

**Universidade Federal da Grande Dourados
Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia
Programa de Pós - Graduação em Química**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**INTERAÇÃO NANOPARTÍCULA-CLOROFILA: UMA
ANÁLISE VIA ESPECTROSCOPIA ÓPTICA**

Amanda Martins Queiroz

Orientador: Prof. Dr. Anderson R. L. Caires

**Março de 2014
Dourados – MS**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central da UFGD, Dourados, MS, Brasil

Q384i Queiroz, Amanda Martins.
Interação nanopartícula-clorofila : uma análise via espectroscopia óptica / Amanda Martins Queiroz – Dourados, MS : UFGD, 2014.
104 f.

Orientador: Prof. Dr. Anderson Rodrigues Lima Caires.

Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal da Grande Dourados.

I. Nanopartícula de prata. 2. Clorofila. I. Caires, Anderson Rodrigues Lima. II. Título.

CDD: 546.654



Termo de Aprovação

Após a apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora foi emitido o parecer APROVADO, para a dissertação intitulada: "Interação Nanopartícula - Clorofila: Uma Análise Via Espectroscopia Óptica", de autoria de Amanda Martins Queiroz, apresentada ao Programa de Mestrado em Química da Universidade Federal da Grande Dourados.

Prof. Dr. Anderson Rodrigues Lima Caires (Orientador-UFGD)
Presidente da Banca Examinadora

Prof. Dr. Heberth Juliano Vieira
Membro Examinador (UFGD)

Prof. Dr. Francisco Eduardo Gontijo Guimarães
Membro Examinador (USP)

Dourados/MS, 06 de março de 2014

Dedico esta tese

A Deus, minha família, amigos, colegas de laboratório e orientador, pelo apoio, incentivo e companheirismo. Sem eles nada disso seria possível.

Agradecimentos

- A Deus por estar sempre presente em minha vida e me mostrar os caminhos certos nos momentos incertos;
- Ao meu orientador Dr. Anderson R. L. Caires pelos ensinamentos, orientações, incentivos e, o mais importante, por ser um exemplo de profissional a qual desejo seguir;
- À minha família, a qual amo muito, pelo carinho e dedicação à mim, e em especial à minha irmã, Ariana e minha mãe, Adalgiza, pela paciência;
- Aos amigos que fizeram parte dessa jornada sempre me incentivando;
- Ao técnico dos laboratórios de Física, William, pelos ensinamentos e paciência;
- Aos colegas do laboratório de Fotônica, pelo convívio e aprendizado;
- Aos colegas do laboratório de Biofotônica, Adalberto e Fernanda, por participarem deste trabalho e pelo apoio;
- Ao aluno de Mestrado de Biologia Geral/Bioprospecção, Bruno Amaral, pelo acompanhamento no experimento e pela ajuda;
- Ao professor Dr. Leonardo de Oliveira Seno, responsável pelo laboratório de Biotecnologia Aplicada à Produção Animal, e ao professor Dr. Francisco Eduardo Gontijo Guimarães, do Instituto de Física de São Carlos (IFSC), pelo apoio técnico;
- A todos os colegas e professores do programa de pós - graduação pelo aprendizado.

Lista de tabelas

Tabela 01: Aplicações de nanopartículas no setor agro-alimentar.	21
---	-----------

Lista de Figuras

Figura 01: Logotipo da IBM produzido por Donald Eigler e colaboradores em 1989. Foram depositados 35 átomos de Xenônio sobre uma superfície de prata utilizando um microscópio de tunelamento.	18
Figura 02: a) Crescimento do número de produtos comercialmente disponíveis nos últimos anos que utilizam nanomateriais em suas composições; b) Distribuição desses produtos por categorias.	20
Figura 03: Estrutura química da clorofila <i>a</i> e <i>b</i> .	25
Figura 04: Diagrama de Jablonski.	26
Figura 05: Espectrofotômetro Cary 50 UV - Vis.	31
Figura 06: Esquema de funcionamento de um espectrofotômetro de absorção.	32
Figura 07: Espectrofluorímetro portátil composto por dois lasers do tipo LED, um monocromador, um laptop e uma fibra óptica do tipo Y.	32
Figura 08: Espectro de absorção para o extrato de clorofila de 12 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ para a amostra sem centrifugar, arrastado e sobrenadante.	34
Figura 09: Absorbância em 672 nm em função da concentração do extrato de clorofila para a amostra sem centrifugação e para a soma das amostras sobrenadante e arrastado.	35
Figura 10: Razão Abs em 350nm / Abs em 418 nm em função da concentração do extrato de clorofila.	35
Figura 11: Espectro de fluorescência do extrato de clorofila de 12 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ da amostra sem centrifugar, do sobrenadante e do arrastado excitados em 405 nm.	36
Figura 12: Espectro de fluorescência do extrato de clorofila, excitado em 405 nm, em função da concentração de clorofila na (a) amostra sem centrifugação, no (b) sobrenadante e no (c) arrastado.	37

- Figura 13:** Fluorescência da clorofila, com excitação em 405 nm, em 678 nm em função da concentração de clorofila. 37
- Figura 14:** Espectro de fluorescência do extrato de clorofila, excitado em 532 nm, em função da concentração de clorofila na (a) amostra sem centrifugação, no (b) sobrenadante e no (c) arrastado. 38
- Figura 15:** Fluorescência da clorofila, com excitação em 532nm, em 678 nm em função da concentração de clorofila. 39
- Figura 16:** Espectro de absorção da solução do extrato de clorofila 5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ sem nanopartícula e com 0,5 mL de nanopartícula de prata de 60 nm a 38,63 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. 40
- Figura 17:** Espectro de absorção da clorofila (a) sem nanopartícula e (b) com 0,5 mL de nanopartícula de prata de 60 nm a 38,63 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. 40
- Figura 18:** Absorbância em 423 nm em função da concentração de clorofila na presença e ausência de nanopartícula de prata de 60 nm a 38,63 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. 41
- Figura 19:** Razão da absorbância em 420 nm da amostra com nanopartícula (CN) pela absorbância em 420 nm da amostra sem nanopartícula (SN) em função da concentração do extrato de clorofila. 42
- Figura 20:** Espectro de fluorescência para uma amostra do extrato de clorofila de 5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ sem nanopartícula e uma amostra do extrato de clorofila de 5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ com 0,5 mL da solução de nanopartícula de prata de 60 nm a 38,63 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. 43
- Figura 21:** Espectro de Fluorescência da clorofila excitada em 405 nm (a) sem nanopartícula e (b) com 0,5 mL de nanopartícula de prata de 60 nm a 38,63 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. 43
- Figura 22:** Fluorescência em 678 nm, excitado em 405 nm, em função da concentração de clorofila na ausência e na presença de nanopartícula de prata de 60 nm a 38,63 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. 43
- Figura 23:** Razão da fluorescência em 678 nm da amostra excitada em 405 nm sem nanopartícula (SN) pela fluorescência em 678 nm da amostra excitada em 405 nm com nanopartícula (CN) em função da concentração do extrato de clorofila. 44
- Figura 24:** Espectro de Fluorescência da clorofila excitada em 532 nm (a) sem nanopartícula e (b) com 0,5 mL de nanopartícula de prata de 60 nm a 38,63 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. 45

Figura 25: Fluorescência em 678 nm, excitado em 532 nm, em função da concentração de clorofila na ausência e na presença de nanopartícula de prata de 60 nm a 38,63 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. 45

Figura 26: Razão da fluorescência em 678 nm da amostra excitada em 532 nm sem nanopartícula (SN) pela fluorescência em 678 nm da amostra excitada em 532 nm com nanopartícula (CN) em função da concentração do extrato de clorofila. 46

Figura 27: Espectro de absorção da solução de nanopartícula de prata de 60 nm a 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ em diferentes pHs (a) sem clorofila e (b) com 0,5 mL de clorofila 3,25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. 46

Figura 28: Espectro de fluorescência das soluções de nanopartícula de prata de 60 nm a 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ com 0,5 mL de clorofila 3,25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (a) excitado em 405 nm e (b) excitado em 532 nm. 47

Figura 29: Espectro de absorção do extrato de clorofila 3,4 \pm 0,2 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. 48

Figura 30: Espectro de absorção do extrato de clorofila 3,4 \pm 0,2 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ em função da concentração de nanopartículas de prata de 10 nm na (a) amostra sem centrifugação, no (b) sobrenadante e no (c) arrastado. 48

Figura 31: Espectro de absorção do extrato de clorofila 3,4 \pm 0,2 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ em função da concentração de nanopartículas de prata de 60 nm na (a) amostra sem centrifugação, no (b) sobrenadante e no (c) arrastado. 49

Figura 32: Espectro de absorção do extrato de clorofila 3,4 \pm 0,2 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ em função da concentração de nanopartículas de prata de 100 nm na (a) amostra sem centrifugação, no (b) sobrenadante e no (c) arrastado. 49

Figura 33: Absorbância do extrato de clorofila 3,4 \pm 0,2 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ em função da concentração de nanopartículas de prata de (a) 10 nm com absorbância em 400 nm, (b) 60 nm com absorbância em 438 nm e (c) 100 nm com absorbância em 493 nm. 50

Figura 34: Absorbância do extrato de clorofila 3,4 \pm 0,2 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ em função da concentração de nanopartículas de prata de 10 nm, 60 nm e 100 nm para as amostras sem centrifugação. 50

Figura 35: Constante da ressonância de plasmon em função (a) do diâmetro e (b) da área superficial para a amostra sem centrifugação. 51

Figura 36: Absorção do extrato de clorofila 3,4 \pm 0,2 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ em função do diâmetro da nanopartícula de prata para a concentração de 154,51 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. 52

Figura 37: Espectro de fluorescência do extrato de clorofila $3,4\pm 0,2 \mu\text{mol.L}^{-1}$, excitado em 405 nm, em função da concentração das nanopartículas de prata de 10 nm na (a) amostra sem centrifugação, no (b) sobrenadante e no (c) arrastado. 52

Figura 38: Espectro de fluorescência do extrato de clorofila $3,4\pm 0,2 \mu\text{mol.L}^{-1}$, excitado em 405 nm, em função da concentração das nanopartículas de prata de 60 nm na (a) amostra sem centrifugação, no (b) sobrenadante e no (c) arrastado. 53

Figura 39: Espectro de fluorescência do extrato de clorofila $3,4\pm 0,2 \mu\text{mol.L}^{-1}$, excitado em 405 nm, em função da concentração das nanopartículas de prata de 100 nm na (a) amostra sem centrifugação, no (b) sobrenadante e no (c) arrastado. 53

Figura 40: Razão de F_0/F em 678 nm para a clorofila $3,4\pm 0,2 \mu\text{mol.L}^{-1}$, com excitação em 405 nm, em função da concentração de nanopartículas de prata de (a) 10 nm, (b) 60 nm e (c) 100 nm. 54

Figura 41: Constante de supressão na intensidade de fluorescência da clorofila $3,4\pm 0,2 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em função da área superficial das nanopartículas de prata, com excitação em 405 nm. 54

Figura 42: Espectro de fluorescência do extrato de clorofila $3,4\pm 0,2 \mu\text{mol.L}^{-1}$, excitado em 532 nm, em função da concentração das nanopartículas de prata de 10 nm na (a) amostra sem centrifugação, no (b) sobrenadante e no (c) arrastado. 56

Figura 43: Espectro de fluorescência do extrato de clorofila $3,4\pm 0,2 \mu\text{mol.L}^{-1}$, excitado em 532 nm, em função da concentração das nanopartículas de prata de 60 nm na (a) amostra sem centrifugação, no (b) sobrenadante e no (c) arrastado. 56

Figura 44: Espectro de fluorescência do extrato de clorofila $3,4\pm 0,2 \mu\text{mol.L}^{-1}$, excitado em 532 nm, em função da concentração das nanopartículas de prata de 100 nm na (a) amostra sem centrifugação, no (b) sobrenadante e no (c) arrastado. 57

Figura 45: Espectro de absorção da clorofila do extrato bruto e da clorofila isolada. 57

Figura 46: Espectro de absorção da clorofila isolada a $3,4\pm 0,6 \text{mol.L}^{-1}$ em função da concentração de nanopartículas de prata de (a) 10nm, (b) 60 nm e (c) 100 nm. 58

Figura 47: Absorbância do da clorofila isolada a $3,4\pm 0,6 \text{mol.L}^{-1}$ em função da concentração de nanopartículas de prata. 58

Figura 48: Espectro de fluorescência da clorofila isolada a $3,4\pm 0,6 \text{ mol.L}^{-1}$, com excitação em 405 nm, com nanopartículas de prata de (a) 10 nm, (b) 60 nm e (c) 100 nm. 59

Figura 49: Razão de F_0/F em 678 nm, com excitação em 405 nm, em função da concentração de nanopartículas de prata. 59

Figura 50: Constante de supressão em função do diâmetro das nanopartículas de prata, com excitação em 405 nm. 60

Figura 51: Espectro de fluorescência da clorofila isolada a $3,4\pm 0,6 \text{ mol.L}^{-1}$, com excitação em 532 nm, com nanopartículas de prata de (a) 10 nm, (b) 60 nm e (c) 100 nm. 61

Figura 52: Espectro de absorção do extrato de clorofila $14,7\pm 0,4 \mu\text{mol.L}^{-1}$. 62

Figura 53: Espectro de absorção do extrato de clorofila $14,7\pm 0,4 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em função da concentração de nanopartículas de prata de 10 nm na (a) amostra sem centrifugação, no (b) sobrenadante e no (c) arrastado. 62

Figura 54: Espectro de absorção do extrato de clorofila $14,7\pm 0,4 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em função da concentração de nanopartículas de prata de 60 nm na (a) amostra sem centrifugação, no (b) sobrenadante e no (c) arrastado. 63

Figura 55: Espectro de absorção do extrato de clorofila $14,7\pm 0,4 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em função da concentração de nanopartículas de prata de 100 nm na (a) amostra sem centrifugação, no (b) sobrenadante e no (c) arrastado. 63

Figura 56: Absorbância do extrato de clorofila $14,7\pm 0,4 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em função da concentração de nanopartículas de prata de (a) 10 nm com absorbância em 400 nm, (b) 60 nm com absorbância em 438 nm e (c) 100 nm com absorbância em 493 nm. 64

Figura 57: Absorbância do extrato de clorofila $14,7\pm 0,4 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em função da concentração de nanopartículas de prata de 10 nm, 60 nm e 100 nm. 64

Figura 58: Coeficiente da ressonância de plasmon em função (a) do diâmetro) e (b) da área superficial para a amostra sem centrifugação. 65

Figura 59: Espectro de fluorescência do extrato de clorofila, excitado em 405 nm, na ausência e na presença do Brij. 66

Figura 60: Espectro de fluorescência do extrato de clorofila $14,7\pm 0,4 \mu\text{mol.L}^{-1}$, excitado em 405 nm, em função da concentração das nanopartículas de 66

prata de 10 nm na (a) amostra sem centrifugação, no (b) sobrenadante e no (c) arrastado.

Figura 61: Espectro de fluorescência do extrato de clorofila $14,7\pm 0,4 \mu\text{mol.L}^{-1}$, excitado em 405 nm, em função da concentração das nanopartículas de prata de 60 nm na (a) amostra sem centrifugação, no (b) sobrenadante e no (c) arrastado. 67

Figura 62: Espectro de fluorescência do extrato de clorofila $14,7\pm 0,4 \mu\text{mol.L}^{-1}$, excitado em 405 nm, em função da concentração das nanopartículas de prata de 100 nm na (a) amostra sem centrifugação, no (b) sobrenadante e no (c) arrastado. 67

Figura 63: Razão de F_0/F em 678 nm para a clorofila $14,7\pm 0,4 \mu\text{mol.L}^{-1}$, com excitação em 405nm, em função da concentração de nanopartículas de prata de (a) 10 nm, (b) 60 nm e (c) 100 nm. 68

Figura 64: Constante de supressão na intensidade de fluorescência da clorofila $14,7\pm 0,4 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em função do diâmetro das nanopartículas de prata, com excitação em 405 nm. 68

Figura 65: Espectro de fluorescência do extrato de clorofila $14,7\pm 0,4 \mu\text{mol.L}^{-1}$, excitado em 532 nm, em função da concentração das nanopartículas de prata de 10nm na (a) amostra sem centrifugação, no (b) sobrenadante e no (c) arrastado. 69

Figura 66: Espectro de fluorescência do extrato de clorofila $14,7\pm 0,4 \mu\text{mol.L}^{-1}$, excitado em 532 nm, em função da concentração das nanopartículas de prata de 60nm na (a) amostra sem centrifugação, no (b) sobrenadante e no (c) arrastado. 69

Figura 67: Espectro de fluorescência do extrato de clorofila $14 \mu\text{mol.L}^{-1}$, excitado em 532 nm, em função da concentração das nanopartículas de prata de 100nm na (a) amostra sem centrifugação, no (b) sobrenadante e no (c) arrastado. 69

Figura 68: Razão de F_0/F em 678 nm para a clorofila $14,7\pm 0,4 \mu\text{mol.L}^{-1}$, com excitação em 532nm, em função da concentração de nanopartículas de prata de (a) 10 nm, (b) 60 nm e (c) 100 nm. 70

Figura 69: Constante de supressão na intensidade de fluorescência da clorofila $14,7\pm 0,4 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em função do diâmetro das nanopartículas de prata, com excitação em 532 nm. 70

Figura 70: Tempo de decaimento da fluorescência do extrato de clorofila na presença e na ausência do Brij. 71

Figura 71: Tempo de decaimento da fluorescência em 673 nm do extrato de clorofila em função da concentração de NPs de prata, com excitação por dois fótons em 800 nm para (a) 10 nm, para (b) 60 nm e para (c) 100 nm. 72

Figura 72: (a) Tempo de vida curto para o extrato de clorofila em função da concentração de NPs de prata de 10 nm, 60 nm e 100 nm; (b) Tempo de vida longo para o extrato de clorofila em função da concentração de NPs de prata de 10 nm, 60 nm e 100 nm. 72

Figura 73: (a) Tempo de vida curto em função do diâmetro das nanopartículas para a concentração de $2,41 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de NPs de prata; (b) Tempo de vida longo em função do diâmetro das nanopartículas para a concentração de $2,41 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de NPs de prata. 73

RESUMO

Nas últimas décadas tem-se observado um rápido desenvolvimento e aplicação da nanotecnologia em diversas áreas, como na medicina, estética, indústrias, tecnologias de comunicação, entre outras. As nanopartículas (NPs) de prata (Ag) estão entre os nanomateriais mais produzidos e utilizados devido as suas propriedades antimicrobiana e antibacteriana, permitindo uma vasta aplicação comercial. Com o aumento do uso e descarte de produtos produzidos a base de nanotecnologia, estima-se que o acúmulo de nanomateriais no meio ambiente será inevitável, resultando em efeitos adversos no ecossistema. Neste cenário é importante também entender os riscos da interação entre NPs e plantas, como um componente básico de todo o ecossistema. Neste contexto, o presente estudo avaliou a interação entre a clorofila e as NPs de Ag com 10, 60 e 100 nm de diâmetro, em diferentes regimes de concentrações, utilizando técnicas ópticas. Os resultados sugerem que a fluorescência da clorofila é suprimida na presença das nanopartículas de prata, e a supressão observada foi dependente da concentração e do tamanho. Em resumo, a partir da determinação da constante de Stern-Volmer, pode-se afirmar que quanto menor a dimensão da nanopartícula maior foi o efeito de supressão. Foi possível observar que a variação de pH suprimiu a intensidade de fluorescência da clorofila, tanto para soluções ácidas como para soluções básicas. Ademais, observou-se que quando a amostra é excitada em 405 nm, parte da supressão é causada pela absorção oriunda do efeito de ressonância de plasmon que ocorre em 420 nm, porém a maior parte da supressão é induzida pela transferência de elétrons da clorofila no estado excitado para a superfície da nanopartícula. Os resultados também revelaram que o tempo de vida curto aumentar na presença das nanopartículas, indicando uma interação efetiva entre as moléculas de clorofila e as NPs de Ag.

Palavras - chave: Nanopartícula, Prata, Clorofila, Vegetal, Fluorescência.

ABSTRACT

Advances in research into nanoparticles have led to great development of nanotechnology in diverse areas such as medicine, cosmetic, industries, communication technologies, among others. Silver nanoparticles (Ag NPs) are among the most widely produced and used nanomaterial due to their antimicrobial and antibacterial properties, allowing a wide range of commercial applications. Thereby, the increasing use of NPs should inevitably lead to the release and accumulation of these NPs into the environment, resulting in adverse effects on ecosystems. In this scenario it is also important to understand the risks of the interaction between NPs and plants, as a basic component of all ecosystems. In this context, the present study evaluated the interaction between Chlorophyll and Ag NPs with 10, 60 and 100 nm of diameter, over a wide range of nanoparticle concentrations, using optical techniques. The results reveal that the Chlorophyll Fluorescence is quenched in the presence of Ag NPs, and the observed suppression was nanoparticle concentration and size-dependent. In summary, by analysing the Stern-Volmer constant it was possible to determine that smaller nanoparticles have induced higher suppression. It was also observed that the pH variation induced a chlorophyll fluorescence quenching when acidic or basic solutions were prepared. Additionally, it was observed that plasmon resonance effect was partially responsible for observing quenching when the sample was excited at 405 nm, however, most of the observed quenching was caused by electron transfer process. The results also indicated that the short fluorescence lifetime was increased in the presence of nanoparticles, revealing an effective interaction between chlorophyll molecules and AgNPs.

Keyword: Silver, Nanoparticle, chlorophyll, Plant, Fluorescence.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1

1. Introdução	18
1.1 Histórico dos nanomateriais	18
1.2 Propriedades das nanopartículas	19
1.3 Aplicação dos nanomateriais	19
1.4 Efeito de nanopartículas em plantas	23
1.5 Estrutura da clorofila	24
1.6 Fluorescência da clorofila	25

CAPÍTULO 2

2. Objetivos	27
2.1 Objetivo geral	27
2.2 Objetivos específicos	27

CAPÍTULO 3

3. Materiais e métodos	28
3.1 Nanopartículas de prata	28
3.2 Extração da clorofila	28
3.3 Obtenção da clorofila <i>a</i>	28
3.4 Estudo com diferentes concentrações de clorofila	29
3.5 Estudo da interação nanopartícula - clorofila variando a concentração de	29

clorofila	
3.6 Estudo do efeito do pH	30
3.7 Preparo das soluções nanopartícula - clorofila	30
3.8 Preparo das soluções nanopartícula - clorofila <i>a</i>	31
3.9 Medidas de absorção e fluorescência molecular	31
CAPÍTULO 4	
4. Resultados e discussão	34
4.1 Estudo com diferentes concentrações do extrato de clorofila	34
4.2 Estudo da interação nanopartícula - clorofila variando a concentração de clorofila	39
4.3 Estudo do efeito do pH	46
4.4 Avaliação da interação das nanopartículas de prata (diferentes diâmetros e concentrações) com a clorofila (baixa concentração $3,4\pm 0,2 \mu\text{mol.L}^{-1}$)	47
4.5 Estudo da interação nanopartícula - clorofila <i>a</i>	57
4.6 Avaliação da interação das nanopartículas de prata (diferentes diâmetros e concentrações) com a clorofila (alta concentração $14,7\pm 0,4 \mu\text{mol.L}^{-1}$)	62
CAPÍTULO 5	
5. Conclusões	74
CAPÍTULO 6	
6. Referências bibliográficas	75

CAPÍTULO 7

7. Anexos

79

7.1 Artigo Submetido

79

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

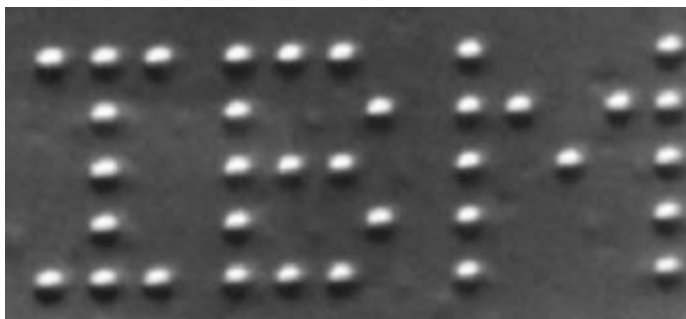
1.1 Histórico dos nanomateriais

O precursor do conceito da nanotecnologia foi o físico Richard Feynman (Prêmio Nobel de Física em 1965) que, apesar de não utilizar esse termo, discutiu acerca da idéia de manipulação da matéria ao nível atômico, ao proferir uma palestra intitulada ‘Há muito espaço lá embaixo’, no encontro anual da Sociedade Americana de Física, em 29 de dezembro de 1959. Desde então, os progressos no campo da nanociência e em suas aplicações práticas apresentam um ritmo intenso e incessante [1].

A primeira definição do termo nanotecnologia surgiu em 1974 na Universidade Científica de Tóquio, proposta pelo japonês Norio Taniguchi [2]. Nas décadas de 80 e 90 surgiram várias teorias em torno dessa definição japonesa, porém somente a partir do ano 2000 que essa tecnologia foi desenvolvida efetivamente em laboratórios, e logo, as pesquisas alcançaram grandes avanços, sendo hoje o centro das atenções de pesquisadores, cientistas e governos de todo o mundo.

Em 1989, o físico norte-americano Donald Eigler e colaboradores, pesquisadores de uma das maiores empresas de computadores, a International Business Machines (IBM), foram capazes de fazer um logotipo reunindo 35 átomos de Xenônio depositados sobre uma superfície de prata, como mostrado na Figura 1. A altura da letra I, formado por nove átomos de Xenônio, é da ordem de 5nm[3].

Figura 01: Logotipo da IBM produzido por Donald Eigler e colaboradores em 1989. Foram depositados 35 átomos de Xenônio sobre uma superfície de prata utilizando um microscópio de tunelamento.



Estudos revelaram que houve um crescimento do número de produtos comercialmente disponíveis nos últimos anos que utilizam nanomateriais em suas composições. Esse número

passou de aproximadamente 50 produtos, em 2005, para pouco mais de 1300, em 2010 [4]. As principais nanopartículas (NPs) utilizadas na produção de nanotecnologia são as de prata, de forma que o número de produtos com essas nanopartículas passou de pouco menos de 25, em 2006, para mais de 300, em 2010.

1.2 Propriedades das nanopartículas

A definição mais aceita para o termo nanomateriais (NMs) inclui partículas naturais ou provocadas pelo homem com pelo menos uma dimensão menor que 100 nm, e nanopartículas (NPs) são amplamente aceitas como materiais com pelo menos duas dimensões inferior a 100 nm [5].

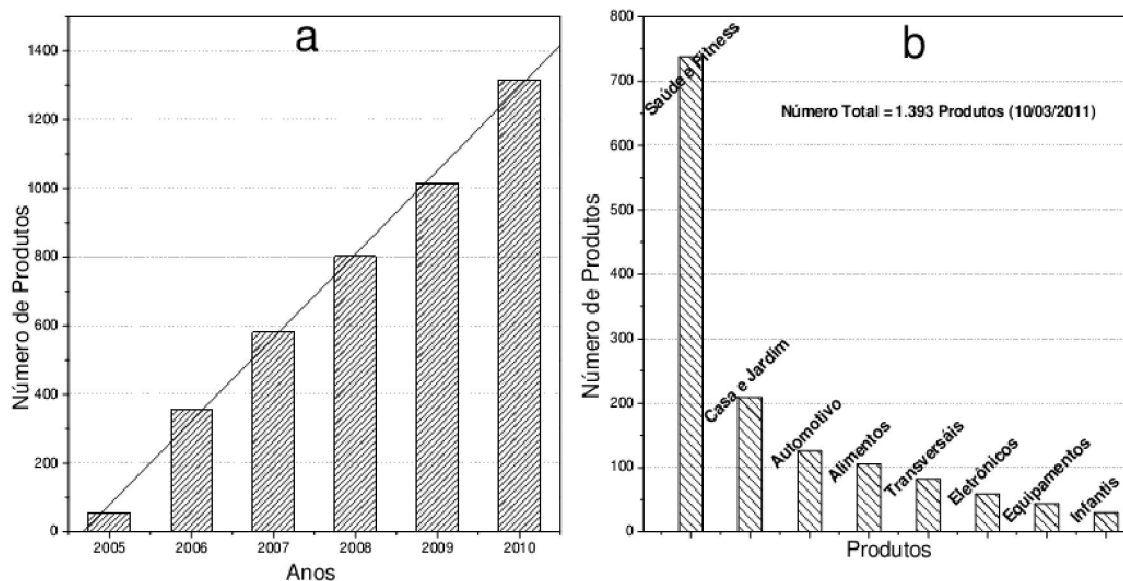
Devido a sua menor dimensão, em relação aos materiais a granel, as nanopartículas possuem propriedades químicas, físicas e biológicas distintamente diferentes destes. Exemplos das propriedades únicas das nanopartículas incluem alta área superficial específica (razão entre a área superficial e a massa da partícula) e energia de superfície elevada, pois estas apresentam abundantes sítios reativos na superfície como consequência de uma grande fração de átomos localizados no exterior do que no interior da partícula [6]. Portanto, o tamanho da partícula é de suma importância em relação aos efeitos que podem produzir, porque muda a natureza das interações das forças entre as moléculas do material e assim, altera os impactos que estes processos ou produtos nanotecnológicos podem causar ao meio ambiente, à saúde humana e à sociedade como um todo [7], o que se torna um perigo devido ao grande aumento de consumo das nanopartículas [8].

1.3 Aplicação dos nanomateriais

Nota-se que ocorreu um desenvolvimento extraordinário da nanotecnologia, trazendo avanços revolucionários em áreas como: medicina, materiais, tecnologias de comunicação e informação, robótica e biotecnologia [9].

Um grande número de nanomateriais já é usado em uma variada gama de produtos de consumo, conforme representado na figura 2. Observa-se que mais de 50% das aplicações, até o ano de 2010, estavam no setor da saúde e fitness, que inclui os cosméticos e produtos de cuidados pessoais. Isto é seguido por outras aplicações, incluindo tintas e revestimentos, produtos eletrônicos, têxteis, farmacêuticos, remediação ambiental, alimentos e embalagens de alimentos [10].

