

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

Natália Bilesky José

**SÍNTESE VERDE E AVALIAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE FERRO BASEADAS
EM *Trichoderma harzianum* VISANDO APLICAÇÃO NA AGRICULTURA**

Sorocaba/SP

2020

Natália Bilesky José

**SINTESE VERDE E AVALIAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE FERRO BASEADAS
EM *Trichoderma harzianum* VISANDO APLICAÇÃO NA AGRICULTURA**

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

Orientadora: Dra. Renata de Lima

Sorocaba/SP

2020

Ficha Catalográfica

B492s Bilesky-José, Natália
Síntese verde e avaliação de nanopartículas de ferro baseadas em
Trichoderma harzianum visando aplicação na agricultura / Natália Bilesky
José. – 2020.
71f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Renata Lima
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) –
Universidade de Sorocaba, Sorocaba, SP, 2020.

1. Nanopartículas. 2. Materiais nanoestruturados. 3. *Sclerotinia* –
Controle biológico. 4. Soja – Doenças e pragas – Controle biológico. 5.
Pragas agrícolas – Controle biológico. I. Lima Renata, orient. II.
Universidade de Sorocaba. III. Título.

Natália Bilesky José

**SINTESE VERDE E AVALIAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE FERRO BASEADAS
EM *Trichoderma harzianum* VISANDO APLICAÇÃO NA AGRICULTURA**

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

Orientadora: Dra. Renata de Lima

BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dra. Renata de Lima
Universidade de Sorocaba

Marcia R. de Moura Aouada

Prof. Dra. Marcia Regina de Moura Aouada

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Faculdade de Engenharia -
Campus de Ilha Solteira



Dr. Lucas Bragança Carvalho

Instituto de Ciência e Tecnologia de Sorocaba – UNESP Campus Sorocaba

AGRADECIMENTOS

Agradeço à FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pela bolsa de mestrado (Processo nº 2017/20932-6 e nº 2017/21004-5) e apoio financeiro a esta pesquisa. As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da FAPESP.

Ao Instituto de Ciência e Tecnologia de Sorocaba (UNESP Sorocaba) e à Universidade de Sorocaba, pelo espaço e oportunidade.

À minha orientadora Renata por me apoiar e incentivar nesta etapa da minha vida. Foram bons anos de aprendizado, obrigada!

Ao professor Dr. Leonardo Fernandes Fraceto por compartilhar seus conhecimentos comigo e por lembrar de me alimentar nas viagens com comidas veganas.

Agradeço aos meus pais e meu irmão por tudo.

Aos pesquisadores Cintia Rodrigues Maruyama, Tais Germano da Costa, Mariana Guilger Casagrande, Estefânia Vangelie Ramos Campos, Lucas Bragança de Carvalho, Jhones Luiz de Oliveira, Bruno Teixeira de Sousa, Halley Caixeta De Oliveira, Renato Grillo, Hudson Wallace Pereira de Carvalho, Leonardo F. Fraceto e Renata de Lima por contribuírem em algumas etapas do meu mestrado.

RESUMO

A produção de nanomateriais aplicados a área agrícola está próximo de ser uma realidade, apresentando a possibilidade de aplicação da nova tecnologia como solução de problemas e consequente melhora no rendimento das culturas. A utilização de nanopartículas metálicas visando o controle de patógenos é recente, porém um dos problemas levantados seria em relação a sua toxicidade, tanto para o ambiente como para os organismos. Desta forma, visando menor toxicidade, existe a proposta de utilização de nanopartículas biogênicas, as quais apresentam um *capping* composto por biomoléculas provenientes do organismo redutor. As nanopartículas de ferro apresentam baixa toxicidade, o que permite sua aplicação no ambiente. O micoparasita *Trichoderma harzianum* é utilizado no controle biológico, este além do combate às pragas traz às lavouras outros benefícios como o crescimento de plantas, porém enfrenta os mesmos problemas de sensibilidade, como temperatura e radiação ultravioleta, que outras espécies utilizadas no controle de pragas. Portanto, este trabalho teve como objetivo realizar a síntese de nanopartículas de ferro (Fe^0 , $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ou $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) biogênicas utilizando o filtrado de *T. harzianum* como agente redutor e estabilizante com a finalidade de aplicação no controle da *Sclerotinia sclerotiorum*. Além da síntese, visa caracterizar as nanopartículas, avaliar sua toxicidade sobre diferentes linhagens celulares e microrganismos de importância agrícola e os seus efeitos sobre a cultura da soja. Para isto, foram sintetizadas cinco nanopartículas que apresentaram diâmetro médio entre 100 e 300 nm, índice de polidispersão entre 0,2 e 0,5 e potencial zeta positivo entre 2 e 17 mV. Das cinco nanopartículas obtidas, foi selecionada a nanopartícula que apresentou maior atividade contra o mofo branco, a NpFe-4, e a mesma foi utilizada nas avaliações seguintes. A nanopartícula selecionada apresentou, através do Espalhamento Dinâmico de Luz, diâmetro hidrodinâmico de $207,30 \pm 1,94$ nm, índice de polidispersão de $0,45 \pm 0,07$ e potencial zeta de $13,47 \pm 2,05$ mV. Em relação à atividade, foi capaz de inibir o crescimento micelial e a germinação de novos escleródios do mofo branco e acelerou o crescimento do *T. harzianum*. A nanopartícula não apresentou citotoxicidade nas linhagens celulares testadas, no entanto induziu baixa genotoxicidade em fibroblastos (3T3 e V79) em maiores concentrações. Também não causou redução do índice de germinação das sementes avaliadas, levando a poucas alterações nas plantas de soja, também não afetou as bactérias de importância agrícola (*Bacillus thuringiensis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bradyrhizobium japonicum*) e o fungo *Beauveria bassiana*, assim como as bactérias envolvidas no ciclo do nitrogênio. Este trabalho traz bons resultados em relação ao potencial das nanopartículas biogênicas de óxido de ferro para o controle de pragas na agricultura, sendo uma possível promessa para contribuir com o controle biológico.

