UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

CÉSAR ADOLFO GROSSO GAMBOA

**Métodos computacionais para detecção de plasticidade vegetal em
Tradescantia minima causada por agentes tóxicos**

São Carlos

2021

CÉSAR ADOLFO GROSSO GAMBOA

**Métodos computacionais para detecção de plasticidade vegetal em
Tradescantia minima causada por agentes tóxicos**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Física do Instituto de
Física de São Carlos da Universidade de
São Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada
Opção: Física Biomolecular
Orientador: Prof. Dr. Odemir Martinez
Bruno

Versão Corrigida

(versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos

2021

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Grosso Gamboa, Cesar Adolfo

Métodos computacionais para detecção de plasticidade vegetal em *Tradescantia minima* causada por agentes tóxicos / Cesar Adolfo Grosso Gamboa; orientador Odemir Martinez Bruno - versão corrigida -- São Carlos, 2021.

102 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2021.

1. Nanopartículas. 2. CNN. 3. Toxicidade. 4. Inteligência artificial. I. Bruno, Odemir Martinez, orient. II. Título.

À minha mãe e irmãos, com carinho, por seu apoio,
compreensão e carinho, por me escutar e me ajudar
em tempos difíceis durante minha estada aqui no Brasil.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Física de São Carlos, por me dar a oportunidade de realizar o curso de mestrado em Física aplicada biomolecular.

Ao Prof. Dr. Odemir, pela oportunidade, pela confiança, e pelo apoio antes, durante e no processo de definição e orientação da presente dissertação.

À minha amiga e compatriota Jeaneth Machicao pela amizade e apoio a distância, pela motivação e incentivo que me deu, que foi decisivo para vir fazer o mestrado aqui em IFSC-USP.

Ao Grupo de Nanomedicina e Nanotoxicologia, particularmente ao Prof. Dr. Valtencir Zucolotto, Bruna Juliana Moreira e Renata Miranda pelo fornecimento das nanopartículas de prata.

Aos meus amigos e companheiros do grupo de pesquisa Leonardo Scabini, Lucas Correia Ribas e Rayner Montes pelo apoio durante a elaboração da presente dissertação.

Aos meus amigos y companheiros Pedro Ramon do grupo de Polímeros e Yuri Sarreta, pelo apoio com recursos dos seus laboratórios, durante a execução experimental da presente dissertação, sem o qual não teria sido possível desenvolvê-la.

Aos meus grandes amigos, Maximiliano, Rossely, Javier, Ruddy, José e Renzhon, pelo apoio moral, por sempre me ouvirem e me derem a força necessária para continuar. Eles têm sido uma peça chave para me manter firme na busca de meus objetivos, e no desenvolvimento desta pesquisa.

Aos meus ex-professores de graduação José Llanos e Eloy Lopez, pelo apoio, sem eles não teria sido possível ingressar no programa de pós-graduação, pelo que estou muito agradecido.

Ao PRONABEC, pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

“L'apprendimento non esaurisce mai la mente”

“Aprender nunca esgota a mente”

“Aprender nunca agota la mente”

Leonardo da Vinci

RESUMO

GROSSO GAMBOA, C. A. **Métodos computacionais para detecção de plasticidade vegetal em *Tradescantia minima* causada por agentes tóxicos.** 2021. 102 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2021.

Os efeitos tóxicos causados por agentes físicos e químicos são um problema potencial de importância agrícola, desde o cloreto de sódio (NaCl) até as frequentemente muito usadas nanopartículas de prata (AgNPs). Está claro que os efeitos tóxicos do NaCl em altas concentrações podem atuar devido ao estresse hídrico pela diminuição do potencial osmótico, por outro lado também podem ser devido ao efeito tóxico dos íons. Ao contrário da salinidade, as vias metabólicas dos efeitos tóxicos causados pelas AgNPs nas plantas ainda não estão muito claras e as pesquisas ainda estão em andamento, mas há antecedentes e propostas de que podem causar diferentes tipos de danos em plantas, como citotoxicidade e genotoxicidade. Várias técnicas computacionais fizeram progressos significativos no processamento de imagens, especialmente Redes Neurais Convulsionais (CNN); podem ser muito úteis na assistência técnica para detecção automática de doenças e também em detecção de plasticidade frente a agentes tóxicos. Para gerar as imagens necessárias para o treinamento das redes neurais artificiais são realizados experimentos com temperatura, fotoperíodo e umidade constantes. Os experimentos foram divididos em dois métodos, as plantas que foram submetidas à toxicidade com NaCl foram cultivadas em substrato *Carolina Soil (in vivo)*, e as plantas tratadas com AgNPs são cultivadas *in vitro* e ambos submetidos a tratamentos de toxicidade nas mesmas condições iniciais. As plantas de *Tradescantia minima* submetidas a experimentos de toxicidade com NaCl apresentaram menor crescimento em altas concentrações, além disso, as folhas das plantas tratadas com cloreto de sódio apresentavam sinais de desidratação (plasmólise). No caso das plantas tratadas com AgNPs, a diferença no crescimento foi menor. Os resultados das redes neurais mostraram uma capacidade relativamente elevada de detecção de plasticidade fenotípica e classificação das imagens, com média de $\chi = 74.02\%$, enquanto os métodos clássicos de visão computacional (descritores de textura) apresentaram média de $\chi = 51.40\%$ de taxa acerto (accuracy). Enquanto os resultados obtidos com inteligência artificial por cada experimento (NaCl e AgNPs), mostraram

resultados promissores: 78.00% e 92.67% de accuracy (para NaCl e AgNPs respectivamente), revelando a efetividade das redes neurais (CNN) para detectar os efeitos tóxicos e classificar as imagens microscópicas segundo a plasticidade fenotípica nas folhas. Além disso, as taxas de acerto (accuracy) dos experimentos com menor concentração de NaCl foram 88.52% (1 mM) de NaCl e 87.41% (10 mM) de NaCl; no caso dos experimentos com nanopartículas de prata as taxas de acerto dos experimentos com menor concentração foram de 97.5% (diluição 1:1000) e 97.6% (diluição 1:100) de AgNPs.

Palavras-chave: Nanopartículas. CNN. Toxicidade. Inteligência artificial.

ABSTRACT

GROSSO GAMBOA, C. A. **Computational methods for detecting plant plasticity in *Tradescantia minima* caused by toxic agents**. 2021. 102 p. Dissertation (Master in Science) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2021.

The toxic effects caused by physical and chemical agents are a potential problem of global importance in the agricultural sector, due to the use of agents such as sodium chloride (NaCl) and silver nanoparticles (AgNPs), the last one frequently used in different industries. Regarding the NaCl, it is clear that their toxic effects at high concentrations may be due to water stress (when osmotic potential is decreased), but may also be caused by the toxic effect of the ions. Unlike salinity, the metabolic pathways of the toxic effects caused by AgNPs in plants are still not very clear and research is still in process, but there are antecedents and hypotheses that these can cause different types of damage, such as cytotoxicity and genotoxicity. Several computational techniques have made significant advances in image processing, especially convolutional neural networks (CNN); These techniques can be very useful in technical assistance for the automatic detection of diseases and also in the detection of plasticity against toxic agents. In order to generate images for training artificial neural networks, experiments are carried out with temperature, photoperiod and humidity at constant parameters. Experiments were divided into two methods, the plants that were subjected to toxicity with NaCl were grown in substrate *Carolina Soil* (*in vivo*), and the plants treated with AgNPs were grown *in vitro* and both were subjected to toxicity treatments under the same initial conditions. Plant *Tradescantia minima* subjected to toxicity experiments with NaCl showed less growth at high concentrations, their leaves also showed signs of dehydration (plasmolysis). In the case of plants treated with AgNPs, the growth difference was shorter. The results obtained with artificial intelligence in the experiments carried out with NaCl and AgNPs, yielded promising results for the use of AI in the detection of toxic effects through images and classifying the microscopic images according to the phenotypic plasticity in the leaves: 78.00% and 92.67% accuracy, for NaCl and AgNPs respectively, revealing the effectiveness of neural networks (CNN).

Keywords: Nanoparticles. CNN. Toxicity. Artificial intelligence.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 -	Processo de semeadura dos explantes de <i>Tradescantia minima</i> em vasos pequenos de 250 mL de volume.....	39
Figura 3.2 -	Processo de aplicação dos tratamentos correspondentes a cada grupo de plantas.	40
Figura 3.3 -	Processo de semeadura dos explantes de <i>Tradescantia minima</i> em tubos de ensaio. Fonte: Elaborada pelo autor.....	41
Figura 3.4 -	Fotos após do processo de semeadura in vitro dos explantes de <i>Tradescantia minima</i>	41
Figura 3.5 -	Processo de aplicação dos tratamentos com nanopartículas de prata nos explantes de <i>Tradescantia minima</i> , in vitro.	42
Figura 3.6 -	Técnica usada para a medição do comprimento dos estômatos (células - guarda).	44
Figura 3.7 -	Processo de medição do comprimento dos estômatos (células-guarda) da planta <i>Tradescantia minima</i> com aumento de 200x. a) Grupo controle, b) 1 mM, c) 10 mM, d) 100 mM, e) 300 mM de NaCl.	44
Figura 3.8 -	Microfotografias da superfície abaxial da folha da planta <i>Tradescantia minima</i> amostrando os estômatos marcados usando VGG Image Annotator: a) Grupo controle, b) 1mM, c) 10 mM, d) 100 mM, e) 300 mM de NaCl.	46
Figura 3.9 -	Ilustração que mostra as distâncias euclidianas entre o estômato p_1 e os demais (em setas vermelhas). Também mostra os dados geométricos necessários para calcular a distância euclidiana entre o estômato p_1 e p_2 a partir de suas coordenadas.	47
Figura 3.10 -	A direção da projeção encontrada com a otimização de Fisher mostra que o gráfico à direita torna a classificação muito mais fácil do que à esquerda.....	53
Figura 3.11 -	Linha separadora de duas classes usando SVM.	54
Figura 3.12 -	Processo do método de K-Vizinhos Mais Próximos (KNN).	55

Figura 3.13 - Modelo do perceptron, neurônio artificial mostrando o processo de vetorização de uma imagem antes de ser inseridas.....	56
Figura 3.14 - Modelo de uma rede neural com uma camada intermediária.....	57
Figura 3.15 - Modelo de uma rede neural profunda com múltiplas camadas. A camada de entrada é representada na cor azul, a camada oculta na cor turquesa claro, e a camada de saída na cor azul claro.	58
Figura 3.16 - Descrição geral de uma rede neural convolucional. Os dados de entrada (imagem) são primeiro processados com camadas convolucionais e Max Pooling. Os resultados desta camada são processados posteriormente em camadas totalmente conectadas.	59
Figura 3.17 - Esquemas da camada convolucional (a, b) e a camada de Max Pooling (c). Em (a), os filtros têm um tamanho de $F \times F$ ($F = 3$ nesta figura). Em (b), um grupo de M filtros é transformado em imagens de M canais na camada anterior. Este processo é repetido N vezes para produzir uma imagem de N canais de saída. Em (c), após os valores máximos dentro de pixels $H \times H$ (2 nesta figura) são extraídos na camada de Max Pooling.....	60
Figura 3.18 - Diagrama da rede totalmente conectada usada após a camada convolucional da CNN implementada (custom CNN).	61
Figura 3.19 - À esquerda, uma representação reduzida da arquitetura da ResNet-50 utilizada na presente dissertação. À direita, a arquitetura da ResNet-50 mostrada em detalhes.	63
Figura 4.1. Fotografia das plantas após serem submetidas à experimentação com NaCl.	66
Figura 4.2 - Fotografia das plantas após serem submetidas à experimentação com AgNPs.	77

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 4.1 - Na esquerda, o gráfico Q-Q plot dos resíduos do modelo linear (Anova) mostra um comportamento de distribuição normal, usando o tamanho das plantas como variável dependente. À direita, o boxplot mostra as significâncias das comparações por pares (Tukey HSD). A significância é codificada desta forma: 0 '****' 0.0001 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05.67
- Gráfico 4.2 - Na esquerda, o gráfico Q-Q plot dos resíduos do modelo linear (Anova) mostra um comportamento de distribuição normal, usando o tamanho dos estômatos como variável dependente. À direita, o boxplot mostra as significâncias das comparações por pares (Tukey HSD). A significância é codificada desta forma: 0 '****' 0.0001 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05.69
- Gráfico 4.3 - Gráfico Q-Q plot dos resíduos do modelo linear (Anova) mostra um comportamento de distribuição não normal, usando a distância ao estômato mais próximo como variável dependente.72
- Gráfico 4.4 - Gráfico boxplot mostrando as significâncias das comparações por pares (Trimmed means de Yuen).72
- Gráfico 4.5 - Na esquerda, o gráfico Q-Q plot dos resíduos do modelo linear (Anova) mostra um comportamento de distribuição normal, usando o tamanho das plantas como variável dependente (Experimento com AgNPs). À direita, o boxplot mostra as significâncias das comparações por pares (Duncan). A significância é codificada desta forma: 0.001 '***' 0.01 '*' 0.05.76
- Gráfico 4.6 - Boxplot de comparação das taxas de acerto (accuracy) dos métodos computacionais.....79
- Gráfico 4.7 - Boxplot de comparação das taxas de acerto (accuracy) dos métodos computacionais, segundo o lado da folha (adaxial ou abaxial) e segundo a quantidade de classes (Binario ou multiclasse).80
- Gráfico 4.8 - Boxplot de Acima amostra se a comparação das redes neurais (RestNet50 e custom CNN), no meio a comparação dos aumentos da microscopia usada, e embaixo a comparação dos

tipos de classificação (Binario ou Multiclasse), segundo o experimento (com NaCl ou AgNPs)..... 81

Gráfico 4.9 - Matriz de confusão entre as etiquetas verdadeiras e as etiquetas das predições, em experimento com cloreto de sódio (NaCl). Feito com os resultados de classificação binaria do lado adaxial da folha e aumento de 50x. Onde: 1 = verdadeiro, 0 = falso. Fonte: Fonte: Elaborada pelo autor, usando python..... 83

Gráfico 4.10 - Matriz de confusão entre as etiquetas verdadeiras e as etiquetas das predições, em experimento com nanopartículas de prata (AgNPs). Feito com os resultados de classificação binaria do lado adaxial da folha e aumento de 50x. Onde: 1 = verdadeiro, 0 = falso..... 84

Gráfico 4.11 - Matriz de confusão entre as etiquetas verdadeiras e as etiquetas das predições, em experimento com cloreto de sódio (NaCl). Feito com os resultados de classificação multiclasse do lado adaxial da folha e aumento 50x..... 84

Gráfico 4.12 - Matriz de confusão entre as etiquetas verdadeiras e as etiquetas das predições, em experimento com nanopartículas de prata (AgNPs). Feito com os resultados de classificação multiclasse do lado adaxial da folha e aumento 50x. 85

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 - Arquitetura da Rede Neural Convolucional implementada (custom CNN).	62
Tabela 4.1 - Estatísticas descritivas do tamanho das plantas tratadas com NaCl. Onde M e SD representam a média e desvio padrão, respectivamente.....	66
Tabela 4.2 - ANOVA de efeitos fixos usando o tamanho das plantas como variável dependente.....	66
Tabela 4.3 - Estatísticas descritivas do tamanho dos estômatos do experimento com NaCl. Onde M e SD representam a média e desvio padrão, respectivamente.	68
Tabela 4.4 - ANOVA de efeitos fixos usando o tamanho dos estômatos como variável dependente.....	68
Tabela 4.5 - Estatísticas descritivas da distância ao estômato mais próximo do experimento com NaCl. Onde M e SD representam as médias aparadas (trimmed means) e desvio padrão, respectivamente.....	71
Tabela 4.6 - ANOVA heterocedastico de uma via de médias aparadas (trimmed means) usando o a distância ao estômato mais próximo como variável dependente.	71
Tabela 4.7 - Quantidade de imagens usadas para extração de características, classificação e treinamento para os métodos clássicos e para Redes Neurais.	73
Tabela 4.8 - Resultados da aplicação de descritores de textura em imagens de experimentos com NaCl (Aumento 50x), obtidos com 2 classes (Binário).....	74
Tabela 4.9 - Resultados da aplicação de descritores de textura em imagens de experimentos com NaCl (Aumento 50x), obtidos com 5 classes (Multiclasse).	74

Tabela 4.10 - Estatísticas descritivas do tamanho das plantas tratadas com AgNPs. Onde M e SD representam a média e desvio padrão, respectivamente.	75
Tabela 4.11 - ANOVA de efeitos fixos usando o tamanho das plantas como variável dependente. Experimento com nanopartículas de prata (AgNPs).	76
Tabela 4.12 - Resultados da aplicação de CNNs em imagens de experimentos com NaCl.	78
Tabela 4.13 - Resultados da aplicação de CNNs em imagens de experimentos com AgNPs.	78

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
1.1	Plasticidade das plantas:	21
1.2	Nanopartículas:.....	22
1.2.1	Aplicações Biomédicas:	24
1.2.2	Em embalagens:	26
1.2.3	Nos alimentos:	27
1.2.4	Toxicidade em pessoas	28
1.2.5	Toxicidade em animais:	29
1.2.6	Toxicidade em plantas:	30
1.3	Salinidade em plantas:.....	32
1.4	Redes Neurais	34
2	Objetivos	37
3	MATERIAIS E MÉTODOS	39
3.1	Fase Experimental	39
3.1.1	Experimento em substrato	39
3.1.2	Experimento <i>in vitro</i>	40
3.2	Fase de coleta de dados.....	42
3.2.1	Captura de microfotografias.....	42
3.2.2	Medições macroscópicas e microscópicas	43
3.3	Fase Computacional	47
3.3.1	Estatística	47
3.3.2	Métodos clássicos de visão computacional	48
3.3.3	Métodos de classificação	51
3.3.4	Redes Neurais Convolucionais (CNN).....	55
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
4.1	Experimento com NaCl	65
4.1.1	Tamanho das plantas	65
4.1.2	Estômatos	67
4.1.3	Métodos clássicos	73
4.2	Experimento com AgNPs	74
4.2.1	Tamanho das plantas	74
4.3	Comparação de métodos computacionais.....	77
5	CONCLUSÃO	87

REFERÊNCIAS..... 89

1 INTRODUÇÃO

1.1 Plasticidade das plantas:

A plasticidade fenotípica é a capacidade de um determinado genótipo ou população expressar diferentes fenótipos em face da variação ambiental ou em ambientes heterogêneos, alterando sua morfologia e fisiologia.¹⁻³ Essas mudanças nas características das plantas são sinais de adaptação e evolução em ambientes heterogêneos.⁴⁻⁵

As variações significativas nas características morfológicas das plantas (plasticidade) são uma resposta adaptativa ao seu desempenho bem-sucedido,⁶ e a seleção natural para o crescimento das plantas em um ambiente hostil.⁷ As mudanças nas variáveis climáticas, incluindo luz, temperatura, chuva, entre outras variáveis ao longo dos gradientes de elevação, podem estar associadas a características melhoradas das plantas e suas respostas evolutivas.⁸ Isso ocorre porque as variáveis ecológicas podem ser cruciais para o rendimento e a sobrevivência das plantas.⁷ A maioria das pesquisas sobre a plasticidade, morfologia e sobrevivência das plantas foi realizada em ambientes controlados.⁹

A quantificação da plasticidade fenotípica não é valiosa apenas contra o conhecimento ecológico das espécies, sendo também necessário desenvolver modelos que permitam prever as respostas das espécies às mudanças climáticas.¹⁰ Os ecologistas estão cada vez mais interessados em prever como as características das espécies e a variação fenotípica impactam as interações das espécies, a composição da comunidade e a função do ecossistema.¹¹⁻¹²

Alguns estudos recentes propõem que a plasticidade fenotípica pode ser mediada por efeitos epigenéticos.¹³⁻¹⁴ O efeito epigenético mais estudado é a metilação do DNA, que demonstrou aumentar a variância em resposta a condições de estresse¹⁵⁻¹⁶ e tem efeitos conhecidos em fenótipos ecologicamente importantes.^{13,17} Portanto, os estados epigenéticos podem ser alterados, e os efeitos epigenéticos poderiam fornecer uma fonte rápida de variação fenotípica sem nenhuma mudança na variação genética,¹⁸ que afeta a capacidade das populações de persistir quando muda o clima.

Em geral, as plantas exibem com frequência plasticidade nas raízes sob estresse por salinidade, sendo essa a chave para lidar com condições estressantes, já que as superfícies das raízes são expostas primeiro ao estresse ambiental. A plasticidade morfológica das raízes pode prevenir o acúmulo de sal nas raízes para que a absorção de água possa continuar em solos salinos.¹⁹ O estresse salino regula amplamente a formação e o desenvolvimento dos pelos das raízes. O desenvolvimento epidérmico das raízes apresenta plasticidade, já que os fatores externos modulam os tipos de células epidérmicas e o início dos pelos radiculares.²⁰ A plasticidade no desenvolvimento da epiderme radicular em resposta às condições ambientais variáveis poderia indicar uma função dos pelos radiculares na detecção de sinais ambientais aos quais as plantas se adaptam sob condições de estresse.²¹

As folhas são os órgãos das plantas mais expostos às condições aéreas, além de serem mais sensíveis e plásticas às mudanças ambientais em relação aos demais órgãos. As mudanças ambientais geralmente resultam em respostas morfológicas e anatômicas; em comprimento, largura e espessura; na superfície (estômatos, epiderme, inserção); e no mesofilo (paliçada, esponjoso, espaço intercelular, esclerificação, veias).²² Muitos fatores, como a luz, quantidade de água no solo, umidade e temperatura, afetam a morfologia e a estrutura das folhas.²³

Os metais pesados são um dos fatores de estresse mais prejudiciais que existem no meio ambiente. Sejam eles necessários ou não para o crescimento das plantas, todos os metais pesados são tóxicos para as plantas em altas concentrações.²⁴ A absorção e o acúmulo de metais em concentrações mais elevadas causam alterações estruturais e ultraestruturais, porém, existem poucas informações sobre a resposta da anatomia foliar ao estresse por metais.²⁵

1.2 Nanopartículas:

A nanociência estabeleceu-se recentemente como uma nova ciência interdisciplinar. É considerada como um conhecimento sobre as propriedades dos materiais de tamanho nanométrico.²⁶⁻²⁷ O prefixo "nano" refere-se a um milionésimo (10^{-9}) de uma unidade, e a natureza dessa unidade é determinada por esta palavra. É aceito

na área da nanociência que as unidades das nanotecnologias devam ser dimensões em vez de qualquer outra unidade de medida científica.²⁴

A nanotecnologia tem mostrado grande avanço tecnológico em diversas áreas, como biomedicina, farmacêutica, cosmética, meio ambiente, têxtil, alimentação e agroindústria.²⁹ Alguns estudos mostram que há um crescimento no número de produtos comerciais disponíveis nos últimos anos que utilizam nanomateriais, sendo os mais comuns aparelhos digitais, artigos, roupas resistentes a manchas, protetores solares, cosméticos e produtos agrícolas. Essa quantidade passou de 50 produtos no ano de 2005 para mais de 1300 no ano de 2010.³⁰

A maioria desses produtos é voltada para a saúde e fitness (próximo de 2000) e aproximadamente um sexto de todos os produtos estão incluídos na categoria de casa e jardim. Mais de 700 são produtos de beleza e cuidados pessoais, e próximo de 400 são usados na indústria de roupas.³¹ Os avanços na nanotecnologia têm desenvolvido um grande número de novos produtos que contêm nanomateriais e que cada vez mais fornecem vários tipos de nanopartículas (NPs).³² Além disso, existe um consenso de que as nanopartículas são agrupamentos de átomos que costumam ter um tamanho entre 1 e 100 nm.²⁸ O nanomaterial mais utilizado para essa finalidade é a prata, principalmente por sua atividade antimicrobiana, seguida do titânio e do silício.³³

As nanopartículas de prata (AgNPs) são de grande interesse devido às suas propriedades exclusivas, por exemplo, seu tamanho, sua forma e suas propriedades elétricas ou magnéticas ópticas que podem ser incluídas em aplicações antimicrobianas.³⁴ As AgNPs têm sido extensivamente estudadas devido a esse particular interesse em suas propriedades antimicrobianas e de ressonância plasmônica de superfície localizada, que lhes conferem propriedades únicas como um antimicrobiano de amplo espectro,³⁴⁻³⁶ também com aplicações em espectroscopia Raman amplificada de superfície (SERS),³⁷⁻³⁸ em sensores químicos/biológicos e materiais de biomedicina³⁹⁻⁴¹ e biomarcadores.⁴²⁻⁴⁴ Essas características proporcionam uma grande variedade de aplicações comerciais para nanopartículas de prata, refletindo numa série de crescente e significativa produção, e consequente eliminação para o meio ambiente.⁴⁵

1.2.1 Aplicações Biomédicas:

O direcionamento de drogas para órgãos e tecidos específicos tornou-se um grande desafio nos últimos anos. Isso se deve ao fato de que, no caso das vias de administração convencionais de fármacos, existem dificuldades em se atingir o objetivo com a dose desejada durante um período de tempo definido. Agora, é possível superar o problema das barreiras bioquímicas no corpo (como a barreira hematoencefálica). Os novos sistemas são capazes de resolver os problemas de solubilidade do fármaco e protegê-lo da fotodegradação e de alterações do pH.⁴⁶ As formas mais comuns de administração dos fármacos incluem lipossomas, cristais líquidos, dendrímeros, ciclodextrinas, micelas, polimerssomas, hidrogéis e nanopartículas (nanoesferas e nanocápsulas).⁴⁷

Dentre todos os tipos de nanopartículas à base de metais nobres, as nanopartículas de ouro (AuNPs) têm demonstrado grande capacidade de uso como possíveis portadores de fármacos. É relativamente fácil obter nanopartículas de ouro com vários tamanhos e formas (esféricas, em forma de bastão, etc.). Além disso, as AuNPs podem ser facilmente funcionalizadas com diferentes tipos de moléculas. A biocompatibilidade, estabilidade, efeito macroscópico de tunelamento quântico e a presença de bandas de ressonância plasmônica de superfície (SPR) também são características importantes das AuNPs. No entanto, não são biodegradáveis e a modificação da superfície pode levar a mudanças na toxicidade, biodistribuição e farmacocinética dos medicamentos transportados.⁴⁸

As nanopartículas de ouro (AuNPs) e prata (AgNPs) têm demonstrado grande capacidade e resultados promissores tanto no diagnóstico quanto na terapia do câncer. Os medicamentos usados atualmente para os tratamentos de câncer são tóxicos para o corpo, produzindo efeitos colaterais e indesejáveis, desenvolvimento de resistência aos medicamentos, metabolismo rápido dos medicamentos e eliminação do corpo do paciente, reduzindo o tempo de tratamento eficaz. A síntese biológica de nanopartículas metálicas fornece agentes terapêuticos seguros e eficazes para o tratamento do câncer. As nanopartículas formuladas com diferentes metais podem apresentar diferentes propriedades e, portanto, espera-se que apresentem diferentes mecanismos de toxicidade contra várias células cancerosas.

As AuNPs e AgNPs também podem ser usadas em conjugação ou combinação com fármacos ou revestidas com um polímero para se usar contra células cancerosas.⁴⁹

A conjugação da AuNP com medicamentos, como antibióticos ou medicamentos anticâncer, não representa um problema, mas é preciso evidenciar que a biofuncionalização, necessária para poder unir os medicamentos desejados, pode alterar a toxicidade das nanopartículas. Gu *et al.* têm demonstrado que as AuNPs conjugadas com polietilenoglicol (PEG) e ácido 3-mercaptopropiônico não induzem citotoxicidade na linha celular de câncer cervical (HeLa).⁵⁰

Bhattacharya *et al.* descobriram que as AuNPs interagem com o ácido fólico PEG-amina, permitindo a administração de medicamentos aos tumores através da ligação ao receptor de folato encontrado na superfície de algumas células cancerosas.⁵¹

Recentes estudos têm revelado que as AuNPs com diferentes formas (Nanoesferas ou Nanobars) protegem os ácidos nucleicos, evitando que o DNA ou RNA sejam degradados pela nuclease. As AuNPs conjugadas com oligonucleotídeos têm propriedades únicas que podem torná-las agentes reguladores de potenciais genes. Esses carreadores podem se dividir em covalentes e não covalentes.⁵² As AuNPs covalentes são capazes de ativar genes relacionados ao sistema imunológico em células mononucleares do sangue periférico. Esta descoberta é promissora na aplicação de tais conjugados no desenvolvimento de sistemas de administração de genes.⁵³ Son *et al.* uniram três fragmentos de ácido nucleico à superfície de AuNP e obtiveram uma nanomáquina que silencia a polo-like kinase 1 via siRNA.⁵⁴ Peng *et al.* sintetizaram AuNPs revestidas com peptídeos derivados de lactoferrina. Estes conjugados obtidos podem entregar eficientemente genes que codificam o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) que induz a formação de vasos sanguíneos.

55

As AgNPs entram nas células dos mamíferos principalmente como agregados por meio de endocitose e também podem cruzar a barreira hematoencefálica devido ao pequeno tamanho que têm. Ao entrarem na célula por uma vesícula endocítica, elas são distribuídas para o citoplasma e núcleo através do tráfego intracelular.⁵⁶ Em uma tentativa de analisar sua toxicidade para a saúde humana, foi descoberto que as AgNPs são tóxicas para as células normais e cancerosas.⁵⁷ A propriedade anticancerígena tem sido analisada *in vitro* contra vários tipos de células cancerosas:

células de hepatoma humano,⁵⁸ câncer de pulmão,⁵⁹ câncer de mama⁶⁰ e carcinoma cervical.⁶¹

O efeito antiproliferativo das células cancerosas mediado pelas AgNPs é devido à capacidade de danificar o DNA, quebrar cromossomos produzindo instabilidade genômica, alterar a homeostase do cálcio (Ca^{2+}) que induz apoptose, dano celular e instabilidade do citoesqueleto. A lesão do citoesqueleto bloqueia o ciclo e a divisão celular, promovendo a atividade antiproliferativa das células cancerosas.⁶²

1.2.2 Em embalagens:

As empresas da área de materiais têm buscado desenvolver produtos com características e propriedades cada vez mais sofisticadas, que atendam à demanda dos consumidores e do mercado em geral. Ao longo destes anos, intensificou-se o desenvolvimento de materiais para este setor da indústria, cada vez mais resistentes mecânica e termicamente; recicláveis, biodegradáveis e que possuem propriedades como permeabilidade seletiva a gases, aumentando a vida útil de frutas e hortaliças.⁶³ A nanotecnologia possibilitou a manipulação e o desenvolvimento de nanopartículas que podem ser adicionadas a embalagens, conferindo-lhes novas funcionalidades. Estes aditivos são componentes adicionados aos materiais poliméricos já conhecidos que permitem melhorar ou aperfeiçoar várias propriedades de acordo com a aplicação desejada. A incorporação de nanopartículas como aditivos é uma alternativa para melhorar as propriedades mecânicas, estabilidade térmica e barreira aos gases.⁶⁴

O uso de nanopartículas dentro de uma estrutura polimérica tem se mostrado eficaz na preservação de alimentos, como no caso de embalagens contendo partículas de prata (AgNPs). Alguns estudos sobre o uso de embalagens de alimentos contendo nanopartículas de prata (AgNPs) mostraram uma diminuição na taxa de crescimento microbiano.⁶⁵ A eficácia de nanopartículas em microrganismos que poderiam causar deterioração, por exemplo, revelou resultados muito promissores.⁶⁶

1.2.3 Nos alimentos:

O setor de alimentos enfrenta desafios relacionados a mudanças nas atitudes, preferências, demografia, mudanças climáticas e seus impactos econômicos e sociais associados, bem como a crescente participação do comércio eletrônico. A indústria está continuamente adaptando suas estratégias para enfrentar esses desafios.⁶⁷ Nos últimos anos, a indústria de alimentos tem se expandido no desenvolvimento, preparo e comercialização de novos materiais, buscando características mais adequadas. Uma forma de melhorar o desempenho é incorporar a capacidade de prevenir o crescimento de bactérias nos alimentos. No entanto, no desenvolvimento de tais materiais de embalagem, um problema determinante é obter um sistema que facilite a migração lenta e contínua de agentes antimicrobianos na superfície do alimento para manter sua concentração necessária para inibir o crescimento microbiano por um longo tempo.⁶⁸⁻⁶⁹

O uso de fotocatalisadores como método de desinfecção microbiana tem ganhado atenção em muitas áreas, incluindo alimentos.⁷⁰ Dentre todos os fotocatalisadores conhecidos, o TiO_2 é um dos mais atraentes devido à sua capacidade antimicrobiana⁷¹ e suas propriedades estáveis, biocompatíveis e hidrofílicas.⁷² No entanto, ainda existem preocupações de segurança sobre o uso de nanopartículas em embalagens de alimentos. As informações disponíveis sobre nanopartículas que são mais frequentemente ingeridas e utilizadas na indústria de alimentos mostram valores que variam entre 1,25 e 3,59 $\mu\text{g}/\text{mg}$ para TiO_2 .⁷³

É bem conhecido que as nanopartículas têm novas propriedades químicas e físicas que diferem das macropartículas normais da mesma composição e podem interagir com sistemas vivos, causando toxicidade inesperada. Avaliações toxicológicas e de segurança já têm sido conduzidas para algumas nanopartículas, mas ainda são necessários mais estudos para avaliar o risco de exposição oral para o uso de nanopartículas em alimentos.⁷⁴

Outra área desafiadora é a nanoencapsulação de pesticidas, que libera pesticidas dentro do estômago do inseto, minimizando a contaminação de plantações. As aplicações atuais da nanotecnologia na ciência alimentar proporcionam a detecção de patógenos alimentares, por meio de nanossensores, que são procedimentos

rápidos, sensíveis e menos trabalhosos, com a crescente conscientização sobre a saúde entre os consumidores.⁷⁴

1.2.4 Toxicidade em pessoas

A diferença entre outros aditivos e as nanopartículas é o fato de que as nanopartículas de grau alimentício contidas nos alimentos são absorvidas e têm interações diretas na superfície com os componentes do sangue. Os efeitos adversos podem ser atribuídos à absorção celular e à indução de estresse oxidativo, que por sua vez depende das propriedades físico-químicas das nanopartículas, como forma, tamanho e carga.⁷⁵

O Dióxido de titânio de grau alimentício (TiO_2) é um aditivo de cor branca usado em bolos, molhos, doces, goma de mascar, iogurte, creme de café, bebidas com sabor e produtos de higiene pessoal, como pasta de dente.⁷⁶ Na Europa, este nanomaterial é utilizado nas quantidades necessárias, o que significa que não existe limite estabelecido para fins alimentares de acordo com as boas práticas de fabricação nesse país; enquanto o *Food and Drug Administration* (FDA) nos Estados Unidos aprovou o uso de dióxido de titânio em 1% do peso final do produto.⁷⁷ O *Panel on Food Additives and Nutrient Sources Added to Food* (ANS) declarou que são necessários mais dados sobre a toxicidade do TiO_2 para estabelecer uma ingestão diária aceitável.⁷⁸

Um estudo recente que usou nanopartículas de TiO_2 para embalagens de alimentos revelou que elas não têm efeito tóxico nas bactérias intestinais e nas células do cólon humano, mesmo quando suas concentrações são altas ($> 200 \mu\text{g/mL}$).⁷⁹ Quando o TiO_2 é irradiado com luz com comprimento de onda inferior a 386 nm, gera energia suficiente para induzir a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), bem como radicais hidroxila ($\text{OH}\cdot$) e radicais superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$).⁸⁰⁻⁸¹ Tem sido demonstrado que essas espécies reativas degradam os componentes celulares de uma ampla gama de microrganismos e agem como agentes antibacterianos por meio de um mecanismo redox.⁸²

Há evidências de que o TiO_2 é absorvido pelo trato gastrointestinal e translocado para a corrente sanguínea de voluntários humanos após 6 horas de ingestão.⁸³ Em

um estudo de Heringa *et al.*, foram analisadas 15 amostras *post-mortem* de fígado e baço de humanos caucasianos de aproximadamente 84 anos de idade e a concentração de titânio no fígado foi de $0,04 \pm 0,02$ mg Ti/kg de tecido, enquanto no baço foi de $0,08 \pm 0,1$ mg Ti/kg de tecido e mais de 24% das partículas apresentaram tamanho inferior a 100 nm.⁸⁴ O fígado é o principal órgão de acúmulo de aditivos alimentares que contêm nanopartículas, sendo provavelmente o mais afetado. Além disso, o autor afirma que as pesquisas sobre os riscos à saúde devido aos aditivos alimentares contendo nanopartículas não recebem suficiente atenção.