Figura 02: a) Crescimento do número de produtos comercialmente disponíveis nos últimos anos que utilizam nanomateriais em suas composições; b) Distribuição desses produtos por categorias [10].



Na área de ciência e tecnologia ambiental, podemos esperar grandes benefícios provenientes da nanotecnologia em três principais temas [11]:

(a) na prevenção de poluição ou dos danos indiretos ao meio ambiente. Por exemplo, o uso de nanomateriais catalíticos que aumentam a eficiência e a seletividade de processos industriais resultaria num aproveitamento mais eficiente de matérias primas, com consumo menor de energia e produção de quantidades menores de resíduos indesejáveis. A nanotecnologia vem contribuindo para o desenvolvimento de sistemas de iluminação de baixo consumo energético. A nanotecnologia também vem aprimorando o desenvolvimento de displays (como, por exemplo, monitores de computador ou displays dobráveis de plástico que podem ser lidos como uma folha de papel) que, além de serem mais leves e possuírem melhor definição, apresentam as vantagens da ausência de metais tóxicos na sua fabricação e de terem um consumo menor de energia.

(b) no tratamento ou remediação de poluição. A grande área superficial das nanopartículas lhes confere, em muitos casos, excelentes propriedades de adsorção de metais e substâncias orgânicas. A etapa subsequente de coleta das partículas e remoção de poluentes pode ser facilitada pelo uso, por exemplo, de nanopartículas magnéticas. As propriedades redox e/ou de semicondutor de nanopartículas podem ser aproveitadas em processos de tratamento de efluentes industriais e de águas e solos contaminados baseados na degradação química ou fotoquímica de poluentes orgânicos. Num cenário futurístico, um exército de

nano-bots poderia ser utilizado para descontaminar microscopicamente sítios de derrame de produtos químicos.

(c) na detecção e monitoramento de poluição. A nanotecnologia vem permitindo a fabricação de sensores cada vez menores, mais seletivos e mais sensíveis para a detecção e monitoramento de poluentes orgânicos e inorgânicos no meio ambiente. Avanços em sensores para a detecção de poluentes implicam diretamente num melhor controle de processos industriais; na detecção mais precoce e precisa da existência de problemas de contaminação; no acompanhamento, em tempo real, do progresso dos procedimentos de tratamento e remediação de poluentes; num monitoramento mais efetivo dos níveis de poluentes em alimentos e outros produtos de consumo humano; na capacidade técnica de implementar normas ambientais mais rígidas, etc.

No setor agroalimentar a nanotecnologia tem o potencial para revolucionar o sistema global. Novos sistemas de segurança agrícolas e alimentares, métodos de entrega de tratamento da doença, ferramentas de biologia molecular e celular, sensores para detecção de patógenos, pesticidas, materiais de embalagem e proteção ambiental são exemplos do importante impacto que a nanotecnologia poderia trazer sobre a ciência e engenharia dos sistemas agrícolas e alimentares [12-14]. Na Tabela 1 é apresentada uma síntese das aplicações da nanotecnologia nesses setores.

Tabela 01: Aplicações de nanopartículas no setor agroalimentar. Tabela adaptada da referência [13].

Setor	Aplicação	Nanotecnologia	Função
Produção Agrícola	Nanosensores	Nano-spray de produtos alimentares	Identifica e colore micro-organismos
		Dispositivos portáteis	Deteção de contaminantes, microtoxinas e microorganismo
	Pesticidas	Nano-emulsões, encapsulados	O aumento da solubilidade em água
		Liberação por nano-capsulas	Tratamento localizado
	Purificação e limpeza da água e solo	Filtro com nano-poros	Remoção de contaminantes
		NPs	Remoção, catalisação, oxidação de contaminante
Produção e processamento de alimentos	Produção de Alimentos	Dispositivos nano-cerâmica	Grande área de superfície reativa
	Refrigeradores, recipientes de armazenamento, equipamentos de preparação de alimentos	NPs incorporadas, de prata e ocasionalmente de óxido de zinco	Revestimento anti - bacteriano
Conservação	Produtos alimentares	Spray de NPs de prata	Ação anti-bacteriana
	Embalagens	Sensores incorporados	Deteção de deterioração e monitoramento das condições de armazenamento
		NPs incorporadas	Aumentar propriedades de barreira, resistência dos materiais
		NPs incorporadas Ativas	Oxigenação, prevenção do crescimento de patógenos
Alimentos funcionais, consumo	Suplementos / aditivos	NPs metálicas coloidais	Aumento da absorção de metal desejável
		Sistemas de entrega " Nano - clusters "	Proteger a entrega do conteúdo
		Nutrientes nanoparticulados	Maior captação

Não obstante a estas perspectivas animadoras dos benefícios da nanotecnologia para a melhoria do meio ambiente, não se deve subestimar o potencial para danos ao mesmo. Uma vez que as mesmas características que tornam as nanopartículas interessantes do ponto de vista de aplicação tecnológica, podem ser indesejáveis quando essas são liberadas ao meio ambiente. O pequeno tamanho das nanopartículas facilita sua difusão e transporte na

atmosfera, em águas e em solos, ao passo que dificulta sua remoção por técnicas usuais de filtração. Pode facilitar também a entrada e o acúmulo de nanopartículas em células vivas [15], pois segundo estudos, as nanopartículas penetram as paredes celulares e membranas plasmáticas das raízes e são transportadas para as folhas [16]. Estudos recentes apontam que os efeitos tóxicos das nanopartículas sobre os organismos são determinados principalmente pela sua composição química e a reatividade de superfície. Sua maior área superficial específica, em comparação com as partículas de maiores dimensões de mesma composição química, torna as nanopartículas biologicamente mais reativas [17].

1.4 Efeito de nanopartículas em plantas

Alguns estudos foram realizados com intuito de compreender os efeitos causados pelas nanopartículas em plantas, como por exemplo, a influência da presença de nanopartículas na produção de biomassa, crescimento da raiz e germinação das sementes.

Estudos realizados com nanopartículas de ouro de 5 nm, 10 nm e 20 nm que a espectroscopia de fluorescência induzida por laser pode ser usado para investigar as alterações na resposta fisiológica de plantas induzidas por nanopartículas de ouro, e que tanto excitação comprimentos de onda, 405 nm e 532 nm, foram capazes de detectar a presença das nanopartículas de ouro no interior das plantas. Os dados revelaram que as nanopartículas de ouro induzir supressão de fluorescência da clorofila, e que a supressão depende do tamanho das partículas e da concentração. Este fenômeno é principalmente atribuído ao efeito de transferência de elétrons fotoinduzido das moléculas de clorofila no estado excitado para as nanopartículas de ouro, resultando em uma diminuição do sinal de fluorescência da clorofila. O maior efeito de supressão da fluorescência foi induzido por nanopartículas de ouro de tamanho 5 nm. Este efeito era devido à maior área de superfície disponível para adsorção das moléculas nas nanopartículas, para soluções de amostra com a mesma concentração de nanopartícula [18].

Estudos realizados com plantas hidropônicas (*Lolium Perenne*) demonstraram que nanopartículas de ZnO de 20 nm, diminuiu a produção de biomassa e provocou um alongamento da raiz [19]. Asli e Neumann, 2009 [20], expuseram raízes de milho em suspensão coloidal de nanopartículas de TiO₂ natural, proveniente da argila contendo nanopartículas entre 1 nm e 6000 nm, e nanopartículas TiO₂ sintetizado com diâmetro de 30 nm. Eles realizaram experimentos de curto prazo e mediram condutividade hidráulica da raiz, folha e as taxas de crescimento da raiz, transpiração, assim como o tamanho dos poros da parede celular da raiz. Eles relataram que quase todas as grandezas analisadas foram alteradas,

tiveram seus valores reduzidos, na presença de nanopartículas de TiO_2 , tanto naturais como sintetizados.

Recentemente Lopez-Moreno, et. al, 2010 [21], relataram a toxicidade de nanopartículas de CeO_2 em quatro espécies de plantas comestíveis. Esses autores encontraram que 2000 mg.L^{-1} de CeO_2 reduziu significativamente a germinação do milho, do tomate e de pepino. Além disso, quando CeO_2 estava presente na germinação nas concentrações entre 500 e 4000 mg.L^{-1} de CeO_2 , o milho e o pepino apresentaram um aumento no crescimento da raiz, no entanto, na alfafa e no tomate houve um decréscimo no crescimento da raiz.

Em outro estudo, foi demonstrado que nanotubos de carbono (CNTs) podem ter efeitos positivos sobre o crescimento das plantas, como mostrado por Khodakovskaya, et. al, 2009 [22], que observou que os CNTs revestem as sementes de tomate e podem ser capazes de manter a captação de água promovendo germinação das sementes. Também tem sido relatado que os nanotubos de carbono entram nas células vegetais [23] e podem ser utilizados como transportadores moleculares para as plantas.

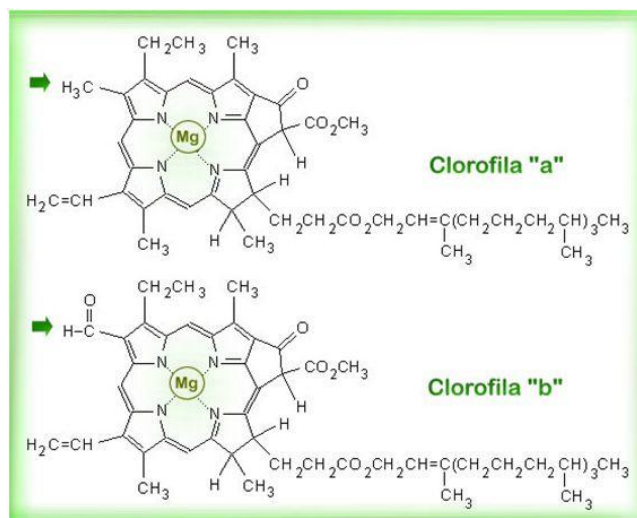
Ma, et. al, 2010 [24], relata que nanopartículas de prata são tóxicas para mudas de agrião, mesmo em baixas concentrações. Segundo esses autores, nanopartículas de 20 nm a 80 nm de diâmetro diminuem claramente o crescimento da planta, e sua fitotoxicidade é dependente da concentração e do tamanho da nanopartícula.

1.5 Estrutura da clorofila

Um dos fatores ligado à eficiência fotossintética de plantas e, conseqüentemente, ao crescimento e adaptabilidade a diversos ambientes é a clorofila, presente em todos os vegetais verdes [25].

Estruturalmente as clorofilas são moléculas complexas, pertencentes à classe das porfirinas, formadas por 4 anéis pirrólicos e um quinto anel isocíclico, localizado ao lado do terceiro anel pirrólico. Os anéis estão ligados entre si por pontes metilênicas e a molécula contém um átomo de magnésio no seu interior, coordenado aos anéis. A clorofila *a* corresponde a aproximadamente 75% dos pigmentos verdes encontrados nos vegetais. A clorofila *b* difere da clorofila *a* pela substituição de um grupo metil, no anel pirrólico², por um grupo aldeído. Uma representação das moléculas de clorofila *a* e *b* podem ser observadas na figura 3 [26].

Figura 03: Estrutura química da clorofila *a* e *b*.

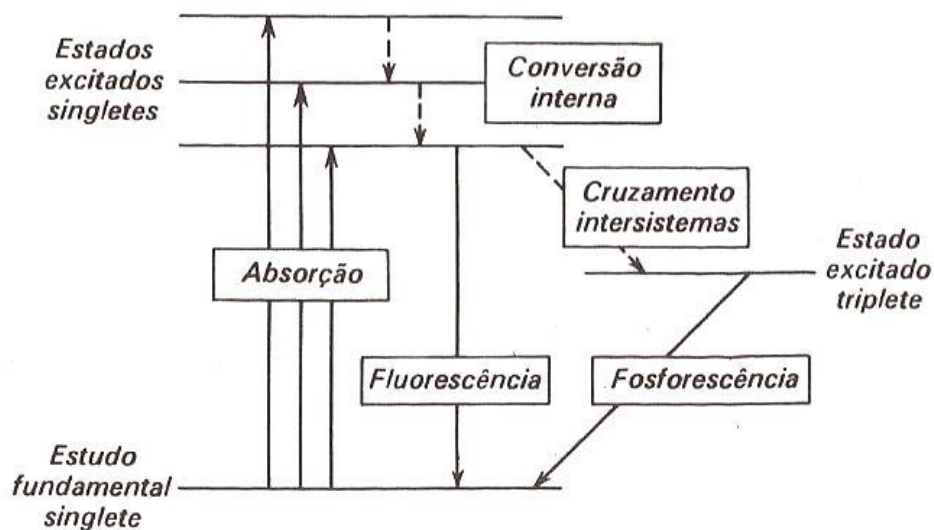


1.6 Fluorescência da clorofila

A luminescência é um fenômeno que envolve a emissão de fótons ultravioleta, visível ou infravermelho a partir de uma espécie eletronicamente excitada. A palavra luminescência, que vem do latim foi introduzido pela primeira vez como *luminescenz* pelo físico Eilhardt Wiedemann, em 1888, para descrever "todos os fenômenos da luz que não são unicamente condicionados pela elevação da temperatura", em oposição à incandescência. A absorção de um átomo é uma das formas de excitação, que leva a espécie absorvente para um estado eletrônico excitado. A emissão dos fótons é então chamada de fotoluminescência (fluorescência, fosforescência), que é um dos possíveis efeitos físicos resultantes interação da luz com a matéria [27].

Quando uma molécula absorve um fóton, para buscar a estabilidade, a molécula dissipa essa energia e, tal dissipação pode ocorrer por decaimento radiativo ou por decaimento não radiativo. Os processos de decaimento radiativo envolvem a emissão de fótons, sendo que essa emissão pode ocorrer por fluorescência ou fosforescência enquanto que os processos de decaimento não radiativos podem ocorrer por relaxação vibracional ou conversão interna ou cruzamento intersistema, como apresentado na figura 4, que ilustra o diagrama de Jablonski.

Figura 04: Diagrama de Jablonski.



Na fluorescência, o processo de decaimento possui tempo de vida na ordem de nanosegundos e a multiplicidade de spin não é alterada, enquanto que na fosforescência o tempo de vida é da ordem de segundos e a multiplicidade de spin sofre alteração em um processo denominado cruzamento intersistema [28].

O avanço no desenvolvimento, fabricação e uso de nanomateriais conduzirá, inevitavelmente, a sua liberação no meio ambiente. Nesta situação, presume-se um contexto favorável ao estresse ambiental que pode ser induzido pelo aumento da liberação de NPs para a biosfera [4]. A detecção de estresse em plantas pela análise espectral de fluorescência da clorofila [29] é uma técnica sensível que infere o grau de estresse das plantas a partir de intensidades de emissão de fluorescência da clorofila [30].

É bem conhecido que, quando eventos fotossintéticos relacionados com os processos bioquímicos ou fisiológicos são inibidos, o rendimento e a cinética de fluorescência dissipada são significativamente alterados [31]. Portanto, a fluorescência da clorofila serve como uma ferramenta analítica para avaliar os processos fotossintéticos em plantas.

CAPÍTULO 2

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Compreender a interação entre as nanopartículas de prata e as moléculas de clorofila por meio de análises ópticas.

2.2 Objetivos específicos

- Compreender a interação nanopartícula-clorofila (imersa no extrato bruto) e a interação nanopartícula-clorofila (isolada).
- Avaliar o efeito do diâmetro da nanopartícula de prata na interação nanopartícula-clorofila;
- Avaliar o efeito da concentração das nanopartículas de prata no processo de emissão da clorofila;
- Investigar o efeito na interação nanopartícula-clorofila depois da centrifugação do extrato de clorofila;
- Avaliar a possível formação de aglomerados em diferentes concentrações do extrato de clorofila utilizando o processo de centrifugação;
- Avaliar o efeito do pH no comportamento óptico das nanopartículas de prata.

CAPÍTULO 3

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Nanopartículas de prata

Foram utilizadas nanopartículas de prata (Ag) adquiridas da Sigma-Aldrich de três diâmetros: 10 nm, 60 nm e 100 nm, sendo todas esféricas. A solução utilizada possuía 0,02 mg/mL de nanopartículas de prata em solução aquosa, contendo citrato de sódio como estabilizador. Foi necessário o armazenamento das nanopartículas em ambiente refrigerado de 2 - 8 °C.

3.2 Extração da clorofila

A extração da clorofila foi realizada a partir de folhas de soja. As folhas foram coletadas, picotadas e adicionadas Metanol PA. 3 g de folhas foram adicionadas em 30 mL de Metanol e deixadas por um período de 72 horas, posteriormente separou-se o extrato obtido. Este extrato foi armazenado em frasco âmbar envolto por papel alumínio e em ambiente refrigerado para que não houvesse degradação da clorofila.

Por meio das medidas de absorção molecular, ajustou-se o teor da clorofila total $[Chl\ a + b]$ das amostras de extrato de clorofila baseando-se no método de Arnon adaptado por Porra, 2002 [32], para extração metanólica, descrito pela Equação 1, onde $[Chl\ a + b]$ é a concentração das clorofilas a e b , A^{652} é a absorbância em 652 nm, $A^{665,2}$ é a absorbância em 665,2 nm e as constantes 24,23 e 3,26 são os coeficientes de extinção específica da clorofila em 652 e em 665,2 nm, respectivamente.

$$[Chl\ a + b] = 24,23A^{652} + 3,26A^{665,2} \quad \text{Equação 1}$$

Obteve-se que o teor de clorofila da solução, manteve-se em $3,4 \pm 0,2 \mu\text{mol.L}^{-1}$ para os testes com clorofila diluída e $14,7 \pm 0,4 \mu\text{mol.L}^{-1}$ para os testes com clorofila concentrada.

3.3 Obtenção da clorofila isolada

Foi realizado inicialmente uma lavagem do extrato bruto para retirada da maior parte de carotenóides presentes na amostra, o procedimento utilizado nesta lavagem foi um método adaptado de Soares, 2009 [33]. Os solventes utilizados foram de qualidade P.A. e a água utilizada foi destilada.

Uma fração de 30 mL do extrato bruto obtido foi transferida para um funil de separação, esta foi lavada com 50 mL de éter de petróleo. Posteriormente separou-se as fases e a clorofila, contida no éter de petróleo, foi lavada com uma mistura metanol/água por 6 vezes. Separou-se novamente as fases e lavou-se a clorofila com uma solução saturada de NaCl. A fase orgânica foi separada e lavada 8 vezes com água destilada.

A fração orgânica foi recolhida num balão de fundo redondo e posta em um ratoevaporador (IKA[®] RV 10 basic) a temperatura ambiente e a pressão utilizada foi de 600 mmHg.

Os pigmentos foram re-dissolvidos em 5 mL de metanol para efetuar-se a separação. Para tal separação utilizou-se o método usado por Maestrin, et. al, 2009 [34] e Filho, et. al, 2012 [35] adaptado. A coluna cromatográfica de sílica foi empacotada com éter de petróleo e inicialmente foi eluída com o mesmo solvente utilizado para o empacotamento da coluna para remover as bandas amarelas ricas em carotenóides. Posteriormente eluiu-se com metanol para obter a fração verde correspondente à clorofila isolada.

Após a separação por coluna, realizou-se novamente a lavagem feita inicialmente para remoção de possíveis carotenóides restantes. A clorofila isolada obtida foi rotaevaporada novamente, nas mesmas condições, e o pigmento obtido foi diluído em 5 mL de metanol.

3.4 Estudo com diferentes concentrações do extrato de clorofila

Foram preparadas solução do extrato de clorofila de diferentes concentrações: 2; 4; 6; 8; 10; 12 e 14 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Diluiu-se 0,5 mL dessas soluções em 2,5 mL de água destilada.

As soluções foram centrifugadas, em uma centrífuga termostatizada, da marca Eppendorf, por um período de 30 minutos a 13000 rpm em uma temperatura de 20 °C, para impedir a degradação por altas temperaturas. As análises foram realizadas nas soluções que não passaram pelo processo de centrifugação e nas amostras que passaram por este processo, chamadas de sobrenadante, a parte superior, e arrastado, a parte inferior, para posterior comparação.

3.5 Estudo da interação nanopartícula-clorofila variando a concentração de clorofila

Para este estudo 0,5 mL de nanopartícula de prata de 60 nm na concentração de 38,63 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ foi adicionado a 2,5 mL do extrato da clorofila nas concentrações de 3; 5; 7; 11 e 14 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

3.6 Estudo do efeito do pH

Preparou-se uma solução de nanopartícula de prata de 60 nm na concentração de 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e adicionou-se 1,5 mL dessa solução em 5 frascos. Ajustou-se o pH das soluções em 3, 5, 7, 11, 13 utilizando para isso soluções de HCl 2 mol.L^{-1} , HCl 1 mol.L^{-1} , NaOH 2 mol.L^{-1} e NaOH 1 mol.L^{-1} . Posteriormente adicionou-se às soluções 0,5 mL do extrato de clorofila 3,25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. O pH das soluções foi medido utilizando fitas de pH.

3.7 Preparo das soluções nanopartícula-clorofila

Para o estudo da interação clorofila-nanopartículas, 0,5 mL do extrato da clorofila foi diluído em 2,5 mL da solução de nanopartículas de prata de 10, 60 e 100 nm. Neste estudo foram utilizadas duas concentrações do extrato de clorofila, 3,4 \pm 0,2 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e 14,7 \pm 0,4 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

As soluções das nanopartículas foram preparadas a partir de soluções estoques, devido às baixas concentrações e a solução que não contém nanopartículas foi chamada de controle.

O extrato de clorofila obtido inicialmente foi adicionado a frascos onde foram adicionadas diferentes concentrações de nanopartículas: 0,30; 1,21; 2,41; 9,65; 38,63; 77,25 e 154,41 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Tais soluções foram analisadas no mesmo dia do preparo.

Antes de realizar as medidas, as soluções foram levadas a uma centrífuga termostaticada, da marca Eppendorf, e centrifugadas por um período de 30 minutos a 13000 rpm em uma temperatura de 20 °C, para impedir a degradação por altas temperaturas. As análises foram realizadas nas soluções que não passaram pelo processo de centrifugação e nas amostras que passaram por este processo, chamadas de sobrenadante, a parte superior, e arrastado, a parte inferior, para posterior comparação.

Após a centrifugação separou-se o sobrenadante do arrastado, utilizando uma micropipeta. Reconstituiu-se o arrastado adicionando-se 1,5 mL de água destilada e esta solução foi levada a um ultrassom (Cristófoli, biossegurança, com frequência ultrassônica de 42 KHz e capacidade 2,5 L) por 30 minutos sem aquecimento.

Foi realizado um teste adicionando 0,1 mL de Brij 1,5% (v/v) no extrato de clorofila concentrada para realizar as medidas de fluorescência. O Brij por ser um surfactante, este desfaz a formação de possíveis aglomerados que possam estar sendo formados no meio.

3.8 Preparo das soluções nanopartícula - clorofila isolada

Para o estudo da interação nanopartículas-clorofila isolada, 0,5 mL do extrato da clorofila *a* $3,4 \pm 0,6 \mu\text{mol.L}^{-1}$ foi diluído em 2,5 mL da solução de nanopartículas de prata de 10, 60 e 100 nm. A concentração de clorofila isolada foi calculada utilizando a equação 1.

O extrato de clorofila isolada obtido inicialmente foi adicionado a frascos onde foram adicionadas diferentes concentrações de nanoprtículas: 2,41; 9,65; 38,63; 77,25 e 154,41 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Tais soluções foram analisadas no mesmo dia do preparo.

3.9 Medidas de absorção e fluorescência molecular

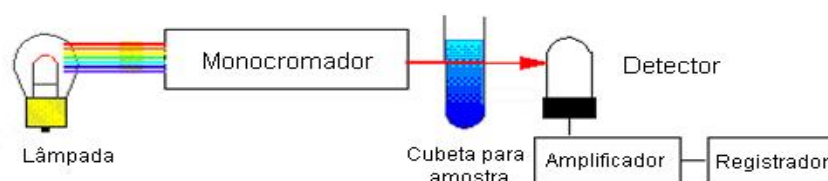
No estudo da absorção do extrato da clorofila concentrada e diluída, e no estudo com diferentes concentrações de clorofila foi utilizado o espectrofotômetro Cary 50 UV-VIS (Varian). O espectrofotômetro de absorção molecular tem como fonte de excitação uma lâmpada de Deutério, um monocromador Czerny-Turner 0,25m e um detector de diodo de Si, como apresentado na figura 05. As medidas de absorção foram realizadas de 200 a 800 nm, usando cubeta de quartzo de duas faces polidas de 10 mm de caminho óptico. Todas as medidas foram realizadas à temperatura ambiente.

Figura 05: Espectrofotômetro Cary 50 UV - Vis.



Um esquema simplificado do funcionamento de um espectrofotômetro como esse está demonstrado na figura 06.

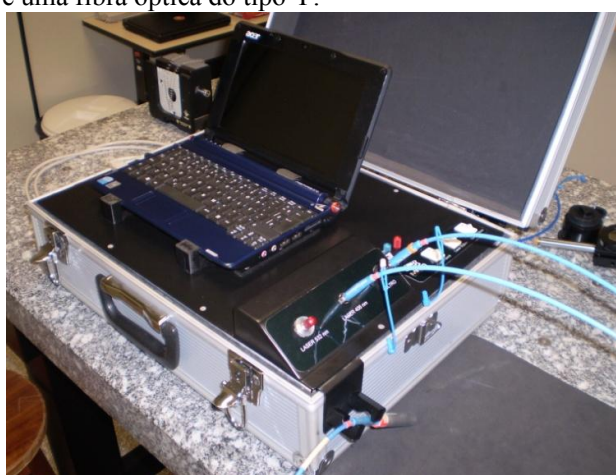
Figura 06: Esquema de funcionamento de um espectrofotômetro de absorção.



Para os demais estudos, utilizou-se o espectrofotômetro de absorção portátil (USB 4000 FL – OceanOptics), que tem como detector Toshiba TCD1304AP Linear CCD array. As medidas de absorção foram realizadas de 350 a 800 nm, usando cubeta de duas faces polidas de 10 mm de caminho óptico.

Nas análises de fluorescência do extrato de clorofila foi utilizado um fluorímetro portátil constituído de dois lasers do tipo LED, operantes em 405 nm e em 532 nm, um monocromador (USB 2000 FL – OceanOptics), uma fibra óptica do tipo Y e um laptop, para obtenção os espectros, como apresentado na figura 07. Primeiramente as amostras foram excitadas em 405 nm e os espectros foram obtidos de 450 nm a 800 nm e posteriormente foram excitadas em 532 nm e os espectros foram obtidos de 550 nm a 800 nm. Para os estudos que foram utilizadas a clorofila diluída, o estudo do pH e o estudo da clorofila isolada usou-se um tempo de integração de 50 ms. Para os estudos que foram utilizadas a clorofila concentrada e para o estudo com diferentes concentrações de clorofila usou-se um tempo de integração de 30 ms. E para o estudo da interação nanopartícula - clorofila variando a concentração de clorofila utilizou-se o tempo de integração de 15 ms. As medidas de fluorescência foram realizadas utilizando uma cubeta de quartzo de quatro faces polidas.

Figura 07: Espectrofluorímetro portátil composto por dois lasers do tipo LED, um monocromador, um laptop e uma fibra óptica do tipo Y.



As medidas de fluorescência resolvida no tempo, para o estudo do tempo de vida no estado excitado de amostras do extrato de clorofila com nanopartículas de prata, foram

realizadas utilizando um Microscópio ConfocalMultifóton LSM 780 Zeiss equipado com Sistema PicoquantFluortime para medida de decaimento da fluorescência, com objetiva de 20x e detectores SPAD (single photon avalanche diodes) com resolução temporal de 70 ps. Como fonte de excitação foi utilizado um laser CoherentChameleon sintonizável de 690-1100 nm, pulsado em 140 femtosegundos com repetição em 80 MHz. As medidas foram tomadas no comprimento de onda de 673 nm com excitação por dois fótons em 800 nm.

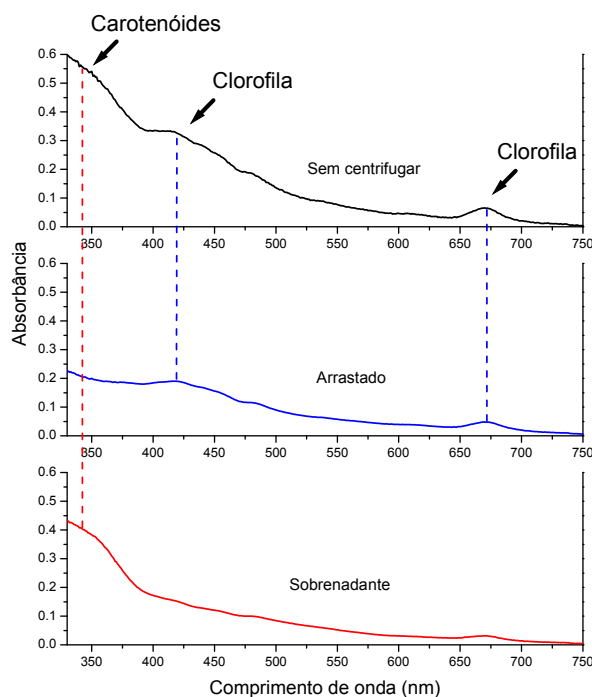
CAPÍTULO 4

4 RESULTADOS E DICUSSÕES

4.1 Estudo com diferentes concentrações do extrato de clorofila

O espectro do extrato da clorofila sem centrifugar, o arrastado e o sobrenadante é apresentado na figura 08.