Palavras-chave: Nanopartícula biogênica de óxido ferro. Controle biológico. Toxicidade. *Sclerotinia sclerotiorum*. Microbiota do solo.

ABSTRACT

The production of nanomaterials applied to the agricultural area is a reality and brings possibilities of application of the new technology as a promise for the problems solution and consequent better crop yield. The use of metallic nanoparticles for pathogen control is recent and one of the problems raised would be regarding its toxicity to both the environment and organisms. Thus, aiming at lower toxicity, it is proposed the use biogenic nanoparticles, which have a capping composed of biomolecules from the reducing organism. Iron nanoparticles have low toxicity, which allows their application in the environment and the mycoparasite *Trichoderma harzianum* is used in biological control that along with pest control it brings other benefits to crops, but this one faces the same sensitivity problems as other species used in pest control. This work aimed to perform the synthesis of biogenic iron nanoparticles (Fe^0 , $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ or $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) using *T. harzianum* filtrate as a reducing and stabilizing agent with the purpose of *Sclerotinia sclerotiorum* control. In addition to the synthesis, it aims to characterize the nanoparticles, evaluate their toxicity on different cell lines and microorganisms of agricultural importance and their effects on soybean crop. The five initially synthesized nanoparticles had an average diameter between 100 and 300 nm, a polydispersion index between 0.2 and 0.5 and a positive zeta potential between 2 and 17 mV. From the five nanoparticles obtained it was selected the one that showed the highest activity against white mold, NpFe-4, and it was used in the following tests. The selected nanoparticle showed, through Dynamic Light Scattering, a hydrodynamic diameter of 207.30 ± 1.94 nm, a polydispersion index of 0.45 ± 0.07 and a zeta potential of 13.47 ± 2.05 mV. Regarding its activity, it was capable of inhibiting mycelial growth and germination of new white mold sclerotia, accelerated *T. harzianum* growth. The nanoparticle did not show cytotoxicity in the tested cell lines, but induced low genotoxicity in fibroblasts (3T3 and V79) at higher nanoparticle concentrations. It caused no reduction in the germination index of the evaluated seeds, caused few changes in soybean plants and did not affect bacteria of agricultural importance (*Bacillus thuringiensis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bradyrhizobium japonicum*) and the fungus *Beauveria bassiana* such as soil microbiota involved in the nitrogen cycle. This work provides good results regarding the potential of biogenic iron oxide nanoparticles for pest control.

Key words: Biogenic iron oxide nanoparticle. Biological control. Toxicity. *Sclerotinia sclerotiorum*. Soil microbiota.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	7
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	8
2.1	Nanomateriais e sua aplicação agrícola	8
2.2	Nanomateriais metálicos para utilização na área agrícola	8
2.3	Síntese verde de nanopartículas para aplicação agrícola.....	9
2.4	Síntese verde de nanopartículas de ferro utilizando metabólitos de <i>T. harzianum</i> para aplicação agrícola.....	10
3	OBJETIVOS.....	13
3.1	Objetivo geral	13
3.2	Objetivos específicos.....	13
4	ETAPAS DO DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO	14
4.1	Obtenção do filtrado de <i>T. harzianum</i>	14
4.2	Síntese das nanopartículas	14
4.3	Caracterização das nanopartículas	15
4.4	Atividade biológica	16
4.5	Síntese e caracterização da nanopartícula com estímulo	17
4.6	Atividade biológica	18
5	RESULTADOS	19
5.1	Artigo I - (<i>envio para ACS Sustainable Chemistry & Engineering</i>)	20
5.2	Artigo II.....	50
6	CONCLUSÕES GERAIS.....	65
7	REFERÊNCIAS.....	66

1 INTRODUÇÃO

Com o intuito de se alcançar uma maior produtividade, atividades antrópicas como o uso de agrotóxicos e fertilizantes estão se tornando cada vez mais comuns, porém este manejo pode estar afetando o ambiente de maneira negativa (LEONG et al., 2020; MUTURI et al., 2017).

