



UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

INTERAÇÃO ENTRE NANOPARTÍCULAS DE OURO E EXTRATOS FOLIARES
DA *Vicia faba*:
UMA ANÁLISE VIA ESPECTROSCOPIA ÓPTICA

Adalberto Villalba Mezacasa

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Grande Dourados para obtenção do grau de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Anderson Rodrigues Lima
Caires

Dourados-MS

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

M617i	Mezacasa, Adalberto Villalba. Interação entre nanopartículas de ouro e extratos foliares da <i>Vicia faba</i>: uma análise via espectroscopia óptica/ Adalberto VillalbaMezacasa. – Dourados, MS: UFGD, 2015. 74f. Orientador: Prof. Dr. Anderson Rodrigues Lima Caires. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal da Grande Dourados. 1. Nanopartícula de Ouro. 2. Extrato Foliar. 3. Clorofila. 4. Feofitina. 5. Espectroscopia. I. Título. CDD –544.6
-------	---

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.

©Todos os direitos reservados. Permitido a publicação parcial desde que citada a fonte.



Termo de Aprovação

Após a apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora foi emitido o parecer APROVADO, para a dissertação intitulada: "Interação Entre Nanopartículas de Ouro e Extratos Foliaves da Vicia Faba: Uma Análise Via Espectroscopia Óptica", de autoria de Adalberto Villalba Mezacasa, 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. Nelson Luis de Campos Domingues
Membro Examinador (UFGD)

Prof. Dr. Valter Aragão do Nascimento
Membro Examinador (UFMS)

Dourados/MS, 13 de março de 2015

Aes meus pais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela vida e por absolutamente tudo.

Aos meus pais, Neodi L. Mezacasa e Eva C.V. Mezacasa, pelo amor, apoio, compreensão, conselhos, amizade e exemplo de perseverança e de vida.

Ao meu orientador Anderson R. L. Caires pela orientação e aprendizado.

Aos meus irmãos Viviane e Josué, primas Carolina e Naiara, demais familiares pelas orações e por estarem sempre torcendo por mim.

Aos amigos Amanda, Fernanda, Silvia, Larisse, Keila, Laísa, Brunna, Cícera e Rodrigo por sempre estarem dispostos a ouvir minhas reclamações e dramas, que não foram poucos, e sempre torceram pelo meu sucesso. Também torço pelo sucesso de vocês!

Aos colegas de laboratório William, Thiago, “JN”, Alessandra, Flávio e demais integrantes do GOA, pelo apoio e companheirismo.

Aos professores do curso de Pós-Graduação em Química pelo conhecimento adquirido e aos técnicos dos laboratórios de física e química.

A Universidade Federal da Grande Dourados, Faculdade de Ciência Exatas e Tecnológicas e ao Grupo de Óptica Aplicada pelo espaço e apoio.

Enfim, agradeço a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho.

Muito obrigado.

“Eu acredito que para cada um que se perde, alguém virá
para mostrar o caminho... Eu acredito que acima da
tempestade, a menor oração ainda será ouvida...”

Mahalia Jackson

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

ABS: Absorbância

Ag: Prata

Al₂O₃: Óxido de Alumínio

ATP: Trifosfato de Adenosina

AuNP (s): Nanopartículas de ouro

Au: Ouro

CeO₂: Óxido de Cério

Chl: Clorofila

Fe₃O₄: Óxido de Ferro

FTIR: Infravermelho por Transformata de Fourier

HAuCl₄: Ácido Cloroáurico

$h\nu$: Quantum

Mg: Magnésio

NaCl: Cloreto de Sódio

NADPH: Fosfato de Dinucleótido de nicotinamida e adenina

Nm: Nanômetros

P.A.: Alta Pureza

pH: Potencial Hidrogeniônico

Pheo: Feofitina

PSI: Fotossistema I

PSII: Fotossistema II

Q_A ou Q_B: Quinonas A e B respectivamente

QH₂: Plasto-Hidroquinona

SiO₂: Dióxido de Silício

TiO₂: Dióxido de Titânio

UV-Vis: Ultravioleta e Visível

ZnO: Óxido de Zinco

μM: Micromolar

μmol.L⁻¹: Micromol por litro

3 D: Três dimensões

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais aplicações de nanomateriais nas principais áreas de conhecimento.....	17
Tabela 2 - Tipo de nanopartícula e seus principais efeitos observados em diferentes plantas.	21
Tabela 3 - Tempo gasto em cada processo de dissipação de energia no diagrama de Jablonski.	29

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Cálice de Licurgo.	19
Figura 2 - Separação das cargas de superfícies de nanopartícula de ouro na presença da radiação incidente.	20
Figura 3 - Estrutura química da molécula de Clorofila a e b.	24
Figura 4 – Estrutura química da molécula de Feofitina a e b.	25
Figura 5 - Estrutura química dos principais carotenóides, Xantofilas: (a) zeaxantina, (b) luteína, (c) criptoxantina e (d) astaxantina; Carotenos: (e) neurosporeno, (f) licopeno, (g) β -caroteno e (h) α -caroteno, respectivamente.....	26
Figura 6 - Diagrama ilustrativo referente à absorção luminosa, segundo a lei de Lambert-Beer.	27
Figura 7 - Diagrama de Jablonski.	28
Figura 8 – <i>Vicia faba</i>	31
Figura 9 - Coluna cromatográfica durante o processo de isolamento da Clorofila.....	32
Figura 10 - Espectros de Absorção UV-Vis das espécies em solução metanólica 10,68 μ M para o Extrato Bruto e a Clorofila e 328,10 μ M para os carotenóides totais.....	37
Figura 11 – Soluções metanólicas da Clorofila (A) e Feofitina (B).	38
Figura 12 - Espectros de Absorção UV-Vis das espécies em solução metanólica 10,68 μ M para a Clorofila e Feofitina.	39
Figura 13 - Transições eletrônicas nas porfirinas metaladas (simetria D_{4h}) e de bases livres (simetria D_{2h}).	40
Figura 14 - Em (A), os espectros de absorbância da titulação espectrofotométrica da desmetalização da Clorofila e formação Feofitina e, em (B), concentração relativa das espécies versus pH normalizados em solução etanólica 90% (v/v).	41
Figura 15 - Espectros de infravermelho das espécies Clorofila (A) e Feofitina (B) em pastilhas de KBr.....	42
Figura 16 - Espectros de absorção molecular UV-Vis das amostras constituídas de Extrato Bruto (0,50 μ mol.L ⁻¹) e AuNP de 5, 10 e 20 nm em (A), (B) e (C), respectivamente.	43
Figura 17 - Espectros de absorção molecular UV-Vis das amostras constituídas de Clorofila (0,50 μ mol.L ⁻¹) e AuNP de 5, 10 e 20 nm em (A), (B) e (C), respectivamente.....	43
Figura 18 - Espectros de absorção molecular UV-Vis das amostras constituídas de	

Feofitina (0,50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) e AuNP de 5, 10 e 20 nm em (A), (B) e (C), respectivamente.	44
Figura 19 - Espectros de absorção molecular UV-Vis das amostras constituídas apenas de AuNPs de 5, 10 e 20 nm em (A), (B) e (C), respectivamente.	44
Figura 20 - Gráficos dos valores de Absorbância em 405 nm das espécies (A) AuNPs, (B) Extrato Bruto, (C) Clorofila e (D) Feofitina em função da concentração de AuNP.	45
Figura 21 - Gráficos dos valores de Absorbância em 520 nm das espécies (A) AuNPs, (B) Extrato Bruto, (C) Clorofila e (D) Feofitina em função da concentração de AuNP.	46
Figura 22 - Gráficos dos valores de Absorbância em 665 nm das espécies (A) AuNPs, (B) Extrato Bruto, (C) Clorofila e (D) Feofitina em função da concentração de AuNP.	47
Figura 23 - Mapas de emissão por fluorescência 3D das espécies: Extrato Bruto (a), Clorofila (b), Feofitina (c) em solução metanólica 10,70 μM	48
Figura 24 - Espectros de Fluorescência obtidos com uma excitação em 405 nm do Extrato Bruto (0,50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) e AuNP com diâmetros de: (A) 5 nm; (B) 10 nm e (C) 20 nm.	49
Figura 25 - Espectros de Fluorescência obtidos com uma excitação em 405 nm da Clorofila (0,50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) e AuNP com diâmetros de: (A) 5 nm; (B) 10 nm; e (C) 20 nm.	49
Figura 26 - Espectros de Fluorescência obtidos com uma excitação em 405 nm da Feofitina (0,50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) e AuNP com diâmetros de: (A) 5 nm; (B) 10 nm; e (C) 20 nm.	49
Figura 27 - Espectros de Fluorescência obtidos com uma excitação em 532 nm do Extrato Bruto (0,50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) e AuNP com diâmetros de: (A) 5 nm; (B) 10 nm; e (C) 20 nm.	50
Figura 28 - Espectros de Fluorescência obtidos com uma excitação em 532 nm da Clorofila (0,50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) e AuNP com diâmetros de: (A) 5 nm; (B) 10 nm; e (C) 20 nm.	51
Figura 29 - Espectros de Fluorescência obtidos com uma excitação em 532 nm da Feofitina (0,50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) e AuNP com diâmetros de: (A) 5 nm; (B) 10 nm; e (C) 20 nm.	51
Figura 30 - Esquema ilustrativo para o efeito de supressão da Fluorescência (A); Esquema ilustrativo para o efeito de aumento da intensidade de Fluorescência (B).	52
Figura 31 - Mapas de Absorção UV-Vis das amostras Clorofila (A), AuNP (5 nm) – Clorofila (B), Feofitina (C), AuNP (5 nm) - Feofitina (D).	53
Figura 32 - Mapas de emissão 3D para a Clorofila em diferentes concentrações (A: 0,25; B: 0,50; B: 0,75; C: 1,00 e D: 1,25 μM) sem nanopartículas (SNPs) e com nanopartículas de 5 nm (CNPs) em função do tempo com excitação em 405 nm.	54

Figura 33 - Mapas de emissão 3D para a Feofitina em diferentes concentrações (A: 0,25; B:0,50; B: 0,75; C: 1,00 e D: 1,25 μM) sem nanopartículas (SNPs) e com nanopartículas de 5 nm (CNPs) em função do tempo com excitação em 405 nm.	55
Figura 34 - Mapas de emissão 3D para a Clorofila (0,5 μM) (A) e com AuNP (4,20 μM) de 5, 10 e 20 (B, C, D) em função do tempo.	56
Figura 35 - Intensidade de Fluorescência em 670 nm em função do tempo para as amostras contendo Clorofila e AuNPs de 5, 10 e 20 nm).	57
Figura 36 - Mapas de emissão 3D para a Feofitina (0,5 μM) (A) e com AuNP (4,20 μM) de 5, 10 e 20 (B, C, D) em função do tempo.	58
Figura 37 - Intensidade de Fluorescência em 678 nm em função do tempo para as amostras contendo Feofitina e AuNPs de 5, 10 e 20 nm).	58
Figura 38 - Fluorescência temporal inicial e final das amostras constituídas de AuNP (4,20 μM) de 5 nm e Clorofila em A e Feofitina em B, (0,5 μM).	59
Figura 39 - Tempo de decaimento da fluorescência da Clorofila em A e da Feofitina em B (0,5 μM), ambas na presença de AuNPs (4,20 μM) de 5, 10 e 20 nm.	60
Figura 40 - Gráfico do tempo de vida médio em função área superficial disponível para as amostras contendo AuNP de 5, 10 e 20 nm e Clorofila e Feofitina.	61
Figura 41 - Espectros de absorção molecular UV-Vis das amostras constituídas de β -Caroteno ($6,71 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) e AuNP de 5, 10 e 20 nm em (A), (B) e (C), respectivamente.	63
Figura 42 - Gráficos da intensidade de Absorbância em 405 e 530 nm em (A) e (B), respectivamente do β -Caroteno em função da concentração e dimensão das AuNPs.	64
Figura 43 - Mapa de emissão 3D do β -Caroteno em solução metanólica $6,71 \times 10^{-4} \text{ M}$	65
Figura 44 - Espectros de Fluorescência obtidos com uma excitação em 405 nm do β -Caroteno ($6,71 \times 10^{-4} \text{ M}$.) e AuNP com diâmetros de: (A) 5 nm; (B) 10 nm; e (C) 20 nm.	65
Figura 45 - Mapas de emissão 3D para o β -Caroteno ($6,71 \times 10^{-4} \text{ M}$) (A) e com AuNP de 5, 10 e 20 (B, C, D) em função do tempo.	66

RESUMO

No presente trabalho foram obtidos extratos foliares constituídos dos principais pigmentos fotossintéticos da planta *Vicia faba*, a partir do qual pôde-se isolar a Clorofila e a Feofitina pelo método de separação em coluna cromatográfica, que foram caracterizados através das técnicas ópticas. Adicionalmente, foram avaliados as interações entre as moléculas porfirínicas (Clorofila e Feofitina) e nanopartículas de ouro (AuNP) de 5, 10 e 20 nm de diâmetro, a partir das análises de Absorção UV-Vis, Fluorescência Molecular e tempo de vida de luminescência. Verificou-se que as moléculas porfirínicas apresentaram diminuição ou aumento na intensidade de fluorescência, de acordo com as condições estudadas, além da diminuição nos tempos de vida de fluorescência das moléculas na presença das AuNPs. Os efeitos das interações foram mais evidentes para as amostras constituídas de Feofitina, sugerindo uma menor afinidade da Clorofila para interagir com as AuNPs, quando comparado com a porfirina desmetalada. De forma geral, foi possível determinar que as AuNPs possuem grande potencial de interferir no processo de fotossíntese dos vegetais, dado a capacidade de interagir fortemente com os pigmentos fotossintéticos que são fundamentais no processo de produção química pelas plantas, ressaltando um potencial risco de toxicidade que as nanopartículas metálicas podem apresentar ao meio ambiente.

Palavras-Chaves: Nanopartícula de Ouro, Extrato Foliar, Clorofila, Feofitina, Espectroscopia.

ABSTRACT

In the present work, analyses were performed using leaf extracts constituted of the main photosynthetic pigments of the plant *Vicia faba*, from which it was possible to isolate the chlorophyll and pheophytin by separation column chromatographic method, which were characterized by optical techniques. Additionally, the interactions were valued between the molecules porphyrin (Chlorophyll and pheophytin) and nanoparticles of gold (AuNP) of 5, 10 and 20 nm of diameter, from the analyses of Absorption UV-Vis, Molecular Fluorescence and time of life of luminescence. One checked that the molecules porphyrins presented reduction or increase in the fluorescence intensity, in accordance with the studied conditions, besides the reduction in the times of life of fluorescence of the molecules in the presence of the AuNPs. The effects were significantly more evident for the samples consisting of Pheophytin, suggesting a less affinity of the Chlorophyll to interact with the AuNPs, when compared with the porphyrin uncomplexed. Generally, it was determined that the AuNPs have great potential to interfere with the plant photosynthesis process, given the ability to interact strongly with the photosynthetic pigments that are critical in chemical production process in plants, highlighting a potential risk of toxicity the metal nanoparticles may have on the environment.

Key-words: Gold nanoparticle, Leaf Extract, Chlorophyll, Pheophytin, Spectroscopy.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	15
1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Fundamentação teórica	16
1.1.1 Nanotecnologia	16
1.1.2 Nanopartículas	18
1.1.3 Interações Nanopartículas – Plantas	20
1.1.4 Pigmentos Fotossintéticos.....	22
1.1.4.1 Clorofila	23
1.1.4.2 Feofitina	25
1.1.4.3 Carotenóides.....	25
1.1.5 Espectroscopia molecular de absorção e fluorescência	26
CAPÍTULO II	30
2 OBJETIVOS	30
2.1 Objetivo geral.....	30
2.2 Objetivos específicos	30
CAPÍTULO III.....	31
3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	31
3.1 Nanopartículas de ouro	31
3.2 Cultivo das plantas.....	31
3.3 Extração e separação dos pigmentos.....	31
3.4 Identificação dos Pigmentos	33
3.5 Avaliação em função da concentração e dimensão das AuNPs.....	34
3.6 Avaliação da interação AuNPs – Clorofila/Feofitina (efeito do Mg^{2+})	34
3.6.1 Estudo temporal por Absorção UV-Vis	34
3.6.2 Estudo temporal por Fluorescência.....	34
3.6.3 Medidas de tempo de vida de luminescência.....	35
3.7 Interação AuNPs - β -caroteno.....	35
3.7.1 Avaliação em função da concentração e dimensão das AuNPs	35
3.7.2 Avaliação temporal em função da dimensão das AuNPs.....	35
CAPÍTULO IV	37
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	37

4.1 Obtenção das amostras.....	37
4.1.1 Extrato Bruto, Clorofila e Feofitina	37
4.1.2 Avaliação do processo de desmetalção da Clorofila em função do pH.....	40
4.1.3 Caracterização da Clorofila e Feofitina por FTIR.....	41
4.2 Absorção UV-Vis: Avaliação em função da concentração e dimensão das AuNPs.....	42
4.3 Espectroscopia de Emissão Molecular Fluorescência	47
4.3.1 Mapas de emissão em 3D.....	47
4.3.2 Avaliação em função da concentração e dimensão das AuNPs	48
4.3.3 Interação AuNPs-Clorofila/Feofitina (efeito do Mg^{+2}).....	53
4.3.1 Absorção UV-Vis: efeito da presença de AuNP em função do tempo	53
4.3.2 Fluorescência: avaliação temporal função da concentração da Chl e Pheo	54
4.3.3 Fluorescência: avaliação temporal em função do diâmetro das AuNPs	56
4.3.4 Análise de Tempo de vida de Luminescência	60
4.5 Avaliação da interação AuNP – β -Caroteno	62
4.5.1 Absorção UV-Vis.....	62
4.5.2 Fluorescência Molecular	64
CAPÍTULO V	68
5 CONCLUSÃO	68
CAPÍTULO VI	70
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

O conceito de *Nanotecnologia* foi apresentado primeiramente pelo 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. Ele concluiu que, se há a possibilidade de ter algum controle sobre o arranjo das coisas em pequena escala, seria possível gerar uma variedade muito maior de propriedades que as substâncias podem ter, esse foi o início da ideia de nanociência e nanotecnologia.^{1, 2} Entretanto, somente a partir do início do século atual que a nanotecnologia 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.¹

Os nanomateriais, assim chamados, têm então apresentado propriedades distintas dos materiais macro cristalinas quimicamente análogas. Nos últimos anos, materiais em escalas nanométricas vêm sendo estudados por vários autores quanto o vasto campo de aplicação, uma vez provada alterações significativas em suas propriedades ópticas, elétricas e/ou mecânicas.³

Entretanto, com o avanço em ritmo acelerado da nanotecnologia, a cada semana, novos produtos contendo nanomateriais estão chegando ao mercado mundial fazendo com que o risco da nanotecnologia se potencialize na medida em que avança suas aplicações, sem ocorrer o mesmo com as pesquisas voltadas para análise de suas conseqüências sociais e ambientais. A falta de informação acerca dos efeitos nocivos das inovações tecnológicas no meio ambiente e na saúde humana serve de argumento para uma maior prudência.⁶

Desta forma, surge-se então o interesse na elaboração de pesquisas relacionadas aos possíveis efeitos nocivos que tais materiais podem apresentar ao meio ambiente. Assim tais estudos pode-se iniciar a partir da avaliação de possíveis interações entre plantas e nanopartículas.

Os vegetais, de forma geral, estão constantemente submetidos a manipulação humana e, se mantém em contato direto com as principais vias de contaminação do meio ambiente e, neste caso ressalta-se ainda a importância de compreender como ocorre tal interação e por quais mecanismos, levando em consideração os possíveis efeitos que nanopartículas

apresentam aos principais pigmentos fotossintéticos nas plantas.

Uma vez que tais pigmentos são constituídos por moléculas que apresentam propriedades diretamente relacionadas com a capacidade fotossintética das plantas, acredita-se que os resultados esperados no presente estudo serão de grande importância para compreensão dos possíveis efeitos causados em plantas submetidas a tratamentos com nanopartículas de ouro.

1.1 Fundamentação teórica

1.1.1 Nanotecnologia

A nanotecnologia tem sido um campo da ciência que se destaca de maneira impressionante, juntamente com a biotecnologia, misturando o conhecimento da ciência dos materiais e da química com os da biologia.⁴ Pode-se assim, conceituar a Nanotecnologia e a Nanociência, respectivamente, como sendo a aplicação e o estudo de objetos ou materiais e dispositivos que tenham ao menos uma de suas dimensões físicas na ordem de algumas dezenas de nanômetros, os chamados *nanomateriais*.⁵

Possibilitando a fabricação de produtos com características diferenciadas ao manipular a estrutura molecular, alterando a geometria ou “arquitetura” da composição das moléculas dos materiais reunindo, freqüentemente, a nanotecnologia apresenta diferentes domínios da ciência com uma abordagem indisciplinar ou “convergente”, esperando-se que resultem em inovações que possam contribuir para a resolução de muitos dos problemas que a sociedade enfrenta atualmente conforme apresentado na Tabela 1.^{6,7}

Tabela 1 - Principais aplicações de nanomateriais nas principais áreas de conhecimento.^{6, 7}

Área	Aplicações
Medicina	• Diagnóstico miniaturizados e precoce de doenças; • Revestimentos de base nanotecnológica podem melhorar a bioatividade e biocompatibilidade de implantes.
Informática	• Armazenamento de dados com densidades de gravação muito elevadas (por exemplo, HD de 1 Terabite); • Novas tecnologias de visores plásticos flexíveis; • Uso da computação quântica que poderá abrir novas vias que ultrapassam as atuais tecnologias de informação e telecomunicações.
Energia	• Novas células de combustível ou de sólidos nanoestruturados leves com potencial para um armazenamento eficiente de hidrogênio; • Desenvolvimento de células solares fotovoltaicas eficientes de baixo custo (por exemplo, “pintura solar”); • Poupanças de energia decorrentes de progressos em nanotecnologias que permitam um melhor isolamento e transporte, bem como uma iluminação mais eficiente.
Ciência dos Materiais	• Superfícies podem ser modificadas com nanoestruturas, de forma a torná-las, por exemplo, à prova de riscos, impermeáveis, limpas ou estéreis; • Melhoramento no desempenho de materiais em condições extremas o que fará avançar, por exemplo, as indústrias automóvel, aeronáutica e espacial.
Instrumentação	• Com o avanço da nanotecnologia surge a necessidade de invenção de equipamentos capaz de monitorar e caracterizar os nanomateriais, como por exemplo, o microscópio de varredura com efeito de túnel que é um marco importante no surgimento das nanotecnologias.
Alimentos, água e ambiente	• A investigação sobre alimentos, água e ambiente pode avançar com progressos derivados das nanotecnologias, incluindo ferramentas para a detecção e neutralização da presença de microrganismos ou pesticidas; • O desenvolvimento de métodos corretivos derivados das nanotecnologias pode permitir a reparação de danos ambientais e a despoluição; • Além do desenvolvimento de novas técnicas no setor agroindustrial com a utilização da nanotecnologia para o melhoramento de cultivo.

No entanto, assim como qualquer material industrialmente produzido, os nanomateriais podem ser liberados ao ambiente através da aplicação direta ou indireta de produtos ou resíduos. Desta forma, pesquisadores têm realizado experimentos na tentativa de avaliar os possíveis efeitos nocivos das nanopartículas, por exemplo, em águas e solos, já que no ambiente, as nanopartículas podem ser submetidas a uma série de possíveis transformações que dependem tanto de suas propriedades intrínsecas quanto as do meio receptor. Assim, a dissolução de nanopartículas pode liberar potencialmente componentes tóxicos para o meio ambiente sendo que a matéria orgânica natural pode interagir com as mesmas causando modificações em suas propriedades naturais, além da possível bioacumulação em plantas e em animais.⁸

Neste contexto, é importante ressaltar a necessidade de estudos e levantamentos dos riscos à saúde humana, animal e vegetal, notando-se a importância do desenvolvimento de pesquisas científicas em busca de respostas quanto à Nanotoxicologia e, somente através de pesquisas, é que se pode obter o máximo de informação a respeito dos nanomateriais e uma possível regulamentação quanto ao seu uso.

1.1.2 Nanopartículas

As *nanopartículas* podem ser definidas como materiais com pelo menos *duas* dimensões entre 1 nm e 100 nm, ou seja, é um tipo de nanomaterial.⁹ Tais materiais podem apresentar-se com suas propriedades físico-químicas modificadas, induzindo o surgimento de efeitos extraordinários de condutividade elétrica, reatividade e sensibilidade óptica e toxicidade.^{9, 10} Dentre as nanopartículas produzidas, as de Ouro e Prata tem ganhado bastante destaque e uma das melhores condições em se obter estas nanopartículas é a partir de soluções coloidais destes metais, que apresentam facilidade de preparo e modificação química.

Os primeiros relatos de sistemas coloidais datam de épocas bem anteriores à ciência moderna, onde nanopartículas metálicas eram usadas para produzir efeitos coloridos a vidros e cerâmicas, como, por exemplo, aqueles gerados pela combinação de nanopartículas de ouro e prata, que conferem ao vidro do famoso Cálice de Licurgo como apresentado na Figura 1 confeccionado na Roma do século IV A.C..¹¹

Figura 1 - Cálice de Licurgo. ¹¹

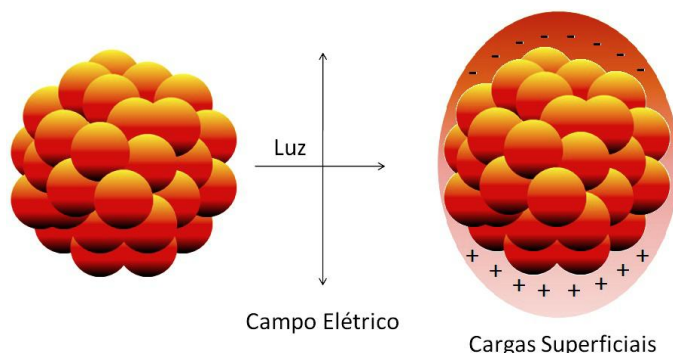


As nanopartículas de ouro têm atraído muita atenção até os dias atuais, pois têm sido aplicadas em métodos analíticos, tais como técnicas colorimétricas para a determinação de íons de metais pesados em soluções aquosas; no campo dos sensores; por possuir atividade catalítica, são ainda usados em reações tais como a reação de deslocamento de gás de água e na oxidação seletiva de CO; na biologia, estas nanopartículas são ainda utilizadas para o desenvolvimento de biossensores e rótulos de DNA. ¹²

Na forma esférica, as nanopartículas de ouro, têm sido usadas para gerar revestimentos elétricos funcionais, ^{13,14} uma vez que estudos ópticos, eletrônicos e eletroquímicos têm apresentado excelentes propriedades para armazenamento de elétrons nestes materiais nanométricos. Além disso, experimentos fotoquímicos e espectroeletroquímico demonstraram que nanopartículas de ouro cobertas com moléculas orgânicas exibem atividade redox incomum, pelo fato de aceitar elétrons de um doador adequado. ¹² As aplicações destas nanopartículas podem facilmente ser justificadas pelo fato de que elas apresentam propriedades ópticas e eletrônicas diferenciadas, uma vez que o modelo físico aplicado no entendimento da interação da radiação ultravioleta e infravermelho com as partículas baseia-se no comportamento dos plasmons de superfície.

Um plasmon pode ser definido com uma onda proveniente da oscilação coletiva de cargas em um dado meio e, no caso de metais, corresponde à oscilação dos elétrons de superfície que, como consequência, gera uma separação dipolar de cargas, como apresentado na Fig. 2, logo, a frequência de ressonância está relacionada com a intensidade da força restauradora, ou seja, da separação das cargas e do tamanho da partícula, o que por esta razão, observa-se a mudança de cor quando se altera o tamanho da partícula. ^{15, 16}

Figura 2 - Separação das cargas de superfícies de nanopartícula de ouro na presença da radiação incidente.¹⁷



Assim, quando nanopartículas de ouro absorvem a luz de frequência e comprimento de onda adequado, seus elétrons são excitados com frequência de ressonância plasmônica, que por sua vez, possui comprimentos de onda entre 510 e 530 nm para nanopartículas com diâmetros entre 4 e 50 nm.^{18, 19}

1.1.3 Interações Nanopartículas – Plantas

Mesmo não apresentando toxicidade significativa em sua forma metálica convencional, muitos metais, quando em dimensões nanométricas, tornam-se capazes de penetrar em tecidos vivos e, neste caso, merecem total atenção quanto a sua toxicidade, uma vez que no interior das células, essas nanopartículas podem provocar diretamente alterações em estruturas de membranas celulares e em moléculas, afetando de forma significativa os mecanismos de proteção em seres vivos em geral. Os efeitos indiretos de nanopartículas metálicas dependem de suas propriedades químicas e físicas e pode incluir restrições físicas (efeitos entupimento), solubilização de compostos tóxicos, ou na produção de espécies reativas com oxigênio.²⁰

As plantas podem estar sujeitas a manipulação humana e está contato direto com águas, solos e ar, sendo estes, os principais meios pelo qual podem ocorrer possíveis contaminações pelo uso e/ou descarte de forma inadequada de resíduos que apresentem em sua constituição qualquer tipo de material nanoparticulado que pode ser transportado ou bioacumulado. Estudos recentes têm apresentado resultados promissores a respeito dos possíveis efeitos causados em diferentes espécies de plantas quando expostas a nanopartículas metálicas.^{21,22}

De acordo com a literatura, a capacidade de absorção, translocação e acumulação de

nanopartículas em plantas podem estar relacionadas com a espécie de planta e o tamanho, tipo, composição química e estabilidade das nanopartículas.^{22, 23} Desta forma, o nível de contaminação e, conseqüentemente, os efeitos provocados pelas nanopartículas em plantas também são bastante variáveis. A Tabela 2 apresenta a relação de algumas nanopartículas metálicas que vem sendo bastante produzidas e alguns de seus efeitos em plantas já comprovados em estudos recentemente desenvolvidos.

Tabela 2 - Tipo de nanopartícula e seus principais efeitos observados em diferentes plantas.^{21, 23, 24}

Nanopartícula	Tamanho (nm)	Planta	Efeito
Ag	1-100	<i>Curcubita pepo</i>	Diminuição da biomassa
		<i>Linum usitatissimum</i>	Inibição do crescimento da parte aérea
		<i>Phaseolus radiatus</i>	Alongamento radicular.
Au	5-20	<i>Glycine max</i>	Supressão da fluorescência da Clorofila
Al₂O₃	150	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Alongamento radicular
CeO₂	7	<i>Medicago sativa</i>	Redução da parte aérea, da Biomassa, da germinação e redução radicular
		<i>Lycopersicon esculentum</i>	
		<i>Zea mays,</i>	
		<i>Cucumis sativus</i>	
		<i>Glycine max</i>	
Fe₃O₄	50	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Inibição no crescimento radicular
SiO₂	40-45	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Inibição no crescimento radicular
TiO₂	30	<i>Zea mays,</i>	Inibição da condutividade hidráulica da raiz, Redução da transpiração; Inibição no crescimento radicular
		<i>Vicia narbonensis</i>	
ZnO	8-10	<i>Glycine max,</i>	Crescimento radicular
		<i>Triticum aestivum,</i>	Diminuição da biomassa
		<i>Allium cepa</i>	Diminuição no crescimento radicular

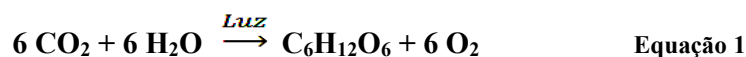
Neste contexto, surge-se a necessidade de aprimoramento e continuidade de estudos voltados à toxicidade de nanopartículas em plantas, sendo que é de grande importância tentar compreender os principais mecanismos pelo qual ocorrem as possíveis interações entre os

mais variados tipos de plantas e tais materiais nanométricos.

A utilização de técnicas capazes de monitorar os níveis de estresse das plantas submetidas a diferentes tipos de agentes contaminantes é de grande importância, aonde as técnicas de espectroscopia molecular, tais como espectroscopia de absorção e de fluorescência molecular tem ganhado bastante destaque, uma vez que através dos espectros de absorção podem-se quantificar os principais pigmentos fotossintéticos das plantas e a fluorescência da clorofila pode ser utilizada como uma técnica precisa e não destrutiva no estudo da eficiência fotossintética,^{25,26} indicando direta ou indiretamente os reflexos dos impactos de fatores ambientais e mudanças no estado fisiológico das plantas. Isso é possível porque a eficiência fotossintética de muitas plantas diminui quando são submetidas a condições de estresse causado pela deficiência de nutrientes, agentes poluidores, etc.^{27, 28}

1.1.4 Pigmentos Fotossintéticos

A vida na terra depende da energia proveniente do sol e a *Fotossíntese* é o único processo de importância biológica que pode aproveitar essa energia. O termo fotossíntese significa então, de forma literal, “síntese utilizando a luz”, ou seja, a energia luminosa dirige a síntese de carboidratos a partir de dióxido de carbono e água com liberação de oxigênio como apresentado na Equação 1.²⁹



A energia armazenada nessas moléculas pode ser utilizada mais tarde para impulsionar processos celulares na planta e servir como fonte de energia para todas as formas de vida. Desta forma, a energia da luz solar é primeiramente absorvida pelos pigmentos da planta presentes nos cloroplastos.

Em membranas internas especializadas dos cloroplastos denominadas *tilacóides* ocorrem às reações da fotossíntese (uma reação redox onde água é oxidada a oxigênio), onde os produtos finais de tais reações são os compostos de alta energia ATP e NADPH, os quais são utilizados para a síntese dos açúcares nas reações de fixação de carbono. Nos cloroplastos, a energia luminosa é convertida em energia química por meio de unidades funcionais chamadas de fotossistemas, onde a luz absorvida pelos pigmentos é utilizada para impulsionar a transferência de elétrons por uma série de compostos que atuam como doadores e aceptores desses elétrons. A maioria dos elétrons reduz NADP⁺ a NADPH e oxida H₂O a O₂ sendo que

a energia luminosa também é utilizada para gerar a força motora de prótons através da membrana do tilacóide, a qual será utilizada para formar ATP.²⁹

Os organismos produtores de oxigênio possuem dois fotossistemas que operam em série: *fotossistemas I e II* (PSI e PSII) que realizam as reações de armazenamento de energia da fotossíntese, sendo que o PSI produz um redutor forte, capaz de reduzir o NADP^+ , e um oxidante fraco, enquanto o PSII produz um oxidante muito forte, capaz de oxidar a água, e um redutor mais fraco do que aquele produzido pelo PSI, assim o redutor produzido pelo PSII reduz o oxidante produzido pelo PSI. Assim, os dois fotossistemas estão ligados por uma cadeia transportadora de elétrons, havendo então, um conjunto de fotossistemas física e quimicamente distintos (I e II), cada um com seus próprios pigmentos antena e centros de reação fotoquímicos.²⁹

1.1.4.1 Clorofila

O mais ativo dos tecidos fotossintéticos das plantas superiores é o mesófilo, que em suas células, possuem muitos cloroplastos, os quais contêm os pigmentos verdes especializados na absorção de luz, as *clorofilas* (Chl). Formada por complexos derivados de porfirinas tendo como átomo central o metal Magnésio (Mg), a Clorofila é o principal pigmento fotossintético das plantas.³⁰

A clorofila parece verde porque ela absorve luz principalmente nas porções vermelha e azul dos espectros, de forma que apenas a parte da luz nos comprimentos de onda do verde (aprox. 550 nm) é refletida. A Equação 2 apresenta a absorção de luz ($h\nu$) pela clorofila no estado fundamental (Chl) fazendo uma transição para o estado de maior energia (Chl*). No estado excitado a clorofila é extremamente instável e rapidamente libera seu excesso de energia ao meio.



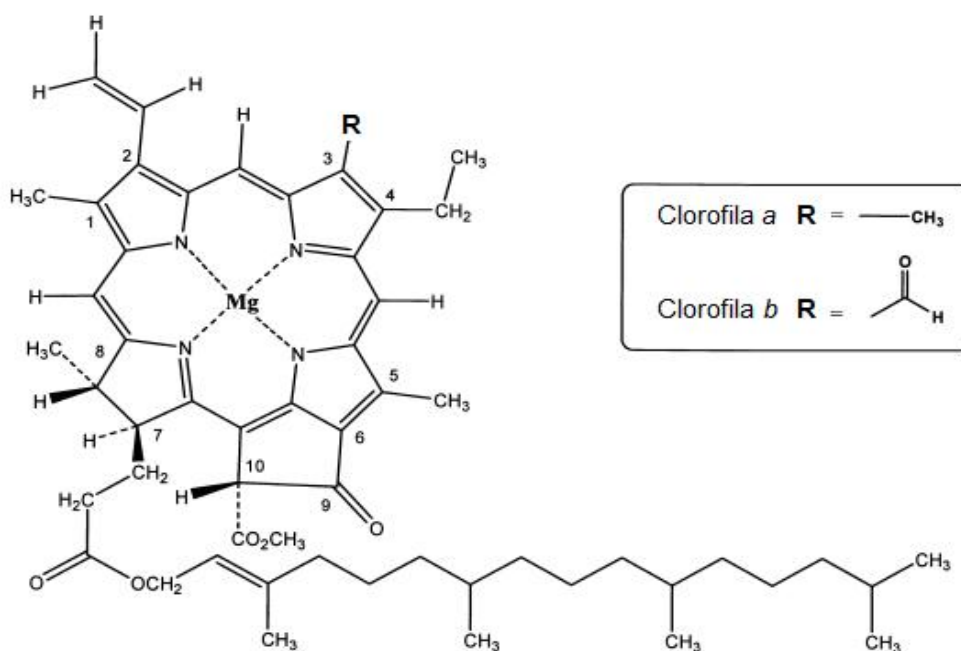
No estado excitado a clorofila apresenta quatro alternativas de rotas para liberar o excesso energia disponíveis:²⁹

- 1) A clorofila pode reemitir um fóton e, assim retornar ao seu estado fundamental – fluorescência;
- 2) A clorofila pode retornar ao estado fundamental por conversão direta de sua energia de excitação em calor;

- 3) Pode ocorrer a transferência de energia de uma molécula excitada para outra molécula;
- 4) Pode haver ainda, um processo fotoquímico, no qual a energia do estado excitado pode favorecer a ocorrência de reações químicas.

Estruturalmente as moléculas de clorofilas podem ser denominadas de acordo com a presença de diferentes grupos funcionais ligados ao segundo de seus quatro anéis pirrólicos, sendo que é denominada Clorofila *a* apresenta um grupo metil enquanto na Clorofila *b* este grupo é substituído por um grupo aldeído, conforme é apresentado na Figura 3.³¹

Figura 3 - Estrutura química da molécula de Clorofila *a* e *b*.³¹

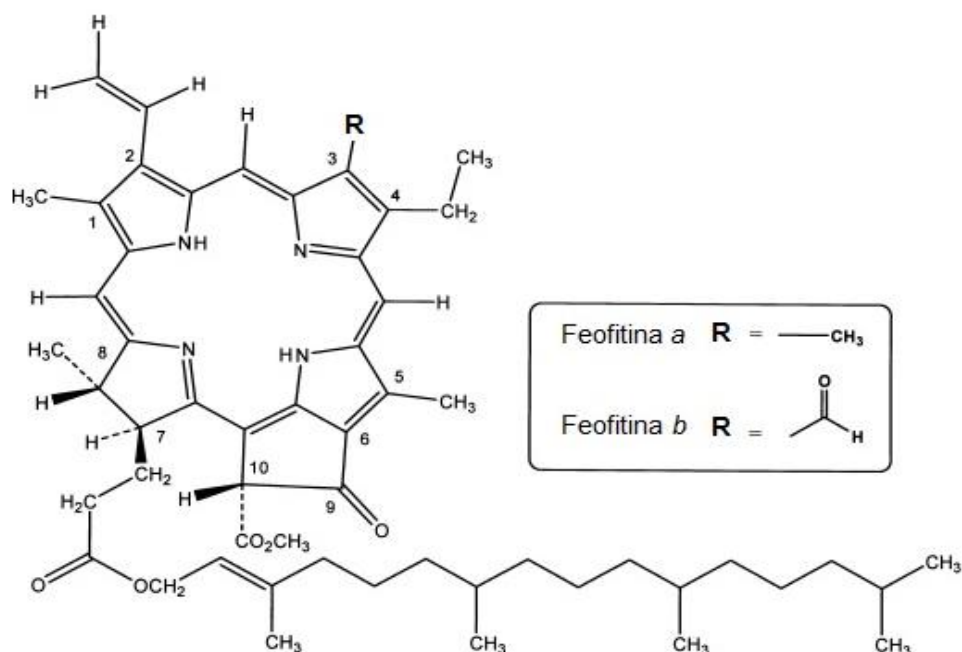


Todas as clorofilas têm uma complexa estrutura em anel, que é quimicamente relacionada com os grupos tipo porfirina encontrada na hemoglobina e nos citocromos, além disso, uma longa cauda de hidrocarbonetos que está quase sempre ligado à estrutura do anel. A cauda ancora a clorofila à porção hidrofóbica de seu ambiente. A estrutura do anel contém alguns elétrons fracamente ligados, além de ser a parte envolvida na transição de elétrons e nas reações redox.²⁹

1.1.4.2 Feofitina

A desmetalação da molécula de clorofila origina a formação da *Feofitina (Pheo)*, no qual o íon metálico (Mg^{2+}) é substituído por dois átomos de hidrogênio e a obtenção deste derivado se dá através de hidrólise ácida, conforme apresenta a Figura 4:³²

Figura 4 – Estrutura química da molécula de Feofitina a e b.³²



Evidências de estudos espectrais indicam que a feofitina atua como umceptor primário no PSII, seguido por um complexo de duas *plastoquinonas* (uma molécula de quinona envolvida na cadeia transportadora de elétrons) situadas muito próximas de um átomo de ferro. Duas plastoquinonas (Q_A e Q_B) estão ligadas ao centro de reação e recebem elétrons da feofitina de forma sequencial. A transferência dos dois elétrons para a Q_B forma Q_B^{2-} e esta, toma dois prótons do lado estroma, produzindo uma *plasto-hidroquinona* (QH_2) totalmente reduzida, que se dissocia do complexo do centro de reação e entra na porção hidrocarbonada da membrana onde transfere seus elétrons para um complexo *citocromo* (grande proteína com múltiplas subunidades e grandes grupos prostéticos).²⁹

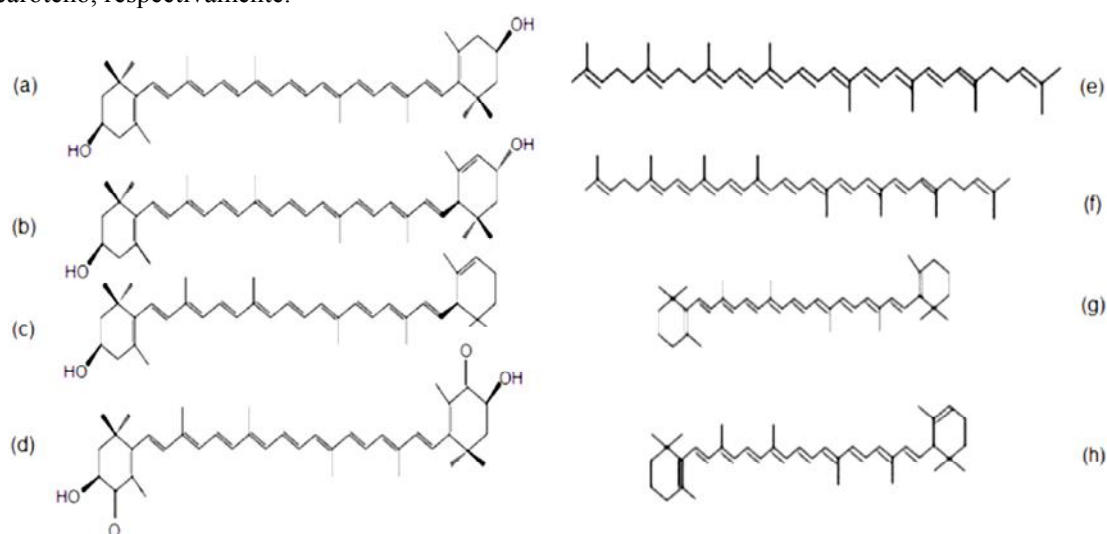
1.1.4.3 Carotenóides

Em sua totalidade, os diferentes tipos de carotenóides encontrados em organismos fotossintéticos são moléculas lineares que apresentam múltiplas cadeias duplas conjugadas.