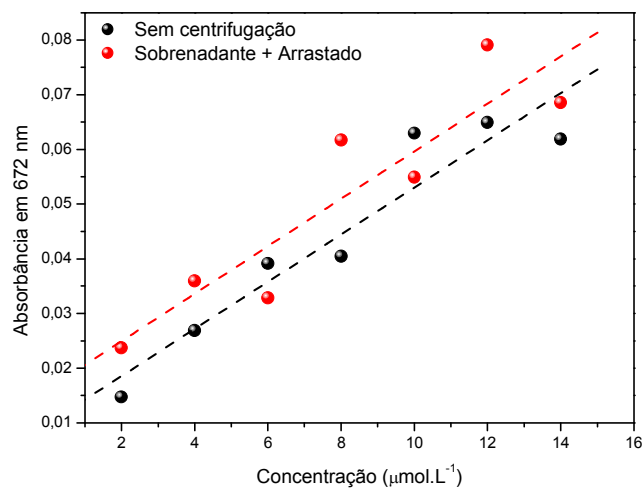
Figura 08: Espectro de absorção para o extrato de clorofila de $12 \mu\text{mol.L}^{-1}$ para a amostra sem centrifugar, arrastado e sobrenadante.



Sabe-se que o espectro de absorção da clorofila apresenta duas bandas características: uma de 300 nm a 500 nm e outra de 650 nm a 700 nm. Todavia, a banda de absorção entre 300 nm a 500 nm no extrato obtido das folhas, não é apenas devido à absorção da radiação eletromagnética pela clorofila *a* e *b*, pois outros pigmentos, como os carotenóides, absorvem nessa região [36]. No entanto a região de absorção correspondente aos carotenóides ocorre em torno de 350 nm, enquanto que a da clorofila *a* e *b* apresenta o máximo em 418 nm. Já a banda entre 650 nm a 700 nm é devida apenas à absorção da radiação eletromagnética pelas clorofilas *a* e *b*.

Por meio da figura 08 é possível observar que durante a centrifugação a maior parte da clorofila vai para o fundo do microtubo, permanecendo no arrastado, enquanto que os carotenóides permanecem no sobrenadante.

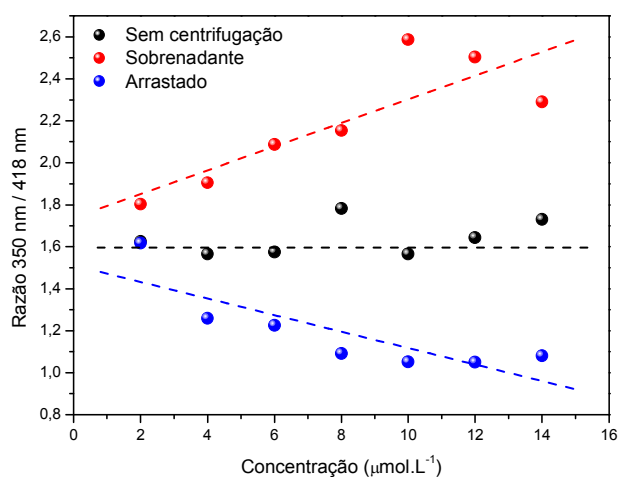
Figura 09: Absorbância em 672 nm em função da concentração do extrato de clorofila para a amostra sem centrifugação e para a soma das amostras sobrenadante e arrastado.



Na figura 09 pode-se observar que o coeficiente angular da amostra sem centrifugar e da soma do sobrenadante com o arrastado é o mesmo, indicando que essa soma das absorções se comporta da mesma forma que a amostra sem centrifugar.

Fazendo uma análise da razão da absorbância em 350 nm pela absorbância em 418 nm em função da concentração de clorofila obteve-se o seguinte gráfico.

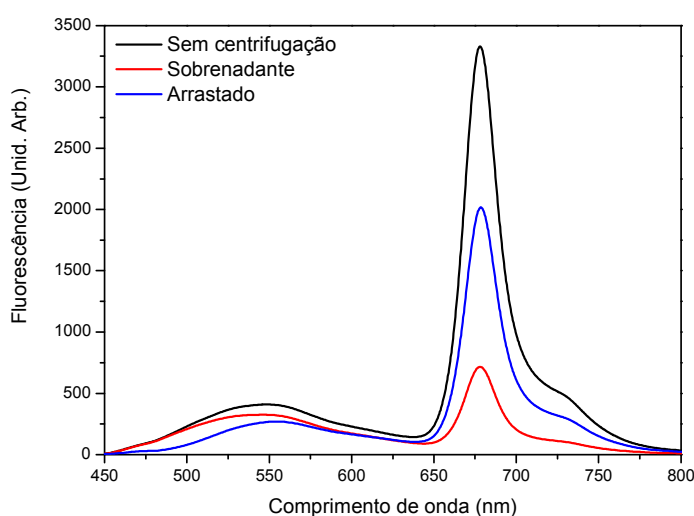
Figura 10: Razão Abs em 350nm/ Abs em 418 nm em função da concentração do extrato de clorofila.



Analisando a figura 10 é possível observar que para o sobrenadante os valores de absorvância em 350 nm são maiores que os valores de absorvância em 418 nm, indicando que quando a amostra passa por um processo de centrifugação, maior quantidade de carotenóides permanecem no sobrenadante, enquanto que no arrastado os valores de absorvância em 418 nm são maiores que os valores de absorvância em 350 nm, indicando que há maior quantidade de clorofila *a* e *b*, confirmando o que já havia sido observado anteriormente.

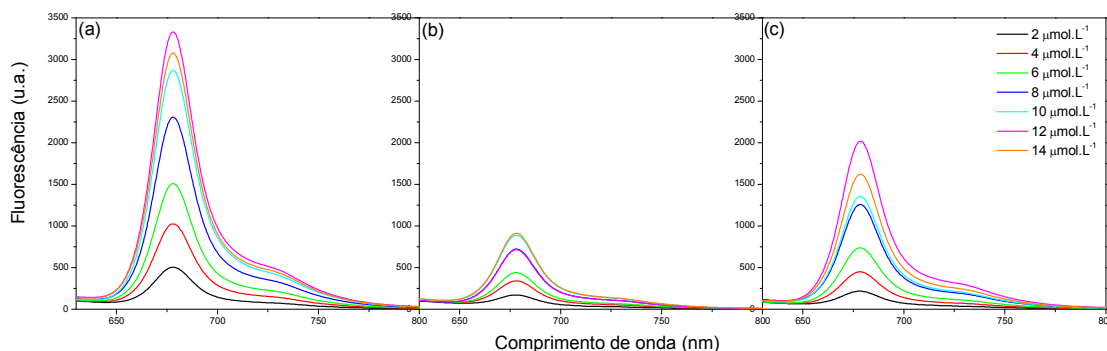
A figura 11 apresenta o espectro de fluorescência da amostra sem centrifugar, do sobrenadante e do arrastado, quando estas são excitadas em 405 nm.

Figura 11: Espectro de fluorescência do extrato de clorofila de $12 \mu\text{mol.L}^{-1}$ da amostra sem centrifugar, do sobrenadante e do arrastado excitados em 405 nm.



A banda entre 450 nm e 625 nm é correspondente à fluorescência dos carotenóides, enquanto que a banda entre 650 nm e 800 nm é correspondente à fluorescência da clorofila *a* e *b*. Sabendo que a fluorescência apresenta uma dependência linear com a concentração da amostra fluorescente, é possível observar que há maior concentração de clorofila *a* e *b* na amostra arrastada, enquanto que no sobrenadante a maior concentração é de carotenóides.

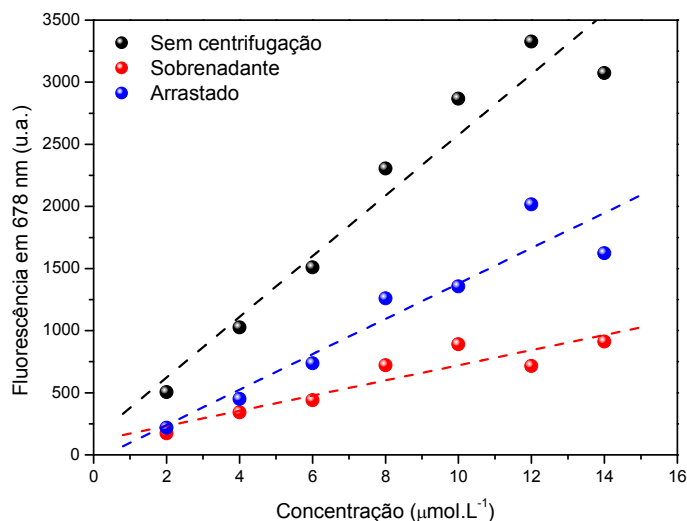
Figura 12: Espectro de fluorescência do extrato de clorofila, excitado em 405 nm, em função da concentração de clorofila na (a) amostra sem centrifugação, no (b) sobrenadante e no (c) arrastado.



O espectro de fluorescência da clorofila é característico, pois apresenta duas bandas de emissão, uma em aproximadamente 680 nm e outra, com menor intensidade, em 730 nm.

À medida que aumenta-se a concentração do extrato de clorofila, há um aumento linear da intensidade de fluorescência, como apresentado na figura 13, pois a fluorescência depende da quantidade de moléculas no meio que são capazes de absorver a radiação e fluorescer, dessa forma, quanto maior a quantidade de moléculas, maior será a fluorescência.

Figura 13: Fluorescência da clorofila, com excitação em 405 nm, em 678 nm em função da concentração de clorofila.

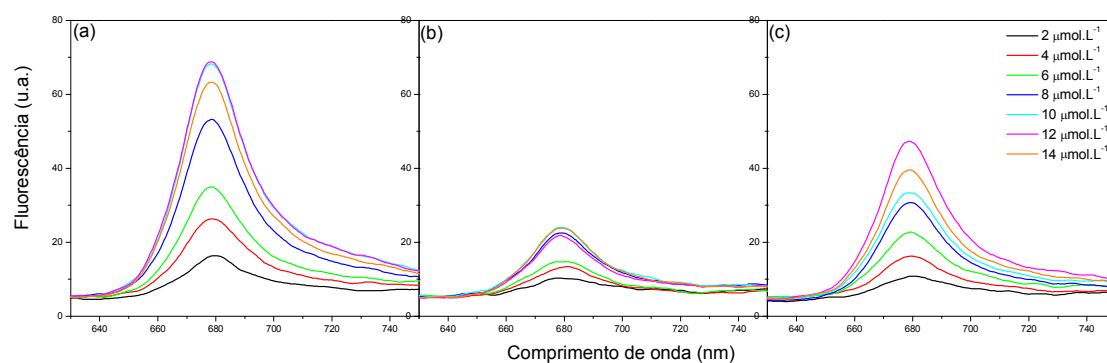


Por meio das figuras 12 e 13, é possível observar que há maior quantidade de clorofila no arrastado do que no sobrenadante, o que está de acordo com os espectros de absorção.

A solução de $14 \mu\text{mol.L}^{-1}$ apresenta intensidade de fluorescência menor que a amostra de $12 \mu\text{mol.L}^{-1}$, isso pode ser em decorrência do processo de reabsorção, conhecido como efeito de filtro interno, pois segundo Silva, et. al, 2012 [37], este efeito ocorre em função da alta concentração de clorofila no meio. Devido a grande quantidade de clorofila na amostra, uma molécula de clorofila é capaz de reabsorver a fluorescência emitida por outra molécula, diminuindo a intensidade de fluorescência.

A figura 14 apresenta o espectro de fluorescência da clorofila quando excitada em 532 nm.

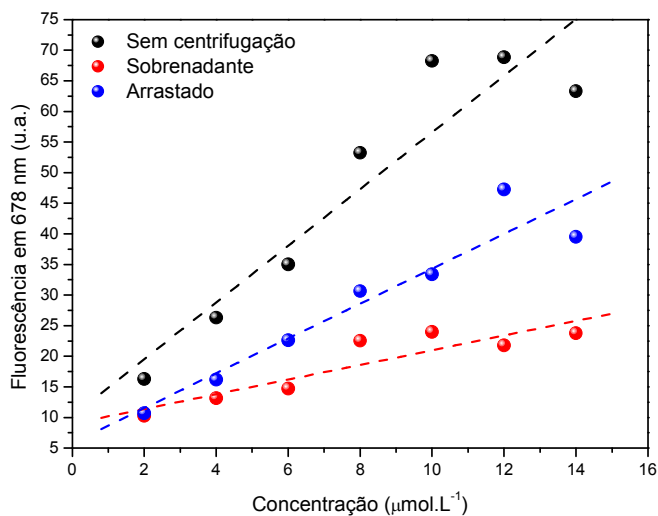
Figura 14: Espectro de fluorescência do extrato de clorofila, excitado em 532 nm, em função da concentração de clorofila na (a) amostra sem centrifugação, no (b) sobrenadante e no (c) arrastado.



Na amostra excitada em 532 nm a banda característica dos carotenóides não é apresentada, apenas as bandas de emissão da clorofila são detectadas. Todavia, entre 650 e 750 nm foi determinado o mesmo perfil de emissão da amostra quando excitada em 405 nm, ambas apresentam as 2 bandas, porém quando excitada em 532 nm a intensidade é bem menor, pois a absorção da clorofila em 532 nm é menor que em 405 nm.

Da mesma forma que quando excitada em 405 nm, à medida que aumenta-se a concentração do extrato de clorofila, há um aumento linear da intensidade de fluorescência para a amostra excitada em 532 nm, como apresentado na figura 15.

Figura 15: Fluorescência da clorofila, com excitação em 532 nm, em 678 nm em função da concentração de clorofila.

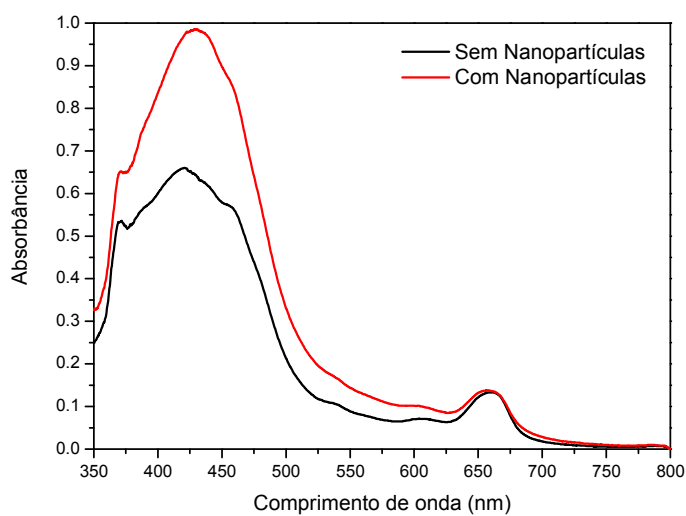


O efeito foi o mesmo observado na figura 13, pois o arrastado apresenta maior intensidade de fluorescência que o sobrenadante, devido a maior quantidade de clorofila nessa amostra.

4.2 Estudo da interação nanopartícula - clorofila variando a concentração de clorofila

A figura 16 apresenta o espectro de absorção do extrato de clorofila na ausência e na presença de nanopartículas de prata. É possível observar que a absorção em 660 nm é pouco afetada quando comparada com a absorção entre 350 e 500 nm. Isso mostra que o aumento observado é devido a ressonância de plasmon da prata, em torno de 420 nm, conceitualmente compreendida como a oscilação coletiva dos elétrons de condução em fase com a radiação eletromagnética incidente [38].

Figura 16: Espectro de absorção da solução do extrato de clorofila $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ sem nanopartícula e com $0,5 \text{ mL}$ de nanopartícula de prata de 60 nm a $38,63 \mu\text{mol.L}^{-1}$.



A figura 17 apresenta o espectro de absorção da clorofila em diferentes concentrações na ausência e na presença de nanopartícula de prata.

Figura 17: Espectro de absorção da clorofila (a) sem nanopartícula e (b) com $0,5 \text{ mL}$ de nanopartícula de prata de 60 nm a $38,63 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

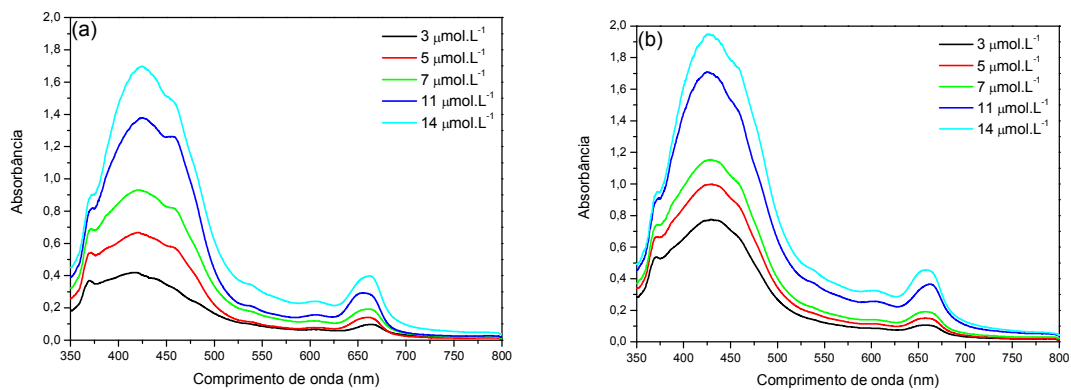
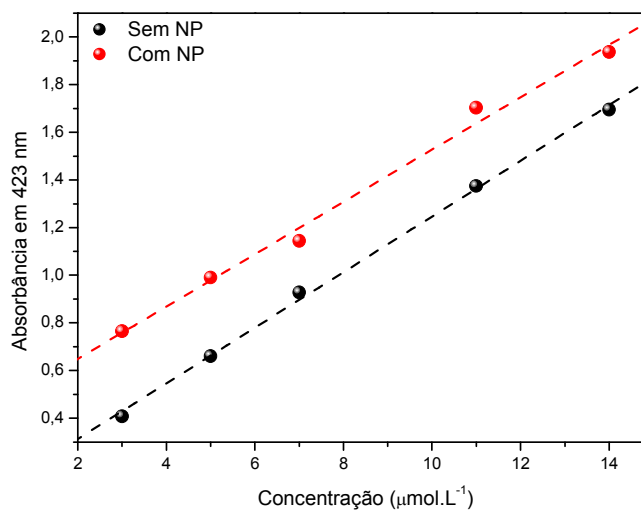


Figura 18: Absorbância em 423 nm em função da concentração de clorofila na presença e ausência de nanopartícula de prata de 60 nm a 38,63 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.



No espectro de absorção da clorofila sem nanopartícula, é possível observar que há um aumento linear da absorbância em função da concentração de clorofila, o que era esperado, pois a absorbância depende da concentração da espécie absorvente, como propõe a lei de Lambert - Beer [39].

$$A_{\lambda} = \epsilon_{\lambda} b C$$

na qual:

A_{λ} = absorbância no comprimento de onda λ ;

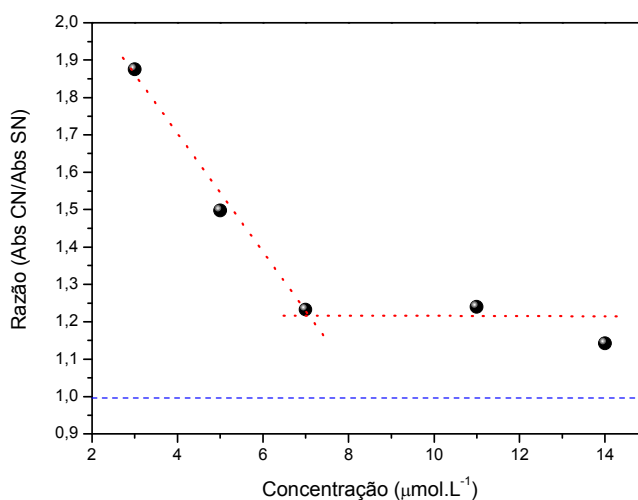
ϵ_{λ} = coeficiente de absorvidade no comprimento de onda λ dado em $\text{Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$;

b = caminho óptico dado em cm;

C = concentração da espécie absorvente dada em mol.L^{-1} .

Quando é adicionado nanopartícula de prata na solução, continua havendo uma dependência linear da absorbância com a concentração da espécie, porém há um aumento nos valores da absorbância, o que se deve ao fato de que a ressonância de plasmon da prata (em torno de 420 nm) ocorrer na mesma região de absorção da clorofila *a* e *b* e outros pigmentos.

Figura 19: Razão da absorbância em 420 nm da amostra com nanopartícula (CN) pela absorbância em 420 nm da amostra sem nanopartícula (SN) em função da concentração do extrato de clorofila.



Por meio da figura 19 é possível observar que a ressonância de plasmon depende da concentração do extrato de clorofila, pois quanto menor a concentração de clorofila maior é o efeito causado pela ressonância de plasmon, por exemplo, para o extrato de clorofila de 3 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, a absorbância da amostra com nanopartícula é praticamente duas vezes maior que a absorbância da amostra sem nanopartícula. Há um decréscimo linear até a concentração de 7 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ do extrato de clorofila e depois essa razão estabiliza em determinado valor, provavelmente devido a alta concentração de clorofila no meio.

Na figura 20 é apresentado é possível observar que a nanopartícula de prata induz a uma supressão da intensidade de fluorescência da clorofila. Tal supressão, provavelmente, ocorre devido a transferência dos elétrons excitados da clorofila para a superfície do metal [40].

Figura 20: Espectro de fluorescência para uma amostra do extrato de clorofila de $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ sem nanopartícula e uma amostra do extrato de clorofila de $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ com $0,5 \text{ mL}$ da solução de nanopartícula de prata de 60 nm a $38,63 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

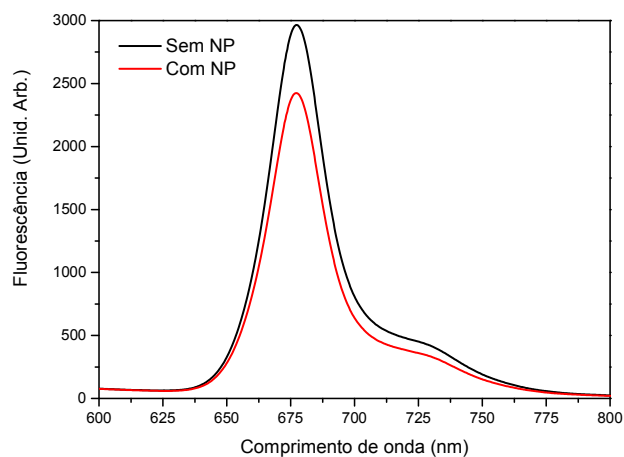


Figura 21: Espectro de Fluorescência da clorofila excitada em 405 nm (a) sem nanopartícula e (b) com $0,5 \text{ mL}$ de nanopartícula de prata de 60 nm a $38,63 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

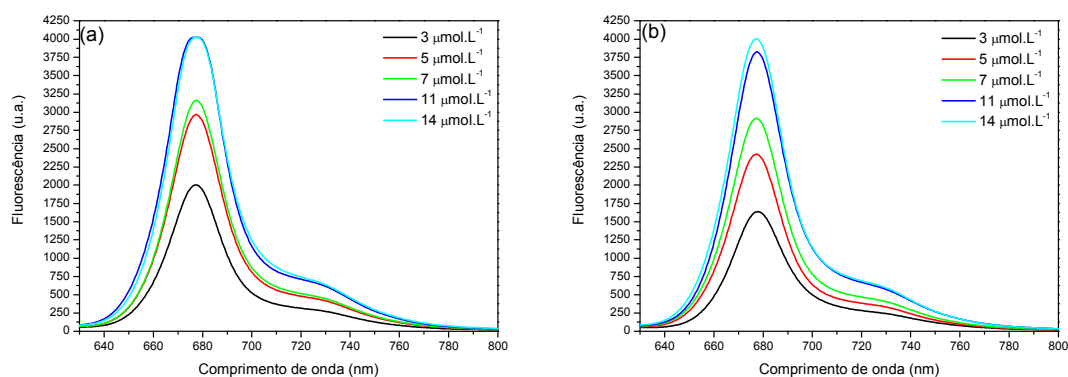
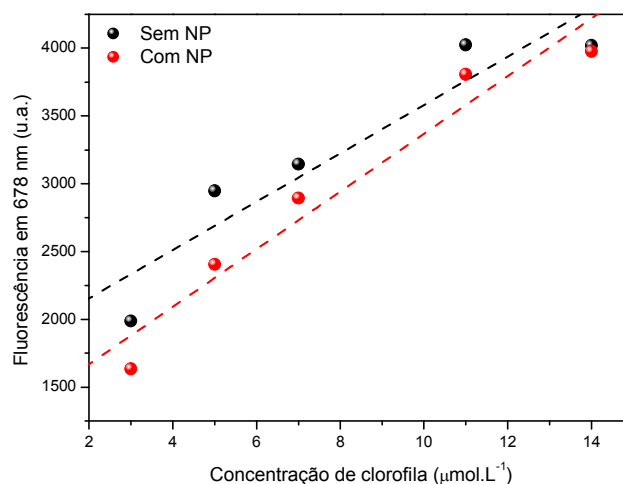


Figura 22: Fluorescência em 678 nm , excitado em 405 nm , em função da concentração de clorofila na ausência e na presença de nanopartícula de prata de 60 nm a $38,63 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

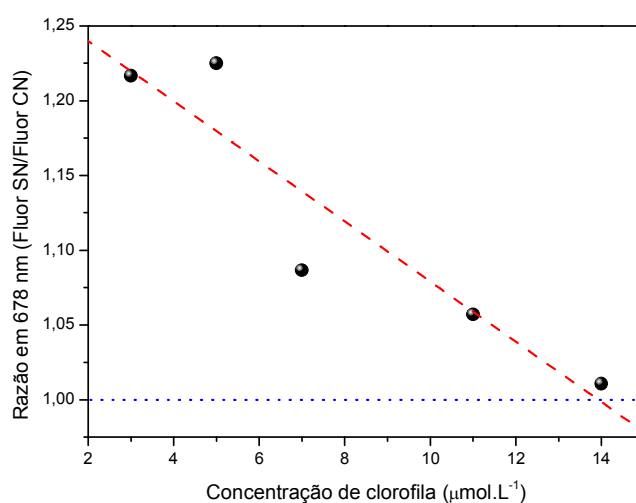


Por meio das figuras 21 e 22, é possível observar que a intensidade de fluorescência, quando a solução é excitada em 405 nm, aumenta linearmente em função do aumento da concentração da clorofila, porém essa intensidade é suprimida com a presença da nanopartícula de prata, efeito este atribuído ao processo de transferência fotoinduzida de elétrons da clorofila no estado excitado para as NPs [40].

Para ocorrer o processo de transferência fotoinduzida de elétrons da clorofila no estado excitado para as NPs, as moléculas de clorofila devem estar adsorvidas à superfície destas e, como a quantidade de nanopartículas de prata foi a mesma em todas as soluções, há certa quantidade de clorofila que poderá ser adsorvida, e à medida que aumenta-se a concentração do extrato de clorofila, maior quantidade dessas moléculas ficarão "livres" na solução.

Até a concentração de $11 \mu\text{mol.L}^{-1}$, é possível observar o efeito de supressão, porém na concentração mais alta de clorofila, praticamente não há o efeito de supressão, pois provavelmente houve uma saturação da clorofila, ou seja, até a concentração de $11 \mu\text{mol.L}^{-1}$, parte da moléculas de clorofila são adsorvidas na superfície das nanopartículas de prata, ocorrendo a transferência fotoinduzida de elétrons da clorofila no estado excitado para as NPs e dessa forma, suprimindo a fluorescência da clorofila, e outra parte fica na solução. Na concentração de $14 \mu\text{mol.L}^{-1}$, a quantidade de clorofila na solução é muito superior à quantidade de clorofila adsorvida na superfície das nanopartículas de prata, fazendo com que a intensidade de fluorescência seja praticamente a mesma na ausência e na presença de tais nanopartículas.

Figura 23: Razão da fluorescência em 678 nm da amostra excitada em 405 nm sem nanopartícula (SN) pela fluorescência em 678 nm da amostra excitada em 405 nm com nanopartícula (CN) em função da concentração do extrato de clorofila.



Por meio da figura 23 é possível observar que quanto menor a concentração do extrato de clorofila, maior é o efeito de supressão induzido pelas nanopartículas, pois menor será a quantidade de moléculas de clorofila que estarão "livres" na solução.

Figura 24: Espectro de Fluorescência da clorofila excitada em 532 nm (a) sem nanopartícula e (b) com 0,5 mL de nanopartícula de prata de 60 nm a 38,63 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

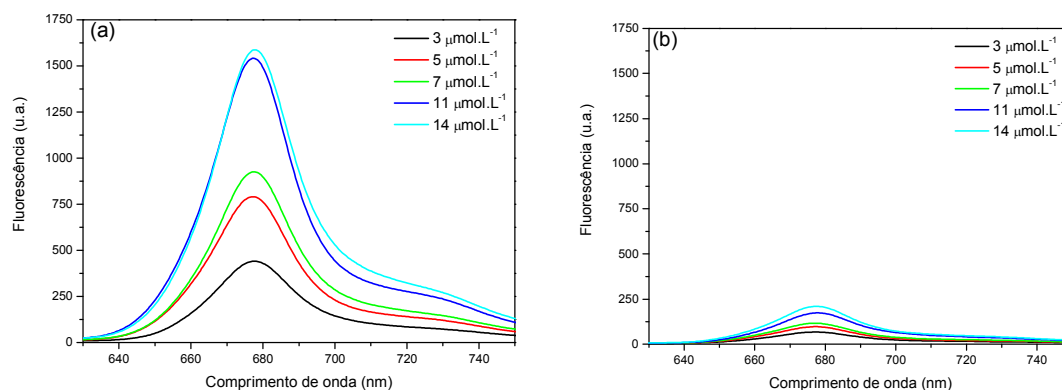
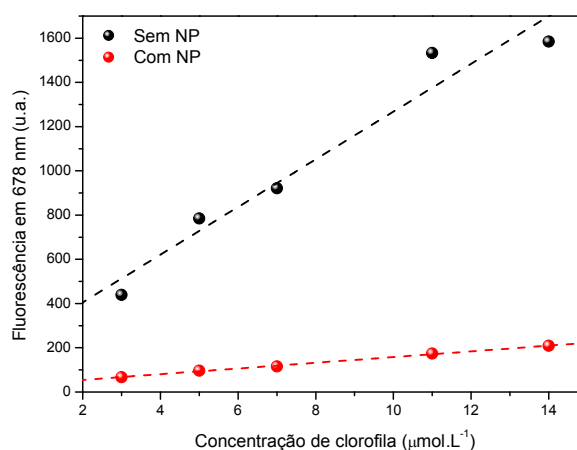
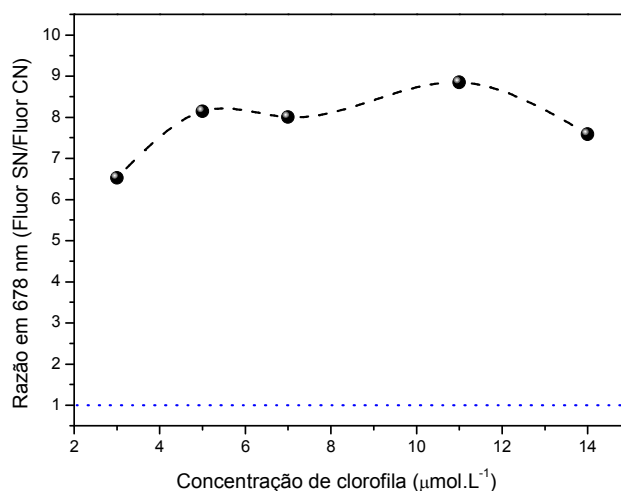


Figura 25: Fluorescência em 678 nm, excitado em 532 nm, em função da concentração de clorofila na ausência e na presença de nanopartícula de prata de 60 nm a 38,63 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.