Entre as diferentes tecnologias utilizadas para facilitar o manejo e obtenção de resultados favoráveis, a nanotecnologia vem apresentando destaque como uma alternativa aos problemas na agricultura, como controle de pragas, doenças em plantas e fertilização de solos (GUILGER et al., 2017; RALIYA et al., 2015). No entanto, as nanopartículas podem oferecer consequências indesejadas, uma vez que, em diferentes condições podem ter suas características físico-químicas alteradas, e isso pode ter como consequência um aumento da sua toxicidade. Também é comum a ocorrência de agregação de nanopartículas em contato com o solo, esses agregados podem se ligar às raízes das plantas e inibir a absorção de nutrientes, prejudicando seu desenvolvimento (ARIF et al., 2016; CHEKLI et al., 2013).

A síntese biogênica possibilita a produção de nanopartículas com revestimento, sem a utilização de produtos químicos que seriam liberados para o ambiente, outro fator positivo é o baixo custo de produção. Este revestimento denominado *capping* pode ser obtido através de diversos agentes como por exemplo, extratos de plantas, bactérias ou fungos, e é capaz de melhorar a estabilidade das nanopartículas (SINGH et al., 2016). As nanopartículas biogênicas apresentam também diferenças na sua atividade, pois possibilita a sinergia entre o precursor escolhido e os metabólitos provenientes do agente redutor.

O fungo *Trichoderma* spp. apresenta resultados promissores na síntese de nanopartículas biogênicas (GUILGER-CASAGRANDE et al., 2019), ele também é amplamente utilizado no controle biológico e é capaz de estimular o crescimento de plantas, no entanto são sensíveis à fatores abióticos como a incidência de raios ultravioleta (UV) (BETTIOL, 2009).

Visando a obtenção de nanopartículas que apresentem o potencial de controle biológico semelhante ao do *T. harzianum* e que apresentem boa estabilidade nas condições ambientais, este trabalho propôs a síntese e avaliação de nanopartículas biogênicas a partir de *T. harzianum* utilizando o cloreto de ferro III como precursor, uma vez que as nanopartículas de ferro apresentam baixa toxicidade para organismos e são utilizadas em tratamentos ambientais (PLACHTOVÁ et al., 2018; TRUSKEWYCZ; SHUKLA; BALL, 2018).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Nanomateriais e sua aplicação agrícola

A nanotecnologia é reconhecida pela Comissão Europeia como uma das seis tecnologias essenciais consideradas promissoras para o desenvolvimento de inovações em todo o setor industrial de forma ambiental e socialmente sustentável (EUROPEAN COMMISSION, 2012). As perspectivas futuras para a nanotecnologia são interessantes, uma vez que, as aplicações desse novo campo da ciência estão em constante expansão. Entretanto, são necessários novos estudos que identifiquem e possibilitem previsões das possíveis consequências da nanotecnologia para os seres vivos e para o ambiente (LOWRY et al., 2010; MELO; PIMENTA, 2010). Uma vez que, este aumento de novos produtos é inevitável, é de se esperar que além dos resíduos das aplicações agrícolas o ambiente também receba nanocompostos que serão liberados devido ao grande uso, e estes podem causar efeitos adversos a microbiota do solo (KELLER et al., 2013; WHITELEY et al., 2013; WIESNER et al., 2011).

A importância principal do nanomaterial é sua elevada taxa de superfície/volume e consequente alta reatividade, podendo ser uma alternativa para muitos problemas enfrentados pela agricultura na atualidade, como incidência de pragas e combate de doenças em plantas (NAIR; KUMAR, 2013). Logo, com a intenção de aumento da produtividade agrícola a nanotecnologia torna-se uma opção nesta área, sendo utilizada como uma alternativa no controle de patógenos e fertilização de solos. Entre as nanopartículas metálicas e de óxidos metálicos, as mais utilizadas, são as de prata, seguida por cobre, titânio e ferro (DIMKPA, 2014). As nanopartículas de prata possuem como principal característica a atividade antimicrobiana (GUILGER et al., 2017; LOO et al., 2015; OKAFOR et al., 2013), as nanopartículas de titânio, o poder de fotoproteção e desenvolvimento de plantas (POŠĆIĆ et al., 2016; ZHENG et al., 2005) e as nanopartículas de ferro e cobre oferecem ação positiva para o crescimento vegetal (WANG et al., 2011; ZUVERZA-MENA et al., 2017). No entanto, sua aplicação deve ser investigada em relação ao seu comportamento no ambiente, visando a sustentabilidade agrícola.

2.2 Nanomateriais metálicos para utilização na área agrícola

Estudos com diferentes nanopartículas metálicas mostraram um aumento na

disponibilidade de nutrientes para as plantas, podendo contribuir para o melhor desenvolvimento e, conseqüentemente, melhor rendimento das culturas (FRACETO et al., 2016; KHOT et al., 2012; MAHMOODZADEH et al., 2013; MORTEZA et al., 2013). Entretanto, este assunto deve ser visto com cautela, uma vez que, existe forte dependência de características físico-químicas das nanopartículas e sua ação em plantas (LAMBREVA et al., 2015). Estudos mostraram que as nanopartículas metálicas foram encontradas em raízes das plantas distribuídas nos diferentes tecidos, como epiderme, córtex, floema e endoderme. Como exemplo, as nanopartículas de titânio podem penetrar nas células vegetais não sendo biotransformadas nos tecidos e exsudadas de forma intacta (ASLI; NEUMANN, 2009; SERVIN et al., 2013) e nanopartículas de ferro também foram observadas em raízes, caules e folhas em condições hidropônicas, o mesmo não foi observado quando estas foram cultivadas em solos (ZHU et al., 2008).

De acordo com Arif et al. (2016), estudos futuros de nanotecnologia aplicada a agricultura devem considerar avaliação de risco e a sustentabilidade agrícola, tendo como foco principal a diversidade de aplicação, disponibilidade de micro/macronutrientes e avaliação de microrganismos. Esta nova tecnologia deve vir acompanhada de novos pensamentos que visam a sustentabilidade agrícola e um ambiente livre de riscos futuros. Contudo, no ambiente, as nanopartículas metálicas que não possuem revestimento tendem a agregar entre si formando aglomerados que se ligam às raízes das plantas, reduzindo a passagem de macronutrientes, como cálcio, potássio e magnésio, prejudicando o seu desenvolvimento (ZUVERZA-MENA et al., 2016). Desta forma, uma das soluções apontadas para minimizar este efeito é a utilização de nanopartículas revestidas, ou nanopartículas biogênicas, as quais possuem um *capping*, geralmente proteico.

2.3 Síntese verde de nanopartículas para aplicação agrícola

A utilização de nanopartículas metálicas de síntese biogênica para aplicação na área agrícola apresentam resultados promissores, como por exemplo, a síntese de nanopartículas biogênicas de prata baseadas em *Trichoderma harzianum* que se mostraram eficientes no controle do mofo branco (GUILGER et al., 2017; GUILGER-CASAGRANDE et al., 2019) e a utilização de nanopartículas biogênicas de titânio baseadas em *Aspergillus flavus*, onde observou-se um aumento no crescimento de ervilhas, mostrando-se efetivas como fertilizantes (RALIYA et al., 2015). Mohamed et al. (2015) relataram atividade antibacteriana de nanopartículas biogênicas de ferro baseadas em *Alternaria alternata* sobre

bactérias gram-positivas e gram-negativas, principalmente em *Bacillus subtilis*.

A síntese biogênica utilizando organismos vivos mostrou ser eficaz e possibilita a sinergia dos benefícios das nanopartículas metálicas e do extrato ou metabólitos utilizados para sua redução, como biomassa, sobrenadantes ou derivados, além de agirem como redutores na síntese, proporcionam recobrimento para a nanopartícula. Outras vantagens da síntese verde são a ausência de liberação de produtos tóxicos e contaminantes químicos no ambiente e o baixo custo. Através da síntese biogênica é possível a obtenção de nanopartículas com características mais eficientes, como maior estabilidade físico-química, facilidade de produção em larga escala e atividade fúngica melhorada (GUILGER et al., 2017; SINGH et al., 2016).

2.4 Síntese verde de nanopartículas de ferro utilizando metabólitos de *T. harzianum* para aplicação agrícola

Entre os redutores mais utilizados na síntese de nanopartículas biogênicas, os fungos são agentes promissores por apresentarem maior quantidade de secreção de enzimas, crescimento micelial acelerado e fácil manipulação.

O *T. harzianum* é um fungo filamentososo de grande importância biotecnológica, pois, além de apresentar desenvolvimento elevado em condições mínimas, é amplamente utilizado no controle biológico de fitopatógenos, por apresentar resultados satisfatórios na síntese de nanopartículas biogênicas (AHLUWALIA et al., 2014; GUILGER et al., 2017; SINGH; RAJA, 2011). A ação desse agente antagonista se dá por meio de mecanismos de defesa químicos e enzimáticos (VINALE et al., 2009). Além dessa ação principal, o contato entre *Trichoderma* spp. e plantas, intensifica a proliferação de raízes, estimula o crescimento e protege as plantas contra agentes químicos (SCHUSTER; SCHMOLL, 2010). Sua ação como controle biológico de fitopatógenos e indutor de crescimento de plantas ocorre por meio de parasitismo, antibiose, competição, indução de resistência à doenças e liberação de hormônios de crescimento (MACHADO; SILVA, 2013).

T. harzianum apresenta moléculas peptaibol e enzimas hidrolíticas que inibem o crescimento de fungos fitopatogênicos (SCHIRMBÖCK, 1994), liberando metabólitos voláteis e não voláteis com ação inibitória sobre o crescimento micelial dos mesmos (KHALILI et al., 2012). Também estimula os mecanismos de defesa da planta parasitada, induzindo a produção de compostos bioquímicos e estruturais (YEDIDIA; BENHAMOU;

CHET, 1999) e, por meio do contato com folhas, raízes e solo, promove o desenvolvimento de resistência local ou sistêmica (GVEROSKA; ZIBEROSKI, 2012).

Os efeitos antagônicos de *T. harzianum* vêm sendo comprovados contra diversos fitopatógenos, tais como: *Sclerotinia sclerotiorum* (ZANCAN et al., 2012), *A. alternata* (GVEROSKA; ZIBEROSKI, 2012), *Rhizopus stolonifer* (BOMFIM et al., 2010), *Bipolaris* sp., *Cladosporium* sp. e *Phoma* sp. (MACHADO; SILVA, 2013). Tal efetividade torna esse fungo um agente de controle biológico promissor a ser aplicado na agricultura (SAITO et al., 2009).

As nanopartículas de ferro (Fe-NP) possuem como ponto positivo a sua baixa toxicidade para os organismos, o que permite sua aplicação no ambiente, sendo uma de suas principais utilizações o tratamento de poluentes de água e solos (XU et al., 2014). Como o ferro é um micronutriente essencial para todas as plantas, a aplicação destas nanopartículas na agricultura pode induzir o crescimento de plantas e aumentar os seus níveis de carboidratos, proteínas e clorofila (BURKE et al., 2015; WANG et al., 2016).

Poucos estudos existem em relação a síntese biogênica de nanopartículas de ferro, de acordo com Siddiqi et al. (2016) estudos sintetizaram nanopartículas de ferro biogênica utilizando chá verde, eucalipto, banana, tangerina, *Trindax procumbers*, entre outras. Eles obtiveram nanopartículas de diferentes diâmetros, sendo este tamanho dependente do pH no momento da síntese.

Entre as diferentes sínteses de Fe-NP já realizadas, estão as sintetizadas por Ehrampoush et al. (2015) que obtiveram Fe-NP a partir de extrato de tangerina, apresentando tamanho de 200 nm com extrato menos concentrado e 50 nm com extrato mais concentrado, observando que a concentração do agente redutor interfere no tamanho e, conseqüentemente, na morfologia das nanopartículas, onde também foi observado a eficiência da remoção de cádmio da água através das nanopartículas.

Tarafdar e Raliya (2013), utilizando o fungo *Aspergillus oryzae*, obtiveram nanopartículas de até 24,6 nm com possíveis aplicações na agricultura, biomedicina e engenharia. A aplicação na agricultura também foi constatada segundo Ealias, José e Saravanakumar (2016) com nanopartículas baseadas em canela (*Cinnamomum tamala*) utilizadas também no tratamento de água.

Podemos notar que diferentes redutores e estabilizantes influenciam na formação das Fe-NP. Mahdavi et al. (2013) obtiveram nanopartículas de ferro com 18 ± 4 nm a partir de

algas marrons (*Sargassum muticum*) possuindo grupos hidroxil, sulfato e aldeído como redutores. Harshiny, Iswarya e Matheswaran (2015) sintetizaram nanopartículas entre 43 e 220 nm a partir de *Amaranthus dubius*, a qual possui como redutores a amarantina e compostos fenólicos. Polifenóis de diferentes extratos, como de *Terminalia chebula*, alecrim, eucalipto, malaleuca e sorgo também resultaram em diferentes nanopartículas (KUMAR et al., 2013; NJAGI et al., 2011; WANG; FANG; MEGHARAJ, 2014). Entretanto, todas as Fe-NP não apresentaram liberação de produtos tóxicos, e algumas nanopartículas foram capazes de remover poluentes (EALIAS; JOSE; SARAVANAKUMAR, 2016; MACHADO et al., 2013), assim como mostraram potencial antimicrobiano contra patógenos humanos (DANIEL et al., 2012).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Esta dissertação teve como principal objetivo sintetizar de forma biogênica nanopartículas de ferro utilizando como agente redutor e estabilizante o *T. harzianum* sob diferentes condições para o controle de pragas na agricultura. Em seguida, realizar a avaliação das características físico-químicas das nanopartículas sintetizadas, sua atividade sobre o fungo fitopatogênico *S. sclerotiorum* e toxicidade em células vegetais e animais.

3.2 Objetivos específicos

- Sintetizar nanopartículas biogênicas de ferro (Fe^0 , $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ou $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) utilizando como agente redutor e estabilizante o filtrado do fungo *T. harzianum* em contato ou não com a parede celular do fungo fitopatogênico *S. sclerotiorum*;
- Caracterizar as nanopartículas para definição de distribuição de tamanho e índice de polidispersão a partir da técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS), potencial zeta a partir de Microeletroforese, concentração a partir de Rastreamento de Nanopartículas (NTA) e morfologia a partir, de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV);
- Avaliar a citotoxicidade das nanopartículas sobre células animais por meio do ensaio de viabilidade indireta através de avaliação da atividade mitocondrial e lisossomal (MTT e Vermelho Neutro, respectivamente) e viabilidade direta através do ensaio por Exclusão de Azul de Tripán;
- Avaliar a genotoxicidade das nanopartículas utilizando as linhagens celulares 3T3, HaCat e V79 por meio do ensaio cometa e células vegetais por meio do ensaio *Allium cepa*;
- Avaliar os efeitos das nanopartículas sobre a microbiota do solo pela técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR Real Time) utilizando *primers* específicos de bactérias que participam do ciclo do nitrogênio;
- Avaliar a efetividade das nanopartículas no controle do mofo branco (*S. sclerotiorum*) utilizando testes *in vitro*;
- Avaliar a resposta de microrganismos de interesse agrícola (*Bacillus thuringiensis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bradyrhizobium japonicum* e *Beauveria bassiana*) na presença das nanopartículas sintetizadas utilizando o teste de concentração inibitória mínima (MIC);
- Avaliar o efeito das nanopartículas sobre a germinação e crescimento de plantas;

4 ETAPAS DO DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

Os resultados deste trabalho são apresentados em forma de 2 artigos, porém foram realizadas análises iniciais para obtenção da nanopartícula que seria utilizada em todo o trabalho proposto.

Para isto, foram realizados 5 diferentes métodos de síntese de nanopartículas de ferro (Fe^0 , $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ou $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) biogênicas a partir do filtrado contendo enzimas produzidas pelo *T. harzianum* e os resultados de caracterização e atividade biológica foram avaliados. Após a avaliação das características físico-químicas e da atividade contra o fitopatógeno *S. sclerotiorum*, a nanopartícula que apresentou melhor desempenho foi também sintetizada utilizando o filtrado estimulado pela parede celular do *S. sclerotiorum*.

4.1 Obtenção do filtrado de *T. harzianum*

Para a obtenção do filtrado, foi realizada uma cultura de *T. harzianum*, a partir do produto comercial Ecotrich WP (Balagro), na formulação pó molhável 1×10^{10} UFC/g. Para isso, foram preparadas placas contendo meio ágar batata-dextrose (BDA) e 1 mL de suspensão de *T. harzianum* na concentração de 200 mg/mL, após o período de 6 dias foram transferidos dois discos de micélio de 6 mm da placa para 75 mL de caldo batata-dextrose. As culturas foram mantidas ao abrigo da luz, em agitação a 150 rpm por 12 dias. Ao final dos 12 dias, foi realizado o isolamento da biomassa por filtragem, onde estas foram pesadas e transferidas para um volume de água ultrapura dez vezes maior que a massa obtida. O filtrado permaneceu em agitação nas mesmas condições anteriores por 72 horas, após este período o material foi filtrado a vácuo. Posteriormente, o material seco foi descartado e o material aquoso foi utilizado na síntese das nanopartículas (GUILGER et al., 2017).

4.2 Síntese das nanopartículas

Para a síntese das diferentes nanopartículas de ferro foram utilizados três diferentes precursores: $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, os quais foram adicionados ao conteúdo enzimático (material aquoso) de *T. harzianum* em diferentes concentrações. As nanopartículas foram sintetizadas utilizando 5 métodos diferentes (Quadro 1).

Quadro 1 – Descrição das diferentes concentrações e sais utilizados para a síntese de nanopartículas biogênicas de ferro.

Nanopartículas	Base para síntese	Referência
NpFe-1	FeCl ₃ .6H ₂ O (0,03M) + FeSO ₄ .7H ₂ O (0,03M) no filtrado	HOAG et al., 2009
NpFe-2	FeCl ₃ .6H ₂ O 0,1M, proporção 1:1 do filtrado	MAHDAVI et al., 2013
NpFe-3	FeCl ₃ (0,07M) + FeCl ₂ .4H ₂ O (0,02M) no filtrado	EHRAMPOUSH et al., 2015
NpFe-4	FeCl ₃ (0,001M) no filtrado	MOHAMED et al., 2015
NpFe-5	FeCl ₂ (0,2 M) e FeCl ₃ (0,1 M) no filtrado	DURÁN et al., 2007 modificado

Para a síntese das nanopartículas biogênicas de ferro, os sais foram pesados de acordo com a descrição do quadro 1 e adicionados diretamente ao filtrado. Para a NpFe-2, uma solução de ferro a 0,1 M foi preparada e adicionada ao filtrado na mesma proporção. Todas as soluções foram mantidas a 150 rpm e temperatura ambiente (25 °C) por 72h após a adição do precursor.

4.3 Caracterização das nanopartículas

A fim de se caracterizar as nanopartículas, foram realizadas análises pelas técnicas de DLS (Espalhamento Dinâmico de Luz), microeletroforese e NTA (Rastreamento de Nanopartículas) obtendo assim, medidas de distribuição de tamanho, índice de polidispersão (PDI), potencial zeta e concentração de cada nanopartícula. Os resultados podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1- Caracterização físico-química das nanopartículas biogênicas de óxido de ferro.

NPs	DLS			NTA		pH
	Diâmetro hidrodinâmico (nm)	Índice de Polidispersão	Potencial zeta (mV)	Tamanho (nm)	Concentração (NP/mL)	
NpFe-1	102,5 ± 1,7	0,3 ± 0,1	15,57 ± 0,1	166,6 ± 5,5	2,4 x 10 ¹⁰	1,9
NpFe-2	199,2 ± 16,3	0,5 ± 0,0	12,32 ± 6,3	183,4 ± 8,2	8,2 x 10 ⁹	1,8
NpFe-3	157,7 ± 0,8	0,2 ± 0,0	27,77 ± 0,9	225,6 ± 6,2	4,4 x 10 ¹¹	1,7
NpFe-4	207,3 ± 1,9	0,4 ± 0,1	13,47 ± 2,1	304,0 ± 8,3	1,9 x 10 ¹⁰	5,0
NpFe-5	200,9 ± 27,9	0,5 ± 0,0	4,02 ± 1,0	237,0 ± 16,1	1,8 x 10 ¹⁰	1,4

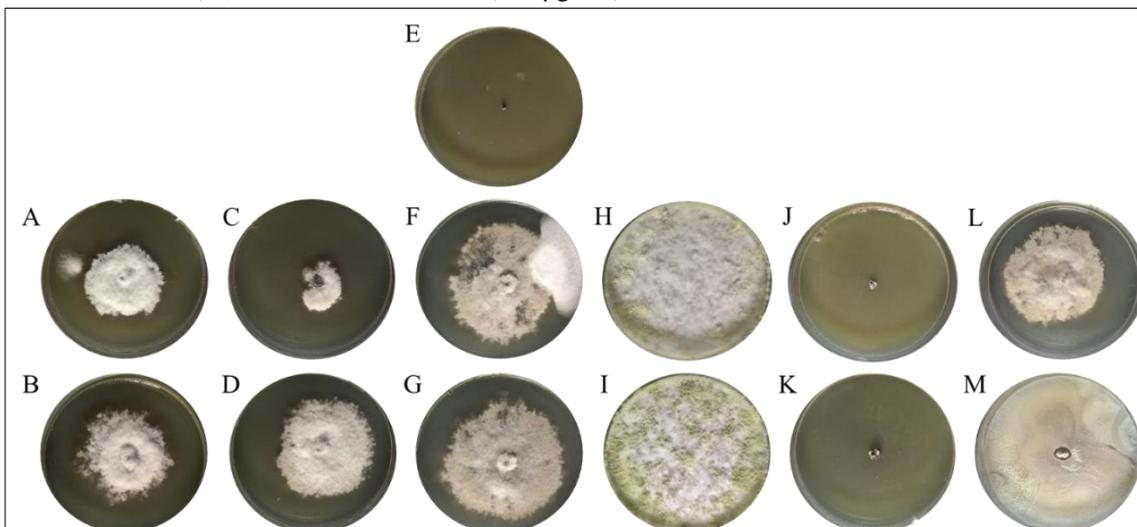
As nanopartículas apresentaram diferentes tamanhos, os quais podem estar relacionados com os diferentes precursores. Em relação à polidispersão, a NpFe-3 apresentou o menor índice (0,2), o qual indica menor variação de tamanho entre as nanopartículas. Quanto ao potencial zeta, carga formada na interface entre as nanopartículas e o meio de dispersão, todas as amostras apresentaram valores positivos, a NpFe-5 apresentou o menor valor de potencial zeta. Em relação ao pH das dispersões contendo as nanopartículas em geral, apresentaram pH inferior a 5,0, sendo consideradas ácidas.

4.4 Atividade biológica

Para determinar o potencial das nanopartículas no controle do mofo branco, foram preparadas placas de Petri contendo meio de cultura BDA suplementado com as cinco dispersões de nanopartículas sem estímulo nas concentrações $8,2 \times 10^8$ NP/mL, $1,3 \times 10^9$ NP/mL e a NpFe-3 foi testada ainda na concentração $3,3 \times 10^{10}$ NP/mL, concentrações que foram determinadas a partir das soluções estoque. Foram preparados também controles contendo apenas BDA e BDA inoculado com *T. harzianum* a $127 \mu\text{g/mL}$, concentração utilizada na lavoura. Após a solidificação do ágar foi colocado um escleródio viável no centro de cada placa, a cultura foi então incubada em temperatura ambiente (25°C), com fotoperíodo de 12 horas, por 7 dias.

De acordo com os resultados da avaliação, as nanopartículas NpFe-1 (Figura 1A e 1B) e 2 (Figura 1C e 1D) não conseguiram inibir o crescimento do mofo branco, e a NpFe-3 inibiu o mofo apenas na maior concentração ($3,3 \times 10^{10}$ NP/mL) (Figura 1E). A NpFe-5 inibiu completamente o crescimento do mofo branco (Figura 1J e 1K), no entanto inibe também o crescimento de *T. harzianum* (teste realizado com todas as nanopartículas e não mostrado aqui).

Figura 1 - Resultados do ensaio de avaliação do potencial inibitório das nanopartículas. (A) NpFe-1 a $1,3 \times 10^9$ NP/mL; (B) NpFe-1 a $8,2 \times 10^8$ NP/mL; (C) NpFe-2 a $1,3 \times 10^9$ NP/mL; (D) NpFe-2 a $8,2 \times 10^8$ NP/mL; (E) NpFe-3 a $3,3 \times 10^{10}$ NP/mL; (F) NpFe-3 a $1,3 \times 10^9$ NP/mL; (G) NpFe-3 a $8,2 \times 10^8$ NP/mL; (H) NpFe-4 a $1,3 \times 10^9$ NP/mL; (I) NpFe-4 a $8,2 \times 10^8$ NP/mL; (J) NpFe-5 a $1,3 \times 10^9$ NP/mL; (K) NpFe-5 a $8,2 \times 10^8$ NP/mL; (L) controle *S. sclerotiorum* e (M) controle *T. harzianum* ($127 \mu\text{g/mL}$).



A nanopartícula NpFe-4 apresentou potencial para o controle do crescimento micelial e da formação de novos escleródios, assim como também apresentou crescimento de *T. harzianum* remanescente do processo de síntese (Figura 1H e 1I). Desta maneira, esta nanopartícula foi selecionada para dar continuidade ao trabalho, pois além de mostrar atividade apresenta compatibilidade com o crescimento de *T. harzianum* e carrega consigo

conídios viáveis. Após esta seleção, a nanopartícula NpFe-4 foi sintetizada utilizando o filtrado estimulado pela parede celular do *S. sclerotiorum*. Uma das possibilidades de melhor desempenho pode estar relacionada com o pH apresentado pela NpFe-4 (pH 5). Uma vez que, o trabalho visa a produção de nanopartícula em larga escala acreditamos ser melhor não interferir no pH de síntese, para que futuramente em produção em larga escala não exista a necessidade de ajustes.

4.5 Síntese e caracterização da nanopartícula com estímulo

Para o preparo do filtrado com estímulo, o preparo foi o mesmo realizado com as nanopartículas sem estímulo, com a diferença que o caldo batata dextrose foi suplementado com 0,5% de parede celular do fitopatógeno (GERALDINE et al., 2013). A parede celular de *S. sclerotiorum* foi inicialmente preparada com base em Mitchell e Taylor (1969), onde o *S. sclerotiorum* foi cultivado em BDA por 7 dias à 25 °C, com fotoperíodo de 12 horas. Em seguida, dez discos de micélio (10 mm) foram transferidos para meio líquido MYG (extrato de malte 0,5%, extrato de levedura 0,25% e glicose 1%) e a cultura foi conduzida a 180 rpm, 25 °C, por 7 dias. O micélio foi filtrado, autoclavado e posteriormente liofilizado para a obtenção da parede celular. O liofilizado foi macerado e a cada 1g de pó adicionou se 200 mL de água, sendo esta solução centrifugada a 12.000 x g, por 15 minutos e o sobrenadante avaliado quanto à presença de proteína. Este procedimento de lavagem do micélio liofilizado por centrifugação e verificação de presença de proteína do sobrenadante foi realizado por diversas vezes, até ausência total de proteínas no sobrenadante. A verificação proteica foi avaliada pelo método de Bradford (1976). Após constatação de ausência total de proteína, o material restante (parede celular) foi novamente liofilizado. Após a obtenção do filtrado, foi realizada a síntese da nanopartícula e sua caracterização, os resultados da caracterização da NpFe-4 com estímulo são mostrados na Tabela 2.

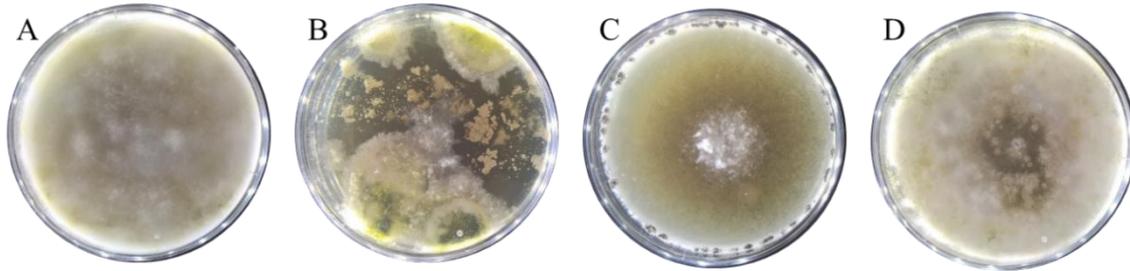
Tabela 2- Caracterização físico-química das nanopartículas biogênicas de óxido de ferro com estímulo.

NPs	DLS			NTA		pH
	Diâmetro hidrodinâmico (nm)	Índice de Polidispersão	Potencial zeta (mV)	Tamanho (nm)	Concentração (NP/mL)	
NpFe-4 c/estímulo	365,4 ± 11,4	0,6 ± 0,0	10,3 ± 2,1	253,4 ± 8,9	1,2 x 10 ⁹	3,6

4.6 Atividade biológica

A NpFe-4 com estímulo também apresentou potencial para atividade do controle do crescimento micelial e da formação de novos escleródios do mofo branco, sendo as respostas semelhantes as obtidas em relação a nanopartícula sintetizada sem estímulo (Figura 2).

Figura 2 - Resultados do ensaio de avaliação do potencial inibitório das nanopartículas. (A) NpFe-4 sem estímulo a $5,0 \cdot 10^7$ NP/mL; (B) NpFe-4 com estímulo a $5,0 \cdot 10^7$ NP/mL; (C) controle *S. sclerotiorum* e (D) controle *T. harzianum* ($127 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$).



No teste de atividade das nanopartículas com estímulo também foi observado o crescimento de *T. harzianum*, embora em uma intensidade inferior ao observado nas NpFe-4 sem estímulo, indicando o comportamento de permanência de esporos durante a síntese. O pH próximo ao neutro das NpFe-4 sem estímulo pