa a NFT? **Horticultura Brasileira**, v.22, n.4, p.794-798, 2004.

ANKANNA, S. Production of biogenic silver nanoparticles using *Boswellia valifoliolata* stem bark. **Dig. J. Nanomater. Biostruct.**, v.5, n.2, p.369-372, abr./jul. 2010.

ARAÚJO NETO, S. E. De; RIBEIRO, M. C. C. **Hidroponia: Uso eficiente de água e energia na produção agrícola**. Mossoró: ESAM, 1999. 56 p.

ARNAUD, N. M. et al. An Iron-induced Nitric Oxide Burst Precedes Ubiquitin-dependent Protein Degradation for *Arabidopsis AtFer1* Ferritin Gene Expression. **The Journal of Biological Chemistry**., v.281, n.33, p.23579-23588, ago. 2006.

BADU, K. et al. *Effect of nano-silver on cell division and mitotic chromosomes: a prefatory siren.* **Internet J. Nanotechnol**., v.2, n.2, p.1-7, 2008.

BAUER, P.; HELL, R. Tranlocation of iron in plant tissues. In: BARTON, L. L.; ABADÍA, J. Iron nutrition in plants and rhizospheric microorganisms. The Netherlands: Springer, 2006, p.279-288.

BECKER, M.; ASCH, F. Iron toxicity in rice-conditions and management concepts. **J. Plant Nutrit. and Soil Sci**., v.168, n.4, p.558-573, jul. 2005.

BHARDE, A. et al. Bacteria-mediated precursor-dependent biosynthesis of superparamagnetic iron oxide and iron sulfide nanoparticles. **Langmuir**, v.24, n.11, p.5787-5794, jun. 2008.

BHARDE, A. et al. Extracellular biosynthesis of magnetite using fungi. **Small**, v.2, n.1, p.135-141, jan. 2006.

BRIAT, J. F.; CURIE, C.; GAYMARD, F. Iron utilization and metabolism in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v.10, n.3, p.276-282, jun. 2007.

BYRNE, J. M. et al. Control of nanoparticle size, reactivity and magnetic properties during the bioproduction of magnetite by *Geobacter sulfurreducens*. **Nanotechnology**, v.22, n.45, p.1-9, maio. 2011.

CARNIEL, B. F. **Avaliação de impactos ambientais e sociais do uso da nanotecnologia na agricultura: uma proposta metodológica**. 2013. 232p. v.1 Dissertação (Mestrado em Ciências: Biotecnologia) – PPGBiotec, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2013.

CARRIJO, O. A.; MAKISHIMA, N. **Princípios de Hidroponia.** Brasília: EMBRAPA, v. 22, 2000. 28p.

CASIDAY, R. E.; FREY, R. Iron use and storage in the body: ferritin and molecular representations. **Conference Proceedings**, Department of Chemistry, Washington University. 2004.

CASTELLANE, P. D.; ARAUJO, J. A. C. **Cultivo sem solo: hidroponia**. Jaboticabal: FUNEP, 1995. 43p.

CIFUENTES, Z. Absorption and translocation to the aerial part of magnetic carbon-coated nanoparticles through the root of different crop plants**. J. Nanobiotechnol**., v.8, n.26, p.1186-1477, nov. 2010.

COMETTI, N. N. et al. Cooling and concentration of nutrient solution in hydroponic lettuce crop. **Horticultura Brasileira**, v.31, n.2, p.287-292, abr./jun. 2013.

COMETTI, N. N. et al. Efeito da concentração da solução nutritiva no crescimento da alface em cultivo hidropônico – sistema NFT. **Horticultura Brasileira**, v.26, n.2, p.252-257, abr./jun. 2008.

CORREDOR, E. Nanoparticle penetration and transport in living pumpkin plants: in situ subcellular identification. **BMC Plant Biol**., v.9, n.45, p.2-11, abr. 2009.

COSTA, P. et al. Condutividade elétrica da solução nutritiva e produção de alface em hidroponia. **Scientia Agricola**, v.58, n.3, p.595-597, jul./set. 2001.

DAVID, J. M.; MENEZES, M.; TARSITANO, R. A. Análise financeira do sistema hidropônico floating na produção de alface no município de Nova Xavantina - MT. **Convibra**, p.1-8, fev. 2017.

DEVI, T. P. et al. Biosynthesis of silver nanoparticles from *Trichoderma species*. **Indian J. Exp. Biol.**, v.51, p.543-547, jul. 2013.

DHILLON, G. S. et al. Green approach for nanparticle buisynthesis by fungi current trends and applications. **Crit. Rev. Biotechnol.**, v.32, n1, p49-73, mar2012.

DURÁN, N. et al. Mechanistic aspects in the biogenic synthesis of extracellular metal nanoparticles by peptides, bacteria, fungi and plants. **Appl. Microbiol. Biotechnol**., v.90, n.5, p. 1609-1624, jun. 2011.

ELFEKY, S. A. et al. Effect of magnetite nano-fertilizer on growth and yield of *Ocimum basilicum* L. **International Journal of Indigenous Medicinal Plants**, v.46, n.3, p.1286-1293, jun. 2013.

FACTOR, T. L. **Produção de minitubérculos de batata-semente em sistemas hidropônicos NFT, DFT e Aeroponia.** 2007. 131p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

FOSSATI, C. **Como practicar el hidrocultivo**. Madrid: EDAF, 1986. 174 p.

FRACETO, L. F. et al. Nanotechnology in agriculture: Which innovation potential does it have? **Front. Environ. Sci**. v.4, n.20, p.1-5, mar. 2016.

FURLANI, P. R. **Cultivo hidropônico de plantas**. Campinas: IAC. 52p. (Boletim técnico, 180). 1999

GENÚNCIO, G. C. et al. Crescimento e produtividade do tomateiro em cultivo hidropônico NFT em fungos da concentração iônica da solução nutritiva. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.24, n.2, p.175-179, abr./jun. 2006.

GHAFARIYAN, M. H. et al. Effects of Magnetite Nanoparticles on Soybean Chlorophyll. **Environ. Sci. Technol.**, v.47, n.18, p.10645-10652, set. 2013.

GHAZINOORY, S.; ABDI, M.; BAGHERI, S. K. Promoting Nanotechnology Patenting: A New Experience in National Innovation System of Iran. **J. Intellec. Prop. Rights**, v.15, n.6, p.464-473, nov. 2010.

GRILLO, R. et al. Poly (epsilon-caprolactone) nanocapsules as carrier systems for herbicides: physico-chemical characterization and genotoxicity evaluation. **J. Hazard. Mater**., v.231-231, p.1-9, 2012.

GRILLO, R. et al. Sub-micrometer magnetic nanocomposites: insights into the effect of magnetic nanoparticles interactions on the optimization of SAR and MRI performance. **ACS Appl. Mater. Interfaces**, v.8, n.39, p.25777-25787, set. 2016.

GUILGER, M. et al. Biogenic silver nanoparticles based on *Trichoderma harzianum*: synthesis, characterization, toxicity evaluation and biological activity. **Sci. Reports**., v.7, n.44421, p.1-13, mar. 2017.

GUILGER, M. et al. Evaluation of silver nanoparticles: *in vitro* assays for cyto/genotoxicity in cell lines and ecotoxicity on Zebrafish. **Int. J. Glo. Adv. Mat.** v.1, n.1, p.31-42, abr. 2018.

HAZRA, C. et al. Biogenic synthesis, characterization, toxicity and photocatalysis of zinc sulphide nanoparticles using rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* BS01 as capping and stabilizing agent. **J. Chem. Technol. Biotechnol**., v.88, n.6, p.1039-1048, 2013.

HELBEL JUNIOR, C. et al. Soluções nutritivas, vazões e qualidade da alface hidropônica. **Acta Scientiarum Agronomy,** v.29, n.2, p.291-295, 2007.

HOCHMUTH, G. Florida greenhouse vegetable production handbook**. Fla. Coop Ext. Serv**, University of Florida, SP-48, v.3, 1991. (1995).

HOCHMUTH, G. Iron (Fe) nutrition of plants. **Fla. Coop Ext. Serv**, University of Florida, 2011. (2014)

HOCHMUTH, G. J.; HOCHMUTH, R. C. Nutrient Solution Formulation for Hydroponic (Perlite, Rockwool, NFT) Tomatoes in Florida. **Fla. Coop Ext. Serv**, University of Florida, HS 796. 2001.

HONG; J. et al. Toxic effects of cooper-based nanoparticles or compounds to lettuce (*Lactuta sativa*) and alfafa (*Medicago sativa*). **Environ. Sci. Porcesses Impacts**, v 17, p.177-185, 2015.

HUANG, J. et al. Biosynthesis of silver and gold nanoparticles by novel sundried *Cinnamomum camphora* leaf. **Nanotechnology**, v.18, n.10, p.105104, 2007.

IANNONE, F. et al. Impact of magnetite iron oxide nanoparticle on wheat (*Triticum aestivum* L.) development: Evaluation of oxidative damage. **Environ. Exp. Bot**., v.131, p.77-88, 2016.

INÁCIO, M. **Tecnologias emergentes e problemas sociais no Brasil: o caso da nanotecnologia aplicada a doenças negligenciadas**. 2017. 157p. Dissertação (Mestrado em Políticas Públicas) – Setor de Ciências Sociais Aplicadas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2017.

IRAVANI, S. et al. *Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods.* **Res. Pharm. Sci**., v.9, n.6, p.385-406, nov. 2014.

JEYASUBRAMANIAN, K. et al. Enhancement in growth rate and productivity of spinach grow in hydroponics with iron oxide nanoparticles. **RSC Advances**, v.6, p.15451-15459, jan. 2016.

KAH, M.; HOFMANN, T. Nanopesticide research: Current trends and future priorities. **Environ. Internat.**, v.63, p.224-235, fev. 2014.

KOWSHIK, M. Microbial synthesis of semiconductor CdS nanoparticles, their characterization, and their use in the fabrication of an ideal diode. **Biotechnol. Bioeng**., v.78, n.5, p.583-588, jun. 2002.

KUMARI, M.; MUKHERJEE, A; CHANDRASEKARAN, N. *Genotoxicity of silver nanoparticles in Allium cepa*. **Sci. Total Environ,** v. 407, n.15, p.5243-5246. set. 2009.

LEE, J.W. **Effect of root zone warming by hot water in winter season on rhizosphere environment, growth, and yield of greenhouse grown cucumber (*Cucumis sativus* L.).** Kyungpook National University, PhD Diss, 1994.

LIMA, R. et al. *Cytotoxicity and genotoxicity of biogenic silver nanoparticles*. **J. Phys.: Conf. Ser.** v.429, p.1-9, 2013.

MANIMARAN, M.; KANNABIRAN, K. Actinomycetes-mediated biogenic synthesis of metal and metal oxide nanoparticles: progress and challenges. **Letters in Applied Microbiology**, v.64, n.6, p.401-408, jun. 2016.

MARTINS, M. L. C. F. **Estudo da dinâmica do ferro em morangueiro (*Fragaria ananassa*) cv. Diamante.** 2017. 59p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agronómica) - Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2017.

MAYNARD, A. D. Don't define nanomaterials. **Nature**, v.475 (7354), n.31, jul. 2011.

MAZUMDAR, H.; HALOI, N. A study on Biosynthesis of Iron nanoparticles by *Pleurotus sp*. **J. Microbiol. Biotech. Res**., v.1, n.3, p.39-49, mar. 2011.

MELO, P. C.; PIMENTA, M. Nanociências e Nanotecnologia. **Parcerias Estratégicas**, Brasília, v.9, n.18, p.09-21, ago. 2004.

MENEGAES, J. et al. Produção sustentável de alimentos em cultivo hidropônico. **REMOA**, Santa Maria, v.14, n.3, set./dez. 2015.

MITTAL, A.K.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. **Biotech. Advances**, v.31, n.2, p.346-356, mar./abr. 2013.

MUKHERJEE, P. et al. Fungus-mediated synthesis of silver nanoparticles and their immobilization in the mycelial matrix: A novel biological approach to nanoparticle synthesis. **Nano Lett.**, v.1, n.10, p.515–519, 2001.

MUKHERJEE, P. Extracellular synthesis of gold nanoparticles by the fungus *Fusarium oxysporum*. **Chembiochem.,** v.3, n.5, p.461-463, maio. 2002.

NADI, E.; AYNEHBAND, A.; MOJADDAM, M. Effect of nano-iron chelate fertilizer on grain yield, protein percent and chlorophyll content of faba bean (*Vicia faba* L.). **Int. J. Biosci.**, v.3, n.9, p.267-272, 2013.

NAIR, B.; PRADEEP, T. Coalescence of nanoclusters and formation of submicron crystallites assisted by *Lactobacillus* strains**. Cryst. Growth Des**., v.2, n.4, p.293-298, jun. 2002.

NANOCOMPOSIX. *Guidelines for dynamic light scattering measurement and analysis*. **Nanocomposix's *Guide to dynamic Light Scattering Measurement and Analysis***, *v.1, n.3, p.*1-7, set. 2012.

NARAYANAN, K.; SAKTHIVEL, N. Coriander leaf mediated biosynthesis of gold nanoparticles. **Mater. Letters.** v.62, n. 30, p. ,4588, dez. 2008.

PANDA, K. K. et al. *In vitro biosynthesis and genotoxicity bioassay of silver nanoparticles using plants*. **Toxicol. In Vitro**, v.25, n.5, p.1097-1105, ago. 2011.

PATTEKARI, P. et al. Top-down and bottom-up approaches in production of aqueous nanocolloids of low solubility drug paclitaxel. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, v.13, n.19, p.9014–9019, maio, 2011.

PINTO, L. E. V.; GODINHO, A. M. M.; MARTINS, F. B. Produção de alface em sistema hidropônico em função de mudas produzidas com auxílio de iluminação artificial complementar. **Colloquium Agrariae**, Presidente Prudente, v.11, p.51-57, 2015.

plants. **Trends in Plant Science**, v.8, n.4, p.188-193, abr. 2003.

RAI, M. et al. Myconanotechnology: a new and emerging science. In: RAI, M.; BRIDGE, P. D. **Applied mycology**. London, UK: CAB International, 2009, p.258-267.

RAUSCHER, H. The devil is in the definition. In: CHAUDHRY, Q. CASTLE, L.; WATKINS, R. **Nanotechnologies in food.** 2nd edition. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2017, Chapter 2, p.20-38.

SAIFUDDIN, N.; WONG, W. C.; YASUMIRA, A. A. N. Rapid biosynthesis of silver nanoparticles using culture supernatant of bacteria with microwave irradiation. **E-J. Chem.**, v.6, n.1, p.61-70, 2009.

SCHMIDT, W. Iron solutions: acquisition strategies and signaling pathways in

SCHULZ, P. A. B. O que é nanociência e para que serve a nanotecnologia. **Física na Escola**, São Paulo, v.6, n.1, p.58-62, jan. 2005.

SEABRA, A.; HADDAD, P.; DURAN, N. Biogenic syntesis of nanostructured iron compounds: application and perspectives. **IET Nanobiotechnol**., v.7, n.3, p.90-99, fev. 2013.

SHEYKHBAGLOU, R. et al. Effects of Nano-Iron Oxide Particles on Agronomic Traits of Soybean. **Notulae Scientia Biologicae**, Índia, v.2, n.2, p.112-113, june 2010.

SOARES, I. **Alface: cultivo hidropônico**. No 7. Fortaleza: Edições UFC, 2002. 50p.

SONG, J. Y.; KIM, B. S. Biological synthesis of bimetallic Au/Ag nanoparticles using persimmon (*Diopyros kaki*) leaf extract. **Korean J. Chem. Eng**., v.25, n.4, p.808–811, jul. 2008.

STEIDLE NETO, A. J. et al. Avaliação de um circuito eletrônico para medição da condutividade elétrica de soluções nutritivas. **Engenharia Agrícola**, v.25, n.2, p.427-435, maio. 2005.

SUKANYA, M. K. et al. Therapeutic potential of biologically reduced silver nanoparticles from actinomycete cultures. **J. Nanosci.,** v.2013, n.940719, p.1-8, ago. 2013.

SUNITHA, A. et al. Evaluation of antimicrobial activity of biosynthesized iron and silver nanoparticles using the fungi *Fusarium oxysporum* and *Actinomycetes sp*. on human pathogens. **Nano Biomed. Eng.**, v.5, n.1, p.39-45, mar. 2013.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal.** 5ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918p.

URRESTARAZU, M. et al. Effects of heating nutrient solution on water and mineral uptake and early yield of two cucurbits under soilless culture**. Journal of Plant Nutrition**, v.31, n.3, p.527-538, mar. 2008.

WANG, Y. H.; TACHIBANA, S. Growth and mineral nutrition of cucumber seedlings as affected by elevated air and root-zone temperatures. **J. Japanese Soc. Horticultural Sci**., v.64, p.845-852, 1996.