Quando a solução é excitada em 532 nm (figuras 24 e 25), o aumento da intensidade de fluorescência também apresenta uma dependência linear com a concentração da solução e há supressão da fluorescência quando é adicionada nanopartícula de prata na solução, devido ao processo de transferência fotoinduzida de elétrons da clorofila no estado excitado para as NPs [40], porém tal supressão é mais intensa do que quando a amostra é excitada em 405 nm, pois além da supressão induzida pela nanopartícula a absorção da clorofila nessa região é bem menor do que em 405 nm.

Figura 26: Razão da fluorescência em 678 nm da amostra excitada em 532 nm sem nanopartícula (SN) pela fluorescência em 678 nm da amostra excitada em 532 nm com nanopartícula (CN) em função da concentração do extrato de clorofila.

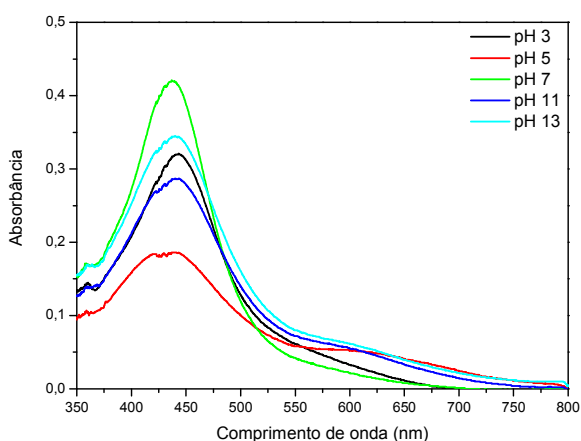


Por meio da figura 26 observa-se que quando a amostra é excitada em 532 nm o efeito de supressão é muito maior do que para a amostra excitada em 405 nm, e tal efeito é praticamente constante quando analisado em função da concentração do extrato de clorofila.

4.3 Estudo do efeito do pH

A figura 27 apresenta o espectro de absorção da solução de nanopartícula de prata de 50 µmol.L⁻¹ em diferentes pHs.

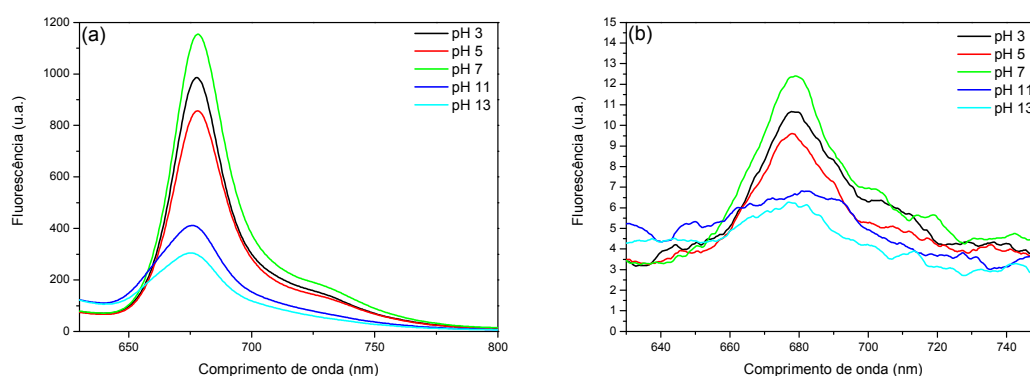
Figura 27: Espectro de absorção da solução de nanopartícula de prata de 60 nm a 50 µmol.L⁻¹ em diferentes pHs(a) sem clorofila e (b) com 0,5 mL de clorofila 3,25 µmol.L⁻¹.



Na figura 27 é possível observar que a ressonância de plasmons da prata, conceitualmente compreendida como a oscilação coletiva dos elétrons de condução em fase com a radiação eletromagnética incidente [38], é suprimida quando submetida a pH ácido ou básico, o que pode ocorrer devido à desestabilização da solução e uma possível formação de aglomerados entre as nanopartículas, pois segundo Keller, et. al, 2010, [41] o pH é um dos fatores que interferem na formação de aglomerados entre as próprias nanopartículas.

A figura 28 apresenta os espectros de fluorescência das soluções de nanopartícula de prata com clorofila, quando excitado em 405 nm e em 532 nm.

Figura 28: Espectro de fluorescência das soluções de nanopartícula de prata de 60 nm a 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ com 0,5 mL de clorofila 3,25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (a) excitado em 405 nm e (b) excitado em 532 nm.

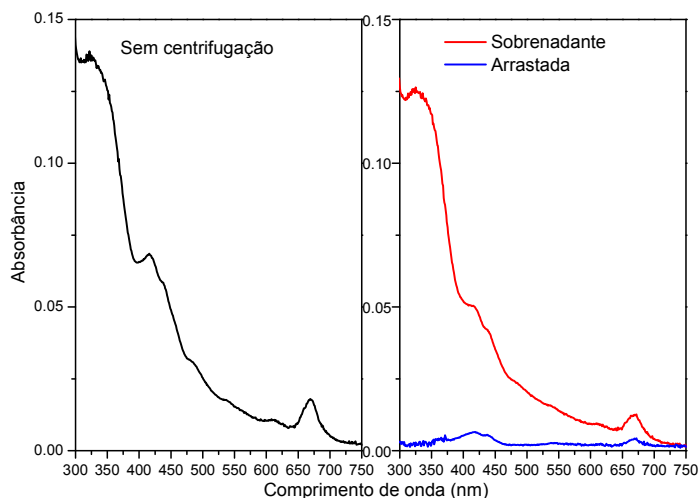


Na figura 28 (a) e (b) é possível observar que tanto o pH ácido como o pH básico suprimem a intensidade de fluorescência da clorofila, porém quanto maior o pH, maior a supressão observada. Por esse motivo os experimentos foram realizados em pH 7, pois dessa forma foi descartado o efeito de supressão causado pela variação do pH.

4.4 Avaliação da interação das nanopartículas de prata (diferentes diâmetros e concentrações) com a clorofila (baixa concentração $3,4 \pm 0,2 \mu\text{mol.L}^{-1}$)

O espectro de absorção do extrato da clorofila na ausência das nanopartículas é apresentado na figura 29.

Figura 29: Espectro de absorção do extrato de clorofila $3,4 \pm 0,2 \mu\text{mol.L}^{-1}$.



Por meio da figura 29 pode-se observar que, ao ser centrifugada, a clorofila nessa concentração e sem presença de nanopartículas metálicas, é muito pouco arrastada, permanecendo a maior parte no sobrenadante.

Ao adicionar-se as nanopartículas de prata observa-se o surgimento de uma banda larga centrada em torno de 420 nm devido a absorção de ressonância de plasmon induzido pela superfície das nanopartículas de prata (figuras 30, 31 e 32), conceitualmente compreendida como a oscilação coletiva dos elétrons de condução em fase com a radiação eletromagnética incidente [38].

Figura 30: Espectro de absorção do extrato de clorofila $3,4 \pm 0,2 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em função da concentração de nanopartículas de prata de 10 nm na (a) amostra sem centrifugação, no (b) sobrenadante e no (c) arrastado.

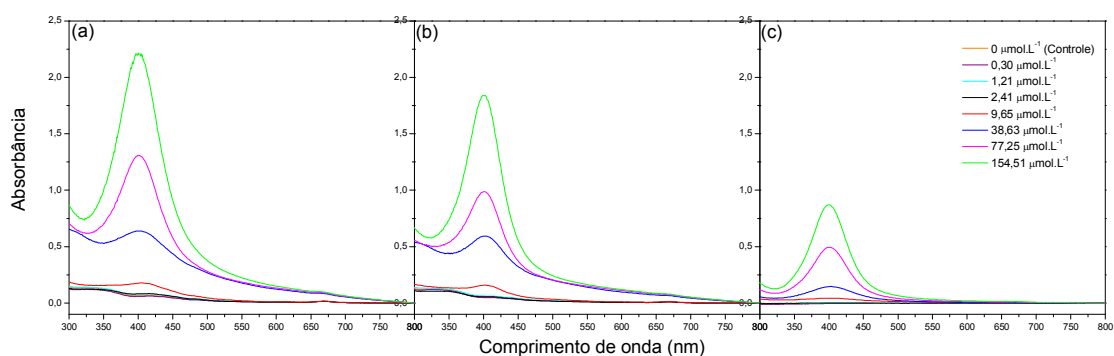


Figura 31: Espectro de absorção do extrato de clorofila $3,4 \pm 0,2 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em função da concentração de nanopartículas de prata de 60 nm na (a) amostra sem centrifugação, no (b) sobrenadante e no (c) arrastado.

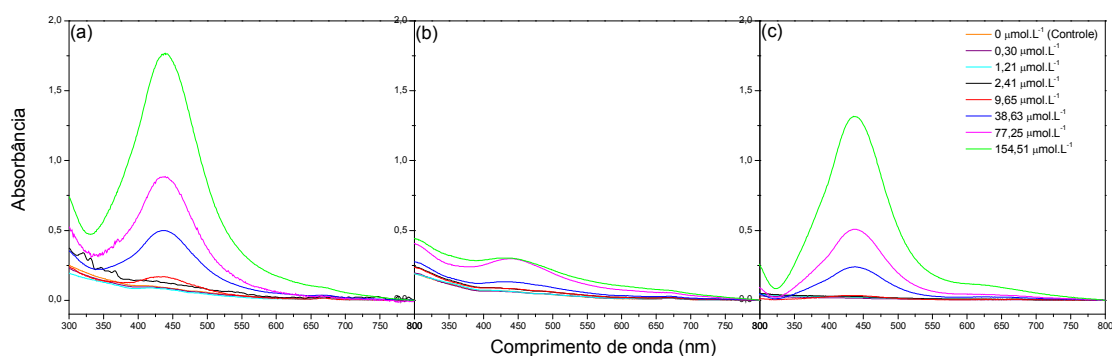
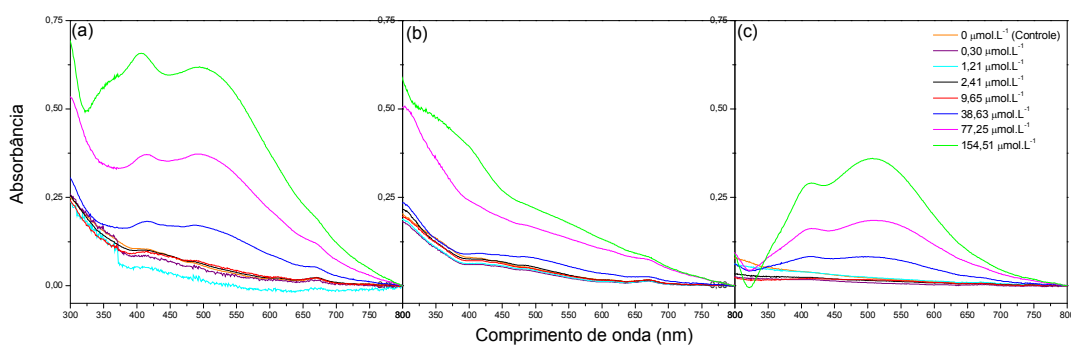
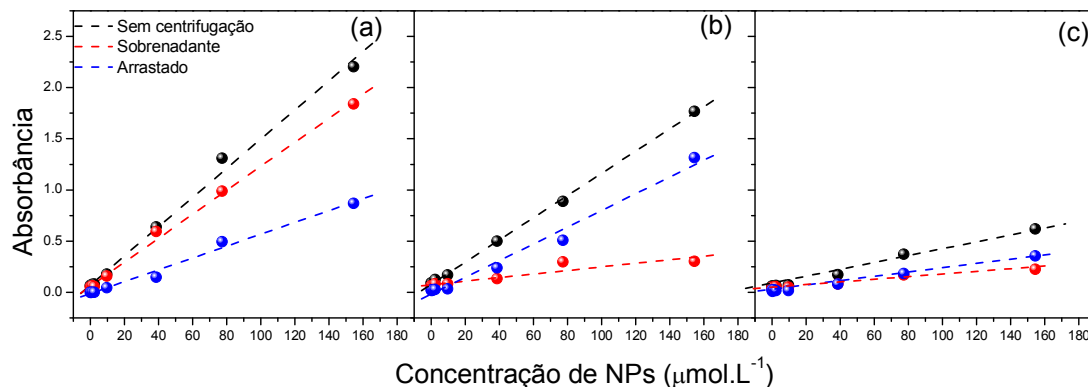


Figura 32: Espectro de absorção do extrato de clorofila $3,4 \pm 0,2 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em função da concentração de nanopartículas de prata de 100 nm na (a) amostra sem centrifugação, no (b) sobrenadante e no (c) arrastado.



No intervalo de 325 nm a 500 nm houve um aumento linear na intensidade de absorção em função da concentração de nanopartículas, como mostrado na figura 33.

Figura 33: Absorbância do extrato de clorofila $3,4 \pm 0,2 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em função da concentração de nanopartículas de prata de (a) 10 nm com absorbância em 400 nm, (b) 60 nm com absorbância em 438 nm e (c) 100 nm com absorbância em 493 nm.



Quando as amostras passam por um processo de centrifugação, as nanopartículas por serem pesadas, são arrastadas para o fundo do micro tubo, porém, como pode-se observar na figura 33, parte das moléculas não são arrastados e permanecem no sobrenadante. Nas amostras que foram adicionadas nanopartículas de 10 nm, a maior parte das nanopartículas permaneceram no sobrenadante, enquanto que nas amostras que foram adicionadas nanopartículas de 60 nm e 100 nm a maior parte das nanopartículas foram arrastadas, isso se deve, provavelmente, pelo fato das nanopartículas de 10 nm serem mais leves, em comparação às outras, e não serem arrastadas facilmente.

Figura 34: Absorbância máxima do extrato de clorofila $3,4 \pm 0,2 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em função da concentração de nanopartículas de prata de 10 nm, 60 nm e 100 nm para as amostras sem centrifugação.

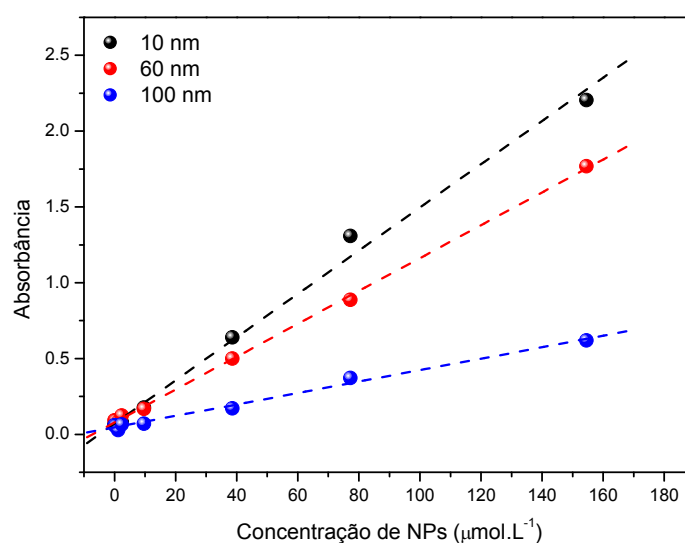
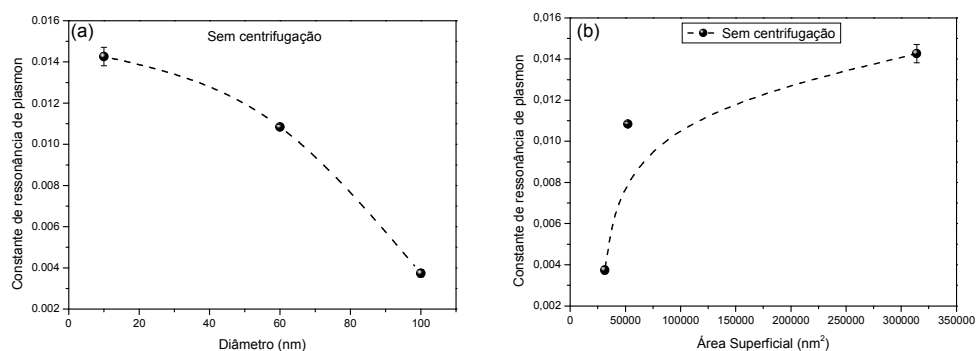


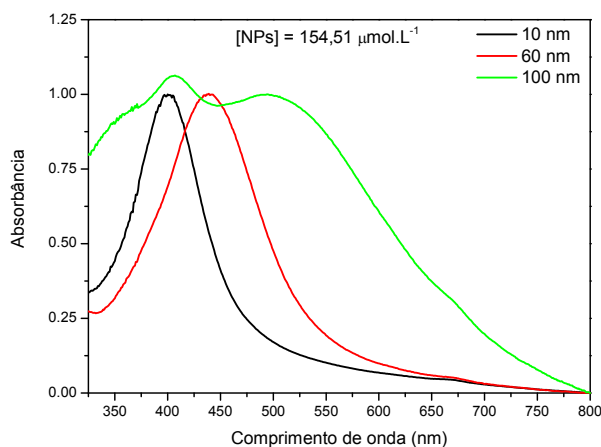
Figura 35: Constante da ressonância de plasmon em função (a) do diâmetro) e (b) da área superficial para a amostra sem centrifugação.



Por meio das figuras 34 e 35 pode-se perceber que a amostra sem centrifugação, apresentou maior variação da absorção, já que esta banda é relacionada à quantidade de nanopartículas de prata que estão presentes na solução. Porém há certa diferença em relação a absorção dos diferentes diâmetros, o que pode estar relacionado à área superficial, pois na mesma concentração há maior quantidade de nanopartículas de 10 nm em relação a de 100 nm, e conseqüentemente, uma maior área superficial para a indução da ressonância de plasmon, e por esse motivo a absorbância é maior nas nanopartículas de 10 nm do que nas de 100 nm.

Outros efeitos observados foram o alargamento e o deslocamento da banda de absorção à medida que se aumenta o diâmetro das nanopartículas (Figura 36). Segundo Link e El-Sayed, 1999, esse efeito está relacionado a uma distribuição não homogênea do diâmetro das nanopartículas, ou seja, é possível haver a formação de aglomerados entre as mesmas [42], e quanto maior o diâmetro, maior também é a possibilidade da formação de tais aglomerados.

Figura 36: Absorção do extrato de clorofila $3,4 \pm 0,2 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em função do diâmetro da nanopartícula de prata para a concentração de $154,51 \mu\text{mol.L}^{-1}$.



As medidas de fluorescência foram feitas nas mesmas amostras do extrato de clorofila com nanopartículas de prata. As figuras 37, 38 e 39 apresentam o espectro de fluorescência da clorofila com nanopartículas de prata, quando a amostra é excitada em 405 nm, e é possível observar a supressão da fluorescência da clorofila causada pela presença das nanopartículas.

Figura 37: Espectro de fluorescência do extrato de clorofila $3,4 \pm 0,2 \mu\text{mol.L}^{-1}$, excitado em 405 nm, em função da concentração das nanopartículas de prata de 10 nm na (a) amostra sem centrifugação, no (b) sobrenadante e no (c) arrastado.

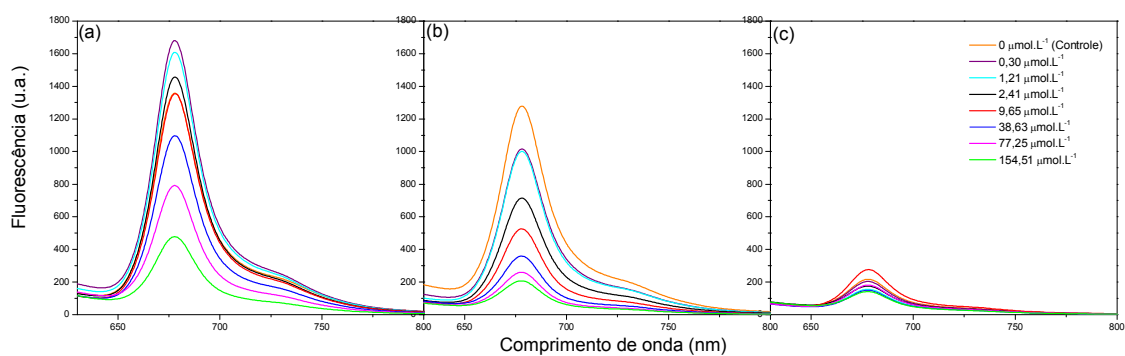


Figura 38: Espectro de fluorescência do extrato de clorofila $3,4 \pm 0,2 \mu\text{mol.L}^{-1}$, excitado em 405 nm, em função da concentração das nanopartículas de prata de 60 nm na (a) amostra sem centrifugação, no (b) sobrenadante e no (c) arrastado.

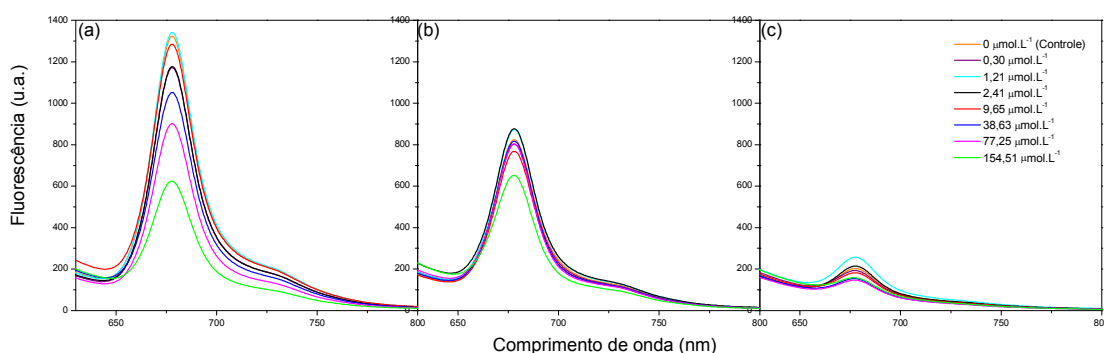
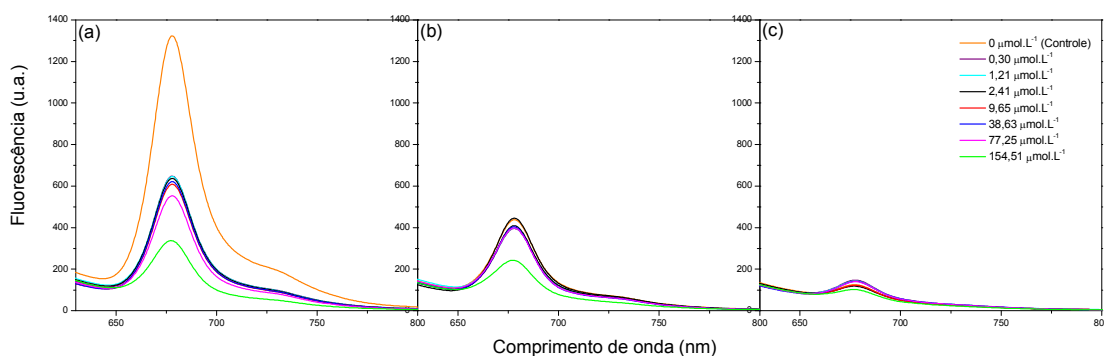
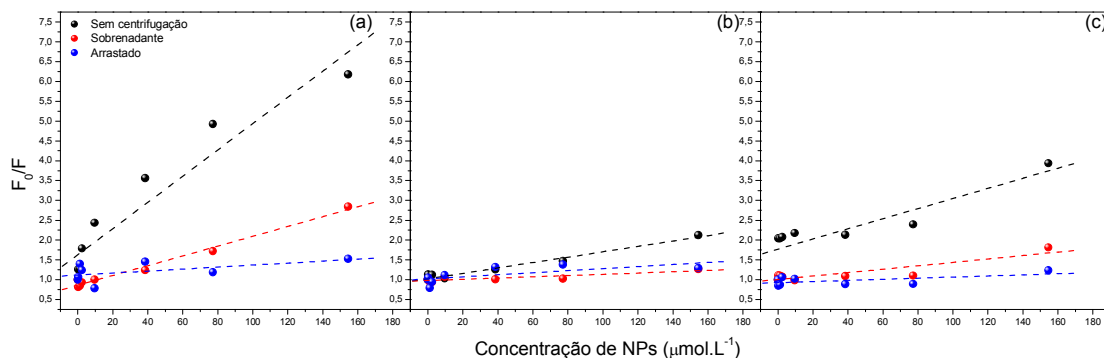


Figura 39: Espectro de fluorescência do extrato de clorofila $3,4 \pm 0,2 \mu\text{mol.L}^{-1}$, excitado em 405 nm, em função da concentração das nanopartículas de prata de 100 nm na (a) amostra sem centrifugação, no (b) sobrenadante e no (c) arrastado.



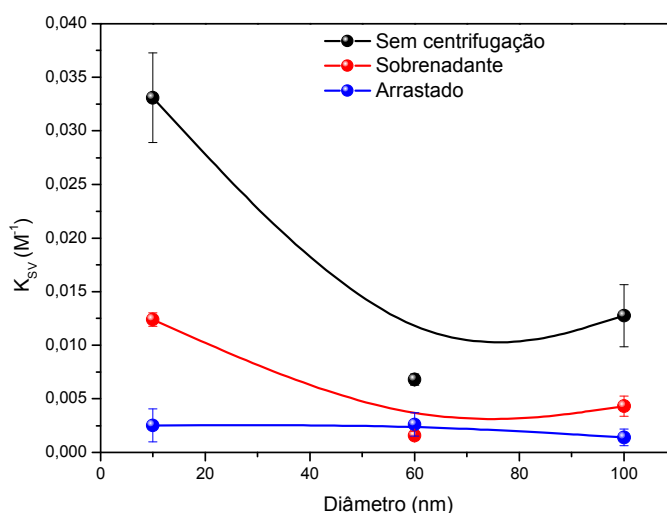
Tal supressão pode ser observada na figura 40 de forma que os gráficos de F_0/F em função da concentração das nanopartículas de prata são lineares, isso indica que a supressão obedece a relação de Stern-Volmer: $F_0/F = 1 + K_{SV} [Q]$, onde F_0 e F são, respectivamente, as intensidades de fluorescência da clorofila na ausência e presença do supressor (nanopartículas de prata), K_{SV} é a constante de supressão de Stern-Volmer e $[Q]$ é a concentração do agente supressor.

Figura 40: Razão de F_0/F em 678 nm para a clorofila $3,4 \pm 0,2 \mu\text{mol.L}^{-1}$, com excitação em 405 nm, em função da concentração de nanopartículas de prata de (a) 10 nm, (b) 60 nm e (c) 100 nm.



A inclinação da reta é a constante de supressão da clorofila induzida por nanopartículas de prata, e por meio desta inclinação pode-se perceber que houve um decréscimo na constante de supressão, à medida que se aumenta o diâmetro da nanopartícula (Figura 42), pois em uma mesma concentração há menor quantidade de nanopartículas de 100 nm, quando comparada com a quantidade de nanopartículas de 10 nm, e portanto, menor área superficial. Quanto maior a área superficial, maior a supressão causada, pois maior será a quantidade de clorofila que poderá ser adsorvida na superfície da nanopartícula, ocorrendo o processo de transferência de elétrons da clorofila no estado excitado para a superfície da nanopartícula.

Figura 41: Constante de supressão na intensidade de fluorescência da clorofila $3,4 \pm 0,2 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em função do diâmetro das nanopartículas de prata, com excitação em 405 nm.



Barazzouk e seus colaboradores (2005), através de estudos realizados com nanopartículas de ouro de 8 nm, atribuíram o efeito de supressão da fluorescência do extrato de clorofila ao processo de transferência fotoinduzida de elétrons da clorofila no estado excitado para as NPs [40]. Segundo Barazzouk e seus colaboradores, em geral, existem vários processos moleculares importantes pelo qual um supressor pode desativar um fluoróforo no estado excitado, sendo os mais importantes os de transferência de elétrons e a transferência de energia. No entanto, como os metais em dimensões de nanopartículas são mais eletronegativos que o material a granel, é mais provável que estes participem no processo de transferência de elétrons. Ainda nesse estudo, Barazzouk e seus colaboradores, através de estudos eletroquímicos, mostraram que nanopartículas metálicas podem aceitar e armazenar elétrons. Outro fato importante é que os autores obtiveram um grande valor da constante de associação, indicando uma forte ligação entre clorofila e as nanopartículas de ouro, que também proporciona condições favoráveis para o processo de transferência de carga da clorofila para as nanopartículas de ouro. Dessa forma, eles chegaram a conclusão que é muito provável que a transferência de elétrons é o processo dominante na supressão da emissão de clorofila por nanopartículas de ouro onde a clorofila no estado excitado doa elétrons para as nanopartículas de ouro. Nossos resultados sugerem que a transferência dos elétrons excitados da clorofila para a superfície do metal pode ser o efeito responsável pela supressão da fluorescência da clorofila induzida pelas nanopartículas de prata.

Analisando as figuras 37, 38 e 39 é possível observar que quando a amostra passa por um processo de centrifugação, parte da clorofila permanece no sobrenadante e uma menor quantidade vai para o arrastado. Ao comparar-se a inclinação da reta (figura 40) dentro de um mesmo diâmetro, percebe-se que para a amostra de 10 nm (figura 40 (a)), a solução sem centrifugar apresenta a intensidade de fluorescência maior que o sobrenadante, enquanto que o arrastado apresenta um coeficiente angular próximo de zero. Na amostra de 60 nm (figura 40 (b)), o sobrenadante apresenta o menor coeficiente angular, enquanto que para 100 nm (figura 37 (c)), o arrastado é o que apresenta o menor coeficiente angular.

Quando as amostras, contendo nanopartículas de prata, são centrifugadas, estas são arrastadas para o fundo do micro tubo, por serem pesadas, e são arrastadas com elas as clorofilas que estão adsorvidas às nanopartículas. Ao analisar a figura 41, percebe-se que, a constante de supressão em função da área superficial é praticamente zero, o que demonstra que não há fluorescência nessa amostra. A intensidade da fluorescência diminui nessas amostras devido ao processo de transferência fotoinduzida de elétrons da clorofila, que se

encontra adsorvida às nanopartículas, no estado excitado para as NPs de prata, e por esse motivo quase não há fluorescência nas amostras que foram arrastadas após a centrifugação.

As figuras 42, 43 e 44 apresentam o espectro de fluorescência da clorofila com nanopartículas de prata, quando a amostra é excitada em 532 nm.

Figura 42: Espectro de fluorescência do extrato de clorofila $3,4 \pm 0,2 \mu\text{mol.L}^{-1}$, excitado em 532 nm, em função da concentração das nanopartículas de prata de 10 nm na (a) amostra sem centrifugação, no (b) sobrenadante e no (c) arrastado.

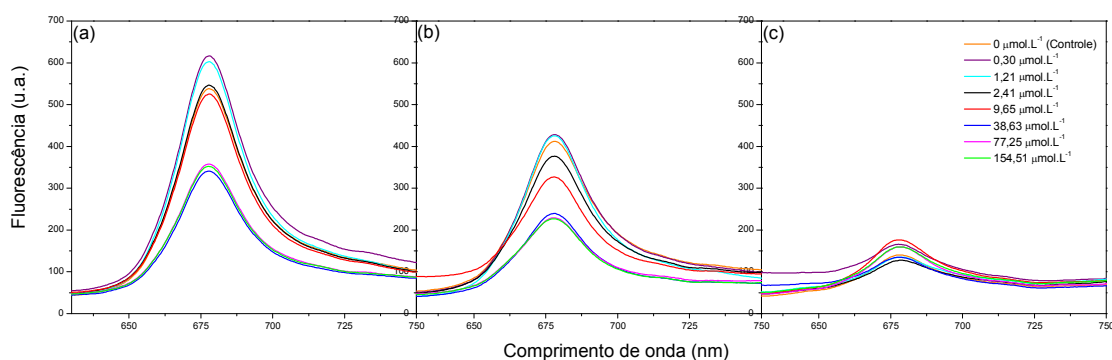


Figura 43: Espectro de fluorescência do extrato de clorofila $3,4 \pm 0,2 \mu\text{mol.L}^{-1}$, excitado em 532 nm, em função da concentração das nanopartículas de prata de 60 nm na (a) amostra sem centrifugação, no (b) sobrenadante e no (c) arrastado.

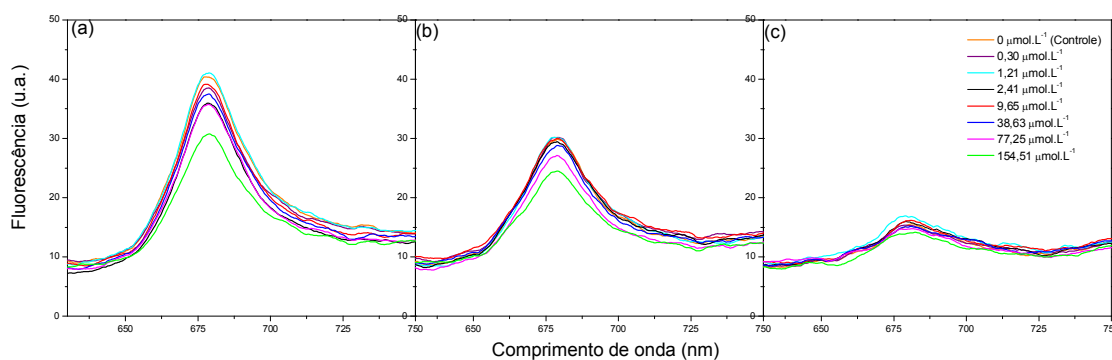
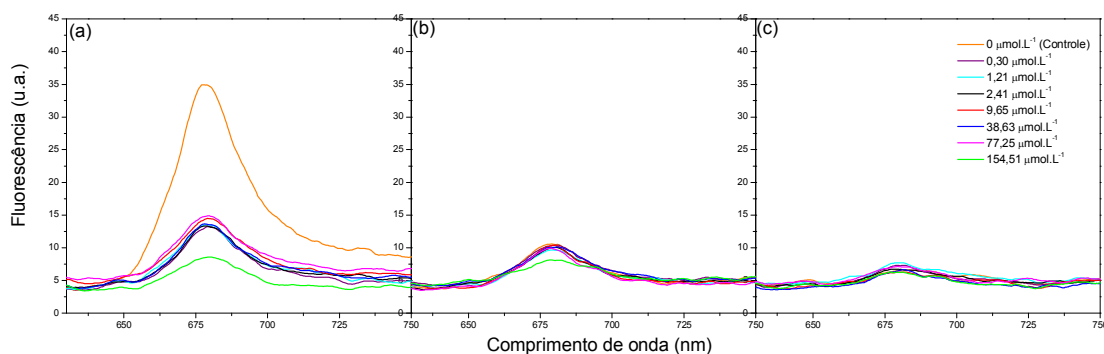


Figura 44: Espectro de fluorescência do extrato de clorofila $3,4 \pm 0,2 \mu\text{mol.L}^{-1}$, excitado em 532 nm, em função da concentração das nanopartículas de prata de 100 nm na (a) amostra sem centrifugação, no (b) sobrenadante e no (c) arrastado.

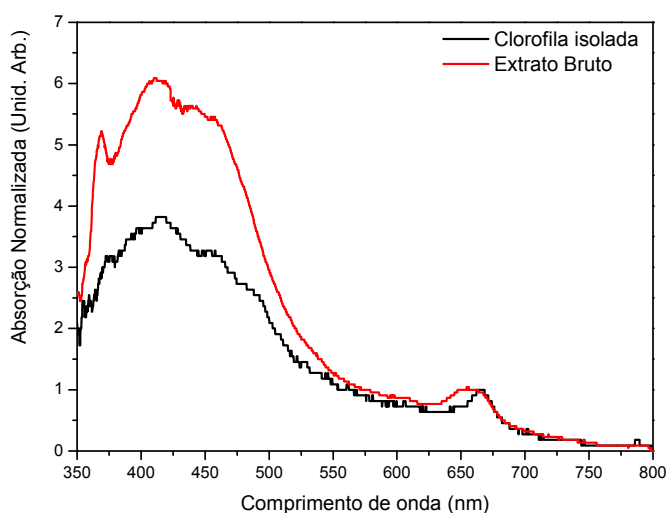


Quando a amostra é excitada em 532 nm, a intensidade de fluorescência é menor do que quando a excitação ocorre em 405 nm, pelo fato da absorção ser menor nesse comprimento de onda de excitação, e por esse motivo não foi possível observar o efeito de supressão causado pelas nanopartículas em tais amostras.

4.5 Estudo da interação nanopartícula - clorofila isolada

A figura 45 apresenta o espectro de absorção normalizada da clorofila do extrato bruto e da clorofila isolada.

Figura 45: Espectro de absorção da clorofila do extrato bruto e da clorofila isolada.



Por meio do espectro de absorção, pode-se perceber que há um decréscimo na banda que abrange os comprimentos de onda entre 350 nm e 550 nm para a clorofila isolada, o que

se deve ao fato da eliminação de parte dos carotenóides pelos processos de lavagem e purificação da amostra utilizando-se coluna cromatográfica, pois essa banda é devido à absorção da radiação eletromagnética pela clorofila *a* e *b*, e outros pigmentos, como os carotenóides, que absorvem nessa região [36].

Figura 46: Espectro de absorção da clorofila isolada a $3,4 \pm 0,6 \text{ mol.L}^{-1}$ em função da concentração de nanopartículas de prata de (a) 10nm, (b) 60 nm e (c) 100 nm.

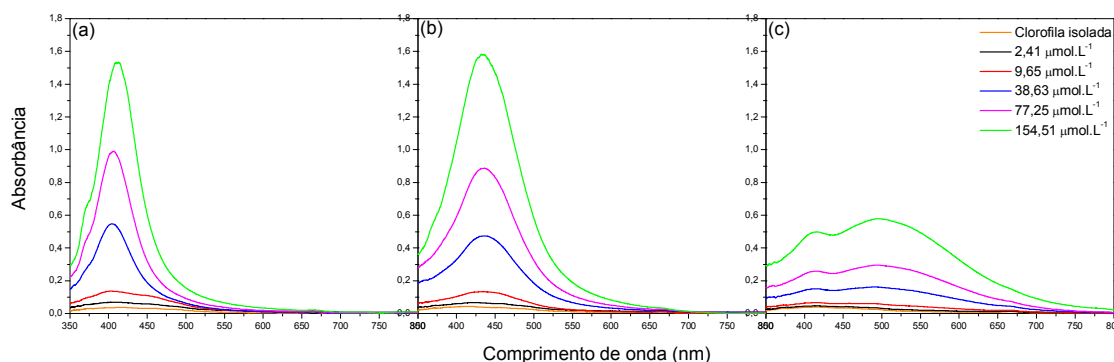
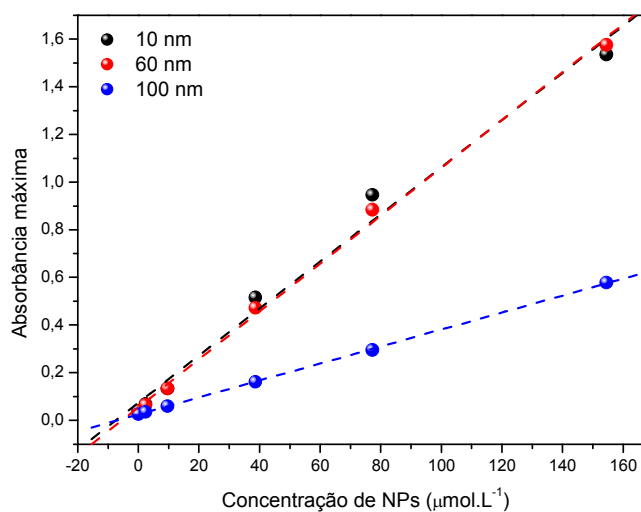


Figura 47: Absorbância da clorofila isolada a $3,4 \pm 0,6 \text{ mol.L}^{-1}$ em função da concentração de nanopartículas de prata.



Ao adicionar-se as nanopartículas de diferentes diâmetros, há a formação de uma banda correspondente à ressonância de plasmões das nanopartículas de prata (figura 46) [37]. E por meio da figura 47, percebe-se que há uma dependência linear da concentração de nanopartículas com a absorbância, como previsto na lei de Lambert - Beer [39].

Figura 48: Espectro de fluorescência da clorofila isolada a $3,4 \pm 0,6 \text{ mol.L}^{-1}$, com excitação em 405 nm, com nanopartículas de prata de (a) 10 nm, (b) 60 nm e (c) 100 nm.

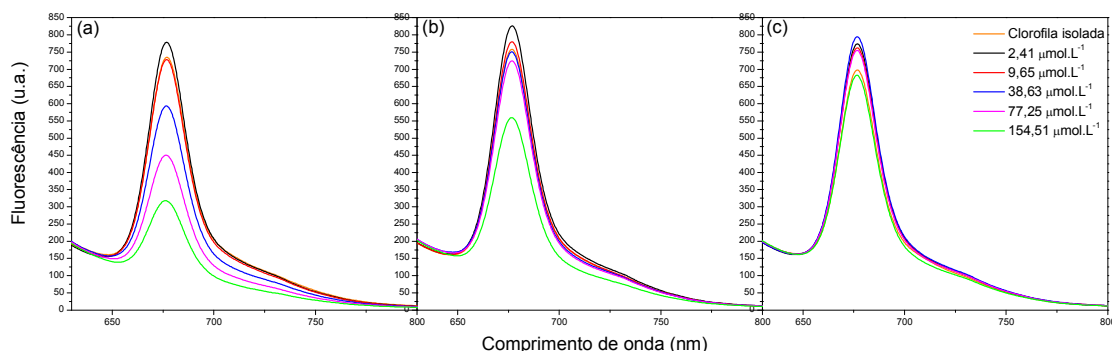
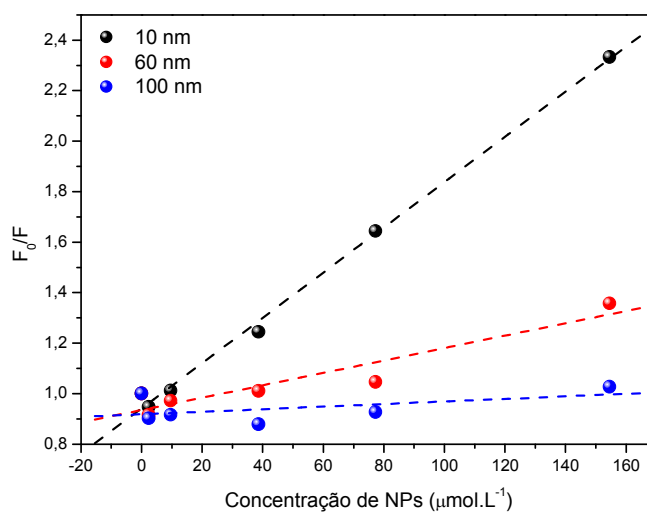
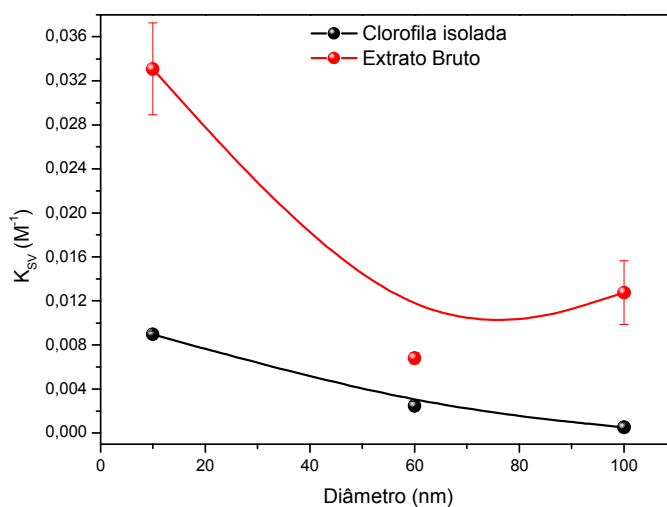


Figura 49: Razão de F_0/F em 678 nm, com excitação em 405 nm, em função da concentração de nanopartículas de prata.



A supressão da fluorescência pode ser observada na figura 48 de forma que os gráficos de F_0/F em função da concentração das nanopartículas de prata (figura 49) são lineares, isso indica que a supressão obedece a relação de Stern-Volmer: $F_0/F = 1 + K_{SV} [Q]$, onde F_0 e F são, respectivamente, as intensidades de fluorescência da clorofila na ausência e presença do supressor (nanopartículas de prata), K_{SV} é a constante de supressão de Stern-Volmer e $[Q]$ é a concentração do agente supressor.

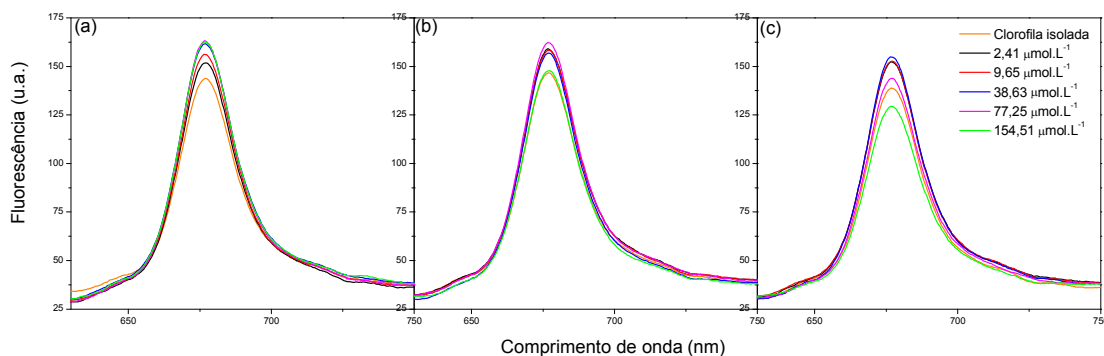
Figura 50: Constante de supressão em função do diâmetro das nanopartículas de prata, com excitação em 405 nm.



A inclinação da reta é a constante de supressão da clorofila induzida por nanopartículas de prata, e por meio desta inclinação pode-se perceber que houve um decréscimo na constante de supressão, à medida que se aumenta o diâmetro, quando feita a comparação entre os diâmetros, ou seja, quando diminui a área superficial da nanopartícula (Figura 50), pois em uma mesma concentração há menor quantidade de nanopartículas de 100 nm, quando comparada com a quantidade de nanopartículas de 10 nm, e portanto, menor área superficial disponível para a adsorção de clorofila às nanopartículas.

Os valores da constante de supressão são maiores para o extrato bruto do que para a clorofila isolada, ou seja, a maior supressão causada pelas nanopartículas de prata é no extrato bruto. Tal efeito pode ocorrer devido ao fato que no extrato bruto, além da clorofila *a* e *b*, existem outros pigmentos, como os carotenóides, que podem contribuir com o efeito de supressão.

Figura 51: Espectro de fluorescência da clorofila isolada a $3,4 \pm 0,6 \text{ mol.L}^{-1}$, com excitação em 532 nm, com nanopartículas de prata de (a) 10 nm, (b) 60 nm e (c) 100 nm.

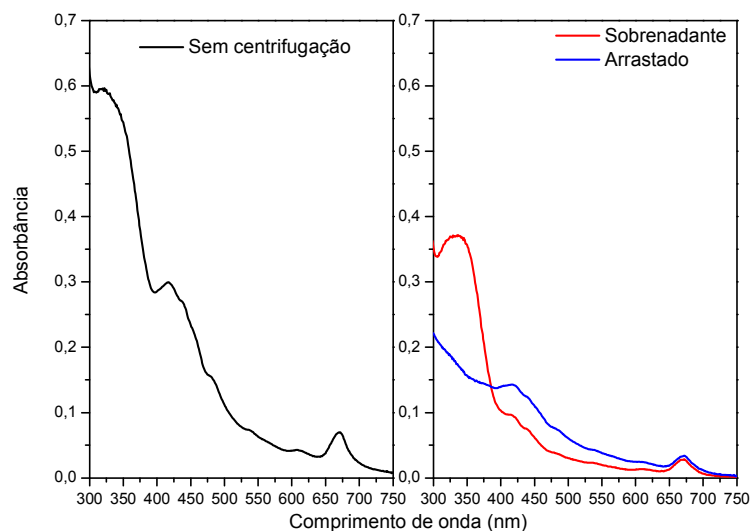


Nas amostras excitadas em 532 nm, não foi possível obter os parâmetros de fluorescência. Tal efeito pode ser explicado pelo fato da absorção nessa região ser menor do que quando a amostra é excitada em 405 nm, pois a clorofila isolada não absorve radiação nesse comprimento de onda de excitação por refletir a luz verde e, conseqüentemente a fluorescência nessa região também será menor. Pelo fato da clorofila isolada não absorve radiação nesse comprimento de onda de excitação, seus elétrons não serão excitados e não haverá a transferência destes para a superfície das nanopartículas metálicas, não havendo a supressão da fluorescência. Por esse motivo não foi possível apresentar o gráfico de F_0/F em função da concentração das nanopartículas.

4.6 Avaliação da interação das nanopartículas de prata (diferentes diâmetros e concentrações) com a clorofila (alta concentração $14,7 \pm 0,4 \mu\text{mol.L}^{-1}$)

O espectro do extrato da clorofila sem nanopartículas é apresentado na figura 52.

Figura 52: Espectro de absorção do extrato de clorofila $14,7 \pm 0,4 \mu\text{mol.L}^{-1}$.



Quando o extrato de clorofila passa pelo processo de centrifugação, devido à sua alta concentração, a maior parte desta vai para o arrastado, como é possível observar na figura 52.

Ao adicionar-se as nanopartículas de prata observa-se o surgimento de uma banda larga centrada em torno de 420 nm devido a absorção de ressonância de plasmon induzido pela superfície das nanopartículas de prata [38] (figuras 53, 54 e 55).

Figura 53: Espectro de absorção do extrato de clorofila $14,7 \pm 0,4 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em função da concentração de nanopartículas de prata de 10 nm na (a) amostra sem centrifugação, no (b) sobrenadante e no (c) arrastado.

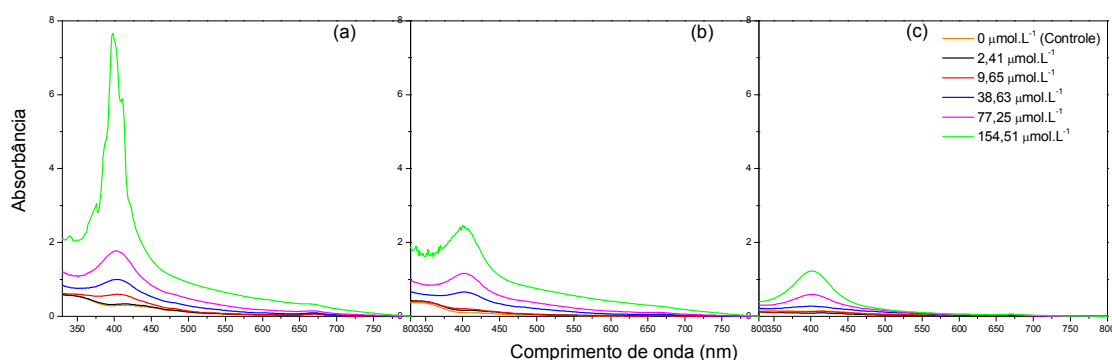


Figura 54: Espectro de absorção do extrato de clorofila $14,7 \pm 0,4 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em função da concentração de nanopartículas de prata de 60 nm na (a) amostra sem centrifugação, no (b) sobrenadante e no (c) arrastado.

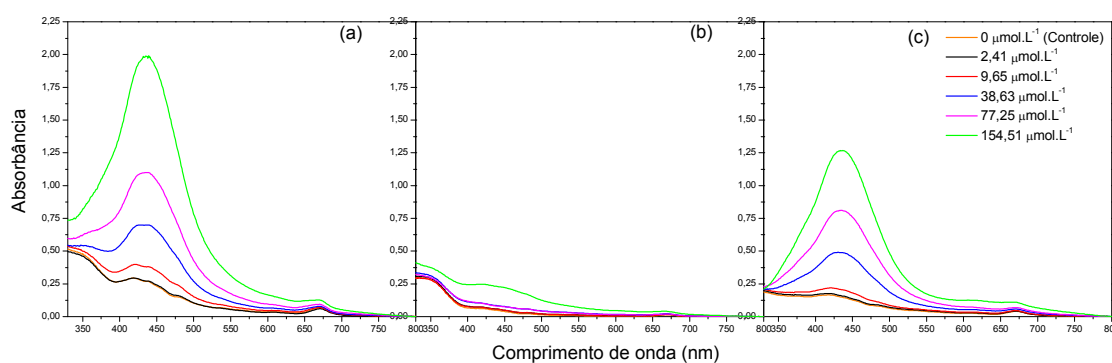
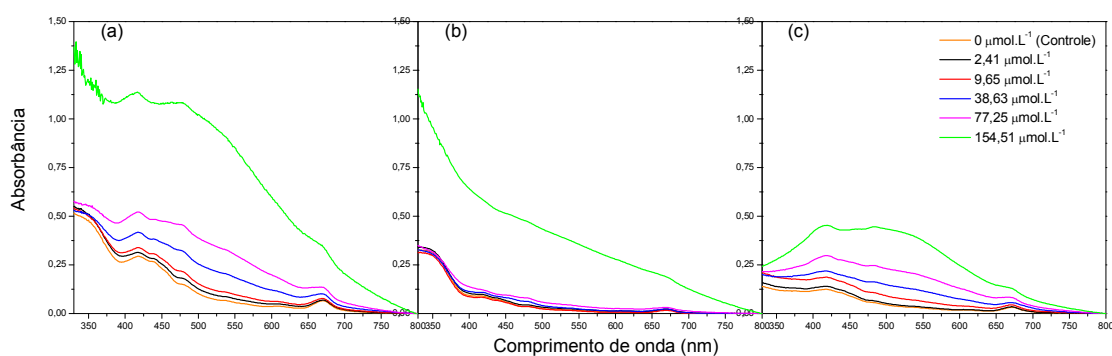
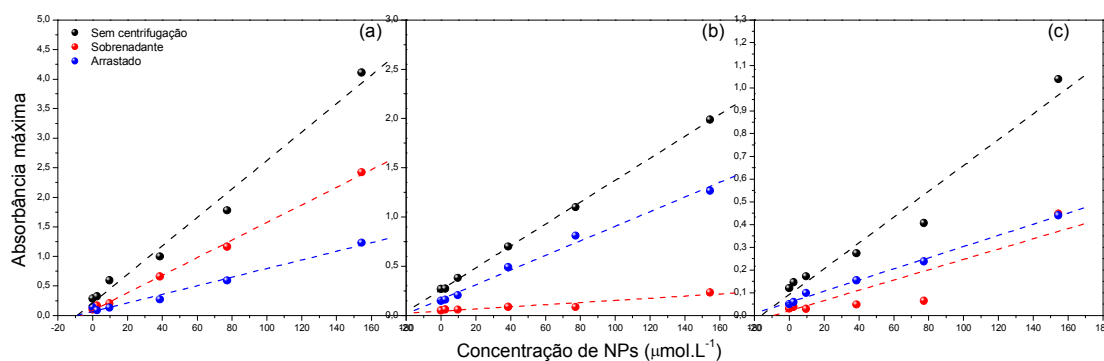


Figura 55: Espectro de absorção do extrato de clorofila $14,7 \pm 0,4 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em função da concentração de nanopartículas de prata de 100 nm na (a) amostra sem centrifugação, no (b) sobrenadante e no (c) arrastado.



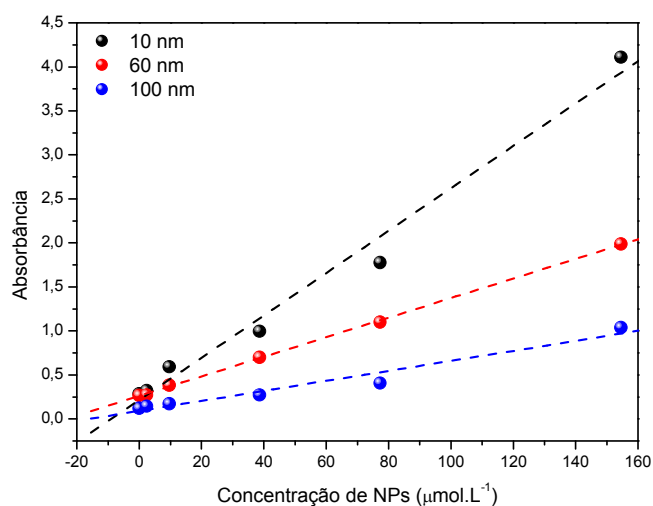
No intervalo de 325 nm a 500 nm houve um aumento linear na intensidade de absorção em função da concentração de nanopartículas, como mostrado na figura 56.

Figura 56: Absorbância do extrato de clorofila $14,7 \pm 0,4 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em função da concentração de nanopartículas de prata de (a) 10 nm com absorbância em 400 nm, (b) 60 nm com absorbância em 438 nm e (c) 100 nm com absorbância em 493 nm.



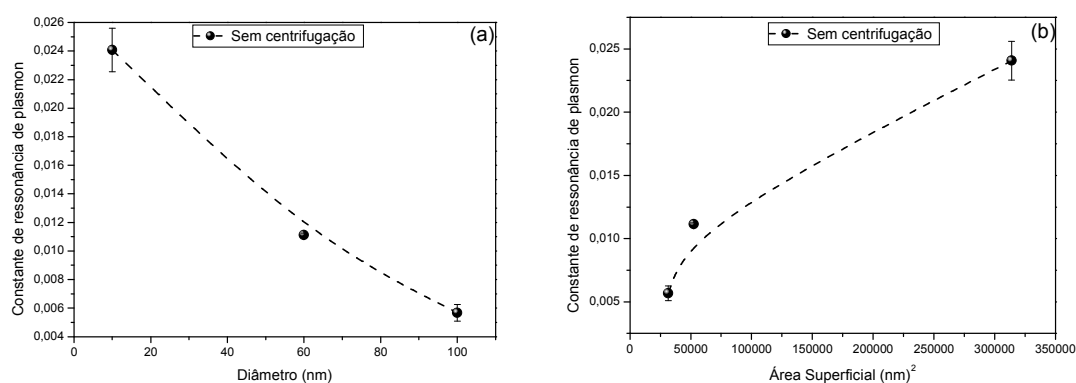
O efeito observado foi o mesmo que no estudo realizado com a clorofila $3 \mu\text{mol.L}^{-1}$, pois quando as amostras passam por um processo de centrifugação, as nanopartículas por serem pesadas, são arrastadas para o fundo do micro tubo, porém, como pode-se observar na figura 56, parte das partículas não são arrastados e permanecem no sobrenadante. Nas amostras que foram adicionadas nanopartículas de 10 nm, a maior parte das nanopartículas permaneceram no sobrenadante, enquanto que nas amostras que foram adicionadas nanopartículas de 60 nm e 100 nm a maior parte das nanopartículas foram arrastadas, isso se deve ao fato das nanopartículas de 10 nm serem mais leves, em comparação às outras, e não serem arrastadas facilmente.

Figura 57: Absorbância do extrato de clorofila da amostra sem centrifugação $14,7 \pm 0,4 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em função da concentração de nanopartículas de prata de 10 nm, 60 nm e 100 nm.



Por meio da figura 57 é possível observar que o efeito da ressonância de plasmon depende do diâmetro da nanopartícula metálica, pois quanto menor o diâmetro, maior é o efeito observado, provavelmente por ter maior área superficial específica disponível para que ocorra a ressonância. Obteve-se então a constante de ressonância de plasmon por meio do coeficiente angular das retas da figura 57 e plotou-se um gráfico dessa constante em função do diâmetro e da área superficial das nanopartículas.

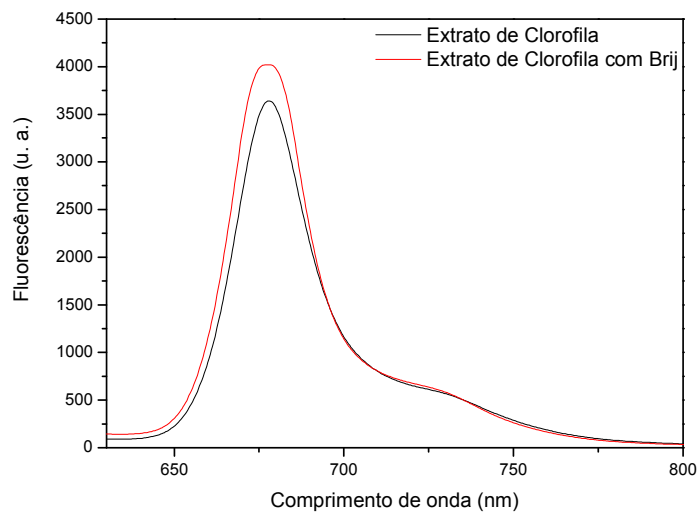
Figura 58: Constante da ressonância de plasmon em função (a) do diâmetro) e (b) da área superficial para a amostra sem centrifugação.



O efeito observado foi o mesmo que no estudo com a clorofila $3 \mu\text{mol.L}^{-1}$, pois quanto maior a área superficial, maior é o efeito causado pela ressonância de plasmon.

As medidas de fluorescência foram feitas nas mesmas amostras do extrato de clorofila com nanopartículas de prata. Realizou-se um teste utilizando o Brij, este foi utilizado com a finalidade de desfazer possíveis aglomerados que poderiam ser formados entre as moléculas de clorofila e como é possível observar na figura 59 houve um aumento da fluorescência na presença do Brij, o que sugere que nessa concentração de clorofila há a formação de aglomerados.

Figura 59: Espectro de fluorescência do extrato de clorofila, excitado em 405 nm, na ausência e na presença do Brij.



As figuras 60, 61 e 62 apresentam o espectro de fluorescência da clorofila com nanopartículas de prata, quando a amostra é excitada em 405 nm, e é possível observar a supressão da fluorescência da clorofila causada pela presença das nanopartículas.

Figura 60: Espectro de fluorescência do extrato de clorofila $14,7 \pm 0,4 \mu\text{mol.L}^{-1}$, excitado em 405 nm, em função da concentração das nanopartículas de prata de 10 nm na (a) amostra sem centrifugação, no (b) sobrenadante e no (c) arrastado.

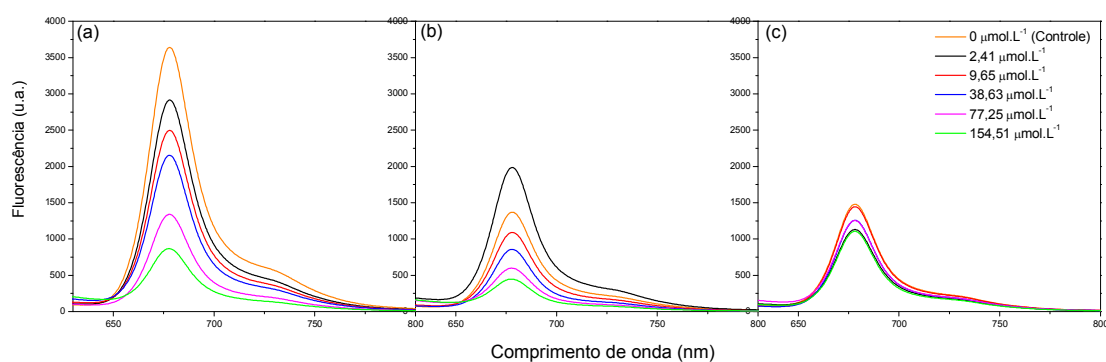


Figura 61: Espectro de fluorescência do extrato de clorofila $14,7 \pm 0,4 \mu\text{mol.L}^{-1}$, excitado em 405 nm, em função da concentração das nanopartículas de prata de 60 nm na (a) amostra sem centrifugação, no (b) sobrenadante e no (c) arrastado.

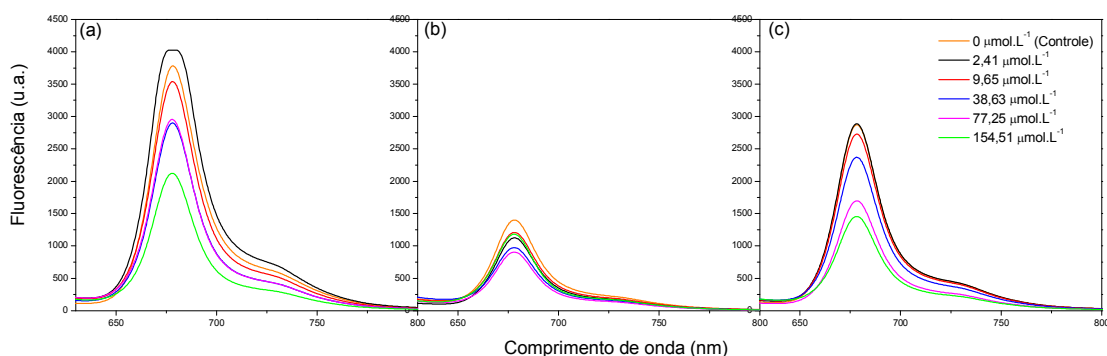
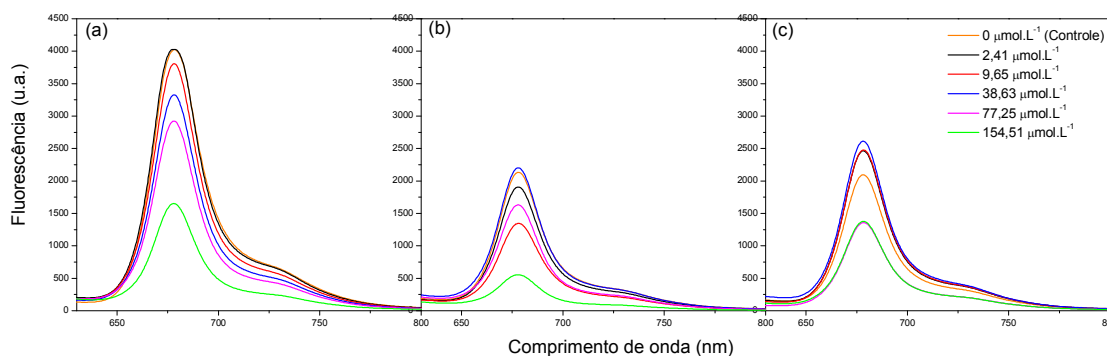
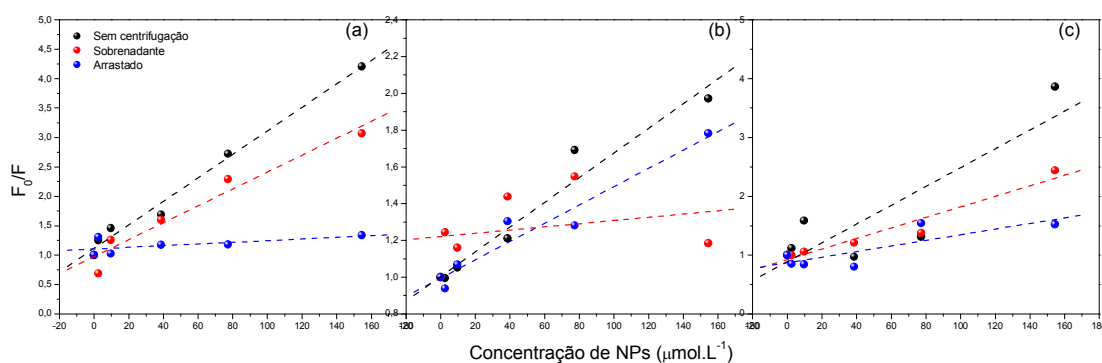


Figura 62: Espectro de fluorescência do extrato de clorofila $14,7 \pm 0,4 \mu\text{mol.L}^{-1}$, excitado em 405 nm, em função da concentração das nanopartículas de prata de 100 nm na (a) amostra sem centrifugação, no (b) sobrenadante e no (c) arrastado.



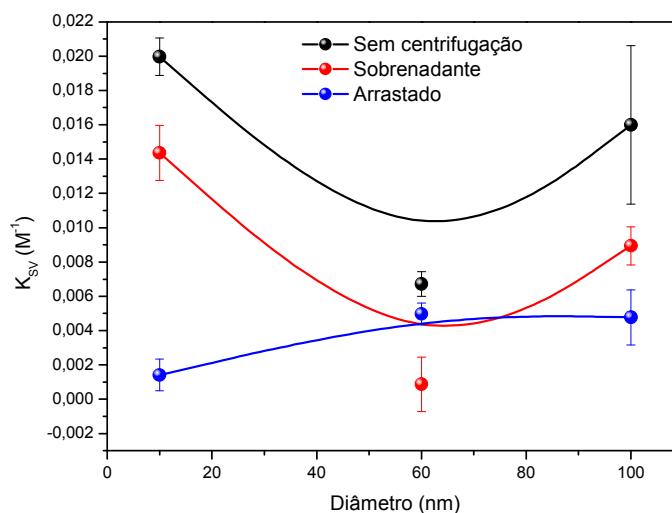
Todas as amostras apresentaram o efeito de supressão causado pelas nanopartículas de prata. Na figura 63 é possível observar que essa supressão obedece a relação de Stern - Volmer, pois o gráfico de F_0/F em função da concentração de nanopartículas é linear.

Figura 63: Razão de F_0/F em 678 nm para a clorofila $14,7 \pm 0,4 \mu\text{mol.L}^{-1}$, com excitação em 405nm, em função da concentração de nanopartículas de prata de (a) 10 nm, (b) 60 nm e (c) 100 nm.



Sabendo que a inclinação da reta é a constante de supressão, plotou-se um gráfico dessa constante em função do diâmetro (figura 64), e observou-se que quanto menor o diâmetro maior é o efeito de supressão causado pela nanopartícula, como já havia sido observado para a amostra da clorofila $3 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Somente no arrastado houve um aumento da constante de supressão em função do diâmetro, o que pode ter ocorrido devido ao fato das nanopartículas de 10 nm serem menos arrastadas, provavelmente por serem mais leves, e dessa forma, quanto menor a quantidade de nanopartícula menor será a supressão observada.

Figura 64: Constante de supressão na intensidade de fluorescência da clorofila $14,7 \pm 0,4 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em função do diâmetro das nanopartículas de prata, com excitação em 405 nm.



Essas mostras também foram excitadas em 532 nm e os espectros estão apresentados nas figuras 65, 66 e 67.

Figura 65: Espectro de fluorescência do extrato de clorofila $14,7 \pm 0,4 \mu\text{mol.L}^{-1}$, excitado em 532 nm, em função da concentração das nanopartículas de prata de 10 nm na (a) amostra sem centrifugação, no (b) sobrenadante e no (c) arrastado.

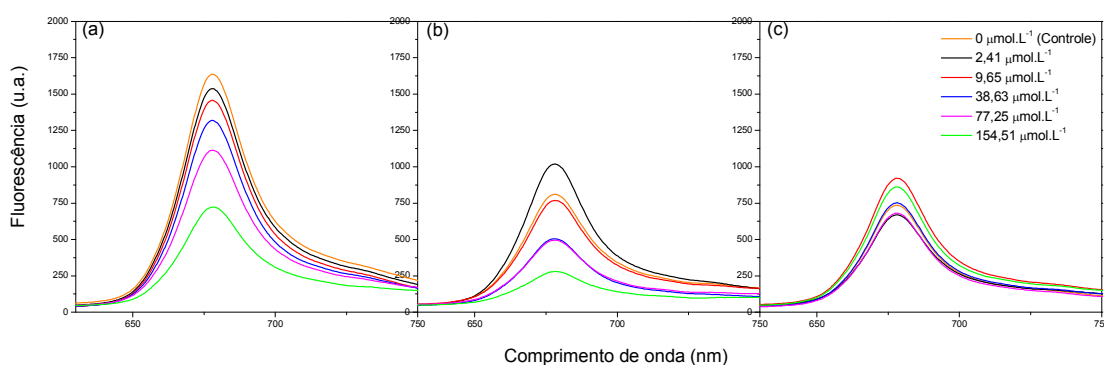


Figura 66: Espectro de fluorescência do extrato de clorofila $14,7 \pm 0,4 \mu\text{mol.L}^{-1}$, excitado em 532 nm, em função da concentração das nanopartículas de prata de 60 nm na (a) amostra sem centrifugação, no (b) sobrenadante e no (c) arrastado.

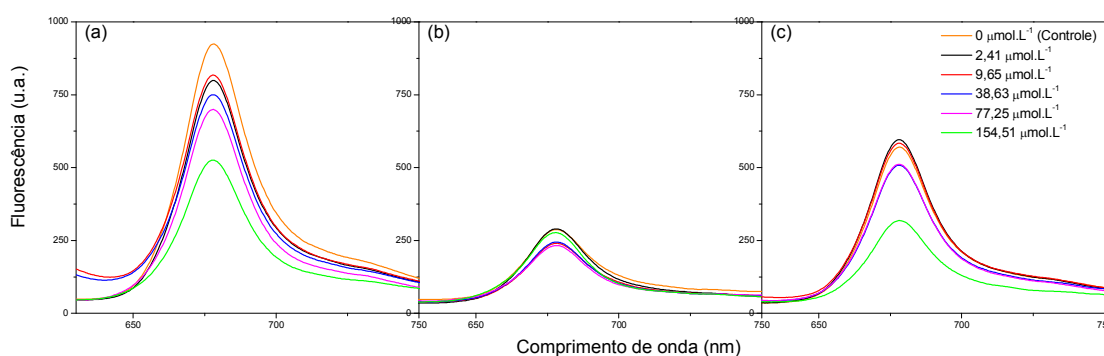
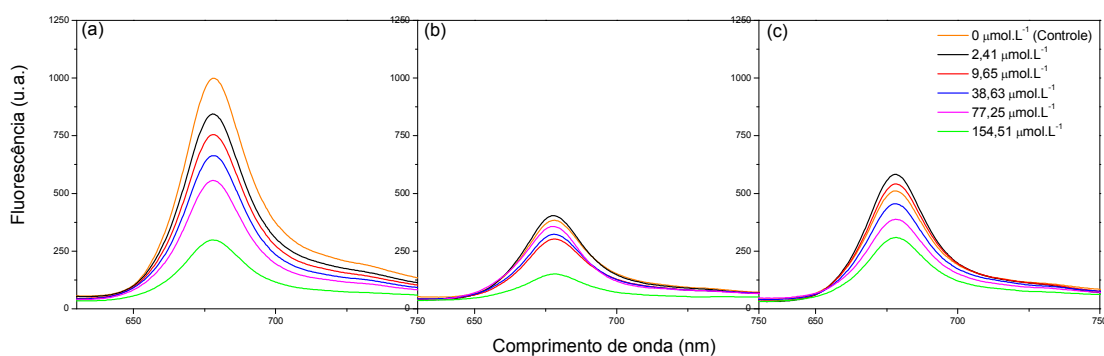


Figura 67: Espectro de fluorescência do extrato de clorofila $14,7 \pm 0,4 \mu\text{mol.L}^{-1}$, excitado em 532 nm, em função da concentração das nanopartículas de prata de 100nm na (a) amostra sem centrifugação, no (b) sobrenadante e no (c) arrastado.



O efeito de supressão foi observado, assim como nas amostras excitadas em 405 nm e também obedece a relação de Stern - Volmer, como é possível observar nas figuras 68 e 69.

Figura 68: Razão de F_0/F em 678 nm para a clorofila $14,7 \pm 0,4 \mu\text{mol.L}^{-1}$, com excitação em 532nm, em função da concentração de nanopartículas de prata de (a) 10 nm, (b) 60 nm e (c) 100 nm.

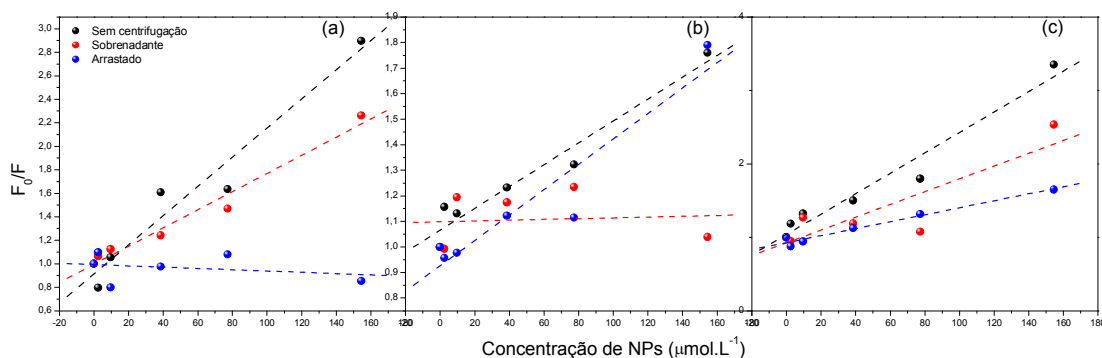
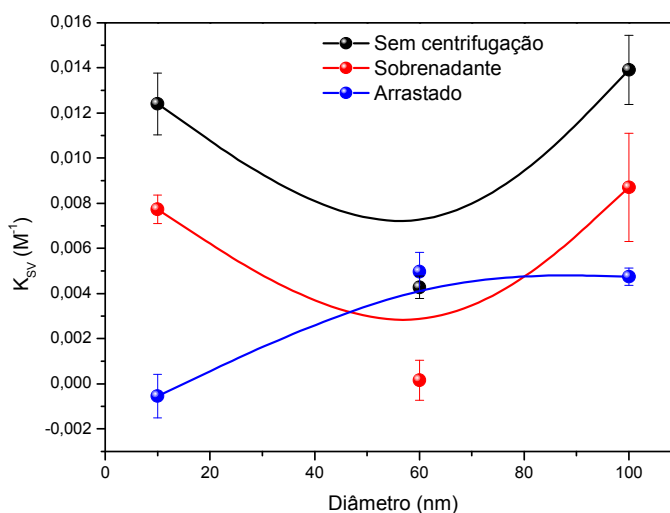


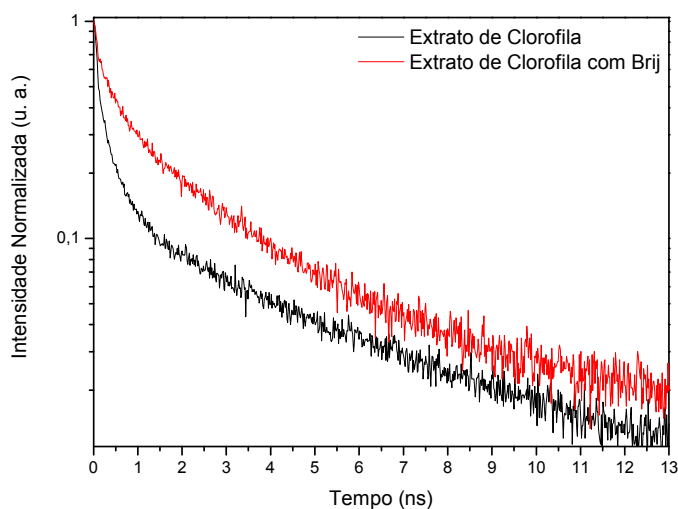
Figura 69: Constante de supressão na intensidade de fluorescência da clorofila $14,7 \pm 0,4 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em função do diâmetro das nanopartículas de prata, com excitação em 532 nm.



Quanto menor o diâmetro maior é o efeito de supressão causado pela nanopartícula, como já havia sido observado para a amostra excitada em 405 nm e, somente no arrastado, houve um aumento da constante de supressão em função do diâmetro, o que pode ter ocorrido devido ao fato das nanopartículas de 10 nm serem menos arrastadas.

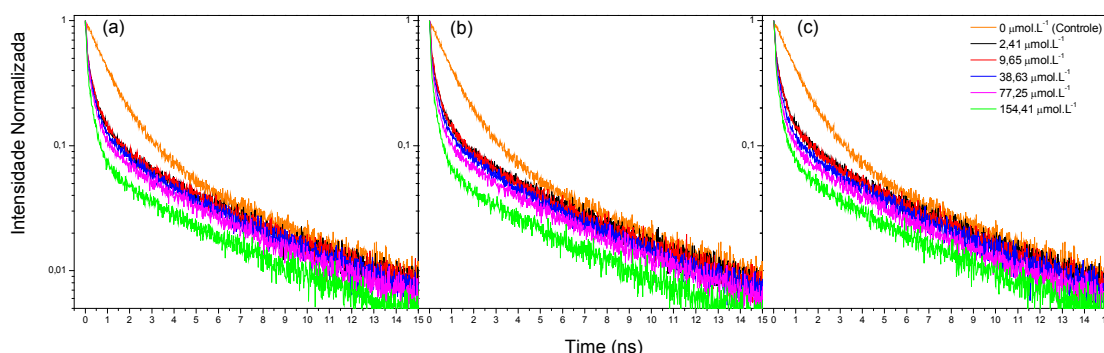
Realizaram-se medidas de fluorescência resolvida no tempo para essas mesmas amostras e os resultados estão apresentados a seguir.

Figura 70: Tempo de decaimento da fluorescência do extrato de clorofila na presença e na ausência do Brij.



O tempo de vida de fluorescência ocorre quando o elétron das clorofilas absorvem energia, passam para o estado excitado e voltam para o estado fundamental emitindo luz. No caso da clorofila, a fluorescência em função do tempo deveria ser uma reta, se não houvesse a formação de aglomerados. Porém, o que pode-se observar foi a existência de dois tempos de vida, um curto e um longo, referente ao tempo de vida das moléculas de clorofila que estão aglomeradas e ao tempo de vida das que não estão aglomeradas, respectivamente. O tempo de vida das moléculas que estão aglomeradas é menor, porque o elétron excitado de uma clorofila pode passar para as outras, no qual esta está ligada, e posteriormente retornar ao estado fundamental, e os processos não radioativos, como a transferência de elétrons, são mais rápidos do que processos radioativos, como a fluorescência, por esse motivo, o tempo de vida curto é correspondente as clorofilas que estão aglomeradas, pois nestas ocorrem processos não radioativos. Com a adição do Brij há um decréscimo no tempo de vida curto, fazendo com que a fluorescência em função do tempo se aproxime de uma reta, o que sugere que as moléculas de clorofila estão sendo separadas.

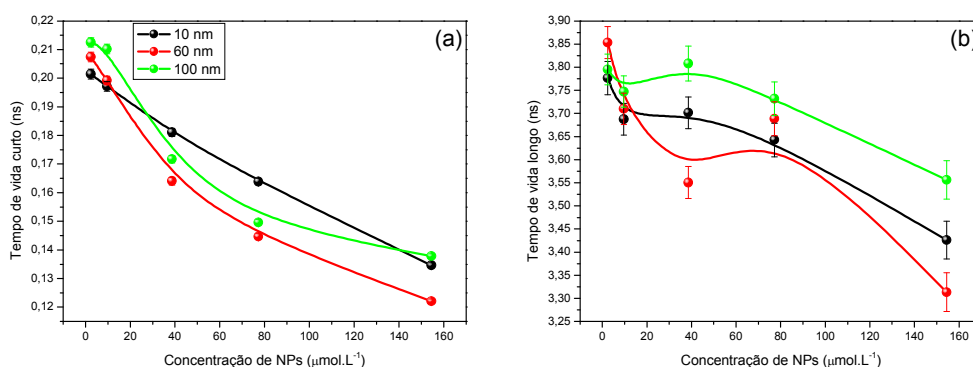
Figura 71: Tempo de decaimento da fluorescência em 673 nm do extrato de clorofila em função da concentração de NPs de prata, com excitação por dois fótons em 800 nm para (a) 10 nm, para (b) 60 nm e para (c) 100 nm.



Por meio da figura 71 pode-se observar que as nanopartículas de prata reduzem o tempo de vida de fluorescência do extrato de clorofila.

A redução causada pelas nanopartículas no tempo de vida curto da clorofila era esperada, pois quando as nanopartículas metálicas são adicionadas, parte da clorofila é adsorvida na superfície da nanopartícula e quando há a incidência de luz ocorre o processo de transferência de elétrons fotoinduzidos da clorofila no estado excitado para a nanopartícula metálica, então ao invés do elétron da clorofila voltar para o estado fundamental emitindo luz, este é transferido para a nanopartícula de forma não radioativa, fazendo com que o tempo de vida curto diminua, o que está de acordo com as medidas de fluorescência discutidas anteriormente.

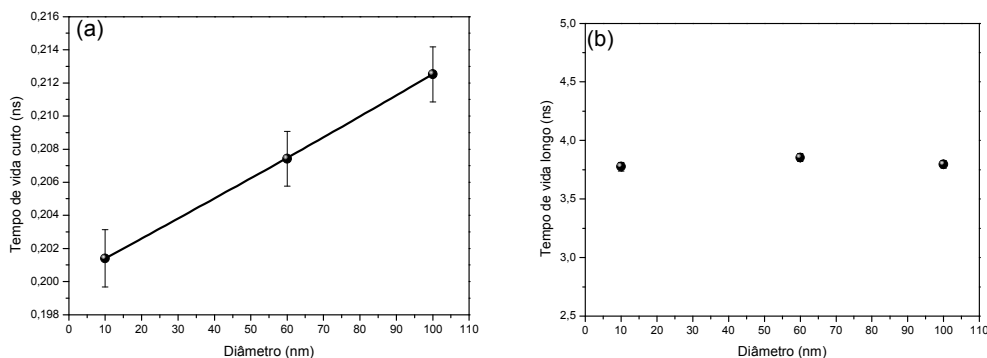
Figura 72: (a) Tempo de vida curto para o extrato de clorofila em função da concentração de NPs de prata de 10 nm, 60 nm e 100 nm; (b) Tempo de vida longo para o extrato de clorofila em função da concentração de NPs de prata de 10 nm, 60 nm e 100 nm.



A redução do tempo de vida depende da concentração das nanopartículas na solução, pois quanto maior a concentração, maior a quantidade de nanopartículas metálicas e então

maior a quantidade de clorofilas que serão adsorvidas e, portanto, menor o tempo de vida (figura 72).

Figura 73: (a) Tempo de vida curto em função do diâmetro das nanopartículas para a concentração de $2,41 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de NPs de prata; (b) Tempo de vida longo em função do diâmetro das nanopartículas para a concentração de $2,41 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de NPs de prata.



Para a concentração de $2,41 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de nanopartículas de prata é possível observar que o tempo de vida curto aumenta linearmente à medida que aumenta-se o diâmetro das nanopartículas (figura 73 (a)). Quanto maior o diâmetro da nanopartícula, menor a área superficial específica disponível para adsorção da clorofila, portanto menor será a quantidade de clorofila adsorvida e, dessa forma, haverá maior quantidade de elétrons retornando ao estado fundamental e emitindo luz, então maior será o tempo de vida curto, como mostrado na figura 70 (a).

O tempo de vida longo é referente às clorofilas que estão livres, ou seja, elas não estão adsorvidas na superfície das nanopartículas e retornam ao estado fundamental emitindo luz, portanto independem do diâmetro destas, permanecendo constante. (figura 73 (b)).

CAPÍTULO 5

5 CONCLUSÕES

A partir das análises de absorção UV-Vis foi possível determinar que, após o extrato da clorofila passar pelo processo de centrifugação, a maior parte dos carotenóides permanece no sobrenadante, enquanto a maior parte das moléculas de clorofila ficam na parte arrastada do extrato.

Os resultados mostraram que a interação clorofila-nanopartículas foi dependente da dimensão e da concentração das nanopartículas. Determinou-se que quanto maior a concentração e menor o diâmetro, maior foi a supressão da intensidade de fluorescência. Isso se deve ao fato de que em ambas as situações (aumento da concentração e/ou diminuição do diâmetro) há um aumento na área superficial de nanopartículas disponíveis para a adsorção das moléculas de clorofila. Foi determinada que as nanopartículas de 10 nm induziram uma maior supressão, e conseqüentemente, por meio da equação de Stern-Volmer uma maior constante de supressão foi obtida para essas nanopartículas.

Ademais, é importante destacar que a interação clorofila-nanopartículas foi dependente do pH do extrato, provavelmente devido à desestabilização da solução e formação de aglomerados. Observou-se que a absorção de ressonância de plasmon foi suprimida, tanto pH ácido quanto para o pH básico. No caso da fluorescência, tanto o pH ácido como o básico suprimiram a intensidade de emissão, contudo a supressão maior foi causada pelo pH básico.

Na clorofila isolada houve um menor efeito de supressão causado pelas nanopartículas, em relação ao extrato bruto, pois no extrato bruto existem outros pigmentos, como carotenóides, que possivelmente interferem no efeito de supressão da fluorescência da clorofila.

Por fim, analisando o extrato de clorofila mais concentrado, foi possível observar o efeito de autoagregação das moléculas de clorofila. Esse efeito ficou evidenciado pela ausência do comportamento monoexponencial do tempo de vida das moléculas de clorofila, bem como o fato da presença das nanopartículas terem alterado apenas o tempo de vida curto.

CAPÍTULO 6

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] MARTINS, P. R.; RAMOS, S. F. **Impactos das nanotecnologias na cadeia de produção da soja brasileira**. São Paulo: Xamã, 2009.
- [2] BRANDÃO, H. M. Nanotecnologia: a próxima revolução na agropecuária. **Revista CRMV**, v.17, n. 53, p 61 - 67, 2011.
- [3] EIGLER, D. M.; SCHWEIZER, E. K. Positioning single atoms with a scanning tunneling microscope. **Nature**, v. 344, n. 6266, p. 524 - 526, 1990.
- [4] AITKEN, R.J.; HANKIN, S.M.; TRAN, C.L.; DONALDSON, K.; STONE, V.; CUMPSON, P.; JOHNSTONE, J.; CHAUDHRY, Q.; CASH, S. REFNANO: Reference materials for engineered nanoparticle toxicology and metrology. Final report on Project CB01099, Defra, London, 2007.
- [5] KLAINE, S.J.; ALVAREZ, P.J.J.; BATLEY, G.E.; FERNANDES, T.F.; HANDY, R.D.; LYON, D.Y.; MAHENDRA, S.; McLAUGHLIN, M.J.; LEAD, J.R. Nanomaterials in the environment: Behavior, fate, bioavailability, and effects. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 27, p. 1825 – 1851, 2008.
- [6] MAYNARD, A.D.; AITKEN, R.J.; BUTZ, T.; COLVIN, V.; DONALDSON, K.; OBERDORSTER, G.; PHILBERT, M.A.; RYAN, J.; SEATON, A.; STONE, V.; TINKLE, S.S.; TRAN, L.; WALKER, N.J.; WARHEIT, D.B. Safe handling of nanotechnology. **Nature**, v. 444, n. 16, p. 267 - 269, 2006.
- [7] NEL, A.; XIA, T.; MADLER, L.; LI, N. Toxic potential of materials at the nanolevel. **Science**, v. 311, n. 5761, p. 622 - 627, 2006.
- [8] TAYLOR, R.; WALTON, D.R.M. The chemistry of fullerenes. **Nature**, v. 363, p. 685 – 693, 1993.
- [9] PARREIRA, D. B.; LEITÃO, T. G. **Nanobiosseseores**. INPI - Instituto Nacional de Propriedade Industrial. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior (Brasil). (Org.) Brasília, DF: INPI, p. 21, 2010.
- [10] AITKEN, R. J.; HANKIN, S. M.; TRAN, C. L.; DONALDSON, K.; STONE, V.; CUMPSON, P.; JOHNSTONE, J.; CHAUDHRY, Q.; CASH, S. REFNANO: Reference materials for engineered nanoparticle toxicology and metrology. Final report on Project CB01099, Defra, London, 2007.
- [11] QUINA, F. Nanotecnologia e o meio ambiente: perspectivas e riscos. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 1028 - 1029, 2004.
- [12] MORARU, C. I.; PANCHAPAKESAN, C. P.; HUANG, Q.; TAKHISTOV, P.; LIU, S.; KOKINI, J. L. Nanotechnology: A new frontier in food science. **Food Technology**, v. 57, n. 12, p. 24 - 29, 2003.
- [13] BOUWMEESTER, H.; DEKKERS, S.; NOORDAM, M. Y.; HAGENS, W. I.; BULDER, A. S., DE HEER, C.; TEN VOORDE, S. E.; WIJNHOFEN, S. W.; MARVIN,

H. J.; SIPS, A. J. Review of health safety aspects of nanotechnologies in food production. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 53, n. 1, p. 52 - 62, 2009.

[14] GARCIA, M.; FORBE, T.; GONZALEZ, E. Potential applications of nanotechnology in the agro-food sector. **Ciencia E Tecnologia De Alimentos**, v. 30, n. 3, p. 573 - 581, 2010.

[15] DAGANI, R. Nanomaterials: Safe or Unsafe? **Chemical & Engineering News**, v. 81, n. 17, p. 30 - 33, 2003.

[16] MA, X.; GEISER-LEE, J.; DENG, Y.; KOLMAKOV, A. Interactions between engineered nanoparticles (ENPs) and plants: Phytotoxicity, uptake and accumulation. **Science of the Total Environment**, v. 408, p. 3053 - 3061, 2010.

[17] NAVARRO, E.; BAUN, A.; BEHRA, R.; HARTMANN, N. B.; FILSER J.; MIAO A.-J.; QUIGG, A.; SANTSCHI, P. H.; SIGG, L. Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. **Ecotoxicology**, v. 17, p. 372 - 386, 2008.

[18] FALCO, W. F.; BOTERO, E. R.; FALCÃO, E. A.; SANTIAGO, E. F.; BAGNATO, V. S.; CAIRES, A. R. L. In vivo observation of chlorophyll fluorescence quenching induced by gold nanoparticles. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 225, p. 65 - 71, 2011.

[19] LIN, D.; XING, B. Root uptake and phytotoxicity of ZnO nanoparticles. **Environmental Science & Technology**, v. 42, p. 5580 - 5585, 2008.

[20] ASLI, S.; NEUMANN, P.M. Colloidal suspensions of clay or titanium dioxide nanoparticles can inhibit leaf growth and transpiration via physical effects on root water transport. **Plant, Cell & Environment**, v. 32, p. 577 - 584, 2009.

[21] LOPEZ-MORENO, M.L.; ROSA, G.; HERNANDEZ-VIEZCAS, J.A.; PERALTA-VIDEA, J.R.; GARDEA-TORRESDEY, J.L. X-ray absorption spectroscopy (XAS) corroboration of the uptake and storage of CeO₂ nanoparticles and assessment of their differential toxicity in four edible plant species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 3689 - 3693, 2010.

[22] KHODAKOVCKAYA, M.; DERVISHI, E.; MAHMOOD, M.; XU, Y.; LI, Z.; WATANABE, F.; BIRIS, A.S. Carbon nanotubes are able to penetrate plant seed coat and dramatically affect seed germination and plant growth. **ACS Nano**, v. 3, n. 10, p. 3221 - 3227, 2009.

[23] LIU, Q.; CHEN, B.; WANG, Q.; SHI, X.; XIAO, Z.; LIN, J.; FANG, X. Carbon nanotubes as molecular transporters for walled plant cells. **Nano Letters**, v. 9, n. 3, p. 1007 - 1010, 2009.

[24] MA, X.; GEISER-LEE, J.; DENG, Y.; KOLMAKOV, A. Interactions between engineered nanoparticles (ENPs) and plants: Phytotoxicity, uptake and accumulation. **Science of Total Environment**, v. 408, p. 3053 - 3061, 2010.

- [25] ENGEL, V. L.; POGGIANI, F. Estudo de concentração de clorofila nas folhas e seu espectro de absorção de luz em função do sombreamento em mudas de quatro espécies florestais nativas. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 3, n. 1, p. 39 - 45, 1991.
- [26] LANFER-MARQUEZ, U. M. O papel da clorofila na alimentação humana: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, n. 3, p. 227 - 242, 2003.
- [27] VALEUR, B. **Molecular Fluorescence: Principles and applications**. WILEY-VCH (Ed). cap. 1, p. 3 - 4, Paris: França, 2001.
- [28] ATKINS, P.; DE PAULA, J. **Físico-química**. 7. Ed. Rio de Janeiro: LTC-Livros Técnicos e Científicos, v. 2, 2004.
- [29] BUSCHMANN, C. Variability and application of the chlorophyll fluorescence emission ratio red/far-red of leave. **Photosynthesis Research**, v. 92, p. 261 – 271, 2007.
- [30] CHERIF, J.; DERBEL, N.; NAKKACH, M.; BERGMANN, H.; JEMAL, F.; LAKHDAR, Z. Analysis of in vivo chlorophyll fluorescence spectra to monitor physiological state of tomato plants growing under zinc stress. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 101, p. 332 – 339, 2010.
- [31] BAKER, N. R. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, p. 89 – 113, 2008.
- [32] PORRA, R. J. The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b. **Photosynthesis Research**, v. 73, n. 1 - 3, p. 149 - 156, 2002.
- [33] SOARES, R. R. S. **Estudos de propriedades da Clorofila a e da Feofitina a visando a Terapia Fotodinâmica**. 81 páginas. Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de Maringá. Maringá, março de 2006.
- [34] MAESTRIN, A. P. J.; NERI, C. R.; OLIVEIRA K. T.; SERRA, O. A.; IAMAMOTO, Y. Extração e purificação de clorofila *a*, da alga *spirulina maxima*: um experimento para os cursos de química. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1670 - 1672, 2009.
- [35] FILHO, J. R. F.; FREITAS, J. J. R.; SILVA, L. P. Investigando cinza da casca do arroz como fase estacionária em cromatografia: uma proposta de aula experimental nos cursos de graduação. **Química Nova**, v. 35, n. 2, p. 416 - 419, 2012.
- [36] CEROVIC, Z. G.; SAMSON, G.; MORALES, F.; TREMBLAY, N.; MOYA, I. Ultraviolet-induced fluorescence for plant monitoring: present state and prospects. **Agronomie**, v. 19, n. 7, p. 543 - 578, 1999.
- [37] SILVA, A. J.; NASCIMENTO, C. W. A.; NETO, A. S. G.; JUNIOR, E. A. S. LED-Induced chlorophyll fluorescence spectral analysis for the early detection and monitoring of cadmium toxicity in maize plants. **Water Air Soil Pollut**, v. 223, n. 6, p. 3527 - 3533, 2012.
- [38] FARIAS, M. A.; GONÇALVES, M. C. Superfície de ressonância plasmônica de nanoesferas de prata: efeito da razão estabilizante/precursor na dimensão da nanopartícula. *34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, São Paulo: 2011.

[39] COUTO, A. B.; RAMOS, L. A.; CAVALHEIRO, E. T. G. Aplicação de pigmentos de flores no ensino de química. **Química Nova**, v. 21, n. 2, p. 221 - 227, 1998.

[40] BARAZZOUK, S.; KAMAT, P. V.; HOTCHANDANI, S. Photoinduced electron transfer between chlorophyll a and gold nanoparticles. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 109, n. 2, p. 716 - 723, 2005.

[41] KELLER, A. A.; WANG, H. T.; ZHOU, D. X.; LENIHAN, H. S.; CHERR, G.; CARDINALE, B. J.; MILLER, R.; JI, Z. X. Stability and aggregation of metal oxide nanoparticles in natural aqueous matrices. **Environmental Science & Technology**, v. 44, p. 1962 – 1967, 2010.

[42] LINK, S.; EL-SAYED, M. A. Size and Temperature Dependence of the Plasmon Absorption of Colloidal Gold Nanoparticles. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 103, p. 4212 - 4217, 1999.

CAPÍTULO 7

7. ANEXOS

7.1 Artigo Submetido

Journal of Nanoparticle Research

FLUORESCENCE QUENCHING OF CHLOROPHYLL MOLECULES NEAR SILVER NANOPARTICLES

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	FLUORESCENCE QUENCHING OF CHLOROPHYLL MOLECULES NEAR SILVER NANOPARTICLES
Article Type:	Original research
Keywords:	Chlorophyll; Plant; Fluorescence; Quenching; Silver Nanoparticles.
Corresponding Author:	Anderson Caires, Ph.D. Federal University of Grande Dourados Dourados, MS BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Federal University of Grande Dourados
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	William Falco
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	William Falco Amanda Queiroz Joelson Fernandes Eriton Botero Evaristo Falcão Francisco Guimarães Jean M'Peko Ian Colbeck Anderson Caires, Ph.D.
Order of Authors Secondary Information:	
Abstract:	Silver nanoparticles (Ag NPs) are among the most widely produced and used nanomaterial due to their antimicrobial and antibacterial properties, allowing a wide range of commercial applications. Thereby, the increasing use of Ag NPs should inevitably lead to the release and accumulation of these NPs into the environment, resulting in adverse effects on plants, animals and humans. Chlorophyll fluorescence (ChlF) has been proposed as a non-destructive and accurate tool for detecting the impacts of environmental stress on plants. Little is known about the photophysical behavior of plants when exposed to a metallic NPs-containing environment. The present study evaluated the interaction between Chlorophyll (Chl) and Ag NPs, over a wide range of nanoparticle concentrations (from 0 M to 10,000.0 M), by monitoring the ChlF. The results reveal that the ChlF is quenched in the presence of Ag NPs, as a result of the static and dynamic quenching processes. In summary, the present results suggest that ChlF has a great potential to be used as an analytical tool for monitoring the interaction of plants and NPs as well as investigating the effects of NPs on plants.
Suggested Reviewers:	Radovan Popovic University of Quebec in Montreal popovic.radovan@uqam.ca Nathir A. F. Al-Rawashdeh Jordan University of Science & Technology

FLUORESCENCE QUENCHING OF CHLOROPHYLL MOLECULES NEAR SILVER NANOPARTICLES

W. F. Falco¹, A. M. Queiroz¹, J. Fernandes¹, E. R. Botero¹, E. A. Falcão¹, F. E. G. Guimarães², J.-C. M'Peko², I. Colbeck³, A. R. L. Caires^{1,*}

¹ Grupo de Óptica Aplicada, Universidade Federal da Grande Dourados, CP 533, 79804-970 Dourados, MS, Brazil

² Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, CP 369, 13560-970 São Carlos, SP, Brazil

³ School of Biological Sciences, University of Essex, Wivenhoe Park, CO4 3SQ Colchester, Essex, United Kingdom

ABSTRACT

Silver nanoparticles (Ag NPs) are among the most widely produced and used nanomaterial due to their antimicrobial and antibacterial properties, allowing a wide range of commercial applications. Thereby, the increasing use of Ag NPs should inevitably lead to the release and accumulation of these NPs into the environment, resulting in adverse effects on plants, animals and humans. Chlorophyll fluorescence (ChlF) has been proposed as a non-destructive and accurate tool for detecting the impacts of environmental stress on plants. Little is known about the photophysical behavior of plants when exposed to a metallic NPs-containing environment. The present study evaluated the interaction between Chlorophyll (Chl) and Ag NPs, over a wide range of nanoparticle concentrations (from 0 μM to 10,000.0 μM), by monitoring the ChlF. The results reveal that the ChlF is quenched in the presence of Ag NPs, as a result of the static and dynamic quenching processes. In summary, the present results suggest that ChlF has a great potential to be used as an analytical tool for monitoring the interaction of plants and NPs as well as investigating the effects of NPs on plants.

Keywords: Chlorophyll; Plant; Fluorescence; Quenching; Silver Nanoparticles.

*Corresponding author: E-mail: andersoncaires@ufgd.edu.br Tel/Fax: +556734102088.

INTRODUCTION

Advances in research into nanoparticles have led to new products with these materials and, consequently, there has been a large increase in the type and variety of engineered nanoparticles (NPs). Between 2005 and 2010, the quantity of products incorporating nanotechnology increased from 54 to 1015, resulting in an increase in NP residues (Judy et al. 2011). NPs, although composed of the same chemical elements, behave differently in relation to larger particles, in terms of their chemical, physical and biological properties. Therefore, the particle size is important regarding the effects it can produce, because it changes the nature of the interaction forces between the molecules of the material and thus modifies the impact that these processes or nanotechnology products can have on the environment, human health and society as a whole (Masarovicova and Kral'ova 2013). Research has shown that NPs with nanometric dimensions (<100 nm) can modify the physicochemical properties of a material (providing extraordinary features of conductivity, reactivity and optical sensitivity) (De La Torre-Roche et al. 2013).

Studies have demonstrated the toxicity of NPs such as fullerene, carbon nanotubes and metallic oxides using human cells, bacteria and rodents (Sun et al. 2013; Yang et al. 2013; Gao et al. 2013; Sergio et al. 2013; Rodriguez-Yanez et al. 2013). For instance, titanium dioxide (TiO₂) and zinc oxide (ZnO) are largely used in the cosmetic industry; both have been used in pharmaceutical products and as protective coverings against ultraviolet radiation (Faure et al. 2013; Lewicka et al. 2013). Although TiO₂ is chemically inert, TiO₂ NPs can cause negative health effects, such as respiratory tract cancer in rats. However, the mechanisms involved in the genotoxicity and carcinogenicity induced by TiO₂ have not been clearly defined and are poorly studied *in vivo*. A study performed in mice investigated the genotoxicity, oxidative DNA damage

and inflammation induced by TiO₂ NPs (Gao et al. 2013; Trouiller et al. 2009). The results showed that TiO₂ NPs cause double strand breaks in DNA and inflammation, possibly due to a secondary genotoxic mechanism associated with oxidative stress.

In this scenario it is also important to understand the risks of the interaction between NPs and plants, as a basic component of all ecosystems. The impact of NPs on plants depends on the composition, concentration, size and other important physical-chemistry properties of the NPs and the plant species. Studies involving NPs and plants have shown that NPs can inhibit the germination and growth of plants (Pokhrel and Dubey 2013; Faisal et al. 2013). Other studies revealed that NPs can potentially be absorbed by plant roots and then transported to the aerial parts through the vascular systems (Yin et al. 2012). Despite knowledge gained in previous studies, many questions about the behavior of NPs in plant systems remain to be answered, such as the role of the surface area or activity of NPs in terms of phytotoxicity, the entrance route into plant tissues and the role of vascular plant cell walls.

Silver (Ag) NPs are among the most widely produced and used to manufacture a large number of consumer products (Anjum et al. 2013). It is well-known that Ag in the form of NPs has been studied, in great part, due to its antimicrobial and antibacterial effects (Anjum et al. 2013; Guerra et al. 2013). These properties have led to a wide range of commercial applications of Ag NPs, thereby increasing their production and so their discard into the environment in high concentrations will be inevitable (Maurer-Jones et al. 2013; Judy et al. 2011). As a consequence, there is an expectation that these NPs may enter and accumulate in natural ecosystems thus interacting with plants via diverse pathways (water, soil and air). Despite few studies reporting the impact of Ag NPs in plants, they have consistently shown that Ag NPs may induce negative effects on plant growth and development. For instance, Stampoulis and co-workers (2009)

reported that Ag NPs of 100 nm induced a decrease in plant biomass and transpiration of *Cucurbita pepo* (zucchini). Jiang *et al* (2012) showed that Ag NPs significantly decreased plant biomass, chlorophyll *a* content, plant tissue nitrate–nitrogen content and chlorophyll fluorescence (F_v/F_m) in aquatic weeds (*Spirodela polyrhiza*).

Chlorophyll fluorescence (ChlF) has been used as a non-destructive and accurate tool for determining the photosynthetic efficiency of plants (Caires *et al.* 2010; Cerovic *et al.* 1999). Several studies showed that ChlF possesses a large potential to assess precisely the physiological state of plants and to detect precociously the impacts of environmental stress on them (Caires *et al.* 2010; Cerovic *et al.* 1999; Baker 2008; Krause and Weis 1991). Falco and colleagues (2011) have recently showed that ChlF was able to detect, *in vivo*, a quenching of the fluorescence in soybean leaves when soybean seeds were previously treated with gold NPs. They demonstrated that ChlF has a great potential to be used for analyzing the effects of NPs on plants.

Thus, studies into the interactions between Ag NPs and chlorophyll have become essential to understand the photophysical behavior of plants when exposed to an environment containing metallic NPs, contributing to elucidate the possible impacts that these materials may have on plants and, thus, on the rest of the food chain. The present work aimed to evaluate the interaction between chlorophyll molecules and Ag NPs by monitoring the ChlF. The investigation was performed using Ag NPs of 100 nm where chlorophyll extract, obtained from soybean leaves, was submitted to different Ag NPs concentrations (from 0 μM to 10,000.0 μM).

MATERIALS AND METHODS

Preparation and planting of soybeans

In this study, we used seeds of soybean (*Glycine max*) of the strain BRS 245RR, with a germination percentage of 92%. Two hundred grams of seeds were added to 0.5 g of inoculant (Biomax 7.2×10^9 cfu/g) and 0.6 mL of the fungicide Derosal Plus. The inoculant stimulated the growth of plants. In this case, the inoculants were composed of two species of *Bradyrhizobium* bacteria, which have the function of fixing nitrogen in soybean by a symbiotic process (Thuita et al. 2012).

The seeds were sown in pots containing 3.26 dm^3 of oxisol. The soil was previously sieved and treated with lime to increase the calcium and magnesium content and correct the acidity. In this step, after liming, the pots were watered by keeping the amount of water to 20% of soil mass for a period of ten days.

During sowing, fertilization of the soil was performed by adding 0.13 g of KCl and 0.51 g of triple superphosphate. Ten seeds were sown per pot. Two weeks after germination, only two plants were left in each pot. The pots were watered with a sufficient volume to keep the soil at 60% of field capacity. The plants were grown in a greenhouse at room temperature.

Chlorophyll extraction and sample preparation

The extraction of chlorophyll (Chl) was performed based on the methodology proposed by Richards & Thompson (1952). Leaves were collected and cut into small pieces. Three grams of these processed leaves were placed in 30 mL of methanol (HPLC grade). The solution was crushed for 2 min. Subsequently, the mixture was mixed for 20 min, at room temperature, and then centrifuged at 2000 rpm for 5 min to

produce a Chl extract. 1 ml of the Chl extract was diluted in 10 ml of methanol for performing UV-Vis absorption and fluorescence analysis. To investigate the interaction between Ag NPs and Chl molecules, the Chl extract was separated into containers and different concentrations of Ag NPs were added, varying from 0 to 10000 μM . Ag NPs of 100 nm of diameter, purchased from Sigma-Aldrich (Brazil), with 10% of NPs in ethylene glycol suspension were used in all experiment.

Determination of the Chlorophyll concentration

The total chlorophyll content [*Chl a + b*] of the Chl extracts was calculated from molecular absorption measurements, based on the Arnon method adapted by Porra (2002) for methanol extraction, described by the following equation:

$$[Chl\ a + b] = 24.23A^{652} + 3.26A^{665.2} \quad (1)$$

where [*Chl a + b*] is the concentration of chlorophylls *a* and *b*, A^{652} is the absorbance at 652 nm, $A^{665.2}$ is the absorbance at 665.2 nm, and the 24.23 and 3.26 constants are the specific extinction coefficients of Chl at 652 and 665.2 nm, respectively.

Optical characterization

Fluorescence measurements of the Chl extract were performed on a Cary Eclipse spectrophotometer (Varian). The excitation source was a pulsed xenon lamp (80 Hz) with the half width of the pulse approximately 2 μs and peak power equivalent to 75 kW. Two monochromators, one for excitation wavelength selection and other for

emission wavelength selection, were used in the measurements. The fluorescence signal detection was performed using a photomultiplier tube (R928).

The samples were excited at 405 nm, and the fluorescence spectra were collected in the 420-900 nm range. The sample holder was a quartz cuvette with a 10 mm optical path, with four polished faces.

The studies of molecular absorption of Chl extract were performed using a Cary 50 UV-VIS spectrophotometer (Varian). The molecular absorption spectrophotometer had a pulsed xenon lamp, a 0.25 m Czerny-Turner monochromator and a Si diode detector. The absorption measurements were performed in the 200-900 nm range, using a sample holder with two polished faces and a 10 mm optical path. All measurements were performed at room temperature in triplicate for each sample.

Measurements of time-resolved fluorescence were carried out using a Zeiss LSM 780 multiphoton confocal microscope, equipped with Picoquant Fluortime software to measure fluorescence decay, with a 20x objective and SPAD (single photon avalanche diode) detector with a temporal resolution of 70 ps. A Coherent Chameleon tunable 690-1100 nm laser was used as the excitation source, pulsed at 140 femtoseconds with a repetition rate of 80 MHz. Lifetime measurements were taken at a wavelength of 673 nm with two-photon excitation at 800 nm.

RESULTS AND DISCUSSION

Fig. 1a shows the absorption spectrum of the Chl extract for various concentrations of Ag NPs. The results indicate two distinct regions of absorption. The first was at 400 to 500 nm; in addition to chlorophyll *a* and *b* absorptions, other pigments such as carotenoids also absorb light radiation in this range, and an overlap of

bands occurs (Vollsnes et al. 2012). The second was in the 600 to 700 nm range, where only chlorophyll *a* and *b* absorb light radiation. From Fig. 1a, it is also possible to observe an increase in the intensity of the absorption band between 400 and 450 nm, associated with the resonance of silver surface plasmons, which is related to the 100 nm Ag NPs. The data of absorbance at 419 nm versus Ag NPs concentration are depicted in Fig. 1b, showing a linear dependence with a slope (β) of $4.040 \times 10^{-3} \mu\text{M}^{-1}$. For concentrations above 200 μM (data not shown), a saturation of the absorption signal was actually observed in this spectrum region.

In the 600 to 700 nm range of absorption of Chl *a* and *b*, no significant changes in the absorbance signal were found, indicating that the chlorophyll content remained constant as a function of the concentration of Ag NPs. The average value of the chlorophyll content found using equation (1) was approximately $4 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Fluorescence measurements were also performed on these Chl solutions with different concentrations of Ag NPs, with excitation at 405 nm. The results are presented in Fig. 2a, for some NPs concentrations, and show that a quenching of fluorescence intensity occurs where the fluorescence quenching was Ag NPs content dependent. It is well known that the quenching processes of fluorescence may occur in two ways: static or dynamic. The static process is based on the formation of a non-fluorescent complex between the fluorophore and the quencher, at the ground level of energy. When the complex absorbs light, it returns to the ground level without photon emission. The fluorescence intensity decreases with the addition of the quencher; however, the lifetime of the fluorophore in the excited state is not affected. The Stern-Volmer relationship between the fluorescence ratio F_0/F and the concentration of the quencher is given by the equation:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_s [Q] \quad (2)$$

where $[Q]$ is the concentration of the quencher, K_S is the association constant of the fluorophore-suppressor complex and F_0 and F are, respectively, the fluorescence in the absence and presence of the quencher (Valeur 2001). A Stern-Volmer graph for static suppression behaves linearly.

In the dynamic process, the decrease in fluorescence intensity is associated with fluorophore deactivation processes due to collisions between the suppression agent and the fluorescent molecule during the lifetime in the excited state. After this contact, the fluorophore returns to the ground state without photon emission and no chemical change in the molecule is involved. In the dynamic process of quenching, the lifetime in the excited state shows some changes. The Stern-Volmer relation for the dynamic process satisfies (Valeur 2001):

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_D [Q] \quad (3)$$

The Stern-Volmer curve for the dynamic quenching process also exhibits linear behavior. However, in this case, the curve's slope is the constant K_D and is given by the product of the lifetime of the excited state in the absence of the suppressor (τ_0) and the bimolecular constant of suppression (k_q), which is related to the quenching efficiency and accessibility of the fluorophore quencher (Valeur 2001).

The linear dependence of the Stern-Volmer plot is not enough to determine the kind of quenching, i.e. static or dynamic. The most efficient method to distinguish between the types of quenching is to analyze the fluorescence lifetime. The static mode causes inhibition of part of the fluorophores in the sample. Complexed fluorophores are not fluorescent and thus the fluorescence signal observed in the measurement is only due to non-complexed fluorophores. The non-complexed fluorophores are not perturbed

and the lifetime remains constant at τ_0 , which is the same lifetime detected in the absence of the quencher. In contrast, the dynamic process reduces the population of the excited state by adding an extra non-radiative decay, resulting in a decrease in lifetime, which is equivalent to a decrease in fluorescence intensity.

The static and dynamic process may occur simultaneously. In this case, the curve of Stern-Volmer is not linear and its behavior can be described by the following equation (Valeur 2001):

$$\frac{F_0}{F} = (1 + K_D [Q]) \cdot (1 + K_S [Q]) \quad (4)$$

A quadratic behavior of the fluorescence ratio with respect to $[Q]$ is in such a case expected, and K_D and K_S can be calculated by fitting the theoretical curve. An alternative procedure is to linearize the curve using the $(F_0/F - 1)/[Q]$ versus $[Q]$ relationship. In this case, it is also possible to determine K_S and K_D , since the linear coefficient is given by the sum of the static and dynamic constants ($K_D + K_S$), while the slope is represented by their product ($K_D \cdot K_S$) (Lakowicz 2006).

In this work, the fluorescence data processed in terms of F_0/F ratio, at 673 nm, as a function of the Ag NPs content in the Chl extract samples are shown in Fig. 2b, and reveal a clear dependence of fluorescence quenching on the Ag NPs content. That is, the F_0/F ratio shows a linear dependence for Ag NPs concentrations between 0 and 100 μM , a result that may arise from development of either a static or a dynamic quenching process; at higher concentrations, between 100 and 500 μM , the behavior changed to quadratic-like, which is characteristic of contribution of both the static and dynamic processes. To get further insights into these results, the detailed analysis of the data in this Fig. 2b will be reconsidered later in this report. The fluorescence measurements performed on Chl extract samples with Ag NPs at concentrations above 500 μM showed

values close to zero; this is because in that case the large number of NPs in the solution is enough to induce a significant increase in light scattering and turbidity.

To understand the different kinds of quenching processes and, particularly, to determine whether static, dynamic or a combination of both processes applies, depending on the NPs content (from 0 to 500 μM), fluorescence lifetime measurements were performed on such Ag-containing Chl extract samples. The study consisted in measuring and analyzing fluorescence decay at 673 nm for excitation by two photons at 800 nm. The decay curves were fitted to a third order exponential decay equation, given by the equation below:

$$F = \sum_{i=1}^3 A_i \exp\left[\frac{-t}{\tau_i}\right] \quad (5)$$

where F is the fluorescence intensity, A_i are the amplitudes (pre-exponential factor), t is the time and τ_i represents the values of the fluorescence lifetimes (Lakowicz 2002).

With the fluorescence decay time data, the average lifetime for each sample was calculated by applying the following equation [26]:

$$\bar{\tau} = \frac{\sum_{i=1}^3 A_i \cdot \tau_i^2}{\sum_{i=1}^3 A_i \cdot \tau_i} \quad (6)$$

As presented in Fig. 3, the results of average lifetime indicate that the addition of Ag NPs in the Chl extract reduces the fluorescence lifetime of the samples, and that this change can occur in different ways as a function of the NPs concentration. However, for low concentrations, i.e. lower than 10 μM , the average lifetime remains identical to the value observed in the absence of NPs, as shown in the inset of Fig. 3.

Now, on the basis of the results presented just above, a close interpretation of the data originally shown in Fig. 2b is possible, in terms of kind of Ag NPs content-dependent process involved. That is, Fig. 3 actually indicates that two different

quenching processes have to be recognized to hold for the 0-100 μM content range, toward which a single linear behavior was apparently observed in Fig. 2b. In fact, after a detailed data analysis, two dissimilar linear behavior-related angular coefficients of fluorescence F_0/F ratio at 673 nm versus $[Q]$ were really found to apply toward this NPs content range. Fig. 4a shows the results for the Ag NPs concentrations between 0 and 10 μM , where quenching is certainly of static type. This is not only because of observation of a linear Stern-Volmer dependence (Fig. 2b), but also because the presence of the NPs produced no change in average lifetime (Fig. 3 inset). In this sense, fitting of the data presented in Fig. 4a gave a static quenching constant of $K_S = 14.8 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$.

In the following, Fig. 4b shows the F_0/F ratio data corresponding to concentrations between 10 and 100 μM where, in contrast, linearity in the Stern-Volmer curve is to be associated with development of a dynamic quenching process. The corresponding constant (equivalent to the slope) was estimated as $K_D = 6.1 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$. Combining this value with the lifetime of the sample with non Ag NPs (τ_0) allows estimating a bimolecular quenching value of $k_q = 2.3 \times 10^{12} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Different from the two cases presented above, the dependence of the F_0/F ratio toward higher Ag NPs concentrations, i.e., from 100 to 500 μM , really reveals actually no linear, as shown in Fig. 4c. The fluorescence quenching behavior observed in this concentration range is characteristic of the simultaneous contribution of both static and dynamic processes, provided that the Stern-Volmer graph exhibited a non-linear behavior (Fig. 2b) and, in addition, the average lifetime of the Ag NPs-containing extract samples was lower than the average lifetime in the absence of NPs (Fig. 3). In this case, therefore, it is convenient to process the data in terms of $(F_0/F - 1)/[Q]$ versus $[Q]$, as shown in Fig. 5. Keeping here in mind that (i) the linear coefficient is given by

the sum of the dynamic and static constants ($K_D + K_S$) and (ii) the slope is the product of these constants ($K_D.K_S$), the values finally estimated for the dynamic and static constants are, respectively, $K_D = 7.1 \times 10^3 M^{-1}$ and $K_S = 24.8 \times 10^3 M^{-1}$, while $k_q = 2.7 \times 10^{12} M^{-1} s^{-1}$ actually applies for the bimolecular quenching value.

CONCLUSIONS

The data presented in this report show that ChlF behavior is changed in the presence of Ag NPs. Concretely, a ChlF quenching was observed, this fluorescence suppression being NPs content dependent. Two different regimes of linearity between ChlF and Ag NPs content were detected: the 0-10 and 10-100 μM concentration ranges, where the quenching process reveals to be, respectively, of static versus dynamic type. In contrast, the ChlF quenching observed above 100 μM was induced simultaneously by both static and dynamic quenching processes. In summary, the results showed that ChlF is strongly affected by Ag NPs, suggesting that ChlF has a great potential to be used as an analytical tool for monitoring the interaction of plants and NPs as well as investigating the effects of NPs on plants.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful for financial support from CNPq, CAPES, and FUNDECT. The authors also acknowledge the support provided by the National Institute of Science and Technology of Optics and Photonics (INOF).

REFERENCES

- Anjum NA, Gill SS, Duarte AC, Pereira E, Ahmad I (2013) Silver nanoparticles in soil–plant systems. *J Nanopart Res* 15:1896–1921.
- Baker NR (2008) Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. *Annu Rev Plant Biol* 59:89–113.
- Caires ARL, Scherer MD, Santos TSB, Pontim BCA, Gavassoni WL, Oliveira SL (2010) Water Stress Response of Conventional and Transgenic Soybean Plants Monitored by Chlorophyll *a* Fluorescence. *J Fluoresc* 20:645–649.
- Cerovic ZG, Samson G, Morales F, Tremblay N, Moya I (1999) Ultraviolet-induced fluorescence for plant monitoring: present state and prospects. *Agronomie* 19:543–578.
- De La Torre-Roche, R. et al. (2013) Impact of Ag nanoparticle exposure on p,p'-DDE bioaccumulation by *Cucurbita pepo* (zucchini) and *Glycine max* (soybean). *Environ Sci Technol* 47:718–725.
- Faisal, M. et al. (2013) Phytotoxic hazards of NiO-nanoparticles in tomato: A study on mechanism of cell death. *J Hazard Mater* 250:318–332.
- Falco WF, Botero ER, Falcão EA, Santiago EF, Bagnato VS, Caires ARL (2011) In vivo observation of chlorophyll fluorescence quenching induced by gold nanoparticles. *J Photoch Photobio A* 225:65–71.
- Faure B et al. (2013) Dispersion and surface functionalization of oxide nanoparticles for transparent photocatalytic and UV-protecting coatings and sunscreens. *Sci Technol Adv Mat* 14:023001. doi:10.1088/1468-6996/14/2/023001
- Gao, G. et al. (2013) Titanium dioxide nanoparticle-induced testicular damage, spermatogenesis suppression, and gene expression alterations in male mice. *J Hazard Mater* 258:133–143.

- Guerra R, Ima E, Guzman A (2013) Antimicrobial supported nanoparticles: Gold versus silver for the cases of *Escherichia coli* and *Salmonella typhi*. *Microporous Mesoporous Mater* 170:62–66.
- Jiang H, Li M, Chang F, Li W, Yin L (2012) Physiological analysis of silver nanoparticles and AgNO₃ toxicity to *Spirodela polyrrhiza*. *Environ Sci Technol Environ Toxicol Chem* 31:1880–1886.
- Judy JD, Unrine JM, Bertsch PM (2011) Evidence for biomagnification of gold nanoparticles within a terrestrial food chain. *Environ Sci Technol* 45:776–781.
- Krause GH, Weis E (1991) Chlorophyll Fluorescence and Photosynthesis: The Basics. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 42:313–349.
- Lakowicz JR (2002) *Topics in Fluorescence Spectroscopy: Protein Fluorescence*. Kluwer, New York.
- Lakowicz JR (2006) *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd ed. Springer, New York.
- Lewicka ZA et al. (2013) Photochemical behavior of nanoscale TiO₂ and ZnO sunscreen ingredients. *J Photoch Photobio A* 263:24–33.
- Masarovicova, E.; Kral'ova, K. (2013) Metal nanoparticles and plants. *Ecol Chem Eng S* 20:9–22.
- Maurer-Jones MA et al. (2013) Toxicity of engineered nanoparticles in the environment. *Anal Chem* 85:3036–3049.
- Pokhrel LR, Dubey B (2013) Evaluation of developmental responses of two crop plants exposed to silver and zinc oxide nanoparticles. *Sci Total Environ* 452:321–332.
- Porra RJ (2002) The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b. *Photosynth Res* 73:149–156.

Richards FA, Thompson TG (1952) The estimation and characterization of plankton populations by pigment analyses: A spectrophotometric method for the estimation of plankton pigments. *J Mar Res* 11:156–172.

Rodriguez-Yanez Y, Munoz B, Albores A (2013) Mechanisms of toxicity by carbon nanotubes. *Toxicol Mech Methods* 23:178–195.

Sergio M et al. (2013) Fullerenes toxicity and electronic properties. *Environ Chem Lett* 11:105–118.

Stampoulis D, Sinha SK, White JC (2009) Assay-dependent phytotoxicity of nanoparticles to plants. *Environ Sci Technol* 43:9473–9479.

Sun JI et al. (2013) Effects of nanotoxicity on female reproductivity and fetal development in animal models. *Int J Mol Sci* 14:9319–9337.

Thuita M et al. (2012) Commercial rhizobial inoculants significantly enhance growth and nitrogen fixation of a promiscuous soybean variety in Kenyan soils. *Biol Fert Soils* 48:87–96.

Trouiller, B. et al. (2009) Titanium dioxide nanoparticles induce DNA damage and genetic instability in vivo in mice. *Cancer Res* 69:8784–8789.

Valeur B (2001) *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. Wiley-VCH, Weinheim.

Vollsnes AV, Melo TB, Futsaether CM (2012) Photomorphogenesis and pigment induction in lentil seedling roots exposed to low light conditions. *Plant Biology* 14:467–474.

Yang Y et al. (2013) Impacts of silver nanoparticles on cellular and transcriptional activity of nitrogen-cycling bacteria. *Environ Toxicol Chem* 32:1488–1494.

Yin L et al. (2012) Effects of silver nanoparticle exposure on germination and early growth of eleven wetland plants. PLoS One 7:e47674.
doi:10.1371/journal.pone.0047674

FIGURE CAPTIONS

Fig. 1 – (a) Absorption spectra of the Chl extract as a function of Ag NPs content. (b) Surface plasmon absorbance at 419 nm as a function of the Ag NPs concentration.

Fig. 2 – (a) Fluorescence of the Chl extract for different contents of Ag NPs when excited at 405 nm. (b) F_0/F fluorescence ratio at 673 nm as a function of the Ag NPs content.

Fig. 3 – Lifetime as a function of the Ag NPs content, obtained from the fluorescence decay time at 673 nm when excited by two photons at 800 nm. Inset: Fluorescence lifetime in the 0 to 10 μM range. Error bars represent standard deviations.

Fig. 4 – F_0/F ratio at 673 nm of the Chl extract as a function of the Ag NPs content, in the range of: (a) 0 to 10 μM , (b) 10 to 100 μM and (c) 100 to 500 μM .

Fig. 5 – $(F_0/F - 1)/[Q]$ versus $[Q]$ at 673 nm of the Chl extract as a function of the Ag NPs concentration in the 100 to 500 μM range.

Figure 1
[Click here to download high resolution image](#)

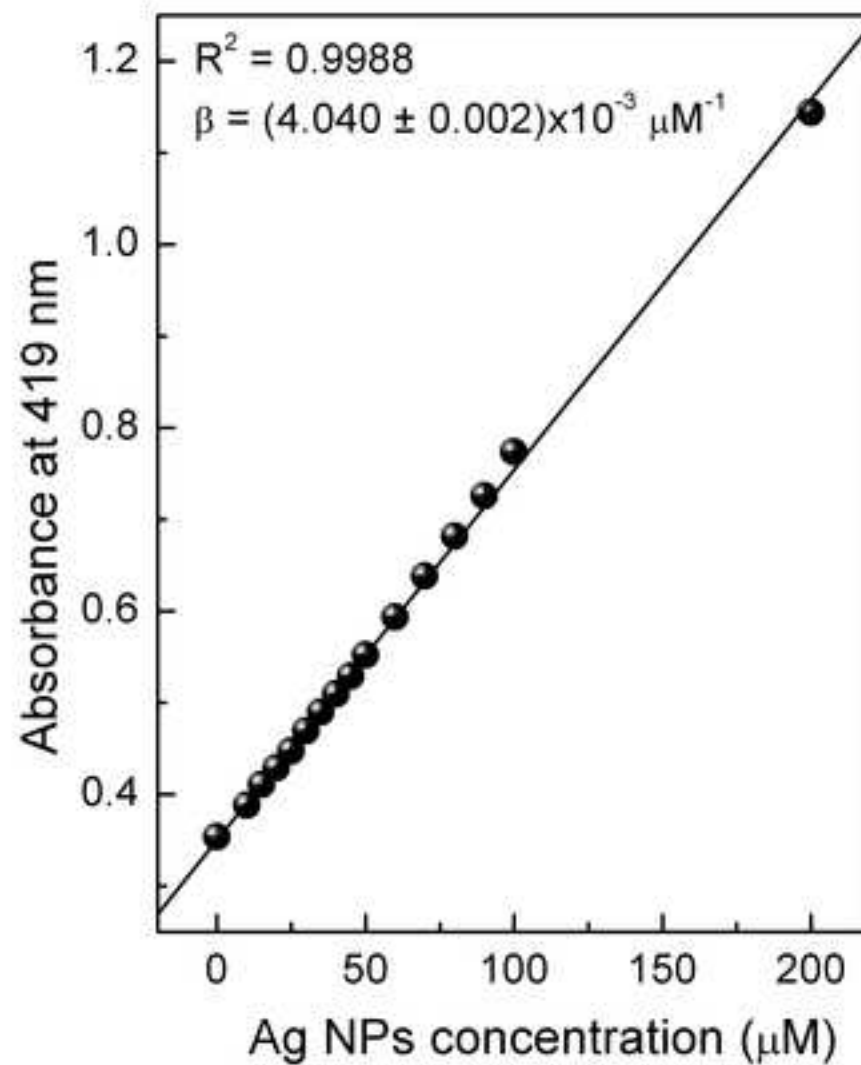
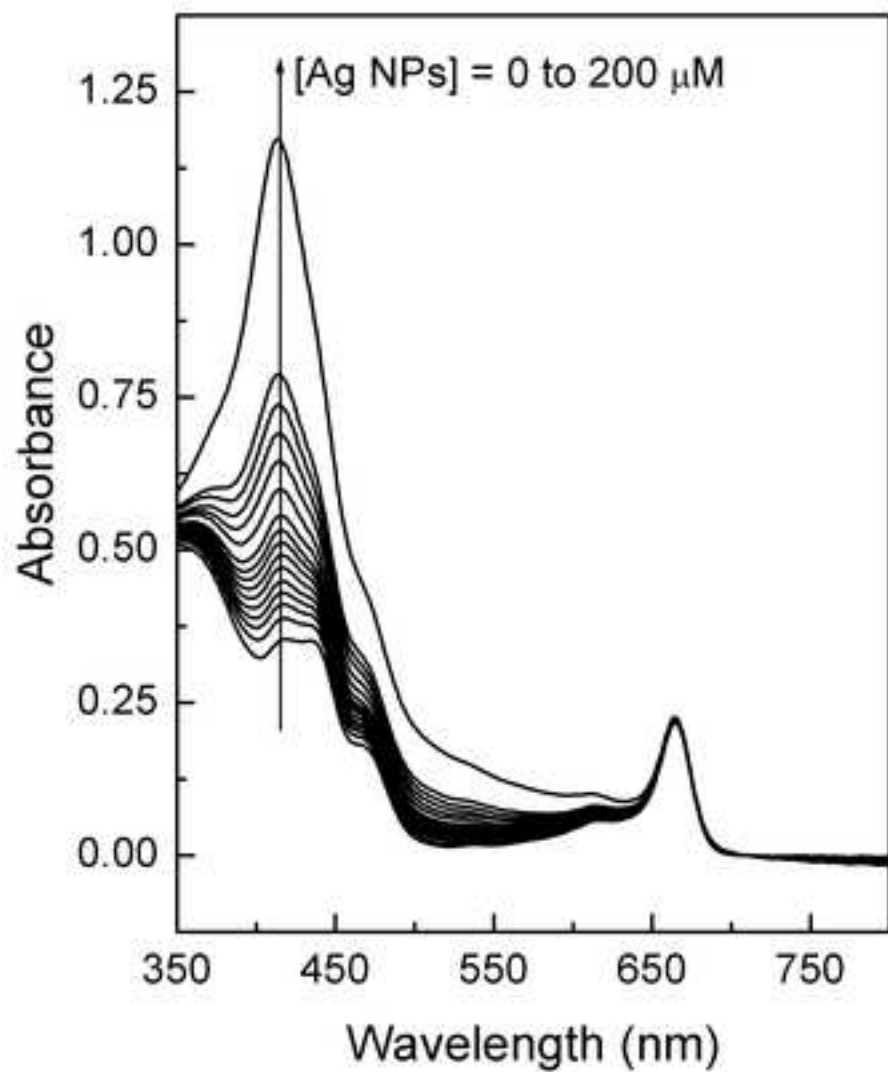


Figure 2
[Click here to download high resolution image](#)

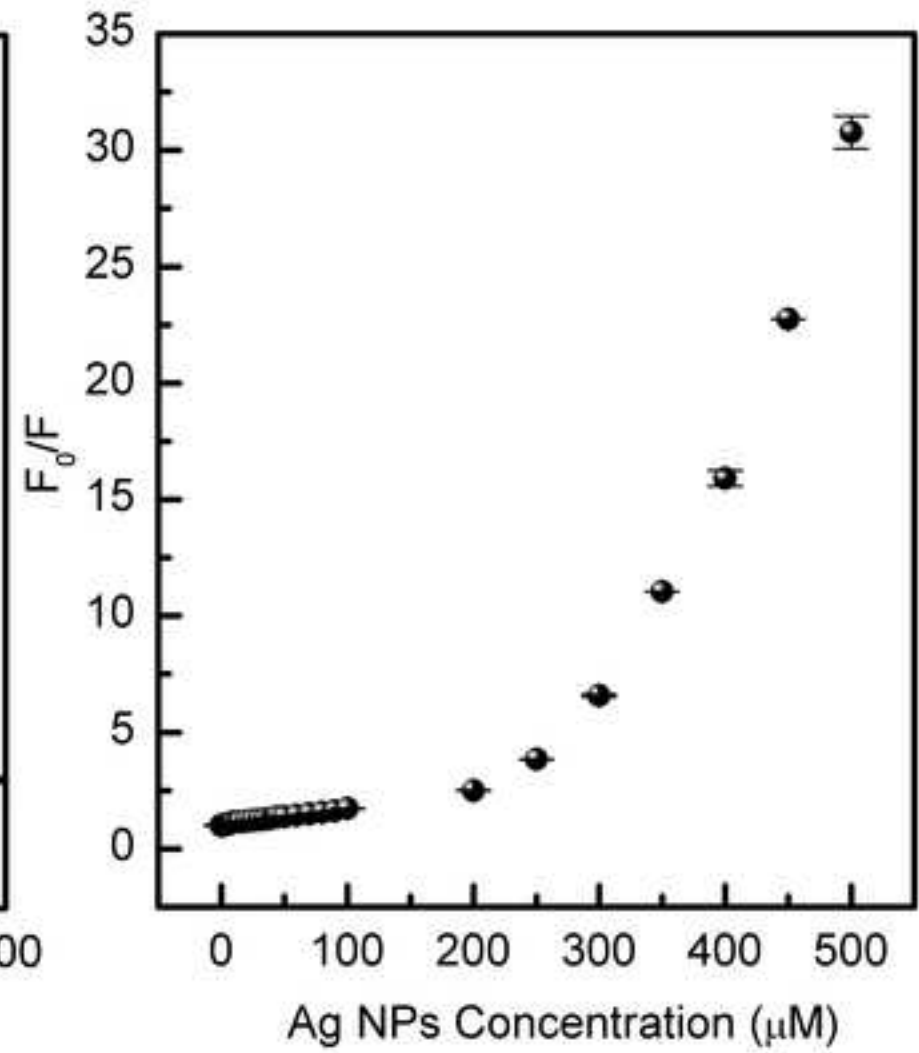
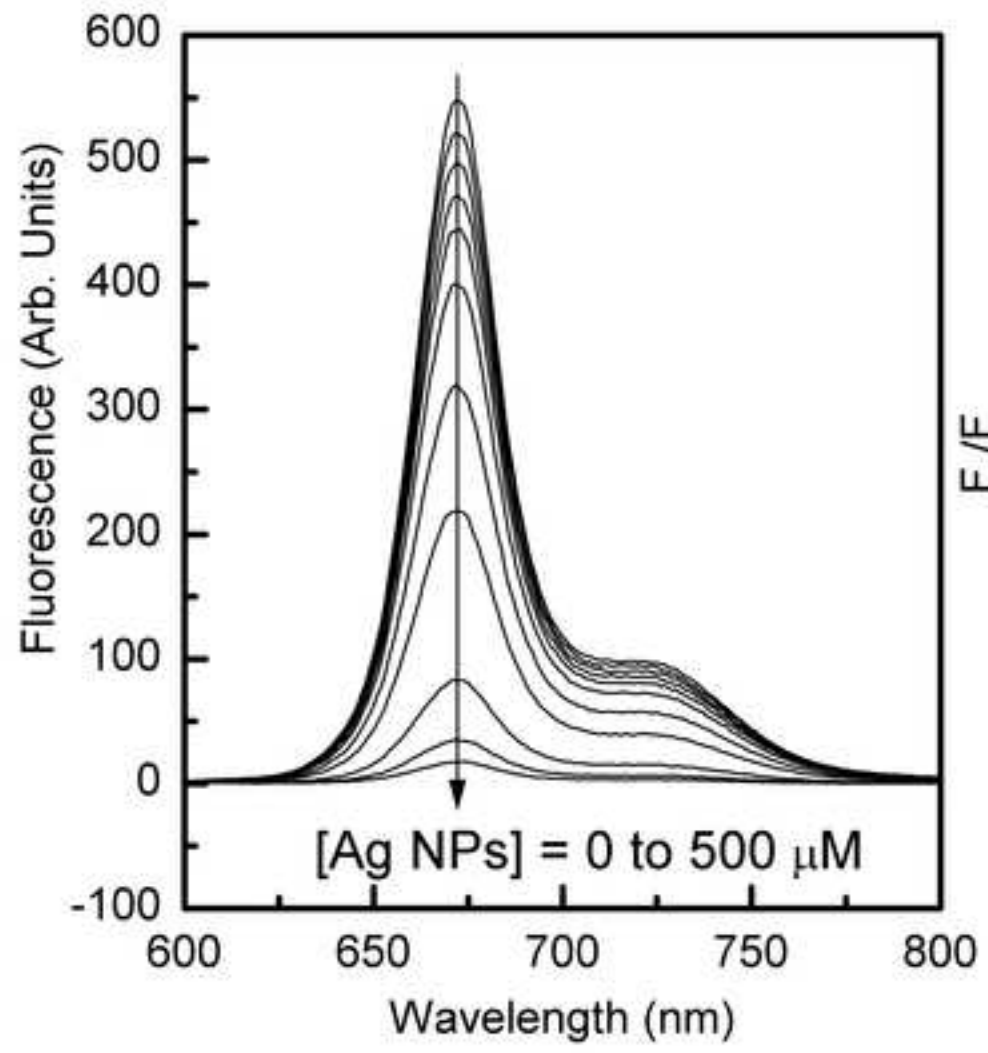


Figure 3
[Click here to download high resolution image](#)

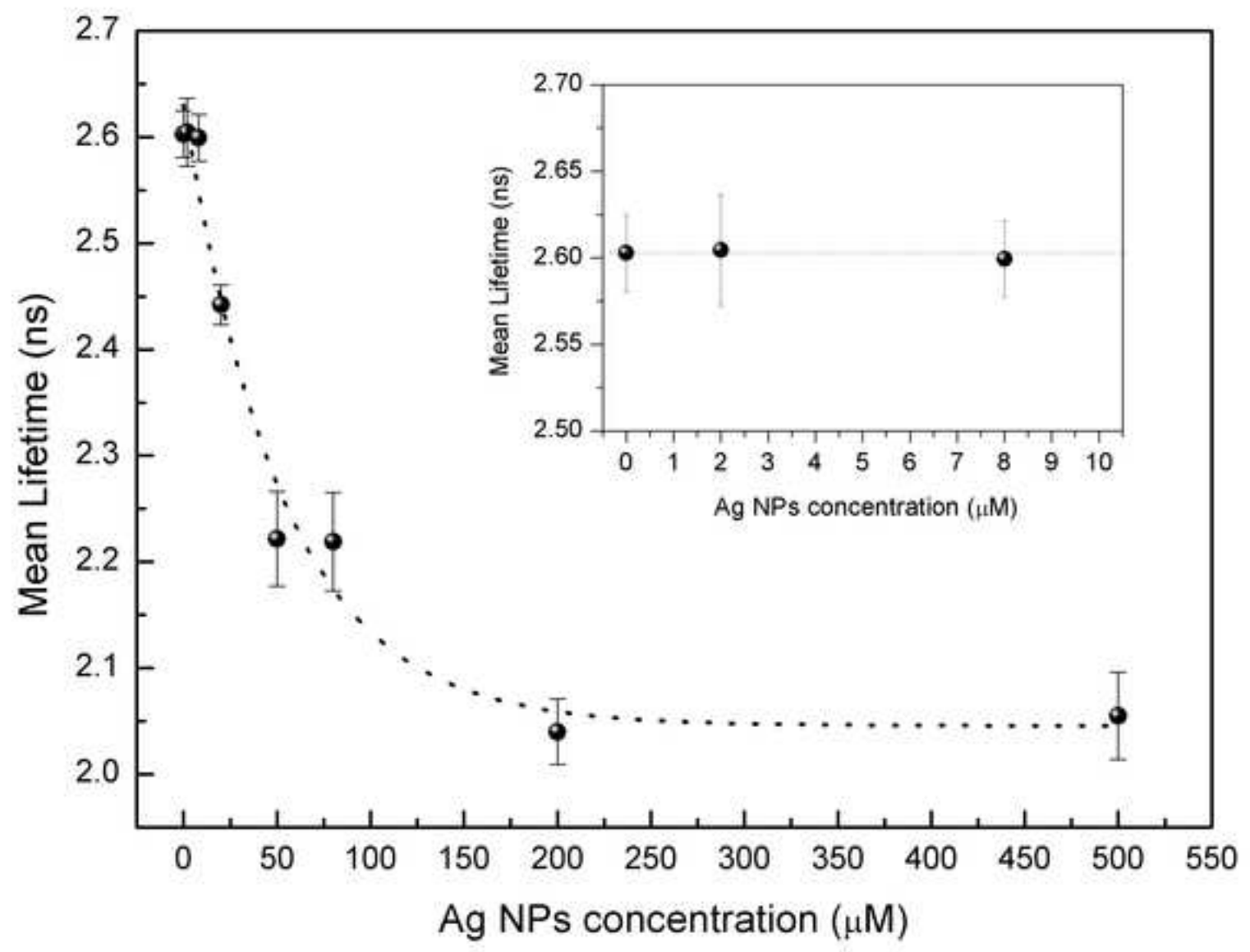


Figure 4
[Click here to download high resolution image](#)

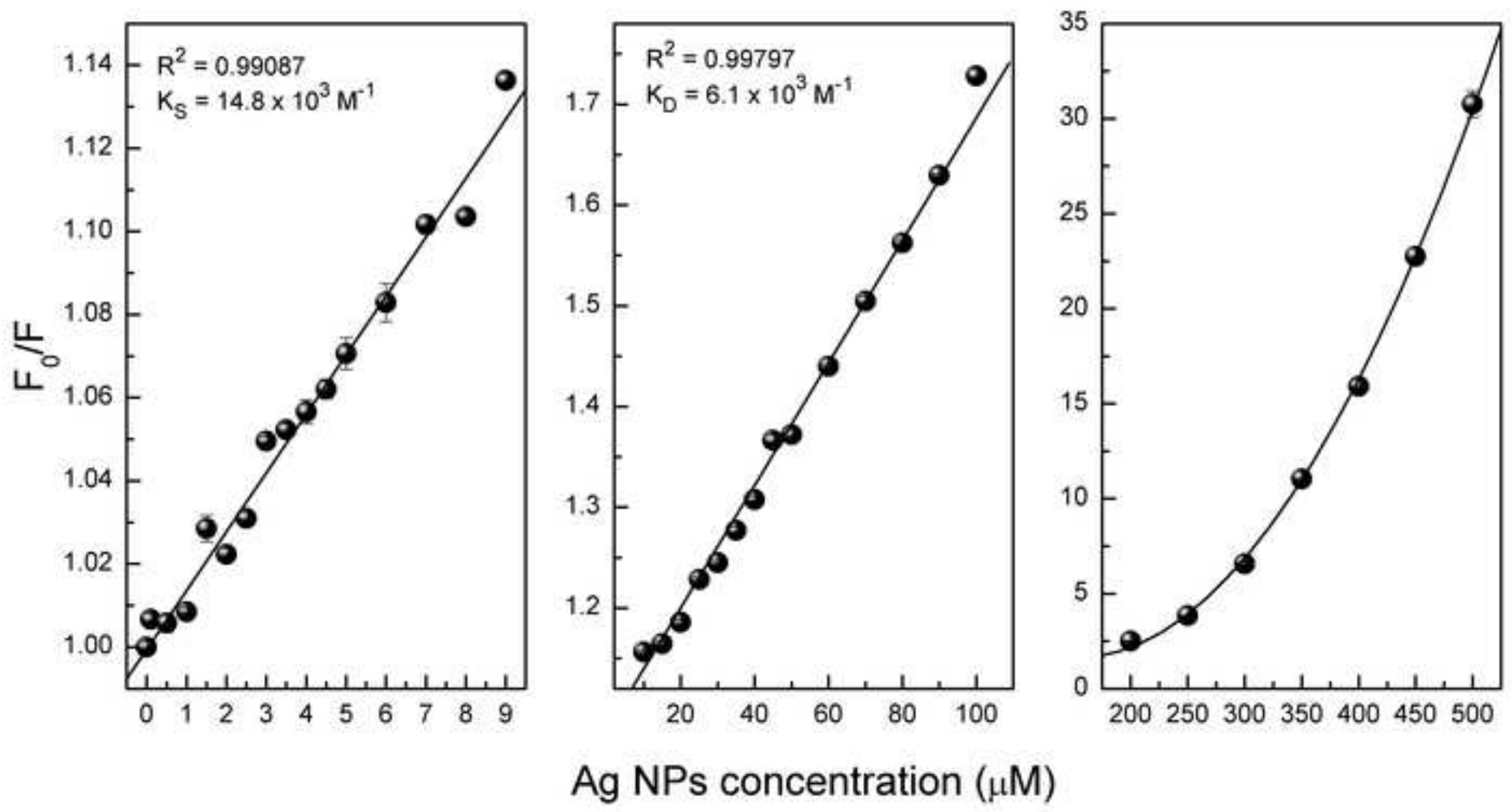


Figure 5
[Click here to download high resolution image](#)