A fraca vigilância e regulamentação governamental sobre esta nova tecnologia é agravada pela falta de dados e protocolos de segurança adequados, o que reforça os possíveis efeitos negativos que poderiam ocorrer na saúde e no ambiente. Um inventário de nanodados da Dinamarca⁸⁵ e Johnston *et al.*⁸⁶ têm demonstrado que as principais vias de exposição às nanopartículas de prata (AgNPs) são oral, dérmica e respiratória. A superexposição a essas nanopartículas pode resultar em riscos prejudiciais, provocando descoloração permanente da pele, causando uma cor cinza-azulada (argiria) ou nos olhos (argirrose).⁸⁷ No entanto, as AgNPs também podem danificar as células epiteliais⁸⁸ e interferem na replicação do DNA.⁸⁹

1.2.5 Toxicidade em animais:

Nas pesquisas de Farrell e Magnuson⁹⁰, não foi encontrada nenhuma diferença na absorção sistêmica após o consumo de alimentos contendo TiO₂. Blevins *et al.*⁹¹ não encontraram efeitos tóxicos nas amostras histopatológicas de vários órgãos, incluindo intestino, fígado e baço, além disso, os parâmetros imunológicos não mostraram alterações. Por outro lado, Bettini *et al.* explicam que o TiO₂ agrava os efeitos da colite e formação de tumores em murinos, promovendo inflamação do cólon e lesões pré-neoplásicas, bem como focos de cripta aberrante em ratos expostos por via oral com água contendo TiO₂ (10 mg/kg bw/dia) por 100 dias.⁹²

O estudo de Urrutia-Ortega *et al.* mostrou 4 vezes mais tumores no cólon após administração intragástrica de TiO₂ (5 mg/kg bw/dia) por 10 semanas em camundongos que sofriam de colite.⁹³ Além disso, o titânio acumulado no fígado e intestino causa inflamação no estômago e no intestino, bem como aumento da

produção de ânions superóxido nesses órgãos em camundongos que receberam 2 mg/kg de peso corporal de TiO_2 por 3 dias por semana por 3 semanas via oral.⁹⁴

Alguns ensaios de toxicidade em *Daphnia magna* com nanopartículas de ouro (AuNPs) funcionalizadas mostraram que não apenas a carga no grupo funcionalizado aumenta a toxicidade aguda e crônica, mas também o tipo de grupo funcionalizado desempenha um papel importante na toxicidade.⁹⁵ Foram estudadas as AuNPs modificadas com monocamadas hidrofílicas e hidrofóbicas para determinar sua absorção, distribuição e toxicidade em peixes medaka. Foram encontradas partículas hidrofílicas no intestino dos peixes, mas não foi observado nenhum efeito perceptível na saúde enquanto as partículas hidrofóbicas se espalhavam para diferentes órgãos, resultando na mortalidade dos peixes em menos de 24 horas.⁹⁶

A toxicidade, o destino e estabilidade das nanopartículas de prata (AgNPs) em qualquer meio são altamente dependentes do tipo de grupos orgânicos revestidos na superfície,⁹⁷ e os estudos de interação celular indicaram que as AgNPs de tamanho pequeno (15 nm) induziram mais toxicidade às células, gerando quantidades 10 vezes maiores de espécies reativas de oxigênio em comparação com as AgNPs de tamanho grande (30 e 55 nm).⁹⁸ Os peixes truta arco-íris foram expostos a AgNPs comerciais de diferentes tamanhos (10, 35, 600-1600 nm) para determinar seu destino e efeitos. Os resultados revelaram que grandes quantidades de pequenas partículas (10 nm) se acumularam nas brânquias e nos tecidos do fígado.⁹⁹

1.2.6 Toxicidade em plantas:

As plantas sempre interagiram e evoluíram na presença de nanopartículas de fontes naturais, como as de processos de intemperismo em solos e de águas superficiais ou vulcões em erupção.¹⁰⁰ A conscientização humana acerca das interações entre nanopartículas e plantas aumentou há uma década¹⁰¹ com a crescente exposição ambiental de nanopartículas antropogênicas incidentais e artificiais. As pesquisas recentes sobre essas interações levaram a um progresso empolgante,

especialmente no campo dos nanoagroquímicos¹⁰² e os efeitos tóxicos destes nas plantas.

Os nanofertilizantes ou nutrientes nanoencapsulados podem ter propriedades que são eficazes para as plantações, liberam os nutrientes no lugar necessário, e liberam fertilizantes químicos que regulam o crescimento das plantas.¹⁰³ Segundo Galbraith, as nanopartículas projetadas podem intervir nas células e folhas das plantas, e também podem transportar DNA e produtos químicos para as células vegetais.¹⁰⁴ A maioria dos estudos sobre nanopartículas até agora refere-se à toxicidade, ao invés de seus benefícios para as plantas.¹⁰⁵

Poucos estudos sobre a interação de nanopartículas de ouro (AuNPs) com plantas têm sido realizados. Alguns pesquisadores descobriram que as AuNPs induzem toxicidade nas plantas ao inibir a função das aquaporinas, um grupo de proteínas que auxiliam no transporte de uma ampla gama de moléculas, incluindo a água.¹⁰⁶ No entanto, alguns autores relatam que as AuNPs melhoram a germinação das sementes.¹⁰⁷⁻¹⁰⁸

Tem sido documentado um grande número de estudos sobre nanopartículas de prata em microrganismos e animais, no entanto, poucos estudos têm sido realizados em plantas.¹⁰⁹ As AgNPs têm um efeito positivo e negativo no alongamento das raízes dependendo da espécie da planta. No estudo de Gruyer *et al.*, o comprimento da raiz aumentou na cevada, mas foi inibido na alface.¹¹⁰ O efeito das AgNPs na morfologia e fisiologia das plantas depende de seu tamanho e forma. As AgNPs ativam a inibição do alongamento radicular derivado do ácido aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), ACC sintase 7 e ACC oxidase 2 em plântulas de *Arabidopsis*, atuando como inibidores da percepção do etileno e que podem interferir na biossíntese do etileno.¹¹¹

A espécie *Arabidopsis thaliana* é frequentemente usada em muitos estudos que investigam os efeitos e a toxicidade de AgNPs nas plantas. O estudo da expressão gênica em *A. thaliana* mostrou uma regulação positiva de 286 genes e uma regulação negativa de 81 genes após o tratamento com AgNP, em comparação com plantas tratadas apenas com Ag⁺.¹¹² Tal resultado sugere que alguns efeitos se originam especificamente no Ag⁺ liberado pelas AgNPs. A expressão regulada negativamente tanto por Ag⁺ quanto por AgNP incluiu genes relacionados à

sinalização do etileno e à resposta a patógenos e estímulos hormonais, como a resistência sistêmica adquirida (SAR) contra fungos e bactérias.¹¹³

Estudos realizados sobre a expressão de genes e proteínas após a exposição a AgNPs revelaram vias envolvidas na citotoxicidade. Os estudos proteômicos em *Oryza sativa* (arroz) mostraram um aumento dos precursores de proteínas para tolerância ao estresse oxidativo, regulação e sinalização de cálcio, além de causar danos diretos à parede celular, DNA, RNA, proteínas, divisão celular e apoptose após exposição a AgNP (até 60 µg/ml; 18 nm) por 21 dias.¹¹⁴ Outros estudos indicam que as AgNPs têm a capacidade de alterar a expressão gênica e causar citotoxicidade, incluindo genotoxicidade, o que pode ser uma preocupação para o ecossistema. Também foi demonstrado que as AgNPs eram mais tóxicas do que Ag⁺, adicionando uma nova perspectiva ao tema de efeitos das nanopartículas versus íons.¹¹⁴

Estudos em outras espécies visando demonstrar a toxicidade das AgNPs devido à formação de ROS mostraram uma alta correlação entre a geração de ROS e a diminuição de células viáveis em *Lemna gibba* (lentilha). Neste mesmo estudo, foram achados altos níveis de prata intracelular após a exposição a nanopartículas (50 nm). Oukarroum *et al.* indicaram que a captação intracelular e liberação de Ag livre nas células desta planta que causou estresse oxidativo foi resultado direto da exposição ao AgNP.¹¹⁵

1.3 Salinidade em plantas:

A salinidade é um dos fatores ambientais mais severos que afetam as plantas, inibindo o crescimento e o desempenho das plantas cultivadas. Mais de 7% da superfície terrestre do mundo e até 50% das áreas agrícolas irrigadas são afetadas pela salinidade.¹¹⁶

A salinidade provoca várias condições para as plantas, como o estresse hídrico, a desnutrição e o acúmulo de íons em excesso a níveis potencialmente tóxicos. A tolerância ao sal difere marcadamente entre as espécies, variedades, estágios ontogenéticos, e geralmente é avaliada pelo rendimento ou taxas de sobrevivência. A tolerância ao sal nas plantas e a adaptação à salinidade são determinadas por

vários mecanismos ao nível das células, tecidos e órgãos.¹¹⁷ As raízes podem apresentar uma enorme plasticidade ao nível da morfologia e fisiologia em resposta a diferentes parâmetros ambientais, como a disponibilidade de água e nutrientes ou o excesso de íons.¹¹⁸ No entanto, apesar da probabilidade de que o sistema radicular possa ser a base para diferentes tolerâncias ao sal, as informações sobre a plasticidade fisiológica e fenotípica do sistema radicular sob estresse salino são escassas.¹¹⁹

Os sais alteram a absorção de água, afetando o crescimento das raízes, além de produzir efeitos tóxicos. A magnitude da resposta das plantas está relacionada à concentração dos sais, à duração do estresse ao qual estão expostas e à espécie. A parte aérea do tomate é afetada pela salinidade, sendo que as plantas atingem um tamanho menor, as folhas se apresentam em menor número e, ao mesmo tempo, apresentam diminuição da densidade estomática na face adaxial, clorose e necrose principalmente na borda das folhas, e a área foliar também diminui.¹²⁰

A modulação de diferentes alterações morfoanatômicas em raízes e folhas, a mudança no tamanho e no número das ultraestruturas, como cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos, fazem parte da adaptação da planta durante o estresse salino.¹²¹ A planta também responde à salinidade, regulando os níveis de fitohormônios endógenos, como ácido abscísico (ABA), auxinas, citocininas, ácido salicílico (SA), ácido jasmônico (JA), poliaminas, giberelinas e brassinosteróides (BR).¹²² A planta também regula positivamente muitos genes, fatores de transcrição, proteínas e metabólitos para desenvolver tolerância contra a salinidade. As abordagens ômicas, como genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica, são respostas essenciais da planta para se adaptar à salinidade e melhorar a produtividade.¹²³

A fotossíntese é um dos processos físico-químicos mais importantes, mas é muito sensível à salinidade. A salinidade leva a uma redução da fotossíntese ao tornar os estômatos sensíveis.¹²⁴ Também torna difícil a transpiração e reduz a condutância estomática, provocando uma troca gasosa deficiente e reduzindo a taxa de fotossíntese. A salinidade leva a uma redução do pigmento fotossintético em gramíneas halofíticas.¹²⁵

No brócolis, a alta salinidade leva a baixos índices fotossintéticos, conteúdo total de clorofila e degradação da estrutura do cloroplasto.¹²⁶ Uma maior concentração de sal

afetou gravemente a cadeia de transporte de elétrons fotossintética no grão de bico,¹²⁷ e também reduziu a condutância estomática, transpiração, fotossíntese e conteúdo de clorofila em vários genótipos de romã.¹²⁸ A alta salinidade ocasionou uma anomalia nos estômatos e na estrutura do cloroplasto e ao pigmento de clorofila, reduzindo ainda mais a fotossíntese em *Eruca sativa*.¹²⁹ No milho, a alta salinidade leva a uma redução na fluorescência da clorofila, na atividade da Rubisco e no conteúdo total de clorofila. Também causa deterioração na estrutura do cloroplasto e estômatos.¹³⁰ Portanto, a salinidade nas plantas leva à uma redução da fotossíntese, a fluorescência da clorofila, a transpiração e condutância estomática, degradando a ultraestrutura, a clorofila e a síntese de carotenóides.¹³¹

1.4 Redes Neurais

A área de “Machine Learning” que mais tem atraído atenção da comunidade científica nos últimos anos, devido à sua aplicabilidade em diferentes áreas e contextos da ciência, é a aprendizagem profunda. Esta é uma classe de aprendizado de máquina que permite a extração de abstrações de alto nível de grandes conjuntos de dados brutos, com alta dimensionalidade e heterogeneidade.¹³²⁻¹³³

O principal objetivo deste tipo de Machine Learning consiste em construir redes (modelos) que recebem um conjunto de variáveis de entrada e retornam uma previsão de uma variável alvo.¹³²

As redes neurais profundas têm sido aplicadas recentemente com sucesso em áreas diversas como exemplos de aprendizagem ponta a ponta. As redes neurais fornecem um mapeamento entre uma entrada, como a imagem de uma planta doente, e uma saída, como um cultivo ou um par de doenças. Os nós de uma rede neural são funções matemáticas que recebem entradas numéricas das arestas de entrada e fornecem uma saída numérica como aresta de saída. As redes neurais profundas simplesmente estão mapeando a camada de entrada para a camada de saída em uma série de camadas empilhadas de nós. O desafio é criar uma rede profunda de forma que a estrutura da rede, bem como as funções (nós) e os pesos das arestas mapeiem corretamente a entrada para a saída. As redes neurais

profundas são treinadas ajustando os parâmetros da rede de forma que o mapeamento melhore durante o processo de treinamento.¹³⁴

O aprendizado supervisionado se refere ao Machine Learning que fornece as etiquetas dos dados que são usados para o treinamento do modelo (Deep Learning). Uma etiqueta é uma característica (como uma planta doente, um tipo de planta cultivada ou um determinado experimento) que está associada a uma imagem. No caso de um modelo de Deep Learning, é possível distinguir entre milho, soja e girassóis após a coleta de um grande número de imagens. Se o modelo for treinado com um conjunto de imagens, cada uma rotulada de soja, milho ou girassol, o processo de aprendizagem é denominado "supervisionado".

Alternativamente, se as imagens de treinamento forem fornecidas sem rótulos, o processo de aprendizagem é não supervisionado. Embora algumas ferramentas de aprendizado de máquina possam ser treinadas com ou sem supervisão, algumas podem ser treinadas das duas maneiras. Com o processo de aprendizado supervisionado, um modelo tenta essencialmente aprender um mapa entre o conjunto de dados de entrada e as etiquetas de saída correspondentes. Para o caso dado, significa que um modelo treinado supervisionado aprende como atribuir todas as imagens de soja ao rótulo da soja, e assim por diante.¹³⁵

2 Objetivos

Objetivos Gerais:

- Desenvolver métodos computacionais para detectar plasticidade vegetal em *Tradescantia minima* causada por agentes tóxicos.
- Detectar plasticidade fenotípica em *Tradescantia minima* induzido pelo cloreto de sódio (NaCl) e por nanopartículas de prata (AgNPs).

Objetivo específico:

- Avaliar o efeito cloreto de sódio (NaCl) e das nanopartículas de prata (AgNPs) sobre o tamanho das plantas
- Avaliar o efeito cloreto de sódio (NaCl) sobre o tamanho dos estômatos.
- Avaliar o efeito cloreto de sódio (NaCl) sobre a densidade estomática.
- Avaliar os padrões de texturas usando métodos computacionais clássicos.
- Criar uma rede neural convolucional (CNN) para detectar e classificar a plasticidade fenotípica das folhas de *Tradescantia minima* induzida pelo cloreto de sódio (NaCl) e por nanopartículas de prata (AgNPs).
- Comparar a rede neural convolucional (CNN) criada com a rede neural conhecida (ResNet).
- Comparar as redes neurais com os métodos clássicos extratores de características.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Fase Experimental

3.1.1 Experimento em substrato

A. Semear plântulas em vasos:

Foi utilizada uma coleção ($n = 90$) dos melhores explantes de uma planta mãe de *Tradescantia minima*, com tamanho de 5 cm aproximadamente. Em seguida, cada explante foi semeado em vasos de 250 mL com substrato estéril “Carolina Soil”, e foram deixados para crescer em incubadoras botânicas com temperatura, umidade e fotoperíodo controlados por um período de 15 dias ($T = 35,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, umidade = 60%, fotoperíodo = 12:12). Durante esse tempo, cada vaso foi irrigado com 10 mL de água ultrapura miliQ, de maneira interdiária. Ver Figura 3.1.

Figura 3.1 - Processo de semeadura dos explantes de *Tradescantia minima* em vasos pequenos de 250 mL de volume.

Fonte: Elaborada pelo autor.

B. Aplicação do cloreto de sódio (NaCl):

Depois de 15 dias, foram separados 90 vasos para serem irrigados com 1, 10, 100 e 300 mM de NaCl. Cada tratamento foi replicado 18 vezes. Além disso, foram separados 18 vasos como grupo controle (irrigados com água ultrapura miliQ). Posteriormente, os vasos foram colocados em incubadoras botânicas com temperatura, umidade e fotoperíodo controlados ($T = 35,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, umidade = 60%,

fotoperíodo = 12:12). A irrigação de todas as plantas foi feita de maneira interdiária, com 10 mL da solução correspondente para cada caso, durante um período de 20 dias. Ver Figura 3.2.

Figura 3.2 - Processo de aplicação dos tratamentos correspondentes a cada grupo de plantas.

Fonte: Elaborada pelo autor.

3.1.2 Experimento *in vitro*

A. *Preparação do material biológico:*

Após a coleta de todos os explantes (3 cm), eles foram imersos rapidamente em uma solução fungicida para plantas da marca “Forth” contendo Difenconazole como composto ativo, utilizando uma concentração de 3% (v/v). Posteriormente, os explantes foram deixados descansar por 5 minutos para evaporar o excesso de água.

B. *Semear plântulas in vitro:*

A solução nutritiva foi preparada em um balão, com água ultrapura miliQ e 1% de NPK. Em seguida, 3 mL da referida solução foram vertidos em 50 tubos de ensaio

(tamanho 20 x 150 mm). Após, um explante foi colocado em cada tubo de ensaio, e cada tubo foi tampado com papel alumínio. A área da raiz também foi protegida (ver Figura 3.3). Ao término, os tubos foram colocados em incubadoras botânicas com temperatura, umidade e fotoperíodo controlados ($T = 35,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, umidade = 60%, fotoperíodo = 12:12) por um período de 20 dias até a obtenção de raízes. Ver Figuras 3.3 e 3.4.

Figura 3.3 - Processo de sementeira dos explantes de *Tradescantia minima* em tubos de ensaio.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 3.4 - Fotos após do processo de sementeira in vitro dos explantes de *Tradescantia minima*.

Fonte: Elaborada pelo autor.

C. Aplicação das nanopartículas de prata (AgNPs):

Após os 20 dias, foram separados 50 novos tubos de ensaio para o tratamento com nanopartículas de prata (tamanho aprox. 34 nm), e foram realizadas as

seguintes diluições: 1:1 (sem diluir), 1:10 ($3,11 \times 10^{10}$ part/mL), 1:100 ($3,11 \times 10^9$ part/mL), 1:1000 ($3,11 \times 10^8$ part/mL) da solução original de nanopartículas ($3,11 \times 10^{11}$ part/mL), fornecida pelo laboratório de Nanomedicina e Nanotoxicologia. Em seguida, 3 mL das soluções diluídas foram esvaziados em tubos de ensaio (10 por grupo), e as plantas com raízes da etapa anterior foram colocadas nesta nova solução por um período de 20 dias. Cada tratamento foi replicado 10 vezes. Além disso, foram separados 10 tubos de ensaio da etapa anterior como controle, os quais foram posteriormente colocados em incubadoras botânicas com temperatura, umidade e fotoperíodo controlados ($T = 35,5^\circ\text{C}$, umidade = 60%, fotoperíodo = 12:12). Ver Figura 3.5.

Figura 3.5 - Processo de aplicação dos tratamentos com nanopartículas de prata nos explantes de *Tradescantia minima*, *in vitro*.

Fonte: Elaborada pelo autor utilizando BioRender.com.

3.2 Fase de coleta de dados

3.2.1 Captura de microfotografias

Para a captura de fotografias, foram pegas as folhas desde o meio do caule até as a parte superior do caule. Essas folhas foram colocadas inteiras sem fazer corte nenhum, numa lâmina, e foram colocadas no microscópio óptico ZEISS Axio Lab.A1, com câmera integrada AxioCam ERc 5s.

As fotografias foram capturadas com os mesmos parâmetros de iluminação e configurações do microscópio. Cada imagem foi agrupada em pastas com as seguintes descrições: planta, folha, lado da folha e aumento do microscópio. Foram capturadas 4 fotos pela parte inferior (abaxial) e 4 fotos pela parte superior (adaxial) da folha com aumento de 50x; 8 fotos pela parte inferior (abaxial) e 8 fotos pela parte superior (adaxial) da folha com aumento de 100x; e 12 fotos pela parte inferior (abaxial) e 12 fotos pela parte superior (adaxial) da folha com aumento de 200x. O ensaio considerou um total de 3 plantas, 4 folhas por planta por cada tratamento com nanopartículas (AgNPs) e cloreto de sódio (NaCl).

3.2.2 Medições macroscópicas e microscópicas

A. Medição das plantas:

Após finalizar os experimentos com NaCl e nanopartículas de prata (AgNPs), o comprimento das plantas foi mensurado desde a transição da raiz e o caule até a ponta botão de folha da última folha, considerando apenas o caule principal.

B. Medição do tamanho dos estômatos:

Após a captura das microfotografias, foram feitas 24 medições do comprimento dos estômatos (células-guarda) de maneira aleatória de 4 folhas de 3 plantas diferentes, totalizando 6 medições por folha. Esse processo foi aplicado para cada concentração de NaCl, incluindo o grupo controle. As medições foram feitas com o programa AxioVision Rel. 4.8, com aumento de 200x, como ilustram as Figuras 3.6 e 3.7.

Figura 3.6 - Técnica usada para a medição do comprimento dos estômatos (células - guarda).
A) Medição no caso de estômatos fechados. B) Medição no caso de estômatos abertos.

Fonte: Elaborada pelo autor, utilizando BioRender.com.

Figura 3.7 - Processo de medição do comprimento dos estômatos (células-guarda) da planta *Tradescantia minima* com aumento de 200x. a) Grupo controle, b) 1 mM, c) 10 mM, d) 100 mM, e) 300 mM de NaCl.

Fonte: Elaborada pelo autor.

C. Medição da distância ao estômato mais próximo:

Após a captura das microfotografias, foram selecionadas 9 fotografias do aumento 50x, de todas as concentrações de NaCl, incluindo o grupo controle, com exceção da concentração de 300 mM. Como algumas fotografias não permitem observar com clareza a localização dos estômatos, foram consideradas apenas 7 fotografias.

Posteriormente, as imagens foram carregadas no site VGG Image Annotator, disponível no link <https://annotate.officialstatistics.org/>. Através do uso da ferramenta de localização de coordenadas de um pixel, cada estômato encontrado foi marcado com um ponto (Figura 3.8). Ao finalizar o procedimento, foi realizado o download do arquivo em formato *.csv com as coordenadas dos estômatos.

Figura 3.8 - Microfotografias da superfície abaxial da folha da planta *Tradescantia minima* amostrando os estômatos marcados usando VGG Image Annonator: a) Grupo controle, b) 1mM, c) 10 mM, d) 100 mM, e) 300 mM de NaCl.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Depois, as coordenadas foram transformadas de pixels a micrômetros (um), e posteriormente foi utilizado um algoritmo de busca do vizinho mais próximo baseado na equação de distância euclidiana (ver Equação 1). Foram coletadas todas as distâncias ao vizinho mais próximo de todos os estômatos para cada foto com aumento de 50x, considerando cada concentração de NaCl e também o grupo controle. De acordo com a equação,

$$d(p_1, p_2) = \sqrt{(x_2 - x_1)^2 + (y_2 - y_1)^2} \quad (1)$$

em que “d” se define como a distância Euclidiana entre dois estômatos p_1 e p_2 ; p_1 tem como coordenadas ao pixel (x_1, y_1) e o estômato p_2 tem como coordenadas (x_2, y_2) , como representado na Figura 3.9.

Figura 3.9 - Ilustração que mostra as distâncias euclidianas entre o estômato p_1 e os demais (em setas vermelhas). Também mostra os dados geométricos necessários para calcular a distância euclidiana entre o estômato p_1 e p_2 a partir de suas coordenadas.

Fonte: Elaborada pelo autor, utilizando BioRender.com.

3.3 Fase Computacional

3.3.1 Estatística

Os dados obtidos na fase de medições macroscópicas e microscópicas foram analisados pelo método ANOVA paramétrico e robusta. A comparação múltipla de médias foi realizada pelo teste Tukey HSD e Duncan, no caso das análises paramétricas, e o teste de Trimmed means de Yuen no caso das análises não paramétricas em presença de outliers, utilizando o pacote estatístico R. Além disso, a média e o desvio padrão por tratamentos foram também relatados.

3.3.2 Métodos clássicos de visão computacional

A textura é um padrão visual relacionado à superfície do objeto, que é representado em uma imagem pela organização espacial de pixels. No entanto, a interpretação da textura é ambígua, por tanto não há uma definição formal do termo que seja amplamente aceita pela comunidade científica. Isso resultou em uma literatura extensa e heterogênea de métodos de análise de textura propostos ao longo dos anos.¹³⁶⁻¹³⁷

A descrição das texturas subjacentes nas imagens tem sido um dos grandes tópicos no campo da Visão Artificial ou Visão Computacional.¹³⁸ Existem vários métodos que permitem representar a informação da textura em forma numérica e para a presente pesquisa foram usados os seguintes métodos: LBP, GLDM, Descritores Fractais e Fourier.

A. *Local Binary Pattern (LBP)*

O Padrão Binário Local (LBP) é um método eficiente usado na extração de recursos de textura por razões de classificação. Tem a característica de ser invariável às mudanças de iluminação nos níveis de cinza, agregando informações complementares da textura da imagem. É ideal para aplicações que requerem extração rápida de recursos e classificação de textura.¹³⁹

Pode ser visto como uma abordagem unificadora para os modelos estatísticos e estruturais de análise de textura, cuja equação é:

$$LBP_{P,R} = \sum_{p=0}^{P-1} s(g_p - g_c) 2^p \quad (2)$$

$$s(x) = \begin{cases} 1, & x \geq 0 \\ 0, & x < 0 \end{cases} \quad (3)$$

A variável g_p na equação 2 indica os vizinhos do elemento central g_c em uma janela. Essa diferença é quantizada após usando a função de sinal da equação 3 e multiplicada por 2^p para obter o padrão binário local. O valor P na equação 2 indica o número de vizinhos ao redor do elemento central g_c do operador. O valor R na

equação 2 indica a distância (raio) que cada um dos vizinhos P estão ao elemento central g_c .

B. Método de Diferenças de Tons de Cinza (GLDM)

As características de textura do GLDM são calculadas usando as ocorrências de qualquer diferença absoluta do nível de cinza para quaisquer dois pixels separados por um deslocamento δ .¹⁴⁰

O método GLDM, calcula a partir de uma imagem $f(x,y)$ uma nova imagem de diferenças $f_\delta(x,y) = |f(x,y) - f(x+\Delta x, y+\Delta y)|$, sendo $\delta = (\Delta x, \Delta y)$ parâmetros do método.¹⁴¹

A partir dessa nova imagem, a função de densidade p_δ é calculada e várias medidas são obtidas:

Contraste:

$$\sum i^2 p_\delta(i) \quad (4)$$

Segundo momento angular:

$$\sum p_\delta(i)^2 \quad (5)$$

Entropia:

$$-\sum p_\delta(i) \log p_\delta(i) \quad (6)$$

Média:

$$(1/M) \sum i p_\delta(i) \quad (7)$$

C. *Descritores Fractais*

A geometria fractal foi criada para resolver o problema de definir a dimensão para objetos complexos, a diferencia da geometria euclidiana, esta tem dimensões representadas por números inteiros, nos fractais, a dimensão é fracionária.¹⁴²

Ao início foi criada para representar objetos complexos, a geometria fractal também é utilizada para entender texturas e seu comportamento. Isso é devido ao fato que a geometria fractal é frequentemente utilizada para estudar fenômenos naturais, como também a natureza de muitas texturas, apresentando uma estrutura não periódica.

¹⁴³

Um dos melhores métodos é o método de Bouligand-Minkoswi,¹⁴⁴ este método está baseado no cálculo da área de influência do objeto quando é dilatado por um disco de raio r .

Para estimar a dimensão é necessário calcular o coeficiente angular da reta, e vários raios são analisados para obter a reta e a dimensão, dada pela seguinte equação:

$$\dim = 2 - \lim_{\varepsilon \rightarrow 0} \left(\frac{\log A(r)}{\log(r)} \right) \quad (8)$$

Onde $A(r)$ é a estimativa da área de influência em relação a um raio r .

D. *Descritores de Fourier*

A transformada proposta por Fourier, consiste na transformação de um sinal periódico em uma soma de senos e cossenos de frequências e amplitudes diferentes.¹⁴⁵ A transformada de uma função bidimensional “ f ” é dada pela equação:

$$F(u, v) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} f(x, y) e^{-2j\pi(ux+vy)} dx dy \quad (9)$$

A transformada de Fourier é muito usada em tarefas de processamento de imagens principalmente para remoção de ruídos e desfoque de imagens.¹⁴⁶

No caso das imagens, pode-se calcular a transformada com a Função abaixo (onde $M \times N$ é referente ao tamanho da imagem):

$$F(u, v) = \frac{1}{MN} \sum_{x=0}^{M-1} \sum_{y=0}^{N-1} f(x, y) e^{-2j\pi(ux/M + vy/N)} dx dy \quad (10)$$

Existem dois tipos de características a ser extraídas de uma imagem. A primeira está em relação a setores de anéis circulares (E_a) e a segunda em relação a regiões circulares (E_b). O vetor final de características está formado pela concatenação de todos os E_{aij} e E_{bi} .

$$E_{a_{ij}} = \int_0^{\lambda_i} \int_{\theta_j}^{\theta_{j+1}} |F(\lambda, \theta)|^2 d\theta d\lambda \quad (11)$$

$$E_{b_i} = \int_0^{\lambda_i} \int_{\theta_j}^{2\pi} |F(\lambda, \theta)|^2 d\theta d\lambda \quad (12)$$

Onde λ e θ são as coordenadas polares no domínio da frequência.

3.3.3 Métodos de classificação

A classificação consiste em identificar a que categoria pertence uma nova amostra, a partir de um conjunto de dados de treinamento cuja pertença a uma categoria é conhecida. O algoritmo que implementa a classificação, especialmente em uma aplicação concreta, é conhecido como classificador.¹⁴⁷

Na terminologia da aprendizagem computacional, a classificação pode ser considerada uma instância de aprendizagem supervisionada, ou seja, a aprendizagem ocorre em um conjunto de treinamento cujas observações corretamente identificadas estão disponíveis. As observações são frequentemente conhecidas como casos, as variáveis explicativas são chamadas de características (agrupadas em um vetor de características) e as categorias possíveis são as classes.¹⁴⁷

Para a realização da presente pesquisa usaram-se os classificadores mais amplamente usados na área de textura e cor, como máquinas de vetores de suporte

(SVM), embora também são usados os k-vizinhos mais próximos (KNN) e Análise Discriminante Linear (LDA).¹⁴⁸

A. Análise Discriminante Linear (LDA)

O Análise discriminante linear segundo os critérios de Fisher, procura amostras que seguem padrões de distribuição gaussiana para um bom desempenho. Dentre suas aplicações mais utilizadas na literatura, é recomendado para tarefas de aprendizagem supervisionada e classificação de classes, já que que projeta os dados para uma dimensão baixa dimensão em comparação com os dados originais, mas garante a máxima dispersão entre as classes para reduzir ao mínimo possível a dispersão interna de cada classe.¹⁴⁹ A tarefa é projetar o conjunto de dados para uma baixa dimensão por meio de um vetor “w” que pode garantir o máximo na dispersão ou separação das classes.¹⁵⁰ Temos $x_1 \dots x_n$ tuplas d-dimensionais que são rotuladas em “c” classes. Cada uma dessas classes possui N_c tuplas. O vetor “w” é necessário, para encontrar $y_i = w^T x_i$ estas serão as projeções em baixa dimensão de cada uma das tuplas.¹⁵¹

Fisher LDA em termos de otimização, tem como objetivo maximizar a função objetivo $J(w)$, que pode ser escrita como segue:

$$Max. J(w) = \frac{w^T S_B w}{w^T S_W w} \quad (13)$$

S_B é a matriz que garante a dispersão entre cada uma das classes, S_W é a matriz que tem a dispersão imersa em cada uma das classes a serem projetadas.

Fisher LDA busca projetar o vetor “w” que possa maximizar o "quociente" entre a base da matriz de dispersão interclasse e a matriz de dispersão intraclasse. Ver Figura 3.10.

Figura 3.10 - A direção da projeção encontrada com a otimização de Fisher mostra que o gráfico à direita torna a classificação muito mais fácil do que à esquerda.
 Fonte: TOWARDS DATA SCIENCE.¹⁵²

B. Máquinas de vetores de suporte (SVM)

As máquinas de suporte vetorial (SVM) se tornaram muito populares devido ao seu grande potencial de classificação.¹⁵³ O SVM transforma os vetores de entrada para um espaço de maior dimensão por meio de uma transformação não linear. Dado um espaço com amostras de classes diferentes, o objetivo do SVM é encontrar uma linha ou plano de equação:

$$W^T x + b = 0 \quad (14)$$

que permite que eles sejam separados como se amostra na Figura 3.11:

Figura 3.11 - Linha separadora de duas classes usando SVM.

Fonte: MANJREKAR *et al.*¹⁵⁴

O objetivo do SVM é que este plano seja obtido de forma que sua distância com cada uma das classes seja máxima. Para isso, são definidos os Vetores de Suporte, que são aqueles que caracterizam o limite da classe e são obtidos a partir dos exemplos mais próximos do plano de separação.¹⁴⁷

C. *K-vizinhos mais próximos (KNN)*

O base do algoritmo é bastante simples, o algoritmo classifica cada novo dado no grupo correspondente, dependendo se ele tem um número k de vizinhos previamente definido, mais próximo de um grupo ou de outro. Ou seja, ele calcula a distância do novo elemento a cada um dos existentes, e ordena essas distâncias do menor ao maior para selecionar o grupo ao qual ele pertence.¹⁵⁵ Este método geralmente tem resultados piores do que o SVM. Ver Figura 3.12.

Figura 3.12 - Processo do método de K-Vizinhos Mais Próximos (KNN).
 Fonte: ATALLAH *et al.* ¹⁵⁶

As imagens microscópicas dos experimentos com cloreto de sódio NaCl foram cortadas em dimensões de 3x3 e depois processadas com os 5 métodos tradicionais de visualização computacional (Ver Capítulo 3.3.2), que após extrair as características das texturas, foram classificadas com os três métodos descritos acima (Ver Capítulo 3.3.3). A classificação das imagens foi realizada de tipo Binário (Control e Tratamentos), e Multiclasse (Control, 1mM, 10mM, 100mM e 300mM de NaCl). Para cada um deles foi usado o aumento 50x do lado abaxial e também do lado adaxial.

3.3.4 Redes Neurais Convolucionais (CNN)

O psicólogo americano Frank Rosenblatt, inspirado na teoria da plasticidade sináptica (adaptação dos neurônios durante o processo de aprendizagem), criou o perceptron (Figura 3.13). Rosenblatt propôs um algoritmo de aprendizado supervisionado para este modelo de neurônio MCP modificado, que permitia ao

neurônio determinar os pesos corretos diretamente dos dados de entrada (ou treinamento).¹⁵⁷

Este neurônio é bastante semelhante ao neurônio MCP; no entanto, demonstra diferenças importantes. Nesse caso, o neurônio recebe uma entrada constante adicional associada a um peso sináptico "b", também conhecido como bias. Os pesos sinápticos "W" não são limitados à unidade, permitindo que algumas entradas tenham mais influência na saída do neurônio do que outras.¹⁵⁸

Na Equação 2, "y" é o vetor de saída da camada, de tamanho m (o número de neurônios na camada); "x" é o vetor de entrada de tamanho n; e, finalmente, W é a matriz de pesos, de tamanho m x n.¹⁵⁹

Em termos matemáticos, o neurônio artificial no qual o perceptron está baseado é:

$$y = \sigma(W^T x + b) \quad (15)$$

Figura 3.13 - Modelo do perceptron, neurônio artificial mostrando o processo de vetorização de uma imagem antes de ser inseridas.

Fonte: COURSERA.¹⁶⁰

Devido à simplicidade de um neurônio simples (perceptron), ele não é capaz de resolver problemas não lineares. Dessa forma, uma solução para isso foi criar redes com uma camada oculta (Figura 3.14), adicionando uma nova camada intermediária. Essa camada não será mais visível de fora, o que nos obrigará a usar algoritmos como backpropagation para ajustar seus parâmetros internos. A presença de uma única camada oculta confere à rede multicamadas a capacidade de fazer uma

aproximação universal (capacidade de aprender tudo o que precisa ser aprendido).

159

Figura 3.14 - Modelo de uma rede neural com uma camada intermediária.
Fonte: COURSERA.¹⁶⁰

Com a finalidade de aproveitar o potencial do deep learning ao momento de projetar soluções para problemas complexos, as redes neurais atuais geralmente incluem várias camadas ocultas, como ilustra a Figura 3.15.

Devido à notória complexidade das redes neurais ao longo do tempo, é necessário descrever as partes de uma rede profunda com multicamadas:

- Camada de entrada: é a primeira camada da rede (entrada dos dados).
- Camada oculta: esta recebe as informações da camada anterior e, após a adição e ativação, transmite os dados para a próxima camada. Na mesma rede, é possível ter quantas camadas ocultas forem necessárias.
- Camada de saída: é a que dá a resposta classificatória.

Figura 3.15 - Modelo de uma rede neural profunda com múltiplas camadas. A camada de entrada é representada na cor azul, a camada oculta na cor turquesa claro, e a camada de saída na cor azul claro.

Fonte: IBM...¹⁶¹

As redes descritas acima apresentam uma limitante, pois as imagens devem ser vetorizadas para serem inseridas na primeira camada da rede. Diante dessa limitação, foi desenvolvido um novo modelo, denominado redes neurais convolucionais (Figura 3.16), também conhecidas como CNN, do inglês *Convolutional Neural Network*. Neste caso, ao contrário das anteriores, as imagens podem ser inseridas nas CNNs como estão, e as características importantes podem ser apreendidas automaticamente.¹⁶²

Portanto, não é necessário extrair as informações das imagens antes do processo de aprendizagem com esta técnica. Em camadas pouco profundas, aprendem características simples como as bordas, dentro das imagens. E em camadas profundas perto da camada de saída, é sabido que aprendem características mais complexas de ordem superior.¹⁶³⁻¹⁶⁴

Figura 3.16 - Descrição geral de uma rede neural convolucional. Os dados de entrada (imagem) são primeiro processados com camadas convolucionais e Max Pooling. Os resultados desta camada são processados posteriormente em camadas totalmente conectadas.

Fonte: YOU CANalytics.¹⁶⁵

A. Camada convolucional:

Como as redes neurais artificiais estão compostas apenas de camadas totalmente conectadas, não podem levar em consideração as informações espaciais (elas lidam com informações de pixels distantes e pixels próximos como iguais), as camadas convolucionais podem tratar a imagem de entrada como ela é (os valores de pixels próximos e os pixels distantes são processados de maneiras diferentes). Nas camadas convolucionais (ver Figura 3.17), vários filtros envolvem os dados da imagem de uma camada anterior. A função de convolução é aplicada deslocando repetidamente a localização dos filtros com S pixels. O número de S é conhecido como *stride* (palavra em inglês). Os valores que estão dentro dos filtros são ajustados por meio de processos de aprendizagem.

Figura 3.17 - Esquemas da camada convolucional (a, b) e a camada de Max Pooling (c). Em (a), os filtros têm um tamanho de $F \times F$ ($F = 3$ nesta figura). Em (b), um grupo de M filtros é transformado em imagens de M canais na camada anterior. Este processo é repetido N vezes para produzir uma imagem de N canais de saída. Em (c), após os valores máximos dentro de pixels $H \times H$ (2 nesta figura) são extraídos na camada de Max Pooling.