Os carotenóides são pigmentos naturais responsáveis pelas cores amarela laranja e vermelha, muito empregadas nas indústrias alimentícia, farmacêutica, de cosméticos e de ração animal.
29, 33

Existem aproximadamente 600 carotenóides encontrados na natureza, os quais são divididos em dois grandes grupos, como ilustrado na Figura 5: **(1) xantofilas**: que são hidrocarbonetos que possuem grupos funcionais oxigenados; **(2) carotenos**: que consistem em hidrocarbonetos puros.³³

Figura 5 - Estrutura química dos principais carotenóides, Xantofilas: (a) zeaxantina, (b) luteína, (c) criptoxantina e (d) astaxantina; Carotenos: (e) neurosporeno, (f) licopeno, (g) β -caroteno e (h) α -caroteno, respectivamente.³³



Os carotenóides constituem integralmente as membranas dos tilacóides e estão, em geral, intimamente associados aos pigmentos protéicos das antenas e dos centros de reação. Assim, a luz absorvida pelos carotenóides é transferida à clorofila para o processo de fotossíntese, em decorrência do papel que desempenham são chamados de pigmentos acessórios.²⁹

1.1.5 Espectroscopia molecular de absorção e fluorescência

A espectroscopia UV-Vis é a observação da radiação eletromagnética nas regiões do visível (400-800 nm) e do ultravioleta (200-400 nm) do espectro. Ela é algumas vezes chamada de espectroscopia eletrônica porque a energia usada para excitar as espécies para níveis eletrônicos mais altos. Contudo, para que isto ocorra é necessário que o fóton absorvido tenha energia exatamente igual à diferença de energia entre os dois estados envolvidos na

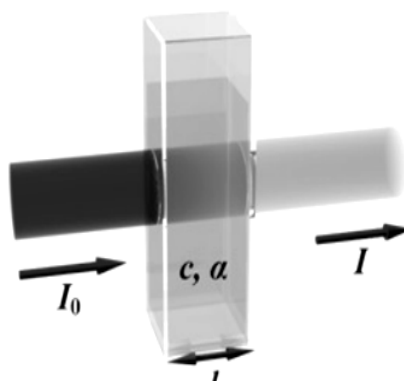
transição.^{34, 35}

Através de medidas de absorção UV-Vis é possível relacionar características da amostra com a quantidade de luz absorvida, tal modelo é apresentado na Fig. 6. Para tal propósito, utiliza-se a lei de Lambert-Beer:³⁶

$$I = I_0 e^{-\epsilon lc} \quad \text{Equação 3}$$

onde “l” é o caminho óptico (cm), I_0 e I são as intensidades de luz incidente e transmitidas, respectivamente. A concentração da amostra “c” é dada em mol.L⁻¹ (M). O parâmetro “ ϵ ” é chamado de coeficiente de extinção molar e seu valor é específico para cada tipo de amostra num dado solvente e também depende do comprimento de onda.^{34, 37}

Figura 6 - Diagrama ilustrativo referente à absorção luminosa, segundo a lei de Lambert-Beer.³⁷



As transições eletrônicas observadas em moléculas orgânicas ocorrem entre orbitais moleculares específicos. No estado fundamental, estes orbitais se dividem em três categorias:³⁷

- Orbitais σ : Associados a ligações simples;
- Orbitais π : Relacionados a ligações múltiplas;
- Orbitais n : São os orbitais ocupados por pares de elétrons livres de heteroátomos como oxigênio e nitrogênio (não estão envolvidos em ligações químicas);

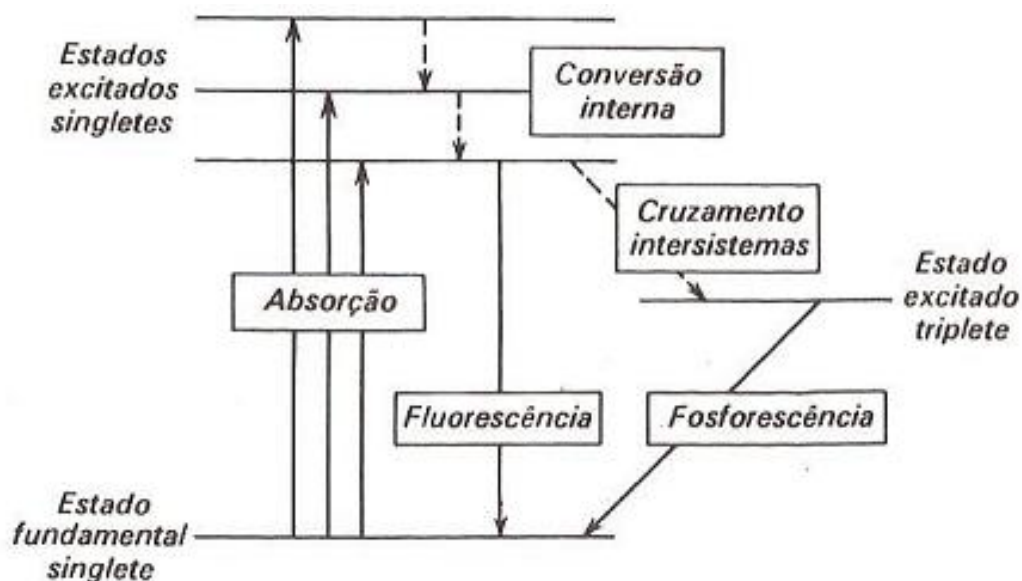
Para os estados excitados têm-se os seguintes orbitais moleculares:

- Orbitais σ^* : Possuem simetria cilíndrica em um plano nodal entre os átomos;
- Orbitais π^* : São deslocalizados com plano nodal ao longo do eixo de ligação.

O processo de fluorescência, também conhecido como fotoluminescência apresenta

relação direta com o processo de absorção eletrônica, uma vez que na fluorescência ocorre o processo inverso e as moléculas excitadas retornam do estado excitado para o estado fundamental, ou seja, estado de menor energia. Tal transição ocorre sem mudança de spin (singleto excitado para singleto fundamental), diferentemente da *Fosforescência* (singleto excitado para tripleto) e, esta transição é proibida pela regra de mudança de spins.³⁸ A Figura 7 apresenta o diagrama de Jablonski onde se tem a ilustração das possíveis formas de dissipação de energia de uma molécula.²⁵

Figura 7 - Diagrama de Jablonski.³⁹



Uma das principais diferenças entre os processos que podem ocorrer para a dissipação da energia absorvida pela molécula é o tempo gasto para a ocorrência de cada um dos processos. A Tabela 3 apresenta os principais processos que ocorrem e seus respectivos tempos.

Tabela 3 - Tempo gasto em cada processo de dissipação de energia no diagrama de Jablonski. ³⁹

Processo	Tempo (s)
Absorção	10^{-5}
Tempo de vida do estado excitado S₁	$10^{-10} - 10^{-7}$
Cruzamento intersistema	$10^{-10} - 10^{-8}$
Conversão interna	$10^{-11} - 10^{-9}$
Tempo de vida do estado excitado T₁	$10^{-6} - 10^0$

CAPÍTULO II

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Compreender a interação entre as nanopartículas de ouro (AuNP) e extratos foliares da *Vicia faba* por análises de espectroscopia óptica.

2.2 Objetivos específicos

- Cultivar e obter extratos foliares da *Vicia faba*;
- Obter a Clorofila livre de carotenóides e, a partir desta, a Feofitina por hidrólise ácida;
- Monitorar o pH ideal para a formação da Feofitina por absorbância molecular;
- Avaliar a interação entre AuNP (5, 10 e 20 nm), em diferentes concentrações, e Extrato Bruto, Clorofila e Feofitina;
- Avaliar o efeito do átomo de Magnésio no centro porfirínico da molécula na interação com as AuNPs em análises temporais e de tempo de vida de luminescência;

CAPÍTULO III

3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 Nanopartículas de ouro

Foram utilizadas nanopartículas de ouro (AuNPs), adquiridas da Sigma-Aldrich, de três diâmetros: 5 nm, 10 nm e 20 nm em solução coloidal constituída de aproximadamente: 0,01% HAuCl_4 suspenso em 0,01% ácido tânico com 0,04% citrato trissódico, 0,26 mM carbonato de potássio e 0,02% azida de sódio.

3.2 Cultivo das plantas

A planta utilizada para obtenção dos extratos foi a *Vicia faba*, apresentada na Figura 8, em que as sementes, tratadas com 0,15% de Captan 750, foram obtidas pela empresa Isla Sementes ®, e semeadas em vasos contendo substrato constituído de Húmus, cinza, fibras vegetais, arenito moído, calcário, pó e casacas de pinus decompostos (150 g de substrato em cada vaso contendo 1 semente), sendo que as plantas foram cultivadas em casa de vegetação à temperatura ambiente (20 – 30 °C) por um período de 4 semanas para a coleta das folhas.

Figura 8 – *Vicia faba*.



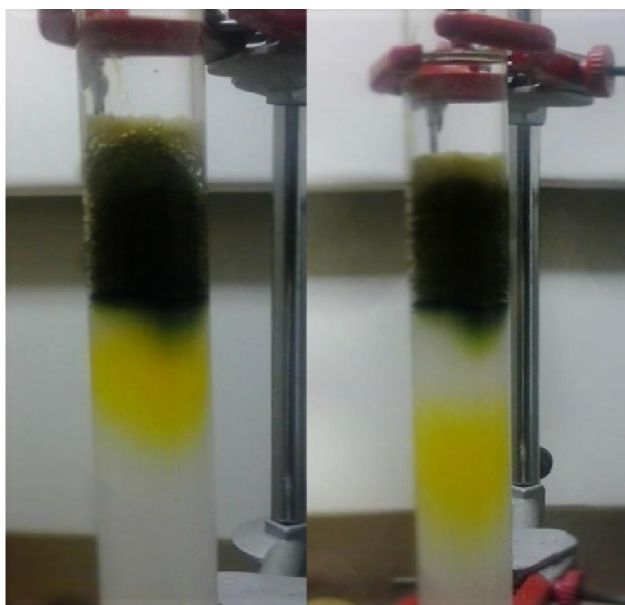
3.3 Extração e separação dos pigmentos

Para a extração foram utilizadas folhas frescas na proporção 15 g:100 mL de folhas picadas em metanol P.A. por um período de 72 horas sob refrigeração de 5 °C. Para a

purificação do extrato e obtenção da clorofila isolada, foi realizada uma extração líquida – líquido a partir do extrato bruto. O procedimento utilizado nesta etapa inicial foi um método adaptado,⁴⁰ aonde uma fração de 20 mL do extrato metanólico foi transferida para um funil de separação e adicionados 20 mL de éter de petróleo P.A. originando duas fases (aquosa e orgânica). A fase orgânica (éter de petróleo contendo clorofila) foi lavada com água destilada e solução aquosa saturada de NaCl por 3 vezes e então, rotaevaporada a temperatura ambiente (25 °C) com baixa luminosidade por aproximadamente 10 min, com uma pressão de 650 mmHg a 75 rpm com o auxílio de um rotaevaporador (IKA[®] RV 10 basic.) obtendo um volume final de 1,5 mL de solução de clorofila.

A separação dos pigmentos foi através do método adaptado utilizando uma coluna cromatográfica que foi empacotada com sílica gel 60 (60-230 mesh, Vetec[®]) e com Tulueno P.A., a proporção de extrato (rotaevaporado) sílica na coluna foi de 1:30 (m/m) e inicialmente foi eluída com o mesmo solvente utilizado para o empacotamento para remover as bandas com coloração amarelada ricas em carotenóides.^{41, 42} Posteriormente eluiu-se com metanol para obter a fração verde correspondente à Clorofila isolada conforme apresenta a Figura 9.

Figura 9 - Coluna cromatográfica durante o processo de isolamento da Clorofila.



A preparação da Feofitina ocorreu com a adição de 50 µL de solução 2 mol.L⁻¹ de HCl à uma alíquota de 10 mL de solução de Clorofila em metanol, sendo que o pH da solução de Feofitina (pH ≈ 2) foi neutralizado com a adição de alíquotas de solução aquosa 2 mol.L⁻¹ de

NaOH. Paralelamente, foi realizado um experimento onde se variou o pH de uma solução tampão (de McIlvaine). Foi adicionada solução de Clorofila a alíquotas desta solução tampão, para o monitoramento da desmetalção da clorofila e formação da feofitina, as soluções em cada alíquota foram analisadas por Absorção UV-Vis conforme descrito na literatura.³²

A determinação da concentração das espécies Clorofila e Extrato Bruto, foi por meio dos espectros de absorção molecular de cada espécie, ajustando o teor de clorofilas totais [*Chl a + b*] baseando-se no método de Arnon adaptado por Porra, 2002,⁴³ para extração metanólica, descrito pela Equação 4:

$$[Chl\ a + b] = 24,23\ A^{652} + 3,26\ A^{665} \quad \text{Equação 4}$$

onde A^{652} e A^{665} é a absorbância em 652 e 665 nm respectivamente, as constantes 24,23 e 3,26 são os coeficientes de extinção específica da clorofila nos comprimentos de onda 652 e 665nm, respectivamente. Já para a Feofitina, determinou-se a concentração a partir da Clorofila.

3.4 Identificação dos Pigmentos

Utilizou-se o Espectrofotômetro de Absorção portátil (USB 4000 FL – OceanOptics®), que tem como detector Toshiba TCD1304AP Linear CCD array, com lâmpada de Tungstênio. As medidas de absorção foram realizadas de 350 a 800 nm, usando cubeta de duas faces polidas de 1,0 cm de caminho óptico. Para a determinação de seus espectros, as amostras foram preparadas nas concentrações de $\approx 10,70\ \mu\text{M}$ para o Extrato Bruto, a Clorofila e a Feofitina, e $328,10\ \mu\text{M}$ para os Carotenóides totais.

Para as medidas de fluorescência sincronizada foi utilizado o Espectrômetro de Fluorescência Molecular (Varian® Cary 50). As amostras foram colocadas em uma cubeta de quartzo com quatro faces polidas de 1 cm de caminho óptico. Os mapas 3D de emissão foram obtidos excitando entre 250 e 600nm e monitorando a emissão de 260 a 800 nm. As concentrações das espécies moleculares foram às mesmas utilizadas nas medidas de Absorção Molecular UV-Vis.

Utilizou-se um Espectrômetro de Infravermelho (JASCO® FT-IR 4100) com nitrogênio como gás de purga e pastilhas de KBr contendo as amostras (previamente rotaevaporadas) em Éter de petróleo (Vetec). Varredura de $4000\text{ a }400\text{ cm}^{-1}$ e resolução de 2,0

cm⁻¹, para a obtenção dos espectros das amostras de pigmentos.

3.5 Avaliação em função da concentração e dimensão das AuNPs

Para o estudo da interação nanopartículas-pigmento em função da concentração e diâmetro das nanopartículas, foram preparadas soluções aquosas de nanopartículas com diferentes concentrações de Au. Foram adicionadas às soluções de AuNP um volume fixo de solução metanólica dos pigmentos extraídos, sendo que a concentração final dos pigmentos manteve-se fixa em 0,50 µM e 6,71 x10⁻⁴ M para o β-caroteno (Sigma-Aldrich® ≥ 93%) e as de ouro mantiveram-se em (0,3; 0,6; 1,20; 2,41; 4,83; 9,65; 19,31; 38,63; 77,25; 154,51 µM). Tais soluções foram preparadas separadamente para cada diâmetro de AuNP e tipo de pigmento (Extrato Bruto, Clorofila, Feofitina e β-caroteno).

Após o preparo foram realizadas medidas de Absorção UV-Vis e Fluorescência em um Fluorímetro portátil constituído de dois lasers, 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 dos espectros que variaram de 350 a 800 nm.

3.6 Avaliação da interação AuNPs – Clorofila/Feofitina (efeito do Mg²⁺)

3.6.1 Estudo temporal por Absorção UV-Vis

Foi realizada análise da interação AuNP (5 nm) com a Clorofila e Feofitina adicionando um volume fixo de solução metanólica de cada molécula em um volume fixo de solução de nanopartícula, onde a concentração final de Au permaneceu constante em 4,20 µM e 0,50 µM para a Clorofila e Feofitina, respectivamente. Foram coletados espectros de absorção UV-Vis das amostras de 10 em 10 s durante 1 h.

3.6.2 Estudo temporal por Fluorescência

Foi realizada uma análise da interação AuNPs-Clorofila/Feofitina em função do tempo, durante 1 hora. A interação das nanopartículas com a Clorofila e a Feofitina (separadamente) foi feita adicionando um volume fixo de solução aquosa de AuNP (5 nm) em um determinado volume de cada espécie (Chl e Pheo), onde a concentração de Au permaneceu constante (4,20 µM) e variou-se as concentrações de cada espécie: 0,25; 0,50; 0,75; 1,0 e 1,25 µM. Os espectros das amostras foram obtidos de 10 em 10 s.

Para a avaliação em função do diâmetro das AuNPs foi realizada análise da interação

AuNP com a Clorofila e Feofitina o adicionando um volume fixo de solução metanólica de cada molécula em um volume fixo de solução de AuNP (5, 10 e 20 nm), separadamente, onde a concentração final de Au permaneceu constante em 4,20 μM e 0,50 μM para a Clorofila e Feofitina, respectivamente. Foram coletados espectros das amostras de 10 em 10 s durante 1h.

3.6.3 Medidas de tempo de vida de luminescência

As medidas de fluorescência resolvida no tempo, para o estudo do tempo de vida no estado excitado de amostras de Clorofila e Feofitina na presença de nanopartículas de ouro de 5, 10 e 20 nm, foram realizadas utilizando um Microscópio Confocal Multifóton LSM 780 Zeiss equipado com Sistema Picoquant Fluortime 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 fentossegundos com repetição em 80 MHz. As medidas foram tomadas no comprimento de onda de 673 nm com excitação por um fóton em 400 nm. As amostras foram preparadas da mesma forma que no experimento em função do tempo e dimensão das AuNPs (seção 3.6.2).

3.7 Interação AuNPs - β -caroteno

3.7.1 Avaliação em função da concentração e dimensão das AuNPs

Para o estudo da interação nanopartículas – β -caroteno (Sigma-Aldrich[®] $\geq 93\%$) em função da concentração e diâmetro das nanopartículas, foram preparadas soluções aquosas de nanopartículas com diferentes concentrações de Au (0,3; 0,6; 1,20; 2,41; 4,83; 9,65; 19,31; 38,63; 77,25; 154,51 μM). Foram adicionadas às soluções de AuNP um volume fixo de solução metanólica do pigmento mantendo a concentração do carotenóide fixa em $6,71 \times 10^{-4}$ M. Tais soluções foram preparadas separadamente para cada diâmetro de AuNP. As amostras foram monitoradas por Absorção Molecular UV-Vis e Fluorescência com excitação em 405 nm.

3.7.2 Avaliação temporal em função da dimensão das AuNPs

Para a avaliação em função do diâmetro das AuNPs foi realizada análise da interação AuNP com o β -caroteno adicionando um volume fixo de solução metanólica do pigmento em

um volume fixo de solução de AuNP (5, 10 e 20 nm), separadamente, onde a concentração final de Au permaneceu constante em 4,20 μM e $6,71 \times 10^{-4}$ M para o carotenóide. Foram obtidos espectros das amostras de 10 em 10 s durante 1 h.

CAPÍTULO IV

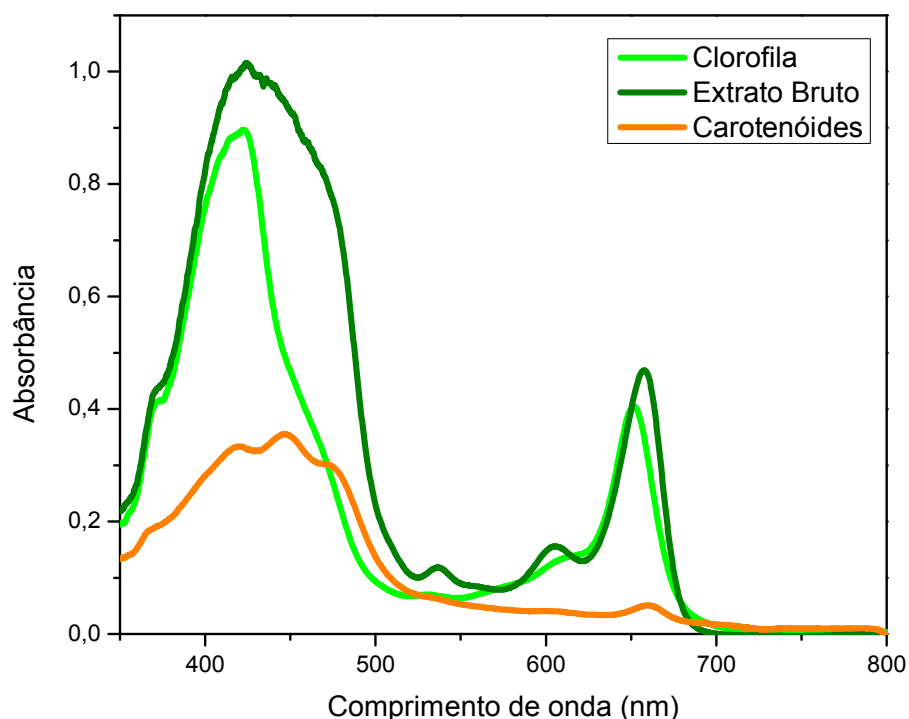
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Obtenção das amostras

4.1.1 Extrato Bruto, Clorofila e Feofitina

Uma vez que cada pigmento apresenta espectro de absorção característico na região UV-Vis, a Figura 10 apresenta os espectros do Extrato Bruto, Carotenóides totais e Clorofila obtidos a partir do extrato da *Vicia faba* por coluna cromatográfica

Figura 10 - Espectros de Absorção UV-Vis das espécies em solução metanólica 10,68 μM para o Extrato Bruto e a Clorofila e 328,10 μM para os carotenóides totais.



De acordo com os espectros apresentados na Figura 10, as espécies obtidas apresentam comportamento de absorbância conforme encontrado na literatura, uma vez que é possível a identificação da Clorofila praticamente livre de carotenóides, após a separação a partir do extrato bruto, sendo que esta apresenta espectro ligeiramente mais estreito na região de 450 nm. Para o espectro referente aos carotenóides totais o comportamento espectral indica evidências da presença predominante do β -caroteno apresentando bandas características em 420, 447 e 473 nm,^{44, 45, 46} enquanto que para o espectro do Extrato Bruto há um significativo

alargamento na região de 350 á 500 nm, devido principalmente a sobreposição das bandas de absorção das clorofilas e carotenóides, os principais pigmentos extraídos da planta.

A partir da Clorofila isolada, na Figura 11 e 12 identifica-se a formação da Feofitina, obtendo assim um composto porfirínico na forma base livre, ou seja, sem a presença do Mg no centro porfirínico da molécula, no qual pode-se constatar a mudança característica de coloração entre as espécies obtidas e, os espectros de absorção UV-Vis das mesmas moléculas, ⁴⁰ respectivamente.

Figura 11 – Soluções metanólicas da Clorofila (A) e Feofitina (B).

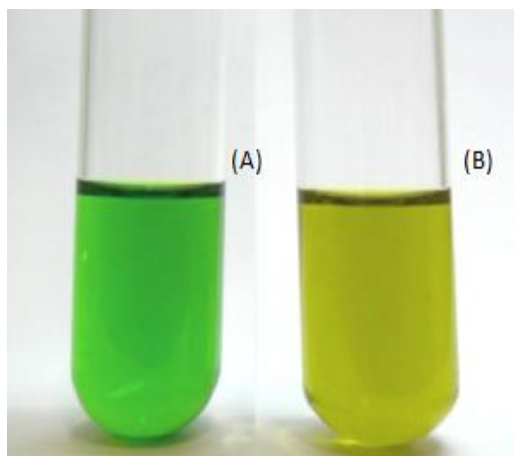
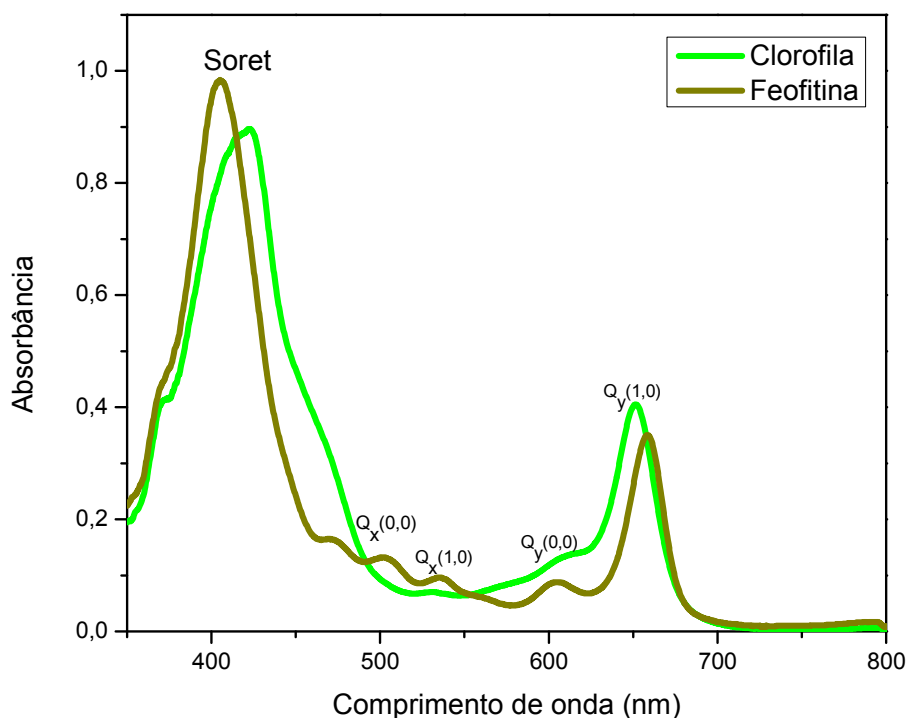


Figura 12 - Espectros de Absorção UV-Vis das espécies em solução metanólica 10,68 μM para a Clorofila e Feofitina.

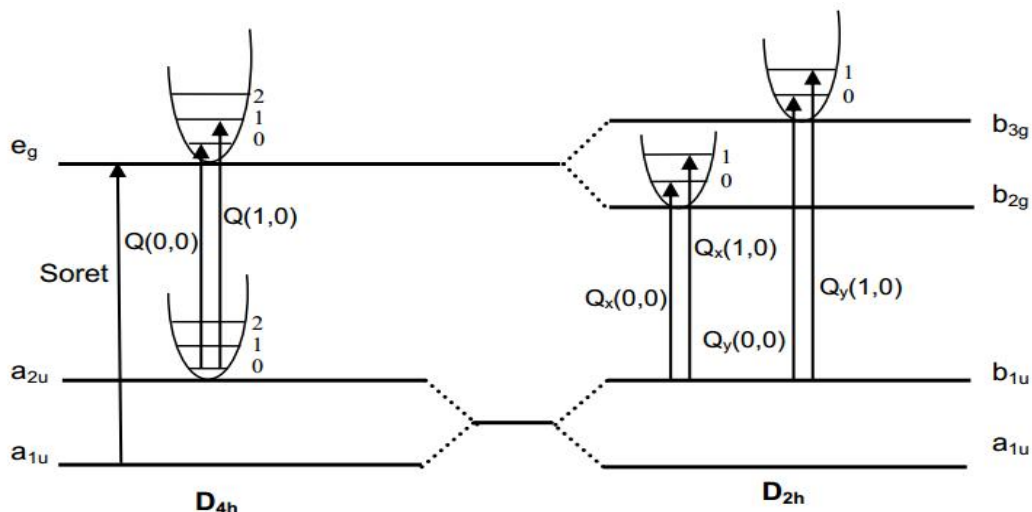


Segundo Gouterman ⁴⁷ o espectro de compostos porfirínicos de base livre, no caso a Feofitina, apresentam cinco bandas de absorção UV-Vis características, o que está coerente com os resultados obtidos. Com maior intensidade, a banda de Soret, possui máximo de absorção entre 390 e 440 nm, enquanto que as demais bandas apresentam máximo de absorção na região entre 500 e 650 nm. Estas bandas genericamente denominadas bandas Q e, mais precisamente chamadas de $Q_{x(0,0)}$, $Q_{x(1,0)}$, $Q_{y(0,0)}$ e $Q_{y(1,0)}$. Tais bandas são provenientes de transições entre dois orbitais π Homo e dois orbitais π^* Lumo, de forma que a identidade do centro metálico e os substituintes do anel afetam a energia dessas transições. ⁴⁰

No caso da Clorofila, com a presença de um centro metálico dentro do anel porfirínico, há um aumento da simetria (D_{4h}) e o desaparecimento de duas bandas Q. O modelo assume que os orbitais Homo $a_{1u}(\pi)$ e $a_{2u}(\pi)$ estão completamente preenchidos e os orbitais Lumo $e_g(\pi^*)$ estão desocupados sendo a banda Soret correspondente a uma transição $a_{1u} \rightarrow e_g$ e as bandas Q, para a simetria D_{4h} , referente às transições do orbital a_{2u} para os níveis vibracionais 0 e 1 do orbital excitado e_g . Por sua vez, com a desmetalização há diminuição da simetria (porfirina base livre – D_{2h}) e o desdobramento $a_{2u} \rightarrow e_g$ em suas componentes nas direções y e x e o aparecimento de quatro bandas Q formadas pelas transições $b_{1u} \rightarrow b_{3g}$ e $b_{1u} \rightarrow b_{2g}$,

conforme apresentado na Figura 13.^{48, 49}

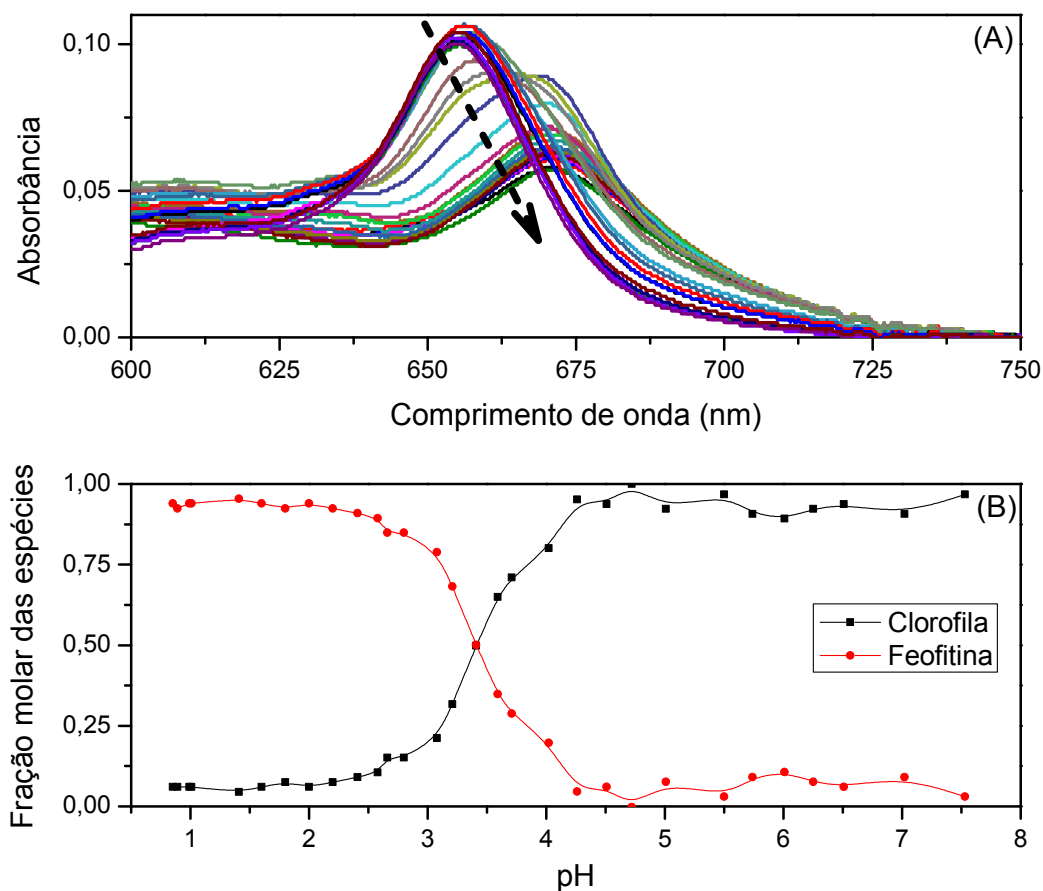
Figura 13 - Transições eletrônicas nas porfirinas metaladas (simetria D_{4h}) e de bases livres (simetria D_{2h}).⁴⁸



4.1.2 Avaliação do processo de desmetalção da Clorofila em função do pH

Como análise complementar, foi realizado o estudo da variação do pH para formação da Feofitina a partir da Clorofila, que por sua vez está apresentada na Figura 14. Desta forma, na Figura 14-A têm-se os espectros obtidos de alíquotas contendo inicialmente Clorofila 3,02 μM em diferentes pHs, onde é possível observar a diminuição da banda (656 nm) além de deslocamentos para comprimentos maiores a medida que variou-se o pH do meio.

Figura 14 - Em (A), os espectros de absorvância da titulação espectrofotométrica da desmetalização da Clorofila e formação Feofitina e, em (B), concentração relativa das espécies versus pH normalizados em solução etanólica 90% (v/v).



A partir das intensidades em 656 nm dos espectros de absorvância e da concentração inicial de Clorofila determinou-se a concentração de Feofitina que se formava à medida que se diminuía a intensidade da banda e, pela diferença do número de mols inicial e final da Clorofila, calculou-se os valores de fração molar das espécies em função o valor de pH. A Figura 14-B, determina que para valores de pHs acima de 4,2 tem-se predominância de Clorofila, e à medida que o pH diminui, abaixo de 2,5, têm-se a predominância da Feofitina.

32

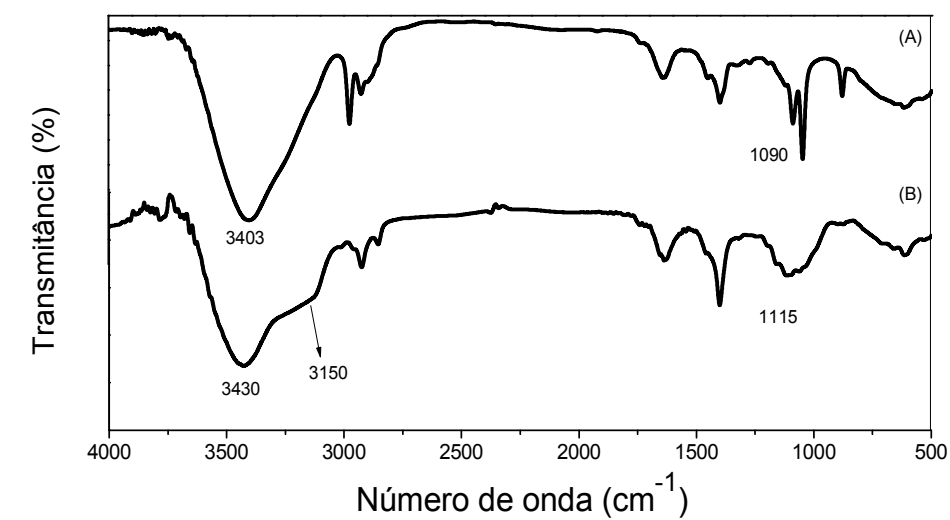
4.1.3 Caracterização da Clorofila e Feofitina por FTIR

Para as caracterizações por espectroscopia de Infravermelho foram realizadas medidas a partir da técnica de FTIR, na Figura 15 apresentando os espectros das espécies Clorofila e Feofitina, sendo possível observar um sinal na região de 3150 cm^{-1} no espectro da Feofitina

que, de acordo com a literatura,^{50, 51} pode-se atribuir ao estiramento NH no anel pirrólico com deformação axial N-H em aminas.⁵²

É possível identificar ainda um deslocamento para frequências maiores (3431 cm^{-1}) no espectro de da Feofitina quando comparado com o da Clorofila (3406 cm^{-1}), resultado em concordância com a literatura sugerindo a presença de águas de coordenação,⁵³ pode-se associar este deslocamento à ausência do átomo de Magnésio na estrutura molecular da Feofitina ocasionando uma maior relaxação no centro porfirínico da molécula.⁵⁴ Observando ainda na região possivelmente correspondente a vibração C-N,⁵⁵ também se pode notar um ligeiro deslocamento para frequências maiores no espectro da Feofitina (1115 cm^{-1}) em relação ao espectro da Clorofila (1090 cm^{-1}), da mesma forma, tal deslocamento pode estar relacionado com a ausência do metal na Feofitina o que permite uma vibração com maior frequência para tal ligação química.

Figura 15 - Espectros de infravermelho das espécies Clorofila (A) e Feofitina (B) em pastilhas de KBr.



4.2 Absorção UV-Vis: Avaliação em função da concentração e dimensão das AuNPs

As Figuras 16 a 18 apresentam os espectros de absorção UV-Vis das espécies Extrato Bruto, Clorofila e Feofitina, respectivamente, contendo Nanopartículas de Ouro (AuNP) em diferentes concentrações e nos diâmetros de 5, 10 e 20 nm. De forma geral, a partir da adição das AuNPs pode-se observar a presença significativa da banda de ressonância de plasmon na região de 500 a 550 nm.¹⁵ Foi determinado que as nanopartículas induziram um aumento na intensidade da absorbância na região da banda de Soret nos pigmentos (350 e 400 nm), uma

vez que as nanopartículas também apresentam absorção nesta região do espectro, conforme apresentado na Figura 19, com os espectros de absorção molecular de soluções de AuNP de 5, 10 e 20 nm mesmas condições das amostras contendo as moléculas porfirínicas.

Figura 16 - Espectros de absorção molecular UV-Vis das amostras constituídas de Extrato Bruto (0,50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) e AuNP de 5, 10 e 20 nm em (A), (B) e (C), respectivamente.

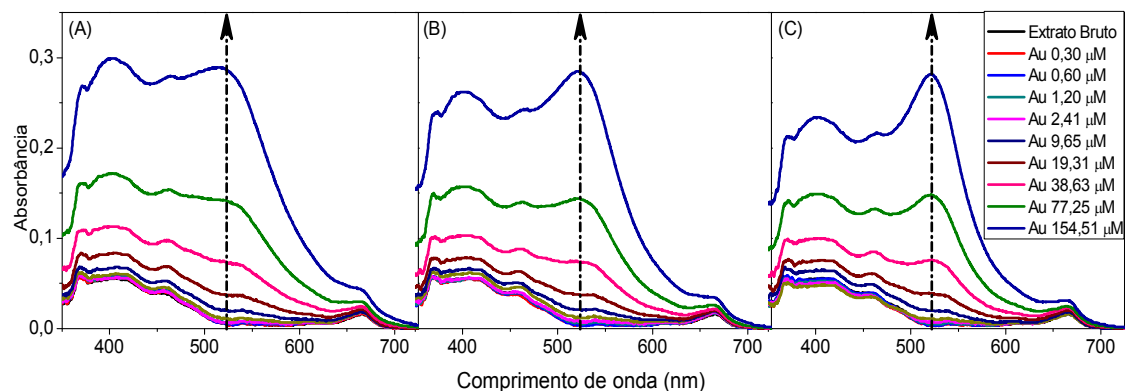


Figura 17 - Espectros de absorção molecular UV-Vis das amostras constituídas de Clorofila (0,50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) e AuNP de 5, 10 e 20 nm em (A), (B) e (C), respectivamente.

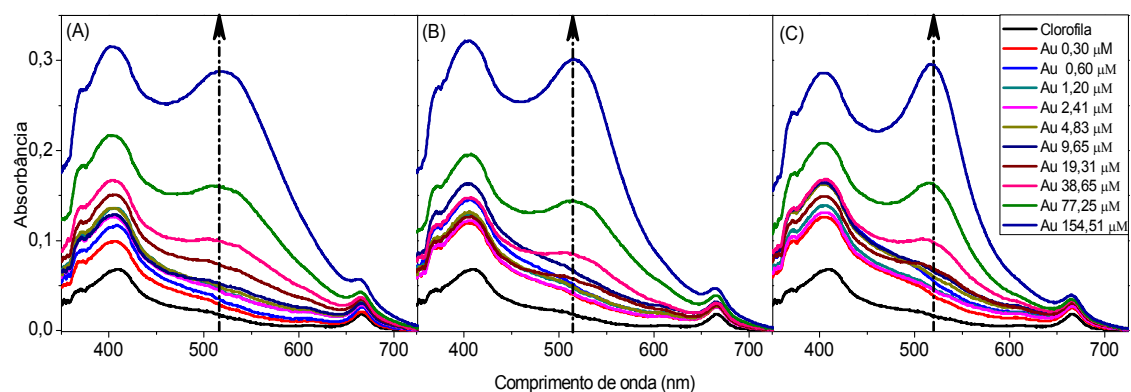


Figura 18 - Espectros de absorção molecular UV-Vis das amostras constituídas de Feofitina (0,50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) e AuNP de 5, 10 e 20 nm em (A), (B) e (C), respectivamente.

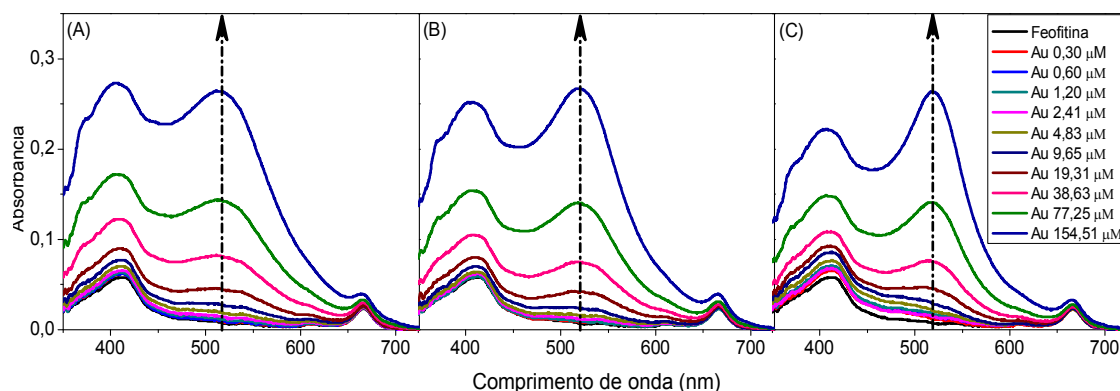
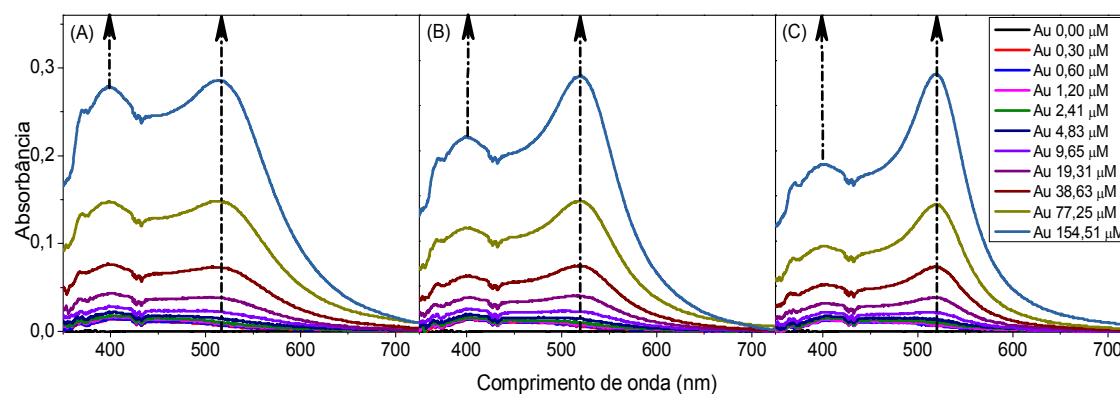
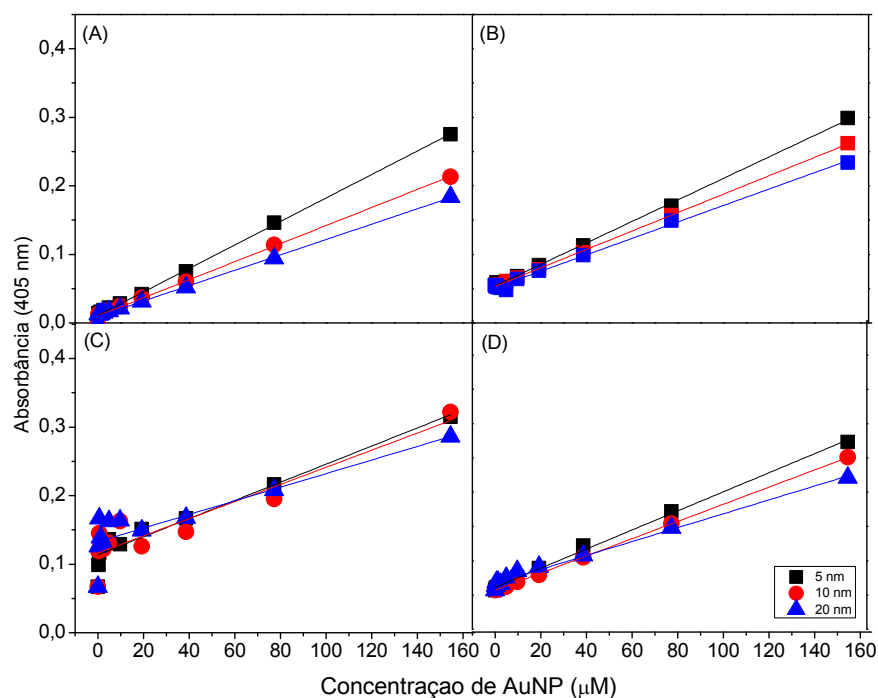


Figura 19 - Espectros de absorção molecular UV-Vis das amostras constituídas apenas de AuNPs de 5, 10 e 20 nm em (A), (B) e (C), respectivamente.



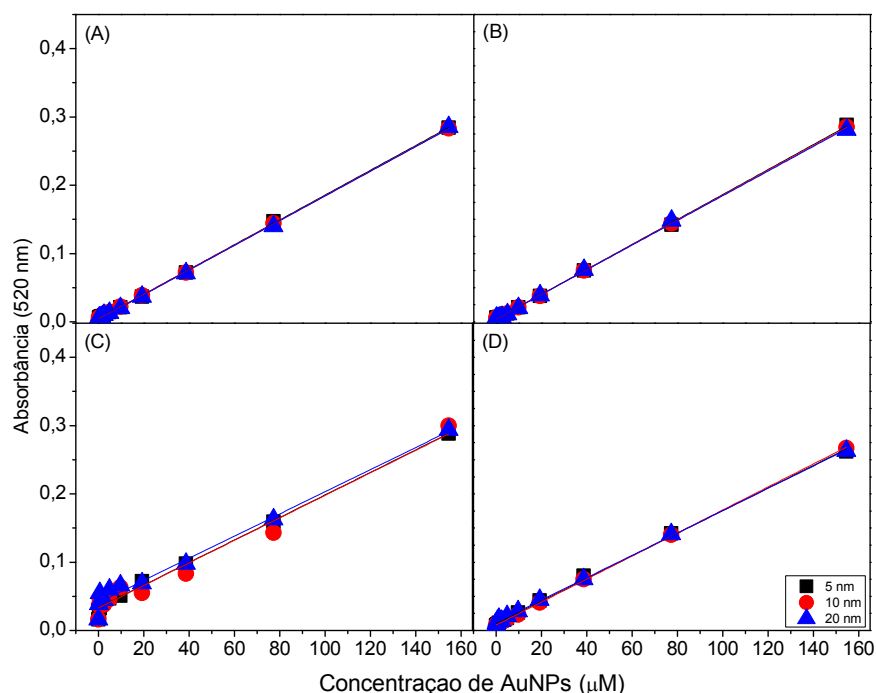
A partir dos espectros obtidos nas figuras anteriores, obteve-se a Figura 20 que ilustra os gráficos de absorbância em 405 nm *versus* concentração de AuNP, podendo observar possíveis efeitos relacionados as dimensões das nanopartículas e, neste caso, principalmente nos gráficos referente ao Extrato Bruto e Feofitina há uma tendência de inclinação das retas em função da dimensão das nanopartículas. Tal efeito pode ser justificado pelo fato de que a absorção das próprias nanopartículas nesta região é menor à medida que se aumenta o diâmetro, conforme apresentado na Figura 19, fato este comprovado quando analisado a intensidade de absorbância das amostras de AuNPs puras conforme a Fig. 20 – A, onde há comportamento e inclinação semelhante ao das amostras contendo as moléculas analisadas.

Figura 20 - Gráficos dos valores de Absorbância em 405 nm das espécies (A) AuNPs, (B) Extrato Bruto, (C) Clorofila e (D) Feofitina em função da concentração de AuNP.



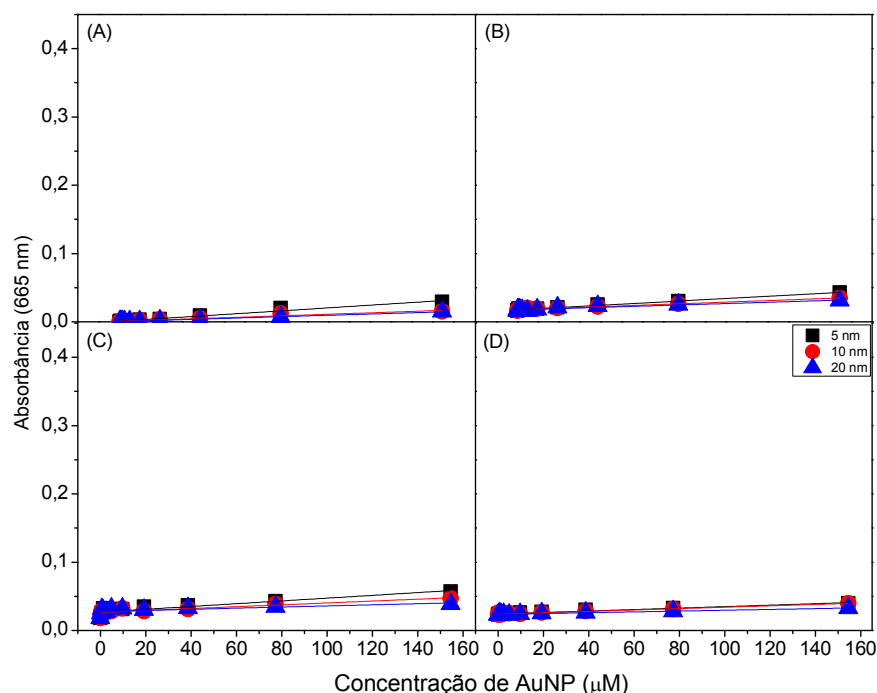
A Figura 21 apresenta os gráficos dos valores de intensidade de ABS em 520 nm (banda de ressonância plasmônica) das amostras em função da concentração e dimensão de AuNP. No intervalo de 520 nm também houve um aumento linear na intensidade de absorvância em função da concentração de AuNPs. No entanto, os gráficos demonstram que os valores de intensidade de absorvância não apresentaram diferença significativa em função da dimensão das AuNPs.

Figura 21 - Gráficos dos valores de Absorbância em 520 nm das espécies (A) AuNPs, (B) Extrato Bruto, (C) Clorofila e (D) Feofitina em função da concentração de AuNP.



A Figura 22 apresenta uma análise das intensidades de absorbância em 665 nm, região esta atribuída as bandas Q $Q_{y(1,0)}$, em função da concentração de ouro nas mesmas amostras. Nota-se que há uma tendência de linearidade nos valores de ABS e, conseqüentemente, observa-se uma ligeira inclinação nas retas, inclusive para as amostras constituídas apenas de AuNPs que pode estar relacionado ao efeito de espalhamento proveniente da banda de ressonância de plasmon em 520 nm. Entretanto, quando comparado com os gráficos apresentados nas Figuras 20 e 21, confere-se que o comportamento é quase constante, sugerindo que a presença das AuNPs nas amostras contendo os pigmentos não influencia de forma significativa na absorção característica exclusivamente dos pigmentos.

Figura 22 - Gráficos dos valores de Absorbância em 665 nm das espécies (A) AuNPs, (B) Extrato Bruto, (C) Clorofila e (D) Feofitina em função da concentração de AuNP.



A partir das análises realizadas por absorção UV-Vis pôde-se observar que, de um modo geral, não há variação no comportamento de absorção das amostras estudadas, quando analisada a região da ressonância plasmônica dos espectros (500 – 550 nm) deixando clara a informação de que os átomos de ouro continuam estabilizados na forma de nanopartículas. No entanto, é evidente que a presença das AuNPs contribuem para um aumento na intensidade de absorbância das bandas características dos próprios pigmentos na região próximo de 400 nm, efeito este significativamente menos observado na região onde há absorção exclusivamente característica do próprio pigmento (banda $Q_{Y(1,0)}$).

4.3 Espectroscopia de Emissão Molecular Fluorescência

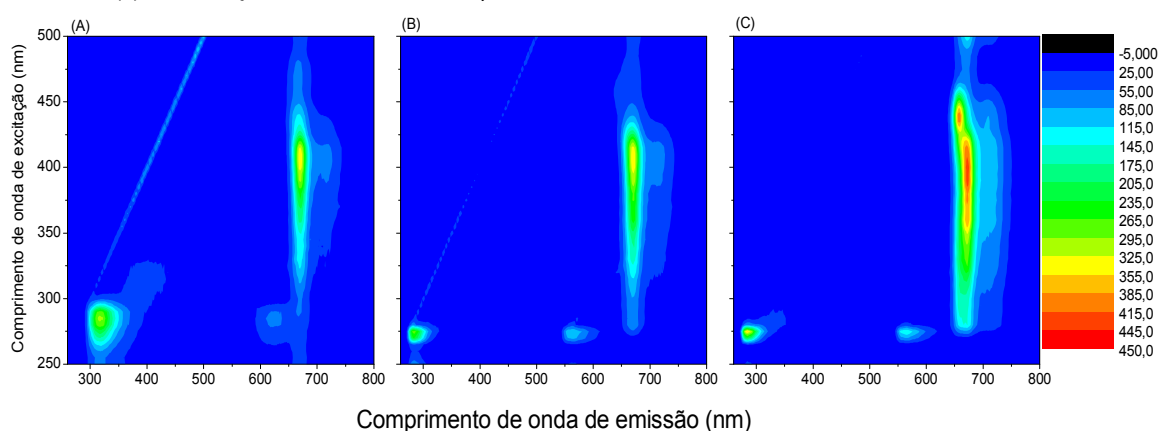
4.3.1 Mapas de emissão em 3D

Para uma avaliação global da emissão por fluorescência das amostras, os mapas de emissão 3D foram obtidos para os pigmentos diluídos em solução metanólica a 10,70 μM para o Extrato Bruto, Clorofila e Feofitina. Como mostra a Figura 23, é possível observar que o comportamento da emissão do Extrato Bruto (a), Clorofila (b) e Feofitina (c) são bastante semelhantes entre si, apresentando a emissão característica de moléculas porfirínicas que,

neste caso, é predominante nas três espécies.

No caso do extrato bruto foi possível identificar um sinal de fluorescência mais evidente em torno de 450 nm quando excitado em 300-350 nm, o que indica a contribuição de emissão possivelmente devido à presença de carotenóides totais.⁵⁶ A Feofitina apresentou uma emissão mais intensa na região de 675 nm com excitação entre 350 e 450 nm quando comparado a Clorofila nos mesmos parâmetros de concentração, o que pode ser justificado com a maior intensidade de absorbância na banda de Soret para a molécula desmetalada.⁵⁷

Figura 23 - Mapas de emissão por fluorescência 3D das espécies: Extrato Bruto (a), Clorofila (b), Feofitina (c) em solução metanólica 10,70 μ M.



4.3.2 Avaliação em função da concentração e dimensão das AuNPs

Da mesma forma que nas análises de absorção UV-Vis, foram determinados os espectros de Fluorescência dos pigmentos em função do diâmetro e da concentração de AuNP, conforme apresentado nas Figuras 24, 25 e 26 (com excitação em 405 nm) e nas Figuras 27, 28 e 29 (com excitação em 532 nm), para o Extrato Bruto, Clorofila e Feofitina, respectivamente. Ao analisar os espectros, de forma geral, não se observou deslocamento significativo das bandas de emissão na presença de AuNP apresentando fluorescência característica na região de 660 a 710 nm.^{56, 57, 58}

Figura 24 - Espectros de Fluorescência obtidos com uma excitação em 405 nm do Extrato Bruto (0,50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) e AuNP com diâmetros de: (A) 5 nm; (B) 10 nm e (C) 20 nm.

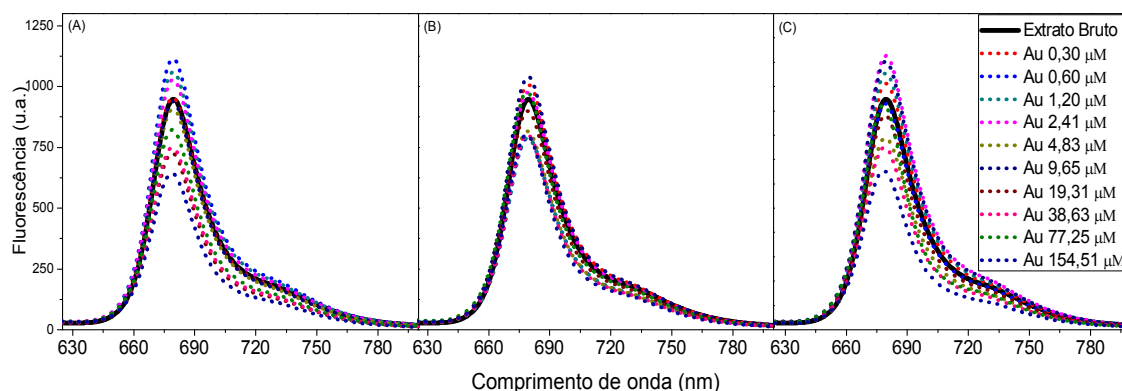


Figura 25 - Espectros de Fluorescência obtidos com uma excitação em 405 nm da Clorofila (0,50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) e AuNP com diâmetros de: (A) 5 nm; (B) 10 nm; e (C) 20 nm.

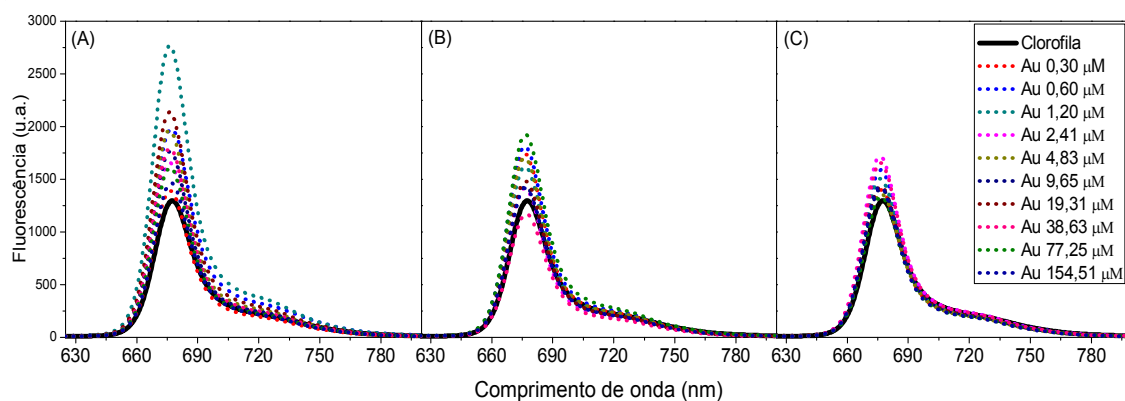
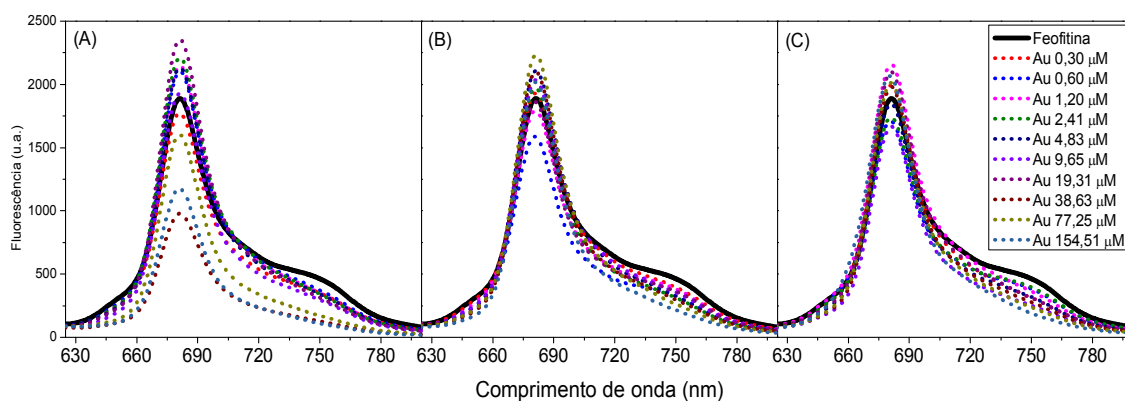


Figura 26 - Espectros de Fluorescência obtidos com uma excitação em 405 nm da Feofitina (0,50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) e AuNP com diâmetros de: (A) 5 nm; (B) 10 nm; e (C) 20 nm.



Os espectros de fluorescência das amostras constituídas de Extrato Bruto e AuNP (Figura 24) nota-se que não houve variação significativa no comportamento dos espectros em função da dimensão das nanopartículas. No entanto para baixas concentrações do

nanomaterial, nota-se uma tendência de aumento no sinal de fluorescência da clorofila presente no Extrato e, para maiores concentrações nota-se que as nanopartículas induziram uma supressão da fluorescência, efeito este conhecido como *quenching*,²⁴ também observado quando as moléculas foram excitadas em 532 nm (Figura 27).

Quando analisado os espectros da Clorofila isolada, não é possível observar efeito de supressão relacionado às amostras controle quando excitadas em 405 e nem em 532 nm (Figura 28), ou seja, mesmo para as maiores concentrações de AuNPs, apenas nota-se o aumento significativo da intensidade de fluorescência, tal comportamento se repete para as três dimensões de nanopartículas (5, 10 e 20 nm) destacando-se mais para as nanopartículas de menor dimensão.

Já para as amostras contendo Feofitina, observa-se um possível efeito da dimensão das AuNPs quando excitadas em 405 nm, é possível identificar uma supressão na intensidade de fluorescência em 678 e em 750 nm mais evidente para as amostras contendo nanopartículas de 5 nm para as mais altas concentrações do nanomaterial. De forma mais evidente, quando excitado em 532 nm, é possível identificar uma supressão bem definida para todas as amostras contendo nanopartículas com relação à amostra controle como mostra a Fig. 29, tal efeito tem ocorrido de forma semelhante para todos os tamanhos da AuNP.

Figura 27 - Espectros de Fluorescência obtidos com uma excitação em 532 nm do Extrato Bruto ($0,50 \mu\text{mol.L}^{-1}$) e AuNP com diâmetros de: (A) 5 nm; (B) 10 nm; e (C) 20 nm.

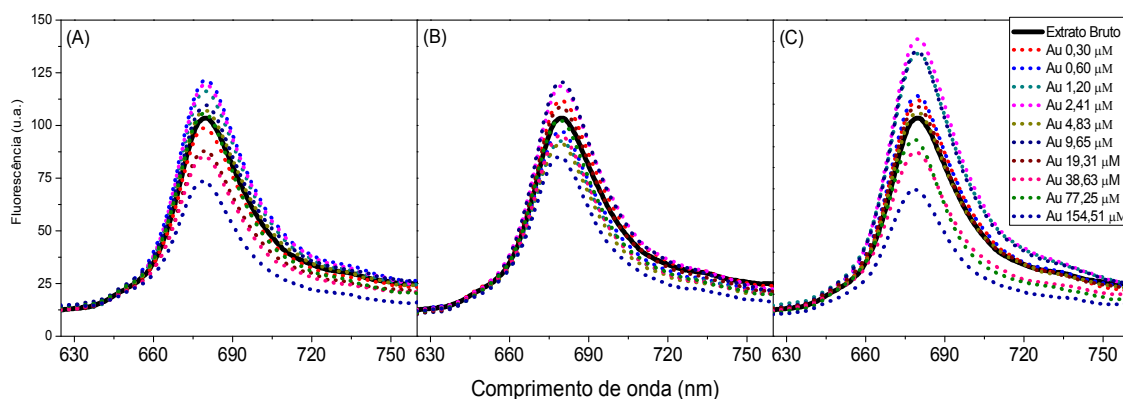


Figura 28 - Espectros de Fluorescência obtidos com uma excitação em 532 nm da Clorofila ($0,50 \mu\text{mol.L}^{-1}$) e AuNP com diâmetros de: (A) 5 nm; (B) 10 nm; e (C) 20 nm.

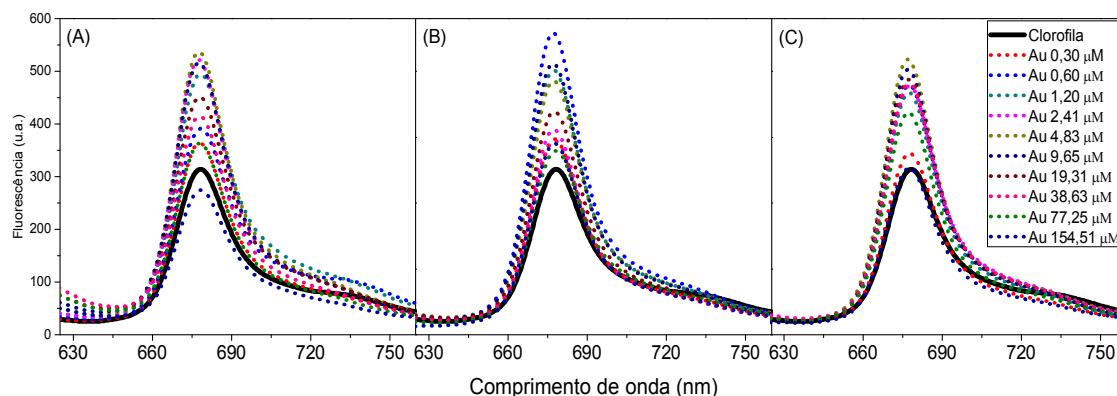
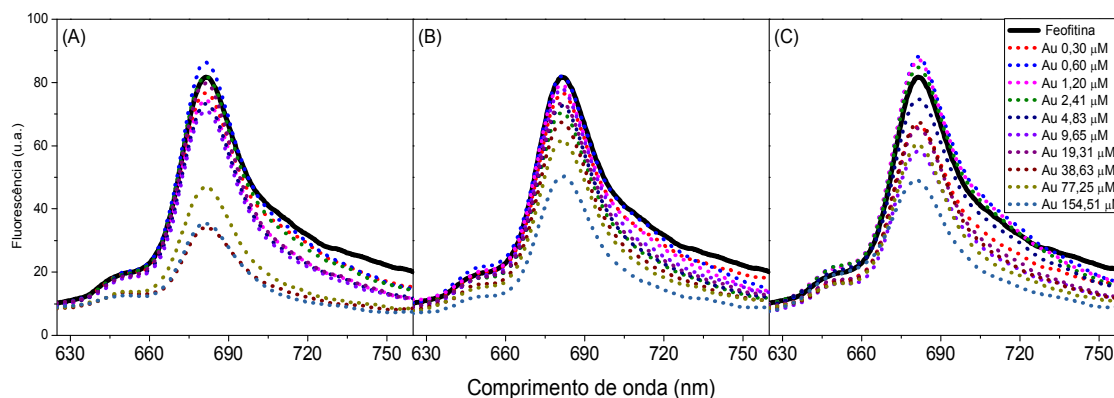


Figura 29 - Espectros de Fluorescência obtidos com uma excitação em 532 nm da Feofitina ($0,50 \mu\text{mol.L}^{-1}$) e AuNP com diâmetros de: (A) 5 nm; (B) 10 nm; e (C) 20 nm.

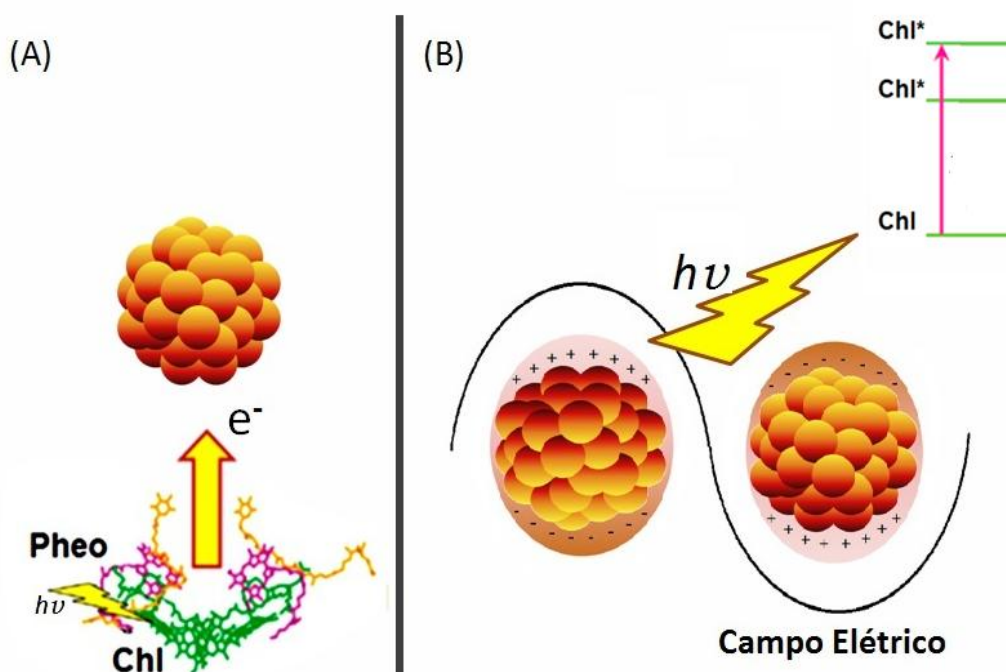


No caso do Extrato Bruto, pelo fato deste apresentar uma mistura de pigmentos (clorofilas, feofitinas, carotenos e xantofilas) é possível que cada pigmento possa apresentar diferente afinidade pelas AuNPs.²⁹ Assim como observado para as amostras contendo Feofitina é provado que as nanopartículas são boas receptoras de elétrons, logo elétrons excitados das moléculas (próximas o suficiente das nanopartículas) podem estar sendo adsorvidos pela superfície metálica do nanomaterial.²⁴ O efeito *quenching* pode ser ilustrado pela Figura 30-A, onde é apresentado um modelo genérico de transferência de elétrons das moléculas excitadas sugerindo impossibilidade do retorno destes elétrons para o estado fundamental e, conseqüentemente, ocorre à supressão do sinal de fluorescência das amostras.

Nanopartículas esféricas de ouro de pequenas dimensões, ao serem irradiadas por um campo elétrico de comprimento de onda e frequência maior que a própria dimensão das partículas, faz com que ocorra a oscilação coletiva dos elétrons na superfície do

nanomaterial.¹⁸ Uma vez que ocorre essa oscilação de cargas, e de acordo com a configuração espacial com que as AuNPs se encontram no meio, pode favorecer a geração de um segundo campo elétrico de intensidade significativamente elevada,^{17, 16, 59} este campo elétrico pode participar da excitação de um número maior de moléculas presentes no meio, neste caso, os pigmentos em questão. Logo, haverá uma quantidade maior de molécula no estado excitado que ao voltar para o estado fundamental, apresentando um maior sinal de emissão fluorescente, conforme apresentado na Figura 30 B.⁶⁰

Figura 30 - Esquema ilustrativo para o efeito de supressão da Fluorescência (A); Esquema ilustrativo para o efeito de aumento da intensidade de Fluorescência (B).



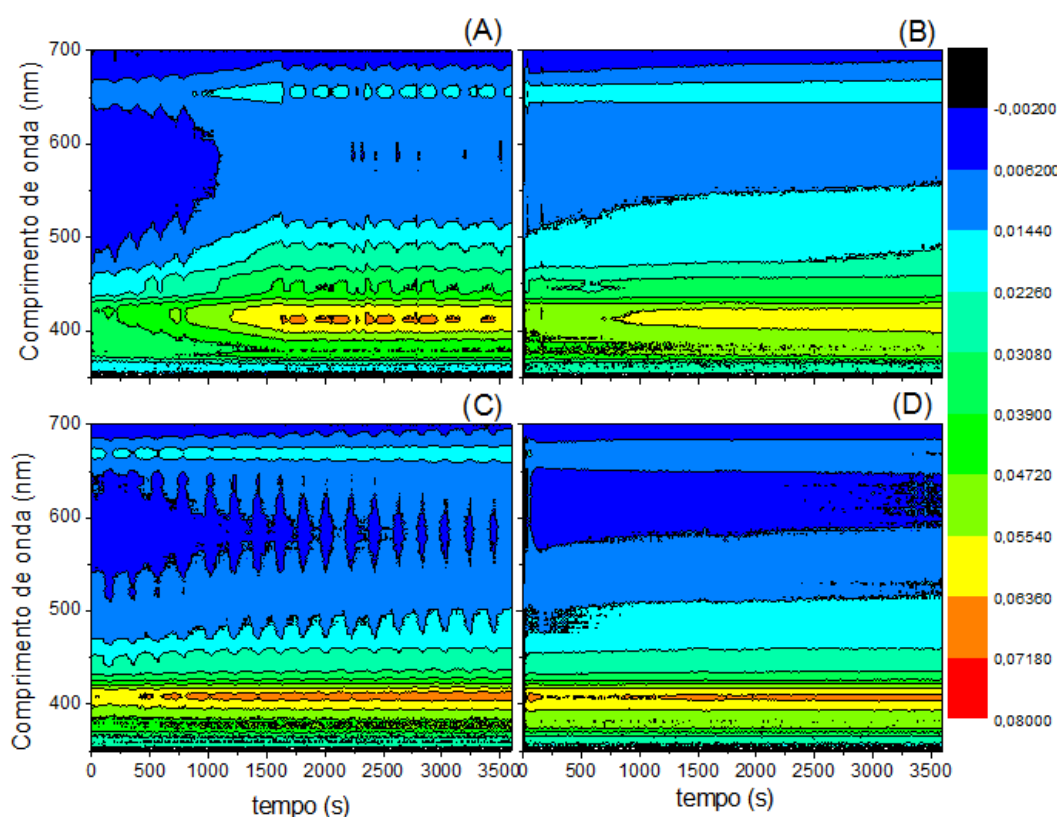
O efeito, possivelmente da ressonância de plasmon, ocorreu preferencialmente para baixas concentrações de AuNP, sugerindo que, no caso de concentrações mais elevada, pode ocorrer possíveis colisões entre as partículas e moléculas presentes no meio, promovendo a perda de energia por processos não radiativos e/ou com a proximidade das moléculas os elétrons que deveriam ser excitados para níveis energéticos superiores, podem ser transferidos para superfície metálica do nanomaterial. Assim não há retorno dos mesmos para os níveis fundamentais e desta forma, obtêm-se um menor sinal de fluorescência.⁶⁰

4.3.3 Interação AuNPs-Clorofila/Feofitina (efeito do Mg^{+2})

4.3.1 Absorção UV-Vis: efeito da presença de AuNP em função do tempo

A Figura 31 apresenta os mapas de absorção em 3D das amostras contendo Clorofila e Feofitina com e sem nanopartículas de ouro no tempo de 1 h. Tal experimento foi realizado com o intuito de avaliar o efeito da interação entre AuNP com as moléculas porfirínicas, uma vez que a única diferença entre tais moléculas é apenas a presença do átomo de Magnésio no centro porfirínico das mesmas.

Figura 31 - Mapas de Absorção UV-Vis das amostras Clorofila (A), AuNP (5 nm) – Clorofila (B), Feofitina (C), AuNP (5 nm) - Feofitina (D).



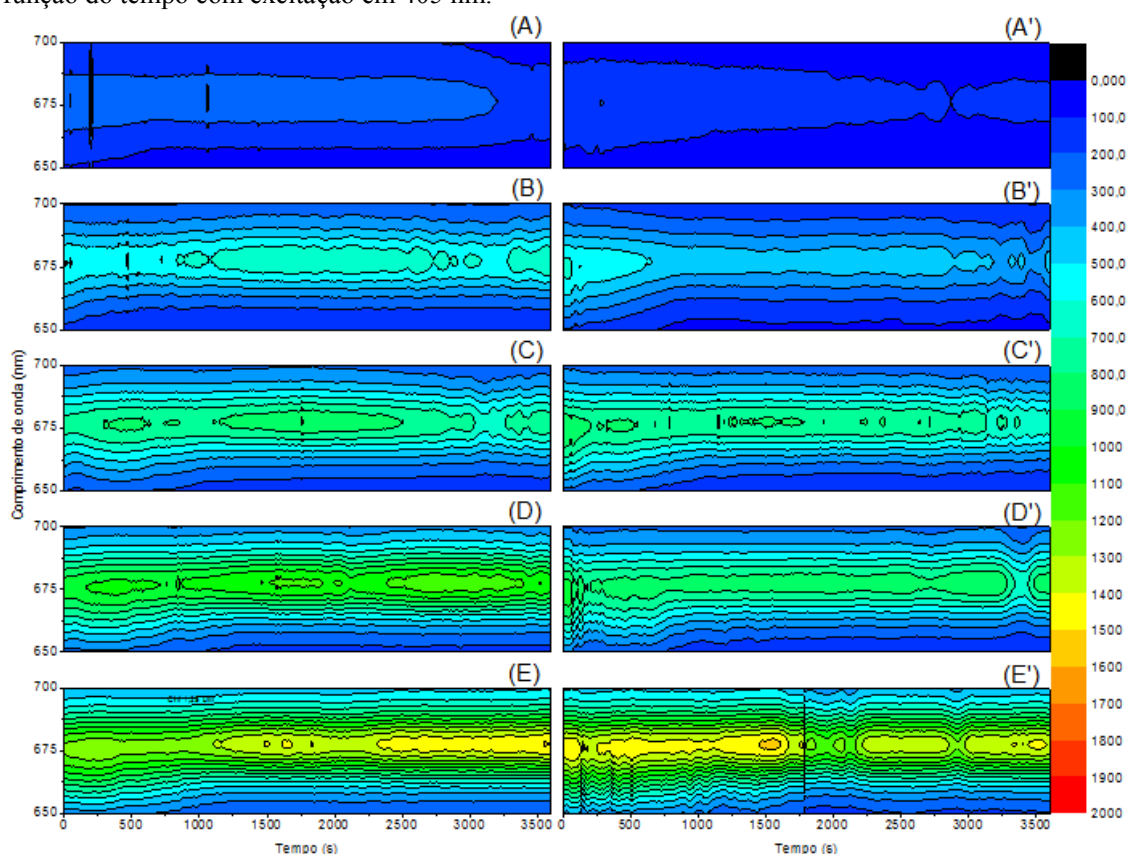
Analisando os mapas de absorção UV-Vis é possível notar um discreto aumento na intensidade de absorbância na região da ressonância plasmônica da AuNP (520 – 530 nm) para as amostras contendo nanopartículas. Já ao analisar as regiões de absorção característica das moléculas (409 – 425 nm), constata-se que para as amostras contendo as NPs observou-se uma ligeira diminuição na intensidade de absorbância com o passar do tempo, sendo este efeito mais evidente para a amostra contendo a Clorofila, sugerindo que tal efeito pode estar atribuído ao fato de a Chl apresentar menor afinidade às nanopartículas e, assim há um maior

número de partículas livres o que favorece o efeito de ressonância plasmônica entre as AuNPs e a Chl pode absorver energia proveniente do campo elétrico gerado e, consequentemente menos energia incidente (da fonte de radiação do equipamento).^{16, 17}

4.3.2 Fluorescência: avaliação temporal função da concentração da Chl e Pheo

Ainda com o objetivo de monitorar possível efeito de interação e/ou degradação dos pigmentos porfirínicos, foram realizadas medidas de Fluorescência com excitação em 405 nm em função do tempo. Na tentativa de analisar possível efeito da presença do Mg^{2+} no centro porfirínico das moléculas dos pigmentos as Figuras 32 e 33 apresentam, respectivamente, os mapas de emissão em 3D da fluorescência das amostras de Clorofila e Feofitina puras e com a adição de nanopartículas em função do tempo e concentração das moléculas.

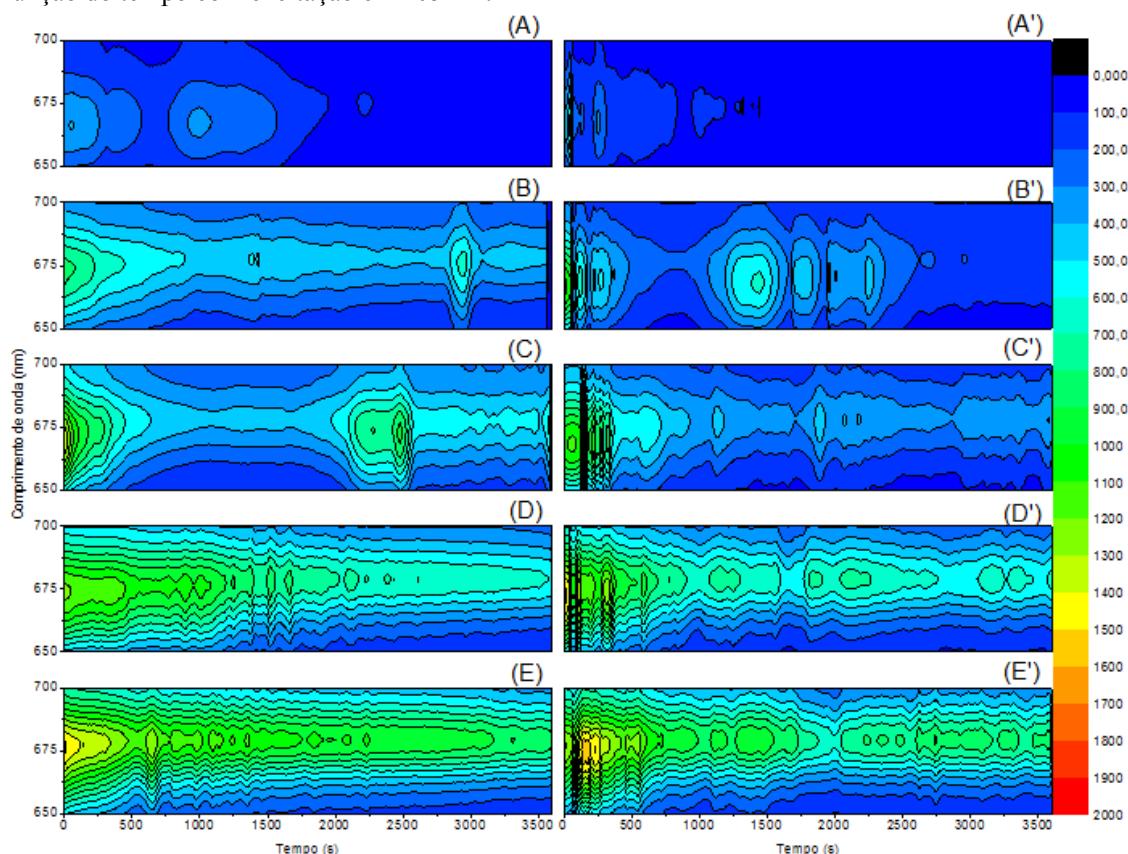
Figura 32 - Mapas de emissão 3D para a Clorofila em diferentes concentrações (A: 0,25; B: 0,50; C: 0,75; D: 1,00 e E: 1,25 μM) sem nanopartículas (SNPs) e com nanopartículas de 5 nm (CNPs) em função do tempo com excitação em 405 nm.



Neste experimento, ao adicionar a solução de AuNP em uma concentração fixa de

cada espécie, notou-se, de forma geral, que para baixas concentrações de Clorofila e Feofitina a presença do nanomaterial favoreceu uma supressão na intensidade de fluorescência das espécies com o passar do tempo, sugerindo uma possível interação entre as partículas e as moléculas de cada pigmento.¹²

Figura 33 - Mapas de emissão 3D para a Feofitina em diferentes concentrações (A: 0,25; B: 0,50; C: 0,75; D: 1,00 e E: 1,25 μM) sem nanopartículas (SNPs) e com nanopartículas de 5 nm (CNPs) em função do tempo com excitação em 405 nm.



Pode-se notar que a Clorofila, apesar de inicialmente não apresentar supressão significativa, neste caso, há uma supressão bem definida com o passar do tempo, principalmente para as concentrações de 0,25 e 0,50 μM e, para a Feofitina houve uma supressão bem mais acentuada, inclusive para as amostras com concentrações a partir de 0,75 μM , levando a crer que a mesma pode apresentar maior afinidade pelas nanopartículas de ouro e consequentemente, a transferência de elétrons excitados para as superfícies metálicas das NPs ocorre mais rapidamente para a porfirina desmetalada.

4.3.3 Fluorescência: avaliação temporal em função do diâmetro das AuNPs

Uma vez comprovada a interação distinta entre as espécies Clorofila e Feofitina, as Figuras 34 e 36 ilustram os espectros 3D de fluorescência com excitação em 405 nm para os mesmos pigmentos sem nanopartículas e com nanopartículas de 5, 10 e 20 nm e, a partir destes, obteve-se o comportamento da intensidade de fluorescência em 670 nm para a Clorofila e 678 nm para a Feofitina em função do tempo como representado nas Figuras 35 e 37.

Figura 34 - Mapas de emissão 3D para a Clorofila (0,5 μ M) (A) e com AuNP (4,20 μ M) de 5, 10 e 20 (B, C, D) em função do tempo.

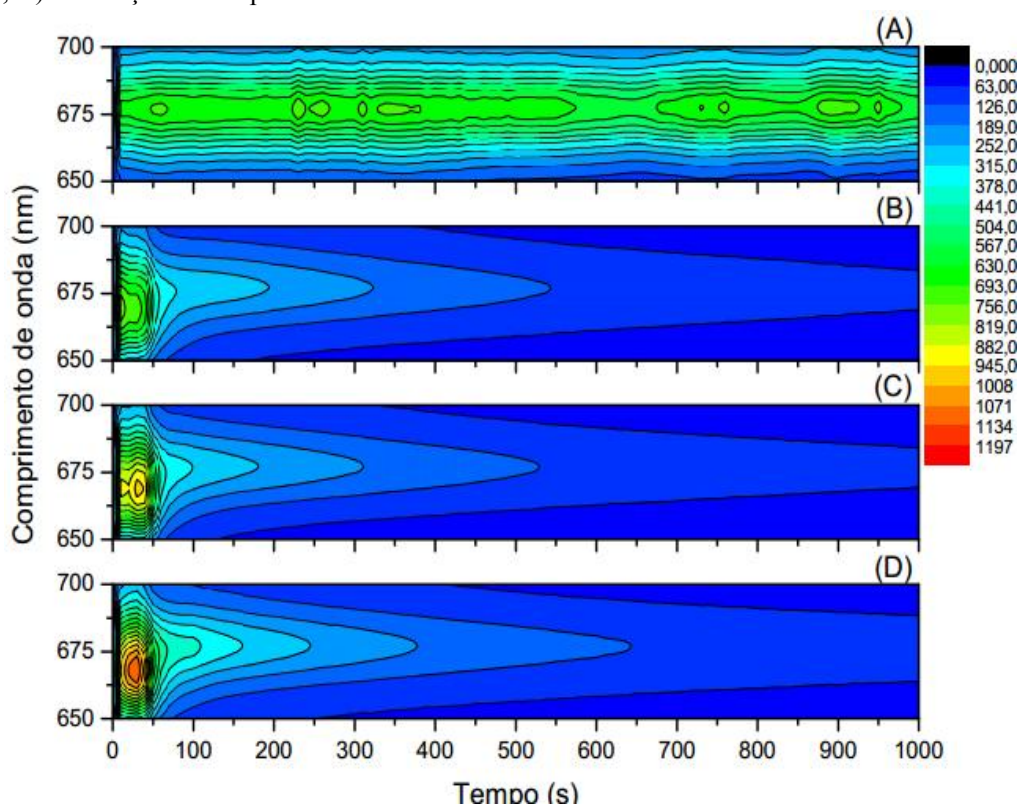
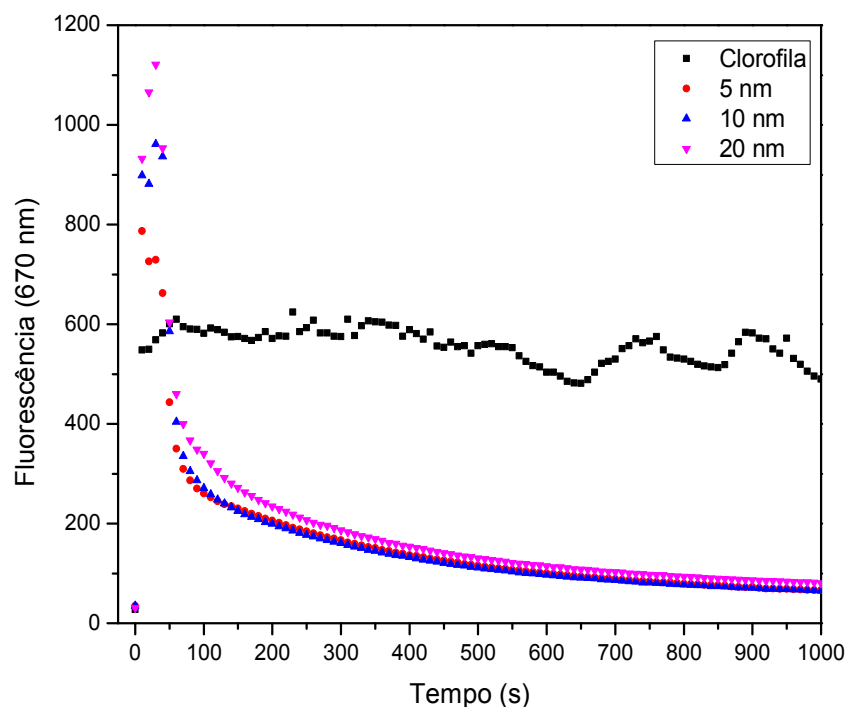


Figura 35 - Intensidade de Fluorescência em 670 nm em função do tempo para as amostras contendo Clorofila e AuNPs de 5, 10 e 20 nm).



Nota-se então que aos primeiros 50 s houve um aumento na intensidade de fluorescência para as amostras de contendo nanopartículas de 10 e 20 nm, fato este mais evidente para a Clorofila o que apresenta certa coerência com os resultados inicialmente apresentados. Desta forma, o efeito de aumento do sinal pode ter sido causado pela ampliação do campo elétrico proveniente da oscilação coletiva dos elétrons na superfície das nanopartículas, uma vez que a clorofila pode apresentar menor afinidade pelas AuNPs há evidência de um número maior de moléculas e partículas livres na solução o que favorece a ressonância plasmônica.^{16, 17} Já para as amostras contendo partículas de 5 nm, observa-se uma discreta diminuição na intensidade quando comparado com as partículas de 10 e 20 nm inclusive para os primeiro segundos, tal efeito está diretamente relacionado com maior área superficial de contato que o nanomaterial apresenta, logo, nota-se uma maior interação com as moléculas de Chl.

Figura 36 - Mapas de emissão 3D para a Feofitina (0,5 μ M) (A) e com AuNP (4,20 μ M) de 5, 10 e 20 (B, C, D) em função do tempo.

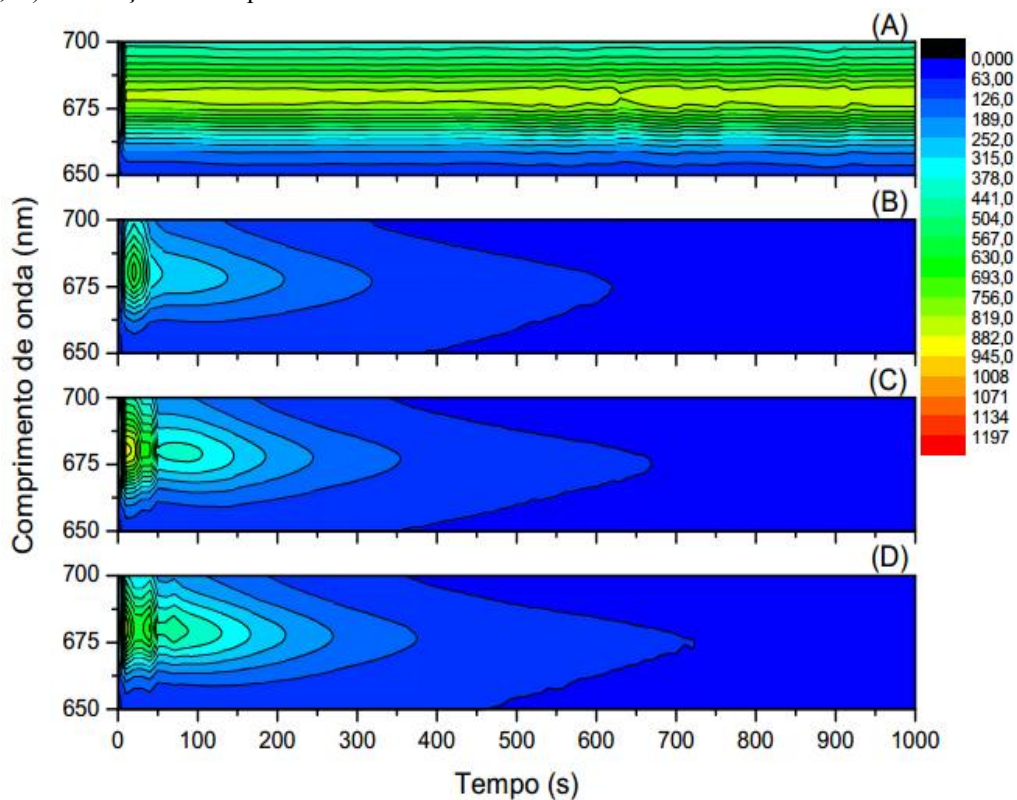
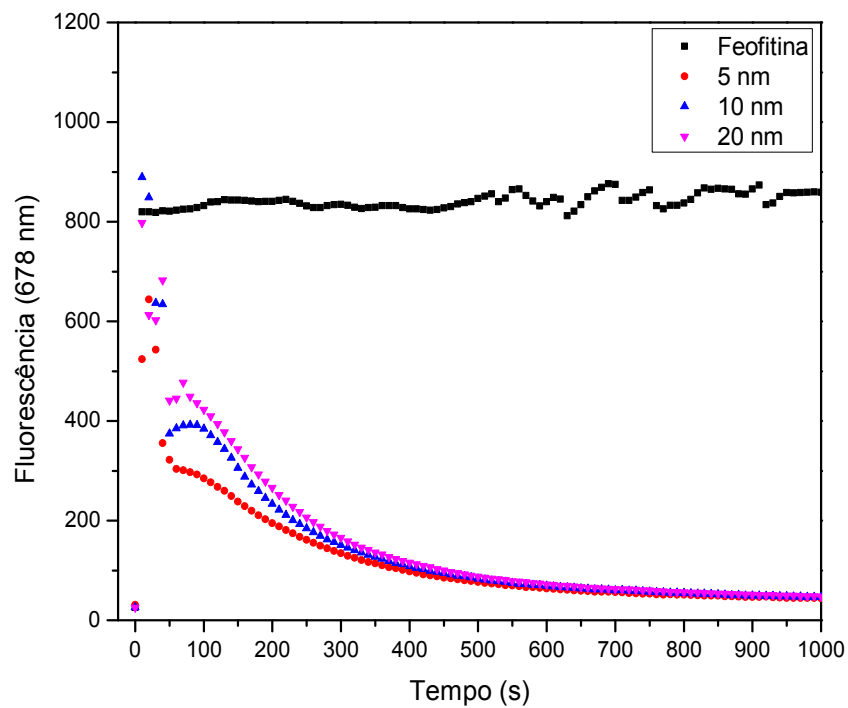


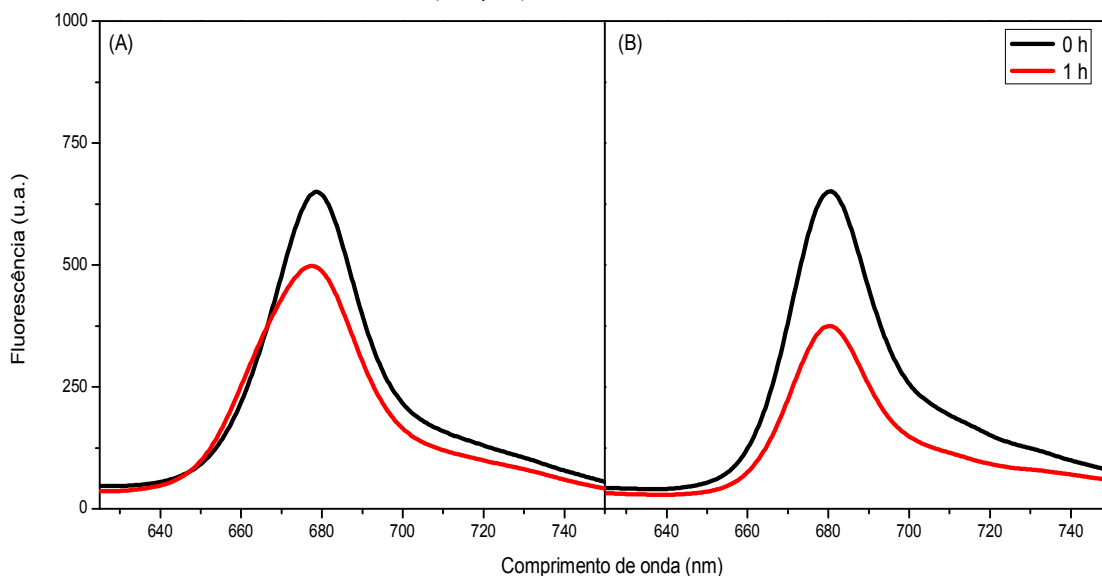
Figura 37 - Intensidade de Fluorescência em 678 nm em função do tempo para as amostras contendo Feofitina e AuNPs de 5, 10 e 20 nm).



Quando comparado com a molécula de Clorofila, nota-se que na Feofitina o efeito de aumento de intensidade de Fluorescência não foi observado de forma significativa, sendo que o principal efeito observado, foi o de supressão (*quenching*)²⁴ sugerindo uma maior afinidade entre as moléculas do pigmento desmetalado pelas nanopartículas, principalmente para a AuNP de 5 nm. Acredita-se que há um número maior de moléculas de Feofitina adsorvida na superfície das AuNPs para que ocorra a transferência de elétrons do estado excitado para a superfície do metal.

Entretanto, com o passar do tempo há uma diminuição bastante acentuada da intensidade de Fluorescência de ambas as amostras contendo o nanomaterial (ligeiramente notória para a Feofitina), o que pode estar relacionado com a fotodegradação de ambas as moléculas. Esta degradação pode ocorrer preferencialmente às moléculas próximas as partículas de ouro na presença da radiação de 405 nm, sugerindo que as moléculas podem ser atraídas pelas nanopartículas que se encontram na direção do feixe de luz e, estas se degradam facilmente na presença da radiação. Fato este comprovado através da Figura 38 onde são apresentados espectros de Fluorescência de amostras preparadas nas mesmas condições que no experimento anterior, medindo apenas o instante inicial e final, apenas para as AuNPs de 5 nm (que apresentou efeito mais acentuado).

Figura 38 - Fluorescência temporal inicial e final das amostras constituídas de AuNP (4,20 μM) de 5 nm e Clorofila em A e Feofitina em B, (0,5 μM).



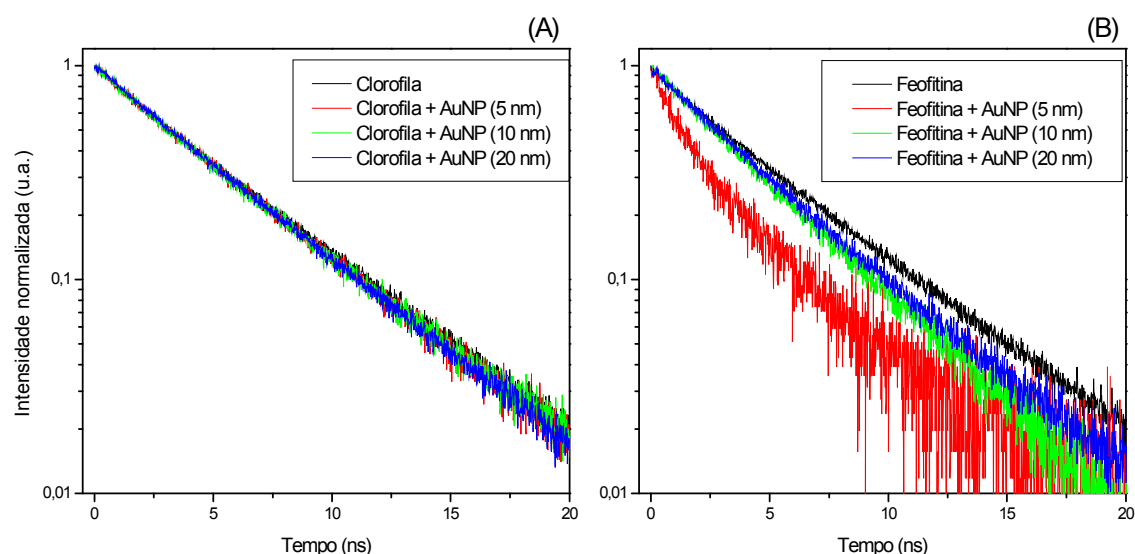
Pode-se observar que embora haja efeito de supressão nas amostras contendo AuNP,

na ausência de luz, o efeito é significativamente menor, o que sugere que nos experimentos anteriores ocorre não só interação das moléculas com as nanopartículas, mas também é comprovado que há efeito de fotodegradação, uma vez que na ausência de luz a supressão é menos intensa.

4.3.4 Análise de Tempo de vida de Luminescência

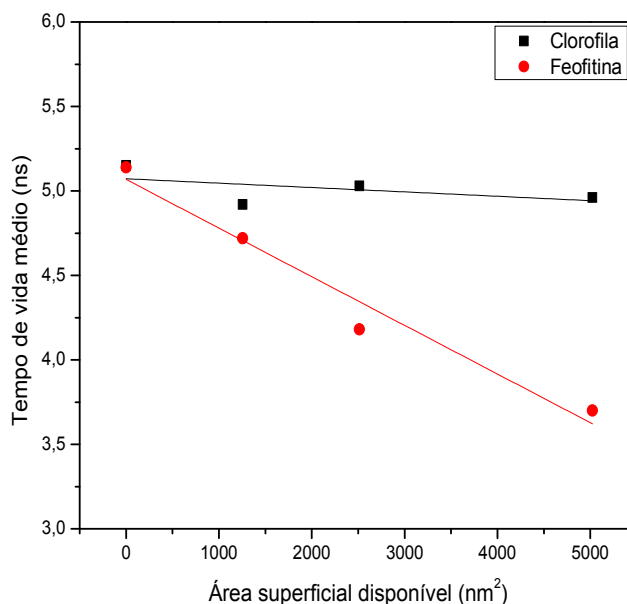
A Figura 39 apresenta os resultados das medidas de fluorescência resolvida no tempo para as amostras de Clorofila e Feofitina, respectivamente em A e B, contendo nanopartículas de ouro de 5, 10 e 20 nm nas concentrações de 0,5 μM para os pigmentos e 4, 23 μM para as AuNPs. O tempo de vida de fluorescência ocorre quando o elétron das moléculas de clorofila e feofitina absorvem energia, passam para o estado excitado e retornam para o estado fundamental emitindo luz.

Figura 39 - Tempo de decaimento da fluorescência da Clorofila em A e da Feofitina em B (0,5 μM), ambas na presença de AuNPs (4,20 μM) de 5, 10 e 20 nm.



A partir dos valores de concentração e volume das nanopartículas utilizadas, obtiveram-se os gráficos da Figura 40 que são representados os valores de tempo de vida médio em função da área superficial disponível, onde se pode notar variação significativa com relação às diferentes dimensões do nanomaterial.

Figura 40 - Gráfico do tempo de vida médio em função área superficial disponível para as amostras contendo AuNP de 5, 10 e 20 nm e Clorofila e Feofitina.



De modo geral, os resultados ilustram uma notável diferença entre a interação das moléculas de Clorofila e Feofitina com as nanopartículas, confirmando a maior afinidade da feofitina pelas AuNPs, principalmente pelas de 5 nm, uma vez que para as NP de 5 nm há uma maior área de superfície relativa. Isto sugere um número maior de partículas atraindo as moléculas porfirínicas desmetaladas.

A redução causada pelas nanopartículas no tempo de vida das moléculas era esperada, pois quando as nanopartículas metálicas são adicionadas, parte da feofitina é adsorvida na superfície da nanopartícula e quando há a incidência de luz ocorre o processo de transferência de elétrons fotoinduzidos da porfirina no estado excitado para a nanopartícula metálica, então ao invés do elétron excitado voltar para o estado fundamental emitindo luz, este é transferido para a nanopartícula de forma não radioativa, fazendo com que o tempo de vida diminua.⁶¹

Para as amostras de Clorofila, houve uma discreta diminuição no tempo de vida médio das amostras contendo as nanopartículas, porém, quando comparado com as amostras de feofitina, os valores mantiveram-se quase constantes, comprovando a maior afinidade da porfirina desmetalada pelas AuNPs e uma maior estabilidade da clorofila na presença do nanomaterial, sendo esta estabilidade associada a presença do átomo de magnésio no centro porfirínico da molécula.

A maior afinidade das AuNPs pelas moléculas de base livre, pode ser justificada pelo

fato de ocorrer uma tendência de complexação dos átomos de ouro presente nas nanopartículas, sendo que tais partículas é constituída de metal de transição e, as moléculas de feofitina, com centro porfírico descomplexado pode atuar como ligante.^{32, 50} Tal complexação possivelmente não ocorre de forma completa, uma vez que os átomos de ouro estão estabilizados na forma de aglomerados (nanopartículas) e estes são relativamente grandes impossibilitando sua entrada no centro da porfirina. No caso da Clorofila, há uma maior estabilidade na presença das AuNPs porque tal molécula apresenta-se de forma já complexada, sendo que o átomo de magnésio já atua como centro metálico e, neste caso, não há tanta afinidade por outros metais.

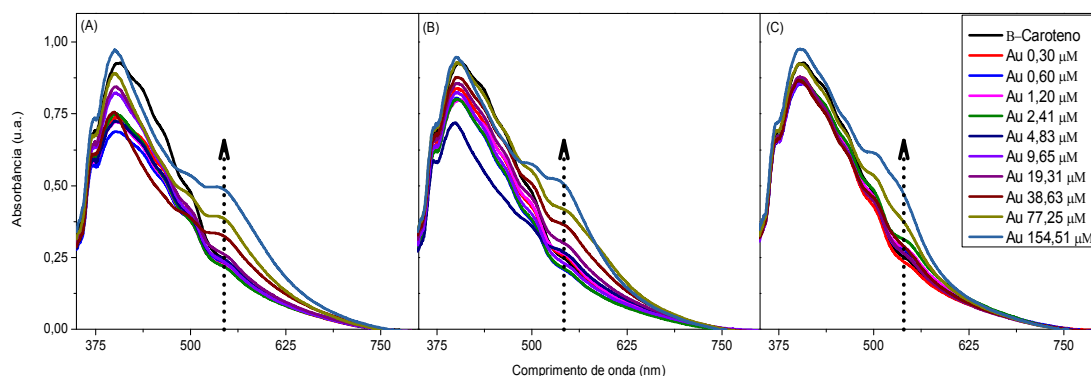
A tendência de complexação das AuNPs pela feofitina pode ser explicada pela Teoria da Ligação de Valência (TLV),^{35, 62} no qual o ligante, no caso os átomos de nitrogênio presente na porfirina, atuam como bases de Lewis ou doadores de elétrons para orbitais vazios do metal, neste caso o ouro da nanopartícula que por sua vez é um metal de transição e apresenta capacidade significativa de armazenamento de elétrons,¹³ que pode estar associada a presença de orbitais não preenchidos nos átomos de ouro.

4.5 Avaliação da interação AuNP – β -Caroteno

4.5.1 Absorção UV-Vis

Uma vez que os carotenóides extraídos das *Vicia faba* apresentaram evidências da presença do β -Caroteno em sua constituição, a Figura 41 apresenta os espectros de absorção molecular UV-Vis para o β -Caroteno em solução metanólica ($6,71 \times 10^{-4}$ M) contendo nanopartículas de 5, 10 e 20 nm em A, B e C, respectivamente. Neste caso foi realizado o experimento em parâmetros de concentração diferentes dos experimentos com Extrato Bruto, Clorofila e Feofitina, já que o β -Caroteno apresenta propriedades diferentes dos pigmentos porfíricos.^{44, 45}

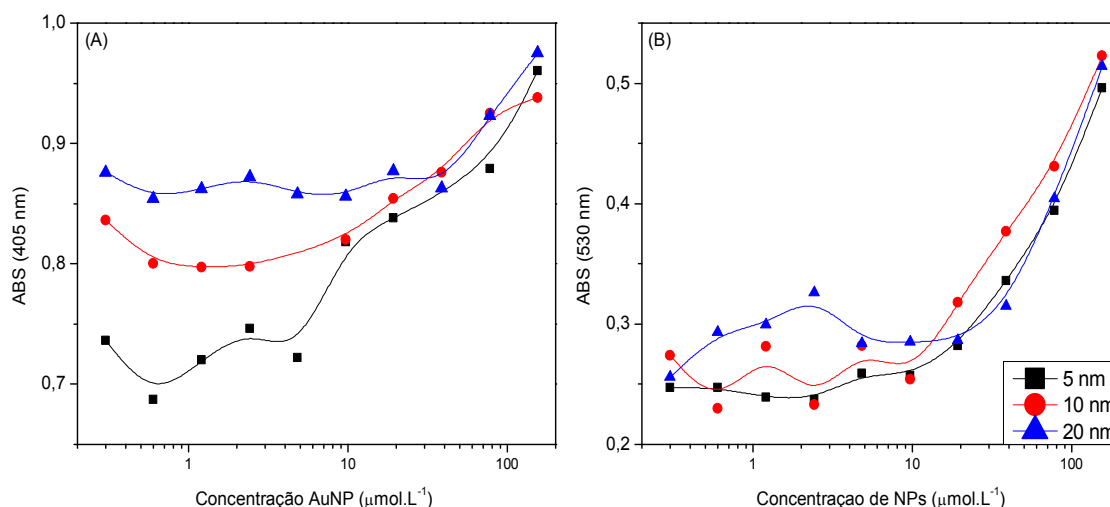
Figura 41 - Espectros de absorção molecular UV-Vis das amostras constituídas de β -Caroteno ($6,71 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹) e AuNP de 5, 10 e 20 nm em (A), (B) e (C), respectivamente.



Analisando a região de 405 nm (Figura 42-A), onde há contribuição da absorção do próprio pigmento e também do nanomaterial. Há um possível efeito da dimensão da partícula principalmente para baixas concentrações de AuNP (5 nm). Isto porque foi determinado que a presença do nanomaterial inibe o sinal de absorbância dos carotenóides e tal fato pode ter ocorrido devido os elétrons na superfície das nanopartículas estarem em ressonância,¹⁸ gerando de um campo elétrico,^{16, 63} que por sua vez excita as moléculas dos carotenos.¹⁷

A partir dos espectros de absorção UV-Vis das amostras, é possível verificar que houve um ligeiro deslocamento na banda de ressonância plasmônica para 530 nm. No entanto nota-se que o comportamento em função do tamanho das AuNPs foi semelhante ao observado no estudo dos demais pigmentos, ou seja, quando analisado a região da ressonância não há diferença significativa entre as amostras (Figura 42-B).

Figura 42 - Gráficos da intensidade de Absorbância em 405 e 530 nm em (A) e (B), respectivamente do β -Caroteno em função da concentração e dimensão das AuNPs.

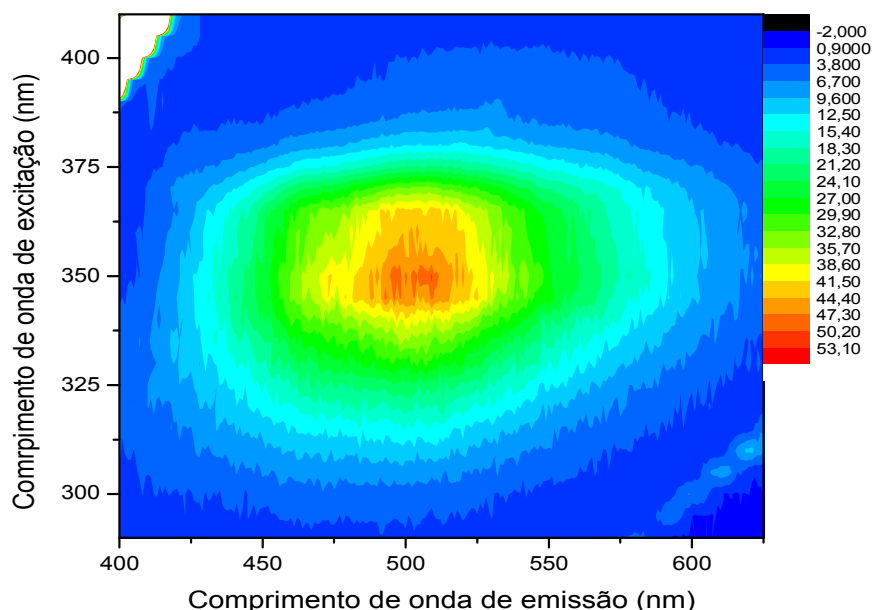


É possível que apenas parte da radiação incidente seja utilizada para a excitação das moléculas de β -Caroteno e estes podem também absorver energia proveniente do campo elétrico da ressonância de plasmon, resultando na diminuição da intensidade de absorbância, uma vez que o espectrofotômetro fornece valores de absorbância a partir da radiação incidente.

4.5.2 Fluorescência Molecular

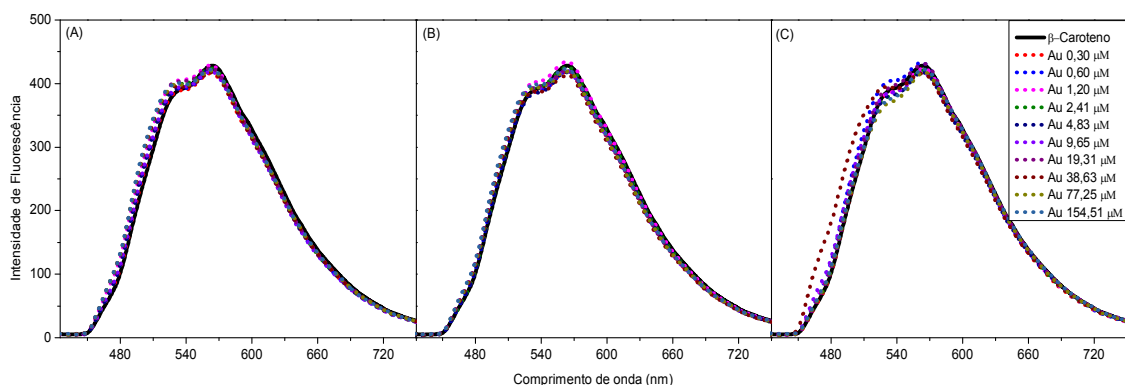
Para uma avaliação global da emissão por fluorescência do β -Caroteno tem-se o mapa de emissão 3D na Figura 43, onde o β -Caroteno em solução metanólica $6,71 \times 10^{-4}$ M apresentou sinal intenso de emissão em na região entre 450 e 570 nm quando este foi excitado em 350 nm, o que é esperado para este pigmento.⁵⁶

Figura 43 - Mapa de emissão 3D do β -Caroteno em solução metanólica $6,71 \times 10^{-4}M$.



Na Figura 44 tem-se os espectros de Fluorescência do β -Caroteno na presença de AuNP de 5 , 10 e 20 nm com excitação em 405 nm. Embora no mapa de emissão em 3D o sinal de fluorescência do mesmo tenha sido baixo quando excitado neste comprimento de onda, neste experimento, no qual foi utilizado o fluorímetro portátil, pôde-se determinar uma banda de emissão com intensidade máxima em 565 nm e, na presença do nanomaterial, não foi identificado nenhum efeito de deslocamento.

Figura 44 - Espectros de Fluorescência obtidos com uma excitação em 405 nm do β -Caroteno ($6,71 \times 10^{-4}M$.) e AuNP com diâmetros de: (A) 5 nm; (B) 10 nm; e (C) 20 nm.

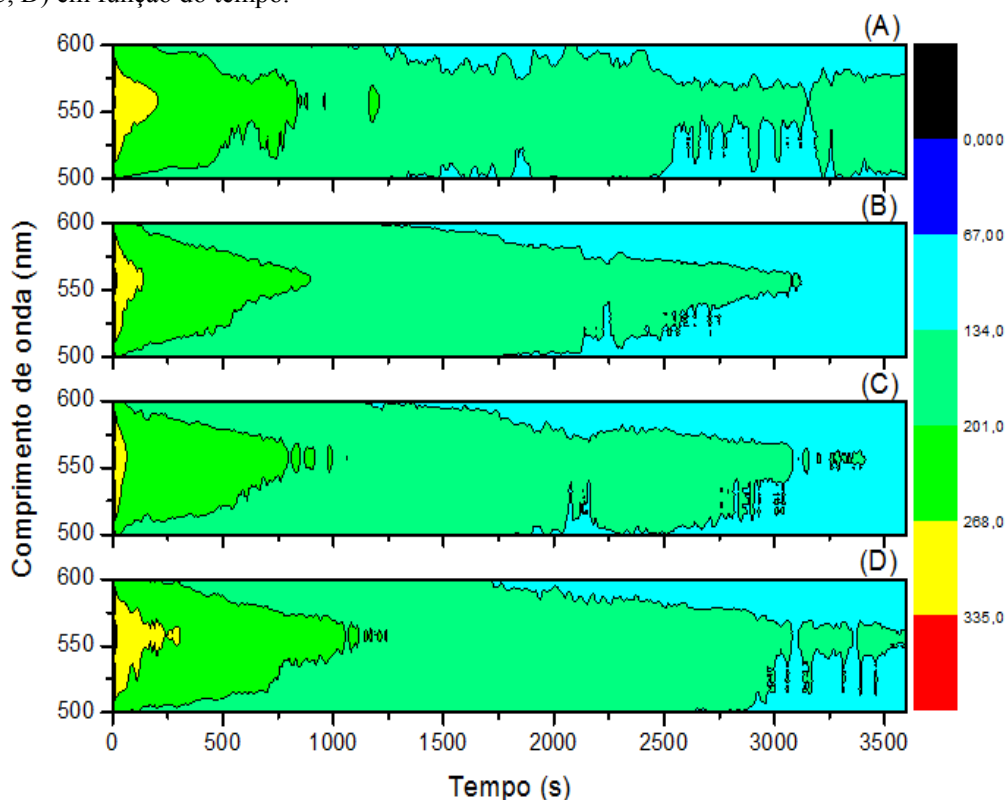


Analisando ainda os resultados apresentados na Fig. 44 pode-se confirmar a idéia inicial a respeito da capacidade das moléculas absorverem energia extra a partir do campo

elétrico gerado pela oscilação dos elétrons das NPs,^{59, 17} pois apesar de ambos apresentarem diminuição na intensidade de absorbância na presença de AuNP a baixas concentrações na região de 405 nm, estes não apresentaram supressão considerável do sinal de fluorescência em função do tamanho e concentração do nanomaterial.

De forma semelhante aos estudos com a Clorofila e Feofitina, foram realizadas medidas com a adição de solução metanólica de β -Caroteno em solução de AuNP de 5, 10 e 20 nm, que foi monitorado o comportamento de fluorescência das amostras em função do tempo como mostra a Figura 45, porém como nos resultados anteriores, não houve diferença significativa na presença das nanopartículas e foi possível notar que o β -Caroteno apresentou certa instabilidade na presença da radiação com comprimento de onda de 405 nm, logo com o passar do tempo, pôde-se observar que para todas as amostras de β -Caroteno houve uma diminuição considerável da intensidade de emissão, sugerindo uma possível fotodegradação da molécula do pigmento o que pode ser uma dificuldade neste tipo de análise.

Figura 45 - Mapas de emissão 3D para o β -Caroteno ($6,71 \times 10^{-4}$ M) (A) e com AuNP de 5, 10 e 20 (B, C, D) em função do tempo.



De forma geral, a partir dos resultados obtidos, não foi possível visualizar interação significativa entre as moléculas do β -Caroteno com as AuNPs nas condições até aqui

estudadas. Entretanto, sabe-se que a presença deste pigmento nas plantas é de fundamental importância e pelo fato de apresentar propriedades distintas dos demais pigmentos, este pode atuar como pigmento acessório e desempenha papel fundamental no processo da fotossíntese das plantas.²⁹

CAPÍTULO V

5 CONCLUSÃO

A técnica de extração e isolamento, por cromatografia em coluna, dos pigmentos se mostrou eficiente, uma vez que a Clorofila pôde ser extraída e separada dos Carotenóides totais e desta forma, a partir da Clorofila obteve-se a Feofitina pela desmetalção do centro porfirínico da molécula, onde a reação de hidrólise ácida demonstrou ser bastante eficaz com a determinação inclusive, do pH ideal para a formação da Feofitina .

As técnicas de Absorção molecular UV-Vis, Fluorescência e FTIR demonstraram-se capazes na caracterização das espécies estudadas. Além de serem bastante promissoras na avaliação da interação Pigmento-Nanopartícula, uma vez que a Absorção Molecular e Fluorescência são técnicas versáteis, precisas e não destrutivas no estudo dos principais pigmentos fotossintéticos das plantas. De forma análoga as análises de Tempo de vida de Fluorescência apresentaram resultados satisfatórios e promissores confirmando a interação entre as moléculas porfirínicas e as AuNPs.

Para as análises envolvendo o principal pigmento porfirínico, a Clorofila, pode-se concluir que tal molécula apresenta interação considerável com as nanopartículas de ouro. No entanto, quando comparado com as moléculas de Feofitina, observou-se que as moléculas apresentam maior estabilidade na presença do metal nanoparticulado e, desta forma menor afinidade pelo mesmo.

Os resultados para a Feofitina sugerem que a interação com as nanopartículas de ouro ocorre de forma significativamente mais intensa, apresentando maior alteração em seu comportamento espectroscópico na presença da AuNPs. Tal interação pode ser justificada com uma possível atração pelo centro porfirínico das moléculas desmetaladas que por sua vez pode atuar como ligante ou base de Lewis, que de acordo com a Teoria da Ligação de Valência tais moléculas apresentam centro porfirínico livre onde os átomos de nitrogênio atuam como potenciais doadores de elétrons para o metal nanoparticulado na tentativa de uma possível complexação.

Com relação ao β -caroteno, um dos principais representantes dos carotenóides nas plantas, pode-se verificar que nos parâmetros analisados não houve interação significativa com as AuNPs, visto que tais pigmentos apresentam estrutura química e, consequentemente, propriedades diferenciadas das moléculas de Clorofila e Feofitina.

De forma geral, pode-se concluir então que os principais pigmentos fotossintéticos,

apresentam afinidade pelas AuNPs e desta forma, há mudanças nas propriedades espectroscópicas de tais moléculas e, na presença de luz, verificou-se que os nanomateriais podem comprometer a estabilidade das moléculas. Uma vez que tais moléculas e suas propriedades estão diretamente relacionadas com a capacidade fotossintética das plantas, nossos resultados sugerem então que as AuNPs apresentam potencial risco de toxicidade aos vegetais e conseqüentemente, ao meio ambiente. Assim, acredita-se que os resultados obtidos no presente estudo serão de grande importância para o entendimento dos possíveis efeitos causados em plantas submetidas a tratamentos com nanopartículas de ouro, uma vez que há, em primeiro plano, a necessidade de compreensão da interação entre AuNP com os principais pigmentos que participam da fotossíntese nas plantas.

CAPÍTULO VI

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹ MARTINS, P. R.; RAMOS, S. F. Impactos das nanotecnologias na cadeia de produção da soja brasileira. São Paulo: Xamã, 2009. 158 p.
- ² MARQUES, Gil da Costa. Física: tendências e perspectivas. São Paulo. Livraria da física: 2005. 333p.
- ³ ESTEVES, A.C.C.; BARROR-TIMMONS, A.; TRINDADE, T. Nanocompósitos de matriz polimérica: estratégia de síntese de materiais híbridos. Química Nova, v. 27, n. 5, p. 798-806, 2004.
- ⁴ FARIA-TISCHER, P.C.S.; TISCHER, C.A. Nanobiotechnology, biomaterials and biological application of nanostructures. Biochemistry and Biotechnology Reports, v. 1, p. 32-53, 2012.
- ⁵ TONIOLO, C. Síntese de pós de alumina nanocristalina por combustão em solução. Porto Alegre-RS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2004. Dissertação de Mestrado, 61 p.
- ⁶ NETO, E.R.L. Aspectos relevantes da nanotecnologia e a sua aplicação na construção civil. Revista Especialize On-Line IPOG, v. 01, n. 6, p. 1-19, 2013.
- ⁷ 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
- ⁸ BATLEY, G.E.; KIRBY, J.K.; MCLAUGHLIN, M.J. Fate and risks of nanomaterials in aquatic and terrestrial environments. Accounts of chemical research, v. 46, n. 3, p. 854-862, 2013.
- ⁹ 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.
- ¹⁰ SOTO, K.F.; CARRASCO, A.; POWELL, T.G.; MURR, L.E.; GARZA, K.M., Biological effects of nanoparticulate materials. Materials Science and Engineering, v. 26, p. 1421-1427. 2006.
- ¹¹ MELO JR, M.A.; Santos, L.S.S.; Gonçalves, M.C.; Nogueira, A.F. Preparação de nanopartículas de prata e ouro: um método simples para a introdução da nanociência em laboratório de ensino. Química Nova, v. 35, n. 9, p. 1872-1878, 2012.
- ¹² BARAZZOUK, S.; KAMAT, P.V.; HOTCHANDANI, S. Photoinduced Electron Transfer between Chlorophyll a and Gold Nanoparticles. The Journal of Physical Chemistry B, v. 109, n. 2, p. 716-723, 2005.

-
- ¹³ BUNGHEZI, I.-R.; ION, R.-M. Gold and silver nanoparticles: Green synthesis and analytical investigations. *Materials and mechanics*, v. 5, p. 26 – 30, 2010.
- ¹⁴ LÓPEZ, P.G.; GONZÁLES, V.G.; NAVARRO, G.M.; GONZÁLEZ, R.E. Síntesis y caracterización de nanocompósitos de óxido de hierro en un polímero semiconductor. *Ingenierías*, v.14, n. 50, p. 9–16, 2011.
- ¹⁵ BONIFÁCIO, L.S. Processos de agregação e de fusão de nanopartículas de ouro: uma abordagem química. Instituto de Química. São Paulo. Universidade de São Paulo, 2005. Dissertação de Mestrado, p. 116.
- ¹⁶ AMARAL, A.M. Nanoestruturas plasmônicas para aplicações em ótica não linear. Recife. Universidade Federal de Pernambuco, 2012. Dissertação de mestrado, p. 139.
- ¹⁷ ZAMARION, V.M. Estudo e aplicações de ressonância plasmônica superficial em nanosondas SERS. São Paulo, Universidade de São Paulo, 2008, Dissertação de Mestrado, p. 98.
- ¹⁸ SPERLING, R.A.; RIVEIRA, G.P.; ZHANG, F.; ZANELLA, M.; PARAK, W.J. Biological applications of gold nanoparticles. *Chemical Society Review*, v. 37, n. 9, p. 1896-1908, 2008.
- ¹⁹ HAISS, W.; THANH, N.T.K.; AVEYARD, J.; FERNING, D.G. Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-Vis spectra. *Analytical Chemistry*, v. 79, n. 11, p. 4215-4221, 2007.
- ²⁰ COVÁ, E.M.; LOVÁ, K.K. Metal nanoparticles and plants. *Ecological Chemistry and Engineering*. S v. 20, n. 1, p. 9-22, 2013.
- ²¹ MIRALLES, P.; CHURCH, T.L.; HARRIS, A.T. Toxicity, uptake, and translocation of engineered nanomaterials in vascular plants. *Environmental Science & Technology*, v. 46, p. 9224-9239. 2012.
- ²² HOLDEN, P.A.; NISBET, R.M.; LENIHAN, H.S.; MILLER, R.J.; CHERR, G.N.; SCHIMEL, J.P.; GARDEA-TORRESDEY, J.L. Ecological nanotoxicology: integrating nanomaterial hazard consideration across the subcellular, population, community, and ecosystems levels. *Accounts of Chemical Research*, v. 46, n. 3, p. 813-822. 2013.
- ²³ RICO, C.M.; MAJUMDAR, S.; DUARTE-GARDEA, M.; PERALTA-VIDEA, J.R.; GARDEA-TORREDEY, J.L. Interaction of nanoparticles with edible plants and their possible implications in the food chain. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, v. 59, p. 3485-3498, 2011.
- ²⁴ 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.
- ²⁵ ATKINS, P.; DE PAUL, J. *Físico-química*. 7. Ed. Rio de Janeiro: LTC-Livros Técnicos e Científicos, v. 2, 2004.
- ²⁶ KLAINE, S.J.; ALVEREZ, 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, behaviour, fate

-
- bioavailability and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 27, n. 9, p. 1825–1851, 2008.
- ²⁷ BAKER, N.R. Chlorophyll fluorescence: A probe of photosynthesis in vivo. In: (Ed.). *Annual Review of Plant Biology*, v. 59, p. 89-113, 2008.
- ²⁸ NDAO, A.S. Analysis of chlorophyll fluorescence spectra in some tropical plants. *Journal of Fluorescence*, v. 15, n. 2, p. 123-129, 2005.
- ²⁹ TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*, 3ª Ed. Artmed: Porto Alegre-RS, 2004.
- ³⁰ STREIT, N.M.; CANTERLE, L.P.; CANTO, M.W.; HECKTHEUER, L.H.H. *The Chlorophylls*. Ciência Rural, Santa Maria, v. 35, p. 748-755. 2005.
- ³¹ 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.
- ³² GEROLA, A.P. Estudos Físico-Químicos de derivados de clorofila em sistemas homogêneos e micro-heterogêneos: aspectos fotofísicos, fotodinâmicos e fotoinativantes sobre micro-organismos. Maringá, Universidade Estadual de Maringá, 2010. Dissertação de Mestrado, p. 124.
- ³³ SILVA, M. C. Alterações na biossíntese de carotenóides em leveduras induzidas por agentes químicos. Campinas. Universidade Estadual de Campinas, 2004. Tese de Doutorado em Ciência de Alimentos, p. 216.
- ³⁴ MELO, C.C. Síntese e investigações estruturais de arranjos supramoleculares formados por metaloporfirinas e metalofalocianinas. São Carlos. Universidade Federal de São Paulo. 2012. Tese de Doutorado, p. 113.
- ³⁵ SHRIVER, D.F.; ATKINS, P.W. OVERTON, T.L.; ROURKE, J.P.; WELLER, M.T.; ARMSTRONG, F.A. *Química Inorgânica*. 4 ed. Ed. Bookman, Porto Alegre, 2008.
- ³⁶ SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; CROUCH, S.R. *Princípios de análise instrumental*. 6 ed. Ed. Bookman, Porto Alegre, 2009.
- ³⁷ TSUTAE, F.M.Y. Processos ópticos e interação entre nanopartículas e sistemas moleculares. São Carlos. Universidade de São Paulo, 2011. Dissertação de Mestrado, p. 89.
- ³⁸ LAKOWICZ, J.R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3 ed. Ed. Springer, New York, 2006.
- ³⁹ MOORE, W. J. *Físico-química*, v. 2, 4 ed., Ed. Edgard Blocher, São Paulo, 1976
- ⁴⁰ SOARES, R. R. S. Estudos de propriedades da Clorofila a e da Feofitina a visando a Terapia Fotodinâmica. Maringá. Universidade Estadual de Maringá, 2006. Dissertação de Mestrado, p. 96.
- ⁴¹ MAESTRIN, A. P. J.; NERI, C. R.; OLIVEIRA K. T.; SERRA, O. A.; IAMAMOTO, Y. Extração e purificação de clorofila a, da alga spirulina máxima: um experimento para os cursos de química. *Química Nova*, v. 32, n. 6, p. 1670 - 1672, 2009.
- ⁴² 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.

- ⁴³ 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. 3, p. 149 - 156, 2002.
- ⁴⁴ RENGE, I.; VAN GRONDELLE, R.; DEKKER, J.P. Matrix and temperature effects on absorption spectra of β -carotene and pheophytin a in solution and in green plant photosystem II. *Journal of Photochemistry and Photobiology A*, v. 96, p. 109-121, 1996.
- ⁴⁵ ZERAIK, M.L.; YARIWAKE, J.H. Extração de β -caroteno de cenouras: uma proposta para disciplinas experimentais de química. *Química Nova*, v. 31, n. 5, p. 1259-1262, 2008.
- ⁴⁶ LICHTENTHALER, H.K. Chlorophils and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, v. 148, n. 34, p. 350- 382, 1987.
- ⁴⁷ GOUTERMAN, M. The Porphyrins. D. Dolphin editor, New York, cap. 3. 1978.
- ⁴⁸ MILGRON, L.R. the colours of life: Na introduction to the Chemistry of Porphyrins na related compounds. New York, Oxford University Press, 1997.
- ⁴⁹ MARSH, D.F.; MINK, L.M. Microscale synthesis and electronic absorption spectroscopy of tetraphenylporphyrin H_2 (TPP) and metalloporphyrins Zn^{II} (TPP) and Ni^{II} (TPP). *Journal of Chemical Education*, v. 73, n. 12, p. 1188, 1996.
- ⁵⁰ NOGUEIRA, D.K.D. derivados porfirínicos nanoencapsulados como fotossensibilizadores em terapia fotodinâmica. São Paulo. Universidade de São Paulo, 2011. Tese Doutorado, p. 195.
- ⁵¹ STONE, A.; FLEISCHER, E.B. The molecular and crystal structure of porphyrin diacids. *Journal of American Chemical Society*, v. 90, n. 11, p. 2735-2748, 1968.
- ⁵² FILHO, S.G.B. Feofitinas e esteróides glicosilados de *Turnera subulata* Sm. (Turneraceae). João Pessoa. Universidade Federal da Paraíba, 2011. Dissertação de Mestrado, p. 151.
- ⁵³ YU, C.; ZHANG, Y.; QUAN, X.; CHEN, S.; HAN, J.; OU, X.; ZHAO, J. Photochemical effect of humic acid components separated using molecular imprinting method applying porphyrin-like substances as templates in aqueous solution. *Environmental Science and Technology*, v. 44, n. 15, p. 5812-5817, 2010.
- ⁵⁴ WEIGL, J.W.; LIVINGSTON, R. Infrared Spectra of Chlorophyll and related compounds. *Journal of the American Chemical Society*, v. 75, n. 9, p. 2173-2176, 1953.
- ⁵⁵ VOGEL, A.I.; TATCHELL, A.R.; FURNIS, B.S.; HANNAFORD, A.J.; SMITH, P.W.G. Vogel's textbook of practical organic chemistry, 5 ed. Ed. Longman Scientific and Technical, New York, 1989.
- ⁵⁶ CHRISTENSEN, R.L.; BARNEY, E.A.; BROENE, R.D.; GALINATO, M.G.I.; FRANK, H.A. Models for the Spectroscopy and Photophysics of Carotenoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 430, p. 30-36, 2004.

-
- ⁵⁷ GUIZADO, T. R. C. Estudos computacionais da interação de porfirinas e seus complexos de ferro com albumina sérica humana. Rio de Janeiro. Pontifícia Universidade Católica. 2008. Dissertação de Mestrado, p. 85.
- ⁵⁸ FERREIRA, M.S. Interferência espacial de Clorofila a por redes neurais artificiais aplicadas a imagens multiespectrais e medidas tomadas in situ. Presidente Prudente-SP, Universidade Estadual Paulista, 2011, p. 103.
- ⁵⁹ CHEN, I-T.; CHANG, P-H.; CHANG, Y-C.; GUO, T-F. Lighting up ultraviolet fluorescence from chicken albumen through plasmon resonance energy transfer of gold nanoparticles. Scientific Reports, v. 4, p. 1-6, 2013.
- ⁶⁰ CAIRES, A.R.L.; COSTA, L.R.; FERNANDES, J. A close analysis of metal-enhanced fluorescence of tryptophan induced by silver nanoparticles: wavelength emission dependence. Central European Journal of Chemistry, v. 11, n. 1, p. 111-115, 2013.
- ⁶¹ QUEIROZ, A.M. Interação nanopartícula – clorofila: uma análise via espectroscopia óptica. Dourados. Universidade Federal da Grande Dourados, 2014. Dissertação de Mestrado, p. 79.
- ⁶² LEE, J.D. Química inorgânica não tão concisa. 5 ed. Ed. Edgar Blucher, São Paulo, 2000.
- ⁶³ HAO, E.; SCHATZ, G. C. Electromagnetic fields around silver nanoparticles and dimers. The Journal of Physical Chemistry, v. 120, p. 357–366, 2004.