Fonte: YASAKA. ¹⁶²

B. Camada totalmente conectada:

Uma camada totalmente conectada está composta por várias unidades de neurônios, sendo 1024 por camada na rede neural implementada em esta pesquisa (custom CNN), ver Figura 3.18. Os sinais de saída das unidades da camada anterior são ponderados e somados para todas as unidades. O sinal ponderado e somado da camada anterior também é adicionado com uma constante chamada bias e, em seguida, é aplicada uma função de ativação. ¹⁶⁶ Na presente pesquisa, foi utilizada a função de unidade linear retificada, também conhecida como Relu (exceto para a

camada de saída), como a função de ativação, que retorna o próprio valor de entrada quando os valores de entrada são maiores que zero, ou retorna zero quando os valores de entrada são iguais ou menores que zero.¹⁶² Para a camada de saída, utilizou-se a função softmax, que é comumente usada para tarefas de classificação múltipla, como no presente estudo, em que cada experimento tem 5 classes. A arquitetura da rede neural que foi criada para a esta pesquisa foi desenvolvida com ajuda do Leonardo Scabini, companheiro do grupo de pesquisa “Scientific Computing Group”. Dita arquitetura é apresentada na Tabela 3.1.

Figura 3.18 - Diagrama da rede totalmente conectada usada após a camada convolucional da CNN implementada (custom CNN).

Fonte: Adaptada de YOU CANalytics.¹⁶⁵

No pré-processamento das imagens, estas foram cortadas em 3x3 partes iguais, obtendo um total de $n = 2160$ para fotografias de aumento 50x – lado adaxial, $n = 4320$ para fotografias de aumento 100x – lado adaxial, $n = 6498$ para fotografias de aumento 200x – lado adaxial. O tamanho de amostra (n) foi exatamente o mesmo para o lado abaxial, e para ambos experimentos (cloreto de sódio e nanopartículas de prata), Ver Tabela 4.7

Para o treinamento da rede neural as imagens foram divididas aleatoriamente em 10 pastas com as suas respectivas subpastas (aumento microscópico), 9 pastas para treinamento e 1 pasta para teste, repetido 10 vezes. A implementação da rede

neural (custom CNN) foi realizada com pacotes de Python para Machine Learning, Keras¹⁶⁷ e back-end TensorFlow¹⁶⁸

Tabela 3.1 - Arquitetura da Rede Neural Convolucional implementada (custom CNN).

Layer (type)	Ouput Shape	Param #
conv2d__1 (Conv2D)	None, 630, 843, 16)	5824
average_pooling2d_1(Average	(None, 315, 421, 16)	0
batch_normalization_1 (Batch	(None, 315, 421, 16)	64
conv2d__2(Conv2D)	(None, 309, 415, 32)	25120
max_pooling2d_1 (MaxPooling2	(None, 77, 103, 32	0
batch_normalization_2(Batch	(None, 77, 103, 32)	128
conv2d__3(Conv2D)	(None, 73, 99, 64)	51264
batch_normalization_3 (Batch	(None, 73, 99, 64)	256
conv2d__4(Conv2D)	(None, 71, 97, 128)	73856
max_pooling2d_2 (MaxPooling2	(None, 23, 32, 128)	0
batch_normalization_4(Batch	(None, 23, 32, 128)	512
conv2d__5(Conv2D)	(None, 21, 30, 256	295168
max_pooling2d_3(MaxPooling2	(None, 10, 15, 256)	0
global_average_pooling2d_1 (	(None, 256)	0
batch_normalization_5 (Batch	(None, 256)	1024
dense_1(Dense)	(None, 1024)	263168
batch_normalization_6(Batch	(None, 1024)	4096
dense_2(Dense)	(None, 1024)	1049600
batch_normalization_7(Batch	(None, 1024)	4096
dense_dense (Dense)	(None, 5)	4100
Total params: 1,778,276		

Fonte: Elaborada pelo autor.

ResNet-50

Nesta dissertação, também foi utilizado o ResNet-50, apresentado pela primeira vez por He *et al.*,¹⁶⁹ A arquitetura desta rede neural tornou-se um modelo fundamental para demonstrar que as redes profundas podem ser treinadas com aprendizado residual e ajudar a resolver o problema de degradação da precisão em arquiteturas CNN profundas. ResNet-50 é uma variante do modelo ResNet, esta tem 48 camadas de convolução junto com 1 MaxPool e 1 camada de Average Pooling. Possui $3,8 \times 10^9$ operações de pontos flutuantes, é um modelo ResNet amplamente utilizado.

Esta rede também foi implementada usando os pacotes de Python para Machine Learning, Keras¹⁶⁷ e backend TensorFlow.¹⁶⁸

Figura 3.19 – À esquerda, uma representação reduzida da arquitetura da ResNet-50 utilizada na presente dissertação. À direita, a arquitetura da ResNet-50 mostrada em detalhes.
Fonte: TECH INSPIRER.¹⁷⁰

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Experimento com NaCl

Como parte de uma pré-análise, antes de realizar a detecção de padrões com a rede neural implementada nesta tese, foram realizadas medidas macroscópicas e microscópicas para determinar se existem evidências estatísticas entre os diferentes tratamentos, para ter certeza de que a rede neural que iremos utilizar tem a capacidade de classificar as imagens, partindo assim do pressuposto de que existem diferenças entre os tratamentos utilizando dados quantitativos que confirmam o correto funcionamento da rede neural, no caso de classificar as imagens com alta precisão, de forma que os resultados obtidos em esta pré-análise é apresentada e discutida.

4.1.1 Tamanho das plantas

Os resultados mostram que existem diferenças significativas entre os tratamentos aplicados às plantas ($p < 0.05$), usando o tamanho das plantas como variável dependente (ver Tabela 4.2). Foi utilizada uma ANOVA paramétrica para detectar diferenças significativas, uma vez que os dados apresentaram uma distribuição normal, o que pode se comprovar no Gráfico 4.1, onde é apresentado o Q-Q plot dos resíduos do modelo, apresentando uma distribuição muito próxima da linha teórica de uma distribuição normal. O maior tamanho das plantas achou-se no tratamento controle e o menor tamanho das plantas achou-se no tratamento 300 mM (ver Tabela 4.1), com um claro padrão de diminuição no tamanho das plantas à medida que aumenta a concentração de cloreto de sódio (NaCl). Esses resultados concordam com os resultados de De Oliveira, Munns, entre outros autores que fornecem uma breve explicação para este fenômeno, em que a inibição do crescimento é atribuída à redução do potencial osmótico, o NaCl pode causar um efeito de toxicidade iônica, também desequilíbrios nutricionais ou ambos, devido ao acúmulo excessivo de íons no tecido da planta. Além disso, as plantas fecham seus estômatos para reduzir a perda de água pela transpiração, o que resulta na diminuição da taxa fotossintética, sendo essas as principais causas da limitação do crescimento das plantas sob estresse salino.¹⁷¹⁻¹⁷⁴ Essas diferenças significativas

são apresentadas no boxplot no Gráfico 4.1, mostrando as suas respectivas significâncias ($p < 0.05$) da comparação das médias por pares de Tukey HSD. Também são mostradas as fotografias das plantas após o experimento (Figura 4.1).

Tabela 4.1 - Estatísticas descritivas do tamanho das plantas tratadas com NaCl. Onde M e SD representam a média e desvio padrão, respectivamente.

Tratamentos	M	SD
CONTROL	22.84	5.08
1 mM	20.94	4.50
10 mM	19.45	3.64
100 mM	18.14	3.38
300 mM	12.36	2.93

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 4.2 - ANOVA de efeitos fixos usando o tamanho das plantas como variável dependente.

Predictor	Sum of Squares	df	Mean Square	F	p	partial η^2	partial η^2 90% CI [LL, UL]
(Intercept)	9393.64	1	9393.64	592.13	0.000		
Concentração de NaCl	1139.09	4	284.77	17.95	0.000	0.46	[0.30, 0.54]
Error	1348.46	85	15.86				

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 4.1. Fotografia das plantas após serem submetidas à experimentação com NaCl.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Gráfico 4.1 - Na esquerda, o gráfico Q-Q plot dos resíduos do modelo linear (Anova) mostra um comportamento de distribuição normal, usando o tamanho das plantas como variável dependente. À direita, o boxplot mostra as significâncias das comparações por pares (Tukey HSD). A significância é codificada desta forma: 0 (*****) 0.0001 (****) 0.001 (***) 0.01 (**) 0.05.

Fonte: Elaborado pelo autor, utilizando R.

4.1.2 Estômatos

O tamanho das plantas não é a única coisa que é afetada após a experimentação com cloreto de sódio (NaCl), o tamanho dos estômatos também é afetado, como pode ser visto na Tabela 4.4, na qual são detectadas diferenças significativas ($p < 0.05$) entre os tratamentos usando o tamanho dos estômatos como variável dependente. O modelo apresentou distribuição normal para a variável tamanho dos estômatos, portanto, foi aplicada uma análise ANOVA paramétrica. Observando-se que o maior tamanho dos estômatos foi encontrado no grupo de controle e o menor tamanho dos estômatos foi encontrado no tratamento de 300 mM (ver Tabela 4.3). Onde pode se observar um padrão na diminuição do tamanho dos estômatos à medida que a concentração de NaCl aumenta. Resultados semelhantes foram obtidos em outras investigações que estudaram o efeito do estresse salino, Garcia observou uma limitação no crescimento dos estômatos de *Saccharum spp.* na presença de NaCl e Na₂SO₄. Kunjupillai e Salomón também mostram o mesmo efeito causado pelo cloreto de sódio (NaCl) em *Morus spp.* e *Panicum maximum*.¹⁷⁵⁻

As diferenças significativas mencionadas são mostradas no boxplot presente no Gráfico 4.2, mostrando sua respectiva significância ($p < 0.05$) por comparação de médias por pares (Tukey HSD). Fotografias dos estômatos (e seus comprimentos) após o período de experimentação também são mostradas (ver Figura 3.7).

Tabela 4.3 - Estatísticas descritivas do tamanho dos estômatos do experimento com NaCl. Onde M e SD representam a média e desvio padrão, respectivamente.

Tratamentos	<i>M</i>	<i>SD</i>
CONTROL	49.17	4.61
1 mM	49.72	3.27
10 mM	48.26	3.57
100 mM	42.58	4.16
300 mM	41.08	3.95

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 4.4 - ANOVA de efeitos fixos usando o tamanho dos estômatos como variável dependente.

Predictor	Sum of Squares	<i>df</i>	Mean Square	<i>F</i>	<i>p</i>	partial η^2	partial η^2 90% CI [LL, UL]
(Intercept)	58029.45	1	58029.45	3738.74	0.000		
Concentração de NaCl	1554.87	4	388.72	25.04	0.000	0.47	[0.34, 0.54]
Error	1784.93	115	15.52				

Fonte: Elaborada pelo autor.

Gráfico 4.2 - Na esquerda, o gráfico Q-Q plot dos resíduos do modelo linear (Anova) mostra um comportamento de distribuição normal, usando o tamanho dos estômatos como variável dependente. À direita, o boxplot mostra as significâncias das comparações por pares (Tukey HSD). A significância é codificada desta forma: 0 (*****) 0.0001 (****) 0.001 (***) 0.01 (**) 0.05 (*).

Fonte: Elaborado pelo autor, utilizando R.

Outra variável importante que também é afetada pelo NaCl é a densidade estomática, que na presente investigação não foi quantificada diretamente, mas sim estudada através da distância ao estômato mais próximo. Com base na tese de doutorado de Almeida Filho, na qual o autor propõe estudar a densidade estomática como grafos, onde cada estômato é um nó e o critério para estabelecer as arestas entre eles é baseado na distância entre pares de estômatos com conectividade de raio proposta pelo autor.¹⁷⁸ Nesta pesquisa, resgatou-se a ideia de usar a distância ao vizinho mais próximo como método computacional alternativo para medir a densidade estomática indiretamente, uma vez que, ao aumentar o número de estômatos por unidade de área foliar, a distância entre eles diminui, e no caso de diminuição da densidade estomática, a distância entre eles aumenta.

Contrário dos casos anteriores não foi observado um padrão linear na distância ao estômato mais próximo com os experimentos com NaCl (ver Gráfico 4.4), porém, foi observado um padrão curvado. A distância ao estômato mais próximo aumentou quando foi exposto a concentrações baixas de cloreto de sódio (desde o controle até

10 mM), e diminuiu quando a planta foi exposta a concentrações altas (desde 100 mM até 300 mM de NaCl). Isso também demonstra que densidade estomática responde de maneira não linear. A densidade estomática diminuiu em presença de baixas concentrações de NaCl (controle, 1 e 10 mM), e aumentou em presença de concentrações altas (100 mM e 300 mM). As diferenças significativas são apresentadas no boxplot no Gráfico 4.4, mostrando as suas respectivas significâncias ($p < 0.05$) de comparação de médias por pares (Tukey HSD). Também ver Tabela 4.5.

Os resultados obtidos em concentrações altas de NaCl (a partir de 100 mM) concordam com os resultados de García, ao descrever os efeitos do cloreto de sódio (100 mM) que causou um aumento na densidade estomática e uma redução no comprimento destes em ambas epidermes das folhas de *Saccharum spp.*, tanto no genótipo tolerante (PR692176) quanto no sensível (V78-1).¹⁷⁵ Resultados semelhantes foram encontrados no feijão preto (Bray e Reid) e no tomate (Salas *et al.*), ao relatar um aumento da densidade estomática e diminuição do seu comprimento apenas na epiderme abaxial.¹⁷⁹⁻¹⁸⁰ Esse comportamento tem sido explicado como uma resposta para enfrentar o efeito do estresse hídrico causado pela salinidade.¹⁸¹

Por outro lado, Vijayan descobriu que a frequência dos estômatos nas folhas de *Morus spp.* aumentou em todos os genótipos tolerantes ao sal em todas as concentrações (0,25, 0,50, 0,75 e 1,0%) em comparação com os controles, mas nos genótipos sensíveis diminuiu em concentrações de NaCl maiores que 0,75% (128 mM).¹⁷⁷

É necessário informar que o comportamento da densidade e do tamanho dos estômatos em outras plantas submetidas ao estresse salino é altamente variável, Hwang e Chen em *Kandelia candel L.*, encontraram uma diminuição na densidade de estômatos (em *Plectranthus verticillatus*) ao aumentar a concentração de NaCl.¹⁸²

Uma maior densidade de estômatos de menor tamanho está relacionada ao incremento da resistência difusiva da lâmina, o que leva à redução da transpiração foliar,¹⁸³ estando comumente associada a espécies adaptadas a ambientes secos.

Sendo que há muita variabilidade entre as espécies de plantas quando se trata de observar os efeitos da salinidade, não é muito estranho observar esse tipo de padrão de declínio e subsequente aumento na densidade estomática em folhas de *Tradescantia minima*. A plasticidade fenotípica das plantas ainda não é muito conhecida e a grande variabilidade que apresenta torna difícil explicá-la de forma completa e detalhada. É possível que esta seja a primeira vez que foi observado este tipo de comportamento na densidade estomática induzida pela salinidade (NaCl).

Tabela 4.5 - Estatísticas descritivas da distância ao estômato mais próximo do experimento com NaCl. Onde M e SD representam as médias aparadas (trimmed means) e desvio padrão, respectivamente.

Tratamentos	M	SD
CONTROL	142.82	32.85
1 mM	159.75	30.47
10 mM	164.38	32.43
100 mM	144.76	28.71
300 mM	136.70	30.12

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 4.6 - ANOVA heterocedastico de uma via de médias aparadas (trimmed means) usando o a distância ao estômato mais próximo como variável dependente.

statistic	df	df.error	p.value	estimate	conf.low	conf.high
80.77	4	890.41	0.00e+00	0.38	0.34	0.41

Fonte: Elaborada pelo autor

Gráfico 4.3 - Gráfico Q-Q plot dos resíduos do modelo linear (Anova) mostra um comportamento de distribuição não normal, usando a distância ao estômato mais próximo como variável dependente.

Fonte: Elaborado pelo autor, utilizando R.

Gráfico 4.4 - Gráfico boxplot mostrando as significâncias das comparações por pares (Trimmed means de Yuen).

Fonte: Elaborado pelo autor, utilizando R.

4.1.3 Métodos clássicos

Com os resultados estatísticos obtidos anteriormente, temos evidências dos efeitos tóxicos causados pelo cloreto de sódio em *Tradescantia minima*. O primeiro passo foi tentar detectar padrões (por plasticidade fenotípica) e classificar as imagens microscópicas das folhas com os métodos clássicos de visão computacional (descritores de textura) detalhados no capítulo 3 - seção 3.3.2.

Os resultados mostraram uma capacidade muito baixa para detectar plasticidade fenotípica e classificação das imagens, com uma média global de $\bar{x} = 51,4$ de taxa de acerto (precisão), ver Gráfico 4.6, e uma média de $\bar{x} = 50,94$ e $\bar{x} = 51,86$ de taxa de acerto para os lados abaxial e adaxial da folha, respectivamente (ver Gráfico 4.7). Esses resultados são muito baixos para considerar que eles têm a capacidade de classificar as imagens de acordo com a plasticidade fenotípica presente nas folhas. Esta análise preliminar demonstra a escassa capacidade dos métodos clássicos (descritores de textura) para resolver problemas complexos pertencentes ao campo da biologia (ver também Tabela 4.8 e Tabela 4.9).

Devido aos resultados ruins obtidos com os métodos clássicos, foi implementada uma rede neural convolucional (custom CNN) a fim de classificar as imagens com uma alta taxa de acerto (accuracy). Também foi utilizada a ResNet-50 como modelo de referência para avaliar a eficiência da rede implementada (custom CNN), por meio da comparação estatística das taxas de acerto.

Tabela 4.7 – Quantidade de imagens usadas para extração de características, classificação e treinamento para os métodos clássicos e para Redes Neurais.

<i>Aumento</i>	<i>Lado da folha</i>	<i>Quantidade</i>
50x	Adaxial	2160 imgs*
100x	Adaxial	4320 imgs
200x	Adaxial	6498 imgs
50x	Abaxial	2160 imgs
100x	Abaxial	4320 imgs
200x	Abaxial	6498 imgs

* Único set de dados usado nos métodos clássicos

Fonte: Elaborada pelo autor

Tabela 4.8 - Resultados da aplicação de descritores de textura em imagens de experimentos com NaCl (Aumento 50x), obtidos com 2 classes (Binário).

Lado da folha	Método	LDA	SVM	KNN
Lado Adaxial	GLDM	67.38	61.69	57.52
	Fractal	61.30	58.84	53.77
	Fourier	52.13	60.53	56.67
	LBP	55.37	55.49	65.28
Lado Abaxial	GLDM	65.44	66.02	55.16
	Fractal	58.68	59.14	62.52
	Fourier	63.66	57.99	55.6
	LBP	52.82	59.95	56.5

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 4.9 - Resultados da aplicação de descritores de textura em imagens de experimentos com NaCl (Aumento 50x), obtidos com 5 classes (Multiclasse).

Lado da folha	Método	LDA	SVM	KNN
Lado Adaxial	GLDM	54.07	52.06	41.84
	Fractal	43.31	43.89	56.62
	Fourier	36.37	42.52	41.96
	LBP	51.17	34.8	40.05
Lado Abaxial	GLDM	52.44	48.19	35.61
	Fractal	42.82	42.09	47.5
	Fourier	38.26	45.17	36.17
	LBP	47.94	38.11	34.83

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2 Experimento com AgNPs

4.2.1 Tamanho das plantas

Os resultados indicam que existem diferenças significativas entre os tratamentos aplicados às plantas ($p < 0.05$), tendo como variável dependente o tamanho das plantas (ver Tabela 4.11). Os dados apresentaram distribuição normal, o que pode ser comprovado no Gráfico 4.1, onde é apresentado o gráfico Q-Q dos resíduos do modelo, apresentando uma distribuição muito próxima da linha teórica de uma distribuição normal. Portanto, foi utilizada uma ANOVA paramétrica para detectar diferenças significativas. As plantas de maior tamanho foram achadas no tratamento controle e as de menor tamanho no tratamento 300 mM (ver Tabela 4.10),

mostrando um padrão de diminuição no tamanho das plantas conforme aumenta a concentração de nanopartículas de prata (AgNPs). As diferenças significativas são apresentadas no boxplot presente no Gráfico 4.5, mostrando sua respectiva significância ($p < 0.05$) da comparação das médias por pares de Tukey HSD. Também são mostradas as fotografias das plântulas após o experimento (Figura 4.2).

Os resultados encontrados concordam com os resultados de Thuesombat et al., ao avaliar os efeitos de nanopartículas de prata (AgNP) de vários tamanhos (20, 30-60, 70, 120 e 150 nm) em *Oryza sativa* L., esses resultados revelaram que a germinação das sementes e o tamanho das plântulas diminuíram gradativamente com o aumento do tamanho e da concentração das nanopartículas. Além disso, as amostras de tecido mostraram que a maior captação de nanopartículas foi encontrada principalmente na raiz.¹⁸⁴

Esses resultados podem ser atribuídos a um efeito tóxico induzido pelas nanopartículas de prata (AgNPs), e embora os mecanismos de nanotoxicidade ainda permaneçam desconhecidos, eles estão intimamente relacionados ao produto químico, composição, estrutura química, tamanho de partícula e a área da superfície. A toxicidade das nanopartículas pode ser atribuída ao seguinte: (1) uma toxicidade química baseada na liberação de íons (tóxicos); (2) estresse ou estímulos causados pela superfície, tamanho e / ou forma das partículas.¹⁸⁵

Tabela 4.10 - Estatísticas descritivas do tamanho das plantas tratadas com AgNPs. Onde M e SD representam a média e desvio padrão, respectivamente.

Tratamientos	<i>M</i>	<i>SD</i>
CONTROLE	7.35	1.29
1:1000	6.72	1.14
1:100	6.05	0.80
1:10	5.99	1.30
1:1	5.74	0.76

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 4.11 - ANOVA de efeitos fixos usando o tamanho das plantas como variável dependente. Experimento com nanopartículas de prata (AgNPs).

Predictor	Sum of Squares	df	Mean Square	F	p	partial η^2	partial η^2 90% CI [LL, UL]
(Intercept)	540.23	1	540.23	460.08	0.000		
Tratamentos	17.27	4	4.32	3.68	0.011	0.25	[0.04, 0.36]
Error	52.84	45	1.17				

Fonte: Elaborada pelo autor.

Gráfico 4.5 - Na esquerda, o gráfico Q-Q plot dos resíduos do modelo linear (Anova) mostra um comportamento de distribuição normal, usando o tamanho das plantas como variável dependente (Experimento com AgNPs). À direita, o boxplot mostra as significâncias das comparações por pares (Duncan). A significância é codificada desta forma: 0.001 (***) 0.01 (**) 0.05 (*).

Fonte: Elaborado pelo autor, utilizando R.

Figura 4.2 - Fotografia das plantas após serem submetidas à experimentação com AgNPs.
Fonte: Elaborada pelo autor.

4.3 Comparação de métodos computacionais

Com as evidências anteriores dos efeitos tóxicos causados pelo cloreto de sódio e nanopartículas de prata em *Tradescantia minima*, e a escassa capacidade dos métodos clássicos de visão computacional em detectar a plasticidade fenotípica nas folhas e poder classificá-las; foram usadas duas redes neurais convolucionais, customCNN e ResNet-50, métodos detalhados no capítulo 3 - seção 3.3.4.

Após a conclusão dos experimentos com cloreto de sódio (NaCl), e os resultados obtidos com os métodos clássicos, procedeu-se para treinar as redes neurais com as imagens pertencentes a este experimento, para fazer uma comparação de ambos métodos. Os resultados de ambas redes neurais mostraram uma capacidade relativamente elevada de detecção de plasticidade fenotípica e classificação das imagens, com média de $\bar{x} = 74.02$, enquanto os métodos clássicos de visão computacional (descritores de textura) apresentaram média de $\bar{x} = 51.40$ de taxa acerto (accuracy). O teste T-student detectou diferenças significativas entre esses métodos computacionais ($p < 0.05$), o que demonstra a efetividade e a superioridade das redes neurais (ver Gráfico 4.6).

Esses resultados concordam com os resultados de Lopez *et al.* onde a rede neural implementada teve maior acurácia (68.5%) que os métodos clássicos KNN (54.4%),

SVM (66.4%) e árvores de decisão (53.7%), na detecção de padrões texturais em imagens minerais.¹⁸⁶ Os resultados obtidos por Rishabh *et al.* eles também deram resultados superiores com redes neurais convolucionais (95%) do que com o método KNN (75%) na classificação de células infectadas com malária.¹⁸⁷ Ahmed *et al.* também obtiveram resultados muito bons em redes neurais convolucionais (97.30%), ao contrário de métodos clássicos como KNN (16.13) e LDA (63.61%).¹⁸⁸

Tabela 4.12 - Resultados da aplicação de CNNs em imagens de experimentos com NaCl.

Experimento Salinidad	Binary		Multiclasse	
	ResNet50	custom CNN	ResNet50	custom CNN
Adaxial – 50x	79.81(+/-1.78)	88.06(±2.84)	62.82(+/-3.43)	78.98(±2.60)
Adaxial – 100x	83.98(+/-1.53)	87.06(±1.31)	68.19(+/-2.01)	77.71(±2.93)
Adaxial – 200x	82.59(+/-1.59)	84.61(±1.91)	62.73(+/-1.55)	69.41(±1.65)
Abaxial – 50x	79.31(+/-2.94)	84.44(±2.69)	49.44(+/-1.95)	70.60(±4.75)
Abaxial – 100x	81.29(+/-0.63)	85.38(±1.31)	56.02(+/-2.84)	67.82(±3.13)
Abaxial – 200x	80.23(+/-1.65)	81.12(±2.28)	54.26(+/-1.71)	60.76(±1.45)

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 4.13 - Resultados da aplicação de CNNs em imagens de experimentos com AgNPs

Experimento Nanopartículas	Binary		Multiclasse	
	ResNet50	custom CNN	ResNet50	custom CNN
Adaxial – 50x	96.99(+/-1.38)	97.92(+/-1.25)	76.85(+/-2.92)	91.3(+/-2.11)
Adaxial – 100x	96.85(+/-0.66)	97.34(+/-0.62)	83.38(+/-1.73)	90.65(+/-1.42)
Adaxial – 200x	95.46(+/-0.82)	95.93(+/-0.98)	78.38(+/-2.34)	83.52(+/-2.48)
Abaxial – 50x	94.4(+/-1.02)	98.52(+/-0.94)	64.17(+/-5.37)	91.3(+/-2.16)
Abaxial – 100x	95.44(+/-1.04)	98.13(+/-0.59)	73.61(+/-1.72)	89.98(+/-1.67)
Abaxial – 200x	92.74(+/-1.18)	95.22(+/-0.81)	71.72(+/-1.45)	82.23(+/-1.58)

Fonte: Elaborada pelo autor.

Gráfico 4.6. Boxplot de comparação das taxas de acerto (accuracy) dos métodos computacionais.
Fonte: Elaborado pelo autor, usando R.

No Gráfico 4.7, foram comparados novamente ambos métodos computacionais, segundo o lado da folha que foi utilizada para classificar as imagens (adaxial e abaxial). Em ambos casos foram detectadas diferenças significativas ($p < 0.05$), porém, a média do accuracy das redes neurais ao classificar as imagens do lado adaxial teve uma média superior ($\bar{x} = 77.16$), do que a obtida ao classificar as imagens do lado abaxial ($\bar{x} = 70.89$). Além disso, a precisão obtida pelo lado adaxial apresentou menor variância ($\sigma^2 = 9.12$) do que as obtidas pelo lado abaxial ($\sigma^2 = 12.9$). Este gráfico também mostra a comparação desses métodos segundo a quantidade de classes que foi usada para classificar as imagens (binária e multiclasse). Novamente em ambos casos foram detectadas diferenças significativas ($p < 0.05$), porém, a diferença entre os métodos computacionais foi muito maior (tamanho do efeito = 6.38) no tipo de classificação binária do que no tipo multiclasse (tamanho do efeito = 2.59).

Gráfico 4.7 - Boxplot de comparação das taxas de acerto (accuracy) dos métodos computacionais, segundo o lado da folha (adaxial ou abaxial) e segundo a quantidade de classes (Binario ou multiclasse).

Fonte: Elaborado pelo autor, usando R.

Após de demonstrar a superioridade das redes neurais, a rede neural implementada (custom CNN) foi comparada com uma rede neural conhecida (ResNet-50) para avaliar sua relevância neste estudo.

A rede neural custom CNN demonstrou ser ligeiramente melhor do que ResNet-50 ($p < 0.1$), com tamanhos de efeito grandes: $g_{Hedges} = 0.7$ e $g_{Hedges} = 0.8$, ao classificar imagens de experimentos com cloreto de sódio (NaCl) e nanopartículas de prata (AgNPs), respectivamente. No experimento com cloreto de sódio (NaCl), a média do accuracy do custom CNN foi maior ($\bar{x} = 78.00$) do que média do accuracy da ResNet-50 ($\bar{x} = 70.05$); enquanto no experimento com nanopartículas de prata (AgNPs), a média do accuracy da custom CNN foi maior ($\bar{x} = 92.67$) do que a precisão média do ResNet-50 ($\bar{x} = 85.00$). Ver o Gráfico 4.8.

Também foi realizada uma comparação entre os aumentos microscópicos, para determinar se existe uma maior capacidade de detectar a plasticidade fenotípica em um aumento específico, utilizando o accuracy como variável dependente. Os

resultados mostraram que não existem diferenças significativas entre os aumentos ($p > 0.05$), nem nos experimentos com cloreto de sódio (NaCl) nem nos experimentos com nanopartículas de prata (AgNPs), porém, o aumento de 50x apresentou um viés maior à esquerda em ambos experimentos (NaCl e AgNPs). Ver o Gráfico 4.8.

Gráfico 4.8 - Boxplot de Acima mostra se a comparação das redes neurais (RestNet50 e custom CNN), no meio a comparação dos aumentos da microscopia usada, e embaixo a comparação dos tipos de classificação (Binario ou Multiclasse), segundo o experimento (com NaCl ou AgNPs).

Fonte: Elaborado pelo autor, usando R.

Por fim, foi realizada uma comparação entre os tipos de classificação (binária e multiclasse); e claramente o Gráfico 4.8 mostras que a classificação binária tem um accuracy muito maior ($p < 0.05$) e menor variância em ambos experimentos (NaCl e AgNPs); com médias de $\bar{x} = 83,16$ (Binário) e $\bar{x} = 64,89$ (Multiclasse), no experimento com NaCl; e médias de $\bar{x} = 96,25$ (Binário) e $\bar{x} = 81,42$ (Multiclasse), no experimento com AgNPs.

Jawale e Han *et al.* também obtiveram resultados semelhantes com o método clássico da máquina de vetores de suporte (SVM) e em redes neurais convolucionais (CNN), respectivamente; Jawale obteve acurácia de 80.95% na classificação binária e 50% na classificação multiclasse usando imagens florestais, enquanto Han *et al.* obtiveram acurácias de 84.9% com classificação binária e 49.5% com classificação multiclasse.¹⁸⁹⁻¹⁹⁰

As matrizes de confusão binária obtidas com os resultados obtidos com custom CNN (Gráfico 4.9), mostraram uma alta taxa de predição com um accuracy de 88.52 para a concentração de 1 mM de NaCl e um accuracy de 87.41 para a concentração de 10 mM de NaCl. Apesar dessas concentrações sejam muito baixas, os accuracy são altos; porém, esses altos valores são obtidos devido ao alto valor preditivo negativo ($NPV_{1mM} = 91.20$ e $NPV_{10mM} = 90.90$) para as concentrações de 1 e 10 mM de NaCl, respectivamente. Enquanto a precisão para essas concentrações foi de 75.2 e 70.94, para NaCl 1 e 10 mM respectivamente. As matrizes de confusão binárias de concentrações maiores de NaCl foram aquelas que apresentaram precisões muito maiores, 91.99 e 99.53 para 100 e 300 mM de NaCl respectivamente. O Gráfico 4.11 mostra a matriz de confusão multiclasse para os experimentos de NaCl.

Esses valores de accuracy obtidos para a predição de concentrações muito baixas de NaCl com folhas de *Tradescantia minima* poderiam desempenhar um papel importante como bioindicador na detecção de baixas concentrações de cloreto de sódio em seu ambiente.

No caso dos experimentos realizados com AgNPs, as matrizes de confusão binárias (Gráfico 4.10) e multiclasse (Gráfico 4.12) apresentaram taxas de acerto (accuracy) muito maiores do que nos experimentos com NaCl, sendo estes valores: 98.10, 97.5, 97.59, 96.02 e 93.89, para o controle, e as diluições 1:1000, 1:100, 1:10 e 1:1 de

AgNPs, respectivamente; enquanto as precisões foram 94.33, 94.58, 96.12, 89.35 e 85.89 para o controle, 1:1000, 1:100, 1:10 e 1:1 de AgNPs, respectivamente.

Esses resultados demonstram a sensibilidade de *Tradescantia minima* às nanopartículas de prata, portanto, essa espécie também poderia ser usada como bioindicador de contaminação por AgNPs.

Gráfico 4.9 - Matriz de confusão entre as etiquetas verdadeiras e as etiquetas das predições, em experimento com cloreto de sódio (NaCl). Feito com os resultados de classificação binária do lado adaxial da folha e aumento de 50x. Onde: 1 = verdadeiro, 0 = falso.
Fonte: Fonte: Elaborado pelo autor, usando python.

Gráfico 4.10 - Matriz de confusão entre as etiquetas verdadeiras e as etiquetas das predições, em experimento com nanopartículas de prata (AgNPs). Feito com os resultados de classificação binária do lado adaxial da folha e aumento de 50x. Onde: 1 = verdadeiro, 0 = falso.

Fonte: Elaborado pelo autor, usando python.

Gráfico 4.11 - Matriz de confusão entre as etiquetas verdadeiras e as etiquetas das predições, em experimento com cloreto de sódio (NaCl). Feito com os resultados de classificação multiclasse do lado adaxial da folha e aumento 50x.

Fonte: Elaborado pelo autor, usando python.

Gráfico 4.12 - Matriz de confusão entre as etiquetas verdadeiras e as etiquetas das predições, em experimento com nanopartículas de prata (AgNPs). Feito com os resultados de classificação multiclasse do lado adaxial da folha e aumento 50x.

Fonte: Elaborado pelo autor, usando python.

5 CONCLUSÃO

Esta pesquisa teve como objetivo detectar plasticidade fenotípica em *Tradescantia minima* induzida por agentes tóxicos como cloreto de sódio (NaCl) e nanopartículas de prata (AgNPs). Com a assistência de redes neurais convolucionais (CNN) foi possível detectar essa plasticidade, e prova disso é a alta capacidade desse método computacional em classificar imagens com alta taxa de acerto (accuracy).

Esses agentes tóxicos causaram alterações fenotípicas macroscópicas e microscópicas, quanto maior a concentração do agente tóxico, mais visível foi a nível macroscópico, como o tamanho das plantas, e quanto menor a concentração, menos perceptível foi neste nível macro. É aqui que as redes neurais desempenharam um papel importante na detecção desta plasticidade induzida, mesmo quando não foi perceptível ao olho humano, demonstrando assim a eficácia deste método computacional (CNN) para este fim.

Por fim, como recomendação, incita-se realizar pesquisas com concentrações mais baixas para desenvolver uma inteligência artificial ultrasensível capaz de utilizar as folhas de *Tradescantia minima* como bioindicadores/biossensores desses agentes tóxicos presentes em um ambiente terrestre.

REFERÊNCIAS

- 1 BRADSHAW, A. D.; HARDWICK, K. Evolution and stress-genotypic and phenotypic components. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 37, p.137-155, 1989. Disponível em: <https://academic.oup.com/biolinnean/article-abstract/37/1-2/137/2646976>. Acesso em: 10 mar. 2021.
- 2 PIGLIUCCI, M. **Phenotypic plasticity**: beyond nature and nurture. Baltimore: John Hopkins University Press, 2001.
- 3 GONZÁLEZ, A. V.; GIANOLI, E. Morphological plasticity in response to shading in three *Convolvulus* species of different ecological breadth. **Acta Oecologica**, v. 26, n. 3, p. 185-190, 2004.
- 4 SCHEINER, S. M. The genetics of phenotypic plasticity. XII. temporal and spatial heterogeneity. **Ecology and Evolution**, v. 3, n. 13, p. 4596-4609, 2013.
- 5 ANDERSON, B. W. *et al.* Impacts of a Poultry processing plant on the diversity of *Escherichia coli* populations and transferability of tetracycline resistance genes in an Urban Stream in South Carolina. **Water Air and Soil Pollution**, v. 225, n. 7, p. 20-30, 2014.
- 6 GODOY, O. *et al.* Forests are not immune to plant invasions: phenotypic plasticity and local adaptation allow *Prunella vulgaris* to colonize a temperate evergreen rainforest. **Biological Invasions**, v. 13, n. 7, p. 1615-1625, 2011.
- 7 NICOTRA, A. B. *et al.* Plant phenotypic plasticity in a changing climate. **Trends in Plant Science**, v. 15, n. 12, p. 684-692, 2010.
- 8 LEINGÄRTNER, A. *et al.* Combined effects of extreme climatic events and elevation on nutritional quality and herbivory of alpine plants. **PloS ONE**, v. 9, n. 4, p. e93881, 2014.
- 9 GOH, C. H. *et al.* The impact of beneficial plant-associated microbes on plant phenotypic plasticity. **Journal of Chemical Ecology**, v. 39, p. 826-839, 2013. DOI: 10.1007/s10886-013-0326-8.
- 10 VALLADARES F. *et al.* Quantitative estimation of phenotypic plasticity: bridging the gap between the evolutionary concept and its ecological applications. **Journal of Ecology**, v. 94, n. 6, p. 1103-1116, 2006.
- 11 BOLNICK, D. I. *et al.* Why intraspecific trait variation matters in community ecology. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 26, p. 183–192, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tree.2011.01.009>.
- 12 KUNSTLER, *et al.* Plant functional traits have globally consistent effects on competition. **Nature**, v. 529, p. 204–207, 2016. DOI: 10.1038/nature16476.
- 13 ZHANG, Y. Y. *et al.* Epigenetic variation creates potential for evolution of plant phenotypic plasticity. **New Phytologist**, v.197, n. 1, p. 314–322, 2013.
- 14 HERMAN, J. J. *et al.* How stable ‘should’ epigenetic modifications be? insights from adaptive plasticity and bet hedging. **Evolution**, v. 68, n. 3, p. 632–643, 2014.

- 15 VERHOEVEN, K. J. *et al.* Changes in genomic methylation patterns during the formation of triploid asexual dandelion lineages. **Molecular Ecology**, v.19, n. 2, p. 315–324. 2010.
- 16 DOWEN, R. H. *et al.* Widespread dynamic DNA methylation in response to biotic stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 32, p. E2183–E2191, 2012.
- 17 CORTIJO, S. R. *et al.* Mapping the epigenetic basis of complex traits. **Science**, v. 343, n. 6175, p. 1145–1148, 2014. DOI: 10.1126/science.1248127.
- 18 BOSSDORF, O. *et al.* Experimental alteration of DNA methylation affects the phenotypic plasticity of ecologically relevant traits in *Arabidopsis thaliana*. **Evolutionary Ecology**, v. 24, n. 3, p. 541–553, 2008.
- 19 SCHLEIFF, U.; MUSCOLO, A. Fresh look at plant salt tolerance as affected by dynamics at the soil/root-interface using Leek and Rape as model crops. **European Journal of Plant Science and Biotechnology**, v. 5, n. 2, p. 27–32, 2011
- 20 WANG, Y. *et al.* Salt-induced plasticity of root hair development is caused by ion disequilibrium in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Plant Research**, v. 121, n. 1, p. 87–96, 2008
- 21 MÜLLER, M.; SCHMIDT, W. Environmentally induced plasticity of root hair development in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v.134, n. 1, p. 409–419, 2004.
- 22 Li, Q. *et al.* Leaf epidermal characters of *Lonicera japonica* and *Lonicera confusa* and their ecology adaptation. **Journal of Forestry Research**, 18, n. 2, p. 103–108, 2007.
- 23 GAMAGE, H. K.; ASHTON, M. S.; SINGHAKUMARA, B. M. Leaf structure of *Syzygium* spp. (Myrtaceae) in relation to site affinity within a tropical rain forest. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 141, n. 3, p. 365–377, 2003.
- 24 GASIC, K.; KORBAN, S. S. Heavy metal stress. *In*: RAO, K.V.M.; RAGHAVENDRA, A.S.; REDDY, K.J. (ed.). **Physiology and molecular biology of stress tolerance in plants**. Dordrecht: Springer Science & Business Media, 2006. p. 219-254.
- 25 SRIDHAR, B.B.M. *et al.* Anatomical changes due to uptake and accumulation of Zn and Cd in Indian mustard (*Brassica juncea*). **Environmental and Experimental Botany**, v. 54, n. 2, p. 131-141. 2005.
- 26 SERGEEV, G. B. Cryochemistry of metal nanoparticles. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 5, p. 529–537, 2003. DOI: 10.1023/B:NANO.0000006153.65107.42. Disponível em: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1023/B:NANO.0000006153.65107.42.pdf>. Acesso em: 16 mar. 2021.
- 27 SERGEEV, G. B.; SHABATINA, T. I. Cryochemistry of nanometals. **Colloids and Surfaces A: physicochemical and engineering aspects**, v. 313, p. 18–22, 2008. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2007.04.064. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927775707004542>. Acesso em: 16 mar. 2021.

- 28 WILLIAMS, D. The relationship between biomaterials and nanotechnology. **Biomaterials**, v. 29, p. 1737–1738, 2008. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2008.01.003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18249439/>. Acesso em: 16 mar. 2021.
- 29 MORETTIN, P. A.; BUSSAB, W. O. **Estatística básica**. 6. ed. São Paulo: Saraiva, 2010.
- 30 AITKEN, R. J. *et al.* **REFNANO**: reference materials for engineered nanoparticle toxicology and metrology. Final report on Project CB01099. London: Defra, 2007. Disponível em: <https://www.safenano.org/media/109902/Defra2007-REFNANO.pdf>. Acesso em: 23 jan. 2021.
- 31 HEINEMANN, S.; CORADIN, T.; DESIMONE, M. F. Bio-inspired silica–collagen materials: applications and perspectives in the medical field. **Biomaterials Science**, v. 1, n. 7, p. 688–702, 2013.
- 32 SONDI, I.; SALOPEK-SONDI, B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E-coli as a model for Gram-negative bacteria. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 275, n. 1, p. 177-182, 2004.
- 33 MEBERT, A. M. *et al.* Nanoengineered silica: properties, applications and toxicity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 109, pt 1, 2017. DOI: 10.1016/j.fct.2017.05.054. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691517302880?via%3Dihub>. Acesso em: 16 mar. 2021.
- 34 CARO, C. *et al.* Silver nanoparticles: sensing and imaging applications. *In*: PEREZ, D.P. (ed.). **Silver nanoparticles**. London: IntechOpen, 2010. p 201–224.
- 34 FRANCI, G. *et al.* Silver nanoparticles as potential antibacterial agents. **Molecules**, v. 20, n. 5, p.8856-8874. 2015.
- 35 JANA, S.; PAL, T. Synthesis, characterization and catalytic application of silver nanoshell coated functionalized polystyrene beads. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v.7, n. 6, p. 2151-2156, 2007.
- 36 STIUFIUC, R. *et al.* SERS-active silver colloids prepared by reduction of silver nitrate with short-chain polyethylene glycol. **Nanoscale Research Letters**, v. 8, n. 1, p. 47, 2013.
- 37 KONRAD, M. P.; DOHERTY, A. P.; BELL, S. E. J. Stable and uniform SERS signals from self-assembled two-dimensional interfacial arrays of optically coupled Ag nanoparticles. **Analytical Chemistry**, v. 85, n. 14, p.6783-6789, 2013.
- 38 MEHERETU, G. M.; CIALLA, D.; POPP, J. Surface enhanced Raman spectroscopy on silver nanoparticles. **International Journal of Biochemistry and Biophysics**, v. 24, n. 4, p. 63-67, 2014
- 39 EVTUGYN, G. A. *et al.* Cholinesterase sensor based on glassy carbon electrode modified with Ag nanoparticles decorated with macrocyclic ligands. **Talanta**, v. 127, p. 9-17, 2014. DOI: 10.1016/j.talanta.2014.03.048.
- 40 THANH, N. T. K.; GREEN, L. A. W. Functionalisation of nanoparticles for biomedical applications. **Nano Today**, v. 5, p. 213-230, 2010. DOI:10.1016/j.nantod.2010.05.003.

- 41 ALON, N. *et al.* Substrates coated with silver nanoparticles as a neuronal regenerative material. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, Supl. 1, p. 23-31, 2014.
- 42 BU, Y.; LEE, S. Influence of dopamine concentration and surface coverage of Au shell on the optical properties of Au, Ag, and AgcoreAushell nanoparticles. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 4, n. 8, p. 3923-3931, 2012.
- 43 LUO, Y. *et al.* SERS detection of dopamine using label-free acridine red as molecular probe in reduced graphene oxide/silver nanotriangle sol substrate. **Nanoscale Research Letters**, v. 10, p. 230, 2015. DOI: 10.1186/s11671-015-0937-9.
- 44 RIVERO, P. J. A. Lossy mode resonance optical sensor using silver nanoparticles-loaded films for monitoring human breathing. **Sensors and Actuators B: chemical**, v. 187, p. 40-44, 2013. DOI: 10.1016/j.snb.2012.09.022.
- 45 GOTTSCHALK, F. *et al.* Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO₂, ZnO, Ag, CNT, Fullerenes) for different regions. **Environmental Science & Technology**, v. 43, n. 24, p. 9216-9222, 2009.
- 46 MARTINHO, N.; DAMGÉ, C.; REIS, C. Recent advances in drug delivery systems. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**, v. 2, p. 510–526. 2011. DOI: 10.4236/jbmb.2011.225062.
- 47 RIGON, R. B. *et al.* Nanotechnology-based drug delivery systems for melanoma antitumoral therapy: a review. **BioMed Research International**, 2015. DOI: 10.1155/2015/841817
- 48 KONG, F.Y. *et al.* Unique roles of gold nanoparticles in drug delivery, targeting and imaging applications. **Molecules**, v. 22, n. 9, p. 1445, 2017. DOI: 10.3390/molecules22091445.
- 49 CHUGH, H. *et al.* Role of gold and silver nanoparticles in cancer nano-medicine. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 46, Supl. 1, p. 1210-1220, 2018. DOI: 10.1080/21691401.2018.1449118.
- 50 GU, Y. J. *et al.* Nuclear penetration of surface functionalized gold nanoparticles. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 237, n. 2, p. 196-204, 2009.
- 51 BHATTACHARYA, R. *et al.* Attaching folic acid on gold nanoparticles using noncovalent interaction via different polyethylene glycol backbones and targeting of cancer cells. **Nanomedicine: nanotechnology, biology and medicine**, v. 3, n. 3, p. 224–238, 2007.
- 52 DING, Y. *et al.* Gold nanoparticles for nucleic acid delivery. **Molecular Therapy**, v. 22, n. 6, p. 1075–1083, 2014.
- 53 KIM, E. Y. *et al.* Gold nanoparticle-mediated gene delivery induces widespread changes in the expression of innate immunity genes. **Gene Therapy**, v. 19, n. 3, p. 347–353, 2012.
- 54 SON, S. *et al.* i-motif-driven Au nanomachines in programmed siRNA delivery for gene-silencing and photothermal ablation. **ACS Nano**, v. 8, n. 6, p. 5574–5584, 2014.

- 55 PENG, L. H. *et al.* Integration of antimicrobial peptides with gold nanoparticles as unique non-viral vectors for gene delivery to mesenchymal stem cells with antibacterial activity. **Biomaterials**, v. 103, p. 137–149, 2016. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2016.06.057.
- 56 GREULICH, C. *et al.* Uptake and intracellular distribution of silver nanoparticles in human mesenchymal stem cells. **Acta Biomaterialia**, v. 7, n. 1, p. 347–354, 2011.
- 57 JEYARAJ, M. *et al.* Biogenic silver nanoparticles for cancer treatment: an experimental report. **Colloids and Surface B - biointerfaces**, v. 106, p. 86–92, 2013. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2013.01.027.
- 58 KAWATA, K. *et al.* In vitro toxicity of silver nanoparticles at noncytotoxic doses to HepG2 human hepatoma cells. **Environmental Science & Technology**, v. 43, n. 15, p. 6046–6051, 2009.
- 59 FOLDBJERG, R.; DANG, D. A., AUTRUP H. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in the human lung cancer cell line, A549. **Archives of Toxicology**, v. 85, n. 7, p. 743–750, 2011.
- 60 GURUNATHAN S. *et al.* Cytotoxicity of biologically synthesized silver nanoparticles in MDA-MB-231 human breast cancer cells. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 535796, 2013. DOI: 10.1155/2013/535796.
- 61 VASANTH K. *et al.* Anticancer activity of Moringa oleifera mediated silver nanoparticles on human cervical carcinoma cells by apoptosis induction. **Colloids and Surfaces B: biointerfaces**, v. 117, p. 354–359, 2014. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2014.02.052.
- 62 ASHARANI P. *et al.* Anti-proliferative activity of silver nanoparticles. **BMC Molecular and Cell Biology**, v. 10, p. 65, 2009. DOI: 10.1186/1471-2121-10-65
- 63 SIMON, P.; CHAUDHRY, Q.; BAKOS, D. Migration of engineered nanoparticles from polymer packaging to food--a physicochemical view. **Journal of Food & Nutrition Research**, v. 47, n. 3, p. 105-113. 2008.
- 64 PAUL, D.; ROBESON, L. Polymer nanotechnology: nanocomposites. **Polymer**, v. 49, n. 15, p. 3187-3204. 2008.
- 65 EMAMIFAR, A. *et al.* Effect of nanocomposite packaging containing Ag and ZnO on inactivation of Lactobacillus plantarum in orange juice. **Food Control**, v. 22, n. 3, p. 408-413, 2011.
- 66 INCORONATO, A. *et al.* Agar hydrogel with silver nanoparticles to prolong the shelf life of Fior di Latte cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 4, p. 1697-1704, 2011.
- 67 JOYE, I. J. *et al.* A comprehensive perspective of food nanomaterials. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 88, p. 1-45, 2019. DOI: 10.1016/bs.afnr.2019.01.001.
- 68 AL-TAYYAR, N. A.; YOUSSEF, A. M.; AL-HINDI, R. Antimicrobial food packaging based on sustainable Bio-based materials for reducing foodborne pathogens: a review. **Food Chemistry**, v. 310, p. 125915, 2020. DOI: 10.1016/j.foodchem.2019.125915.

- 69 HU, S. *et al.* Effects of sorbic acid-chitosan microcapsules as antimicrobial agent on the properties of ethylene vinyl alcohol copolymer film for food packaging. **Journal of Food Science**, v. 82, n. 6, p. 1451-1460, 2017.
- 70 XIE, J.; HUNG, Y.C. Methodology to evaluate the antimicrobial effectiveness of UV-activated TiO₂ nanoparticle-embedded cellulose acetate film. **Food Control**, v. 106, p. 106690, 2019. DOI: 10.1016/j.foodcont.2019.06.016.
- 71 CHORIANOPOULOS, N. G. *et al.* Use of titanium dioxide (TiO₂) photocatalysts as alternative means for *Listeria monocytogenes* biofilm disinfection in food processing. **Food Microbiology**, 28, n. 1, p. 164-170, 2011.
- 72 ZHANG, X. *et al.* Development of multifunctional food packaging films based on chitosan, TiO₂ nanoparticles and anthocyanin-rich black plum peel extract. **Food Hydrocolloids**, v. 94, p. 80-92, 2019. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2019.03.009.
- 73 BRANDELLI, A. The interaction of nanostructured antimicrobials with biological systems: cellular uptake, trafficking and potential toxicity. **Food Science and Human Wellness**, v. 9, n. 1, p. 8-20, 2020.
- 74 DAS, M.; NEHA, S.; PREMENDRA, D. D. Emerging trends of nanoparticles application in food technology: safety paradigms. **Nanotoxicology**, v. 3, n. 1, p. 10-18, 2009. DOI: 10.1080/17435390802504237.
- 75 MEDINA REYES, E. *et al.* Food additives containing nanoparticles induce gastrotoxicity, hepatotoxicity and alterations in animal behavior: the unknown role of oxidative stress. **Food and Chemical Toxicology**, v. 146, p. 111814, 2020. DOI: 10.1016/j.fct.2020.111814.
- 76 LIM, J. H.; BAE, D.; FONG, A. Titanium dioxide in food products: quantitative analysis using ICP-MS and Raman spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 51, p. 13533-13540, 2018.
- 77 WEIR, P. *et al.* Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products. **Environmental Science & Technology**, v. 46, n. 4, p. 2242-2250, 2012.
- 78 EFSA. Re-evaluation of titanium dioxide (E 171) as a food additive: EFSA panel on food additives and nutrient sources added to food. **EFSA Journal**, v. 14, n. 9, p. e04545, 2016. DOI:10.2903/j.efsa.2016.4545. Disponível em: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.2903/j.efsa.2016.4545>. Acesso em: 17 mar. 2021.
- 79 YU, Z. *et al.* Preparation of cellulose nanofibril/titanium dioxide nanoparticle nanocomposites as fillers for PVA-based packaging and investigation into their intestinal toxicity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 156, p. 1174-1182, 2019. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.11.153.
- 80 IBHADON, A.O.; FITZPATRICK, P. Heterogeneous photocatalysis: recent advances and applications. **Catalysts**, 3, n. 1, p. 189-218, 2013.
- 81 MAGALHÃES, P. *et al.* Titanium dioxide photocatalysis: fundamentals and application on photoinactivation. **Reviews on Advanced Materials Science**, v. 51, n. 2, p. 91-129, 2017.

- 82 FENG, S. *et al.* Physico-mechanical and antibacterial properties of PLA/TiO₂ composite materials synthesized via electrospinning and solution casting processes. **Coatings**, v. 9, n. 8, p. 525, 2019.
- 83 PELE, L.C. *et al.* Pharmaceutical/food grade titanium dioxide particles are absorbed into the bloodstream of human volunteers. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 12, p. 26, 2015. DOI: 10.1186/s12989-015-0101-9.
- 84 HERINGA, M. B. *et al.* Detection of titanium particles in human liver and spleen and possible health implications. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 15, n. 1, p. 15, 2018.
- 85 NANODATABASE. **Resource document**. Danish Consumer Council, Danish Ecological Council and DTU Environment. Disponível em: <https://nanodb.dk/en/>. Acesso em: 19 mar. 2021.
- 86 JOHNSTON, H. J. A review of the in vivo and in vitro toxicity of silver and gold particulates: particle attributes and biological mechanisms responsible for the observed toxicity. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 40, n. 4, p. 328–346, 2010.
- 87 DRAKE, P. L.; HAZELWOOD, K. J. Exposure-related health effects of silver and silver compounds: a review. **Annals of Occupational Hygiene**, v. 49, n. 7, p. 575–585, 2005.
- 88 STOEHR, L.C. *et al.* Shape matters: effects of silver nanospheres and wires on human alveolar epithelial cells. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 8, p. 36, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1186/1743-8977-8-36>.
- 89 ASHARANI, P. V. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. **ACS Nano**, v. 3, n. 2, p. 279–290, 2009.
- 90 FARRELL, T. P.; MAGNUSON, B. Absorption, distribution and excretion of four forms of titanium dioxide pigment in the rat. **Journal of Food Science**, v. 82, n. 8, p. 1985–1993, 2017.
- 91 BLEVINS, L. K. *et al.* Evaluation of immunologic and intestinal effects in rats administered an E 171-containing diet, a food grade titanium dioxide (TiO₂). **Food and Chemical Toxicology**, v. 133, p. 110793, 2019. DOI: 10.1016/j.fct.2019.110793.
- 92 BETTINI, S. *et al.* Food-grade TiO₂ impairs intestinal and systemic immune homeostasis, initiates preneoplastic lesions and promotes aberrant crypt development in the rat colon. **Scientific Reports**, v. 7, p. 40373. 2017. DOI: 10.1038/srep40373
- 93 URRUTIA-ORTEGA, I. M. *et al.* Food-grade titanium dioxide exposure exacerbates tumor formation in colitis associated cancer model. **Food and Chemical Toxicology**, v. 93, p. 20, 2016. DOI: 10.1016/j.fct.2016.04.014
- 94 TALAMINI, L. *et al.* Repeated administration of the food additive E171 to mice results in accumulation in intestine and liver and promotes an inflammatory status. **Nanotoxicology**, 13, n. 8, p. 1087–1101, 2019.
- 95 BOZICH, J. S. *et al.* Surface chemistry, charge and ligand type impact the toxicity of gold nanoparticles to *Daphnia magna*. **Environmental Science: nano**, v. 1, p. 260, 2014. DOI: 10.1039 / c4en00006d.

- 96 ZHU, Z. J. *et al.* Surface properties dictate uptake, distribution, excretion, and toxicity of nanoparticles in fish. **Small**, v. 6, p. 2261–2265, 2010. DOI: 10.1002/smll.201000989
- 97 SARMA, S. J. *et al.* Carbon nanotube- bioaccumulation and Recent advances in environmental monitoring. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 45, n. 9, 2014. DOI: 10.1080/10643389.2014.924177.
- 98 CARLSON, C. *et al.* Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 112, p. 13608–13619, 2008. DOI: 10.1021/jp712087m.
- 99 SCOWN, T. M. Effects of aqueous exposure to silver nanoparticles of different sizes in rainbow trout. **Toxicological Sciences**, v. 115, p. 521–534, 2010. DOI:10.1093/toxsci/kfq076.
- 100 HOCELLA, M. F. *et al.* Natural, incidental, and engineered nanomaterials and their impacts on the Earth system. **Science**, v. 363, n. 6434, 2019. DOI: 10.1126/science.aau8299.
- 101 SCHWAB, F. *et al.* Barriers, pathways and processes for uptake, translocation and accumulation of nanomaterials in plants – critical review. **Nanotoxicology**, v. 10, p. 3, p. 257–278, 2016. DOI: 10.3109/17435390.2015.1048326.
- 102 WANG, P. *et al.* Nanotechnology: a new opportunity in plant sciences. **Trends in Plant Science**, v. 21, n. 8, p. 699–712, 2016.
- 103 NAIR, R. *et al.* Nanoparticulate material delivery to plants. **Plant Science**, v. 179, n. 3, p. 154–163, 2010.
- 104 GALBRAITH, D. W. Nanobiotechnology: silica breaks through in plants. **Nature Nanotechnology**, v. 2, n. 5, p. 272–273, 2007.
- 105 SIDDIQUI, M. H. *et al.* Role of nanoparticles in plants. *In*: SIDDIQUI, M.; AL-WHAIBI, M.; MOHAMMAD, F. (ed.). **Nanotechnology and plant sciences**. Cham: Springer, 2015. cap. 2. p 19-35.
- 106 SHAH, V.; BELOZEROVA, I. Influence of metal nanoparticles on the soil microbial community and germination of lettuce seeds. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 197, p. 143–148, 2009. DOI: 10.1007/s11270-008-9797-6.
- 107 ARORA, S. *et al.* Gold-nanoparticle induced enhancement in growth and seed yield of Brassica juncea. **Plant Growth Regulation**, v. 66, p. 303–310, 2012. DOI: 10.1007/s10725-011-9649-z.
- 108 GOPINATH, K. *et al.* Green synthesis of gold nanoparticles from fruit extract of Terminalia arjuna, for the enhanced seed germination activity of Gloriosa superba. **Journal of Nanostructure in Chemistry**, v. 4, p. 1–11, 2014. DOI: 10.1007/s40097-014-0115-0.
- 109 KRISHNARAJ, C. *et al.* Effect of biologically synthesized silver nanoparticles on Bacopa monnieri (Linn.) Wettst. plant growth metabolism. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 4, p. 651–658, 2012.
- 110 GRUYER, N. *et al.* Interaction between silver nanoparticles and plant growth. 2013. Disponível em: <https://www.researchgate.net/profile/Nicolas->

[Gruyer/publication/264858518](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33858518/) Interaction between Silver Nanoparticles and Plant Growth/links/53f344c90cf2dd48950c9fbc/Interaction-between-Silver-Nanoparticles-and-Plant-Growth.pdf. Acesso em: 30 abr. 2021.

111 SYU, Y. Y. *et al.* Impacts of size and shape of silver nanoparticles on Arabidopsis plant growth and gene expression. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 83, p. 57–64, 2014. DOI: 10.1016/j.plaphy.2014.07.010.

112 KAVEH, R. *et al.* Changes in Arabidopsis thaliana gene expression in response to silver nanoparticles and silver ions. **Environmental Science & Technology**, v. 47, n. 18, p. 10637–10644, 2013.

113 FIELD, B. *et al.* Formation of plant metabolic gene clusters within dynamic chromosomal regions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 38, p. 16116– 6121, 2011.

114 MIRZAJANI, F. *et al.* Proteomics study of silver nanoparticles toxicity on Oryza sativa L. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 108, p. 335-339, 2014. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2014.07.013

115 OUKARROUM, A. *et al.* Silver nanoparticle toxicity effect on growth and cellular viability of the aquatic plant Lemna gibba. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 32, n. 4, p. 902-907, 2013.

116 RENGASAMY, P. World salinization with emphasis on Australia. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n. 5, p. 1017-1023, 2006.

117 MUNNS, R.; TESTER, M. Mechanisms of salinity tolerance. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, n. 1, p. 651-681, 2008.

118 REWALD, B. *et al.* Salt stress effects on root systems of two mature olive cultivars. **Acta Horticulturae**, v. 888, p. 109-128, 2011. DOI: 10.17660/ActaHortic.2011.888.11.

119 VADEZ, V. *et al.* Exploiting the functionality of root systems for dry, saline, and nutrient deficient environments in a changing climate. **Journal of SAT Agricultural Research**, v. 4, n. 1, p. 1-61, 2007.

120 ROMERO, R. *et al.* Tomato plant-water uptake and plant-water relationships under saline growth conditions. **Plant Science**, v. 160, n. 2, p. 265-272, 2001.

121 ACOSTA-MOTOS, M. Plant responses to salt stress: adaptive mechanisms. **Agronomy**, v. 7, n. 1, p. 18, 2017.

122 RAO, A. Q. *et al.* Genomics of salinity tolerance in plants. In: ABDURAKHMONOV, I.Y. (ed.). **Plant genomics**. London: IntechOpen, 2016.

123 BENJAMIN, J. J. *et al.* Proteomics revealed distinct responses to salinity between the halophytes Suaeda maritima (L.) Dumort and Salicornia brachiata (Roxb). **Plants**, v. 9, n. 2, p. 227, 2020.

124 BETZEN, B. M. *et al.* Effects of increasing salinity on photosynthesis and plant water potential in Kansas salt marsh species. **Transactions of the Kansas Academy of Science**, v. 122, n. 1-2, p. 49, 2019.

125 METHENNI, K. *et al.* Salicylic acid and calcium pretreatments alleviate the toxic effect of salinity in the Oueslati olive variety. **Scientia Horticulturae**, v. 233, p. 349-358, 2018. DOI: 10.1016/j.scienta.2018.01.060.

126 WANG, P. *et al.* Low salinity promotes the growth of broccoli sprouts by regulating hormonal homeostasis and photosynthesis. **Horticulture, Environment, and Biotechnology**, v. 60, p. 19-30, 2018. DOI: 10.1007/s13580-018-0095-y.

127 CICEK, N. *et al.* Salt stress effects on the photosynthetic electron transport chain in two chickpea lines differing in their salt stress tolerance. **Photosynthesis Research**, v. 136, n. 3, p. 291-301, 2018.

128 SOORI, N. *et al.* Effect of salinity stress on some physiological characteristics and photosynthetic parameters of several Iranian commercial pomegranate genotypes. **Journal of Plant Process and Function**, v. 8, n. 2, p. 155-170, 2019.

129 HNILÍČKOVÁ, H. *et al.* Effects of salt stress on water status, photosynthesis and chlorophyll fluorescence of rocket. **Plant, Soil and Environment**, v. 63, n. 8, p. 362-367, 2017.

130 YAN LU, H. X.; TONG, S. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on photosynthesis and chlorophyll fluorescence of maize seedlings under salt stress. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v. 30, n. 3, p. 199-204, 2018.

131 TSAI, Y. C. *et al.* Chlorophyll fluorescence analysis in diverse rice varieties reveals the positive correlation between the seedlings salt tolerance and photosynthetic efficiency. **BMC Plant Biology**, v. 19, p. 403, 2019. DOI: 10.1186/s12870-019-1983-8.

132 ERASLAN, G. *et al.* Deep learning: new computational modelling techniques for genomics. **Nature Reviews Genetics**, v. 20, n. 7, p. 389–403, 2019.

133 MAMOSHINA, P. *et al.* Applications of deep learning in biomedicine. **Molecular Pharmaceutics**, v. 13, n.5, p. 1445–1454, 2016.

134 LECUN, Y. *et al.* Backpropagation applied to handwritten zip code recognition. **Neural Computation**, v. 1, n. 4, p. 541–551, 1989.

135 SINGH, A. *et al.* Machine learning for high-throughput stress phenotyping in plants. **Trends in Plant Science**, v. 21, n. 2, p. 110-124, 2016.

136 CIMPOI, M. Deep filter banks for texture recognition, description, and segmentation. **International Journal of Computer Vision**, v. 118, n. 1, p. 65-94. 2016.

137 LIU, L. *et al.* From BoW to CNN: two decades of texture representation for texture classification. **International Journal of Computer Vision**, v. 127, p. 74–109. 2019. DOI:10.1007/s11263-018-1125-z.

138 PAJARES, G. A Hopfield neural network for image change detection. **IEEE Transactions of Neural Networks**, v. 17, n. 5, p. 1250-126, 2006.

139 OJALA, T.; PIETIKÄINEN, M.; MÄENPÄÄ, T. Multiresolution gray-scale and rotation invariant texture classification with local binary patterns. **IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence**, v. 24, n. 7, p. 971–987, 2002.

- 140 MARAM, A. *et al.* A novel cumulative level difference mean based GLDM and modified ABCD features ranked using eigenvector centrality approach for four skin lesion types classification. **Computer Methods and Programs in Biomedicine**, v. 165, p. 163-174. 2018. DOI: 10.1016/j.cmpb.2018.08.009.
- 141 NEIVA, M. **Métodos de pré-processamento de texturas para otimizar o reconhecimento de padrões**. 2016. 141 p. Dissertação (Mestrado em Ciências de Computação e Matemática Computacional) – Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.
- 142 NEIL, G.; CURTIS, K. M. Shape recognition using fractal geometry. **Pattern Recognition**, v. 30, n. 12, p. 1957–1969, 1997.
- 143 KAPLAN, L. M. Extended fractal analysis for texture classification and segmentation. **IEEE Transactions on Image Processing**, v. 8, n. 11, p. 1572–1585, 1999.
- 144 TRICOT, C. **Curves and fractal dimension**. Berlin: Springer Science & Business Media, 1994.
- 145 FOURIER, J. B. J. **The analytical theory of heat**. New York: The University Press, 1878.
- 146 HSU, H. P. **Análise de Fourier**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1973
- 147 CORTES, C.; VAPNIK, V. Support-vector networks. **Machine Learning**, v. 20, p. 273–297. 1995. DOI: 10.1023/A:1022627411411.
- 148 SHANG, C.; BARNES, D. Support vector machine-based classification of rock texture images aided by efficient feature selection. *In*: INTERNATIONAL JOINT CONFERENCE ON NEURAL NETWORKS (IJCNN), 2012, Brisbane. **Proceedings [...]**. Brisbane: IEEE, 2012. p. 1–8.
- 149 MASASHI, S; *et al.* Semi-supervised local Fisher discriminant analysis for dimensionality reduction. **Machine Learning**, 78, 35. 2010. DOI: [10.1007/s10994-009-5125-7](https://doi.org/10.1007/s10994-009-5125-7)
- 150 NIYOGI, P. Laplacian eigenmaps for dimensionality reduction and data representation, **Neural Computation**, v. 15, n. 6, p. 1373 – 1396, 2003.
- 151 ANAYA ISAZA, A. **Estudio comparativo de métodos espectrales para reducción de la dimensionalidad: LDA versus PCA**. 2016. Disponível em: https://www.diegopeluffo.com/publicaciones/2016_INCISCOS_LDA%20versus%20PCA.pdf. Acesso em: 01 abr. 2021.
- 152 LINEAR DISCRIMINANT ANALYSIS, EXPLAINED. **Towards data science**. Disponível em: <https://towardsdatascience.com/linear-discriminant-analysis-explained-f88be6c1e00b>. Acesso em: 30 abr. 2021.
- 153 MEYER, D.; LEISCH, F.; HORNIK, K. The support vector machine under test. **Neurocomputing**, v. 55, p. 169–186, 2003. DOI:10.1016/S0925-2312(03)00431-4.
- 154 MANJREKAR, O. & DUDUKOVIĆ, M. Identification of flow regime in a bubble column reactor with a combination of optical probe data and machine learning

technique. **Chemical Engineering Science**, v. 2, 2019. DOI: 10.1016/j.cesx.2019.100023.

155 MELLOR, M.; HONG, B.; BRADY, M. Locally rotation, contrast, and scale invariant descriptors for texture analysis. **IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence**, v. 30, p. 52–61, 2008. DOI: 10.1109/TPAMI.2007.1161.

156 ATALLAH, D. M.; BADAWEY, M.; EL-SAYED, A. Intelligent feature selection with modified K-nearest neighbor for kidney transplantation prediction. **SN Applied Sciences**, v. 1, p. 1297, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s42452-019-1329-z>.

157 ROSENBLATT, F. **The perceptron: a perceiving and recognizing automaton**. New York: Cornell Aeronautical Laboratory, 1957. (Report: cornell aeronautical laboratory, v. 85)

158 LAVEEN, N. K. Perceptron. In: **Encyclopedia of computer science**. Chichester: John Wiley and Sons, 2003. p. 1383–1385.

159 BERZAL, F. **Redes neuronales & deep learning**. Granada: Independently Published, 2018.

160 NEURAL NETWORKS AND DEEP LEARNING. **Coursera**. Disponível em: <https://www.coursera.org/learn/neural-networks-deep-learning/home/week/1>. Acesso em: 04 nov. 2020.

161 NEURAL NETWORKS. **IBM cloud education**. 2020. Disponível em: <https://www.ibm.com/cloud/learn/neural-networks>. Acesso em: 01 mar. 2021.

162 YASAKA, K.; AKAI, H.; KUNIMATSU, A.; KIRYU, S.; ABE, O. Deep learning with convolutional neural network in radiology. **Japanese Journal of Radiology**; v. 36, n. 4, p. 257-272, 2018. DOI: 10.1007/s11604-018-0726-3.

163 LECUN, Y.; BENGIO, Y.; HINTON, G. Deep learning. **Nature**, v. 521, n. 553, p. 436-444, 2015. DOI: 10.1038/nature14539.

164 LE, Q. V. *et al.* **Building high-level features using large scale unsupervised learning**. 2012. Disponível em: <https://arxiv.org/pdf/1112.6209.pdf>. Acesso em: 05 mar. 2021.

165 CONVOLUTIONAL NEURAL NETWORKS (CNN) SIMPLIFIED (PART 4). **YOU CANalytics**. 2019. Disponível em: <http://ucanalytics.com/blogs/convolutional-neural-networks-cnn-simplified-part-4/>. Acesso em: 03 mar. 2021.

166 NAIR, V.; HINTON, G. **Rectified linear units improve restricted Boltzmann machines**. 2010. Disponível em: <https://www.cs.toronto.edu/~fritz/absps/reluCML.pdf>. Acesso em: 12 jan. 2021.

167 CHOLLET F. *et al.* **Keras**. GitHub. 2015. Disponível em: <https://github.com/fchollet/keras>. Acesso em: 30 abr. 2020.

168 ABADI, M. *et al.* **TensorFlow: large-scale machine learning on heterogeneous system**. 2015. Disponível em: <https://www.tensorflow.org/>. Acesso em: 23 jan. 2021.

169 HE, *et al.* Deep residual learning for image recognition. In: CONFERENCE ON COMPUTER VISION AND PATTERN RECOGNITION (CVPR). 2016, Las Vegas. **Proceedings [...]**. Las Vegas: IEEE, 2016. DOI:10.1109/cvpr.2016.90.

170 RESNET50 ARCHITECTURE FOR DEEP LEARNING. **Tech inspirer**. Disponível em: https://roamerworld.blogspot.com/2019/05/resnet50-architecture-for-deep-learning_24.html. Acesso em: 15 maio 2021.

171 DE OLIVEIRA, M. R. *et al.* Efeito do NaCl sobre o crescimento, fotossíntese e relações hídricas de plantas de berinjela. **Ceres**, v. 56, n. 3, p. 296-302, 2009. Disponível em: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=305226745007>. Acesso em: 10 mar. 2021.

172 MUNNS, R. Comparative physiology of salt and water stress. **Plant Cell and Environment**, v. 25, p. 239-250, 2002. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.0016-8025.2001.00808.x>. Acesso em: 10 mar. 2021.

173 YOKOI S, BRESSAN RA & HASEGAWA PM. Salt stress tolerance of plants. **Jircas Working Report**, v. 23, p. 25-33, 2002. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000128&pid=S1806-6690201300040001500028&lng=pt. Acesso em: 10 mar. 2021.

174 FLOWERS, T. J. Improving crop salt tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 396, p. 307-319, 2004.

175 GARCIA MARINA, JAUREGUI DAMELIS. Efecto de la salinización con NaCl o Na₂SO₄ sobre la anatomía foliar en dos genotipos de caña de azúcar (*Saccharum* spp.) con tolerancia salina diferencial. **Ernstia**, v. 18, n. 1, p. 089-105, 2008. Disponível em: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0252-82742008000100006&lng=es. Acesso em: 15 mar. 2021.

176 SALOMÓN, J.; SAMUDIO, A. Efecto del estrés salino en la germinación y vigor de semillas de *Panicum maximum* jacq. variedades tanzania y mombasa. **Compendio de Ciencias Veterinarias**, v. 5, n. 2, p. 23-31, 2015. DOI: 10.18004/compend.cienc.vet.2015.05.02.23-31.

177 VIJAYAN, K. *et al.* NaCl induced morpho-biochemical and anatomical changes in mulberry (*Morus* spp.). **Plant Growth Regulation**, v. 56, p. 61, 2008. DOI: 10.1007/s10725-008-9284-5.

178 ALMEIDA FILHO, H. A. **Redes complexas em sistemas celulares e moleculares de plantas**. 2018. 119 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

179 BRAY, S.; REID, D. The effect of salinity and CO₂ enrichment on the growth and anatomy of the second trifoliate leaf of *Phaseolus vulgaris*. **Canadian Journal of Botany**, v. 80, p. 349-359, 2002.

180 SALAS, J. *et al.* Variación en el índice y densidad estomática en plantas de tomate *Lycopersicon esculentum* Mill. sometidas a tratamientos salinos. **Bioagro**, v. 13, p. 99-104, 2001. Disponível em: <https://www.redalyc.org/pdf/857/85713302.pdf>. Acesso em: 18 mai. 2021.

181 LONGSTRETH, D.; NOBEL, P. Salinity effects on leaf anatomy. **Plant Physiology**, v. 63, p. 700-703, 1979.

182 HWANG, Y.; CHEN, S. Anatomical responses in *Kandelia candel* (L.) Druce seedlings growing in the presence of different concentrations of NaCl. **Botanical**

Bulletin of Academia Sinica, v. 36, p. 181-188, 1995. Disponível em: <https://ejournal.sinica.edu.tw/bbas/content/1995/3/bot363-06.pdf>. Acesso em 30 abr. 2021.

183 ROTH, I. **Leaf structure of a Venezuelan cloud forest in relation to the microclimate**. Berlin: Gebruder Borntraeger, 1990. 244 p.

184 THUESOMBAT, P. *et al.* Effect of silver nanoparticles on rice (*Oryza sativa* L. cv. KDML 105) seed germination and seedling growth. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 104, p. 302-309, 2014. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2014.03.022.

185 ASLANI, F. *et al.* Effects of engineered nanomaterials on plants growth: an overview. **Scientific World Journal**, v. 2014, p. 28. DOI: [10.1155/2014/641759](https://doi.org/10.1155/2014/641759).

186 LOPEZ CARVAJAL, J.; BRANCH BEDOYA, J. W. Comparación de modelos de clasificación automática de patrones texturales de minerales presentes en los carbones colombianos. **Dyna**, v. 72, n. 146, p. 115-124, 2005

187 MALHOTRA, R. *et al.* Approaching Bio cellular classification for malaria infected cells using machine learning and then deep learning to compare & analyze K-nearest neighbours and deep CNNs. 2020. Disponível em: <https://arxiv.org/ftp/arxiv/papers/2005/2005.11417.pdf>. Acesso em 23 jan. 2021.

188 AHMED, J.; HUANG, S.; LI, K. Comparison of machine learning and deep learning classifiers for traffic sign image classification. **Unpublished**.

189 JAWALE, A. Comparison of image classification techniques: binary and multiclass using convolutional neural network and support vector machines. **INFOCOMP Journal of Computer Science**, v. 18, n. 2, p. 28-35, 2019.

190 HAN, S. S. *et al.* Assessment of deep neural networks for the diagnosis of benign and malignant skin neoplasms in comparison with dermatologists: A retrospective validation study. **PLoS Medicine**, v. 17, n. 11, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1003381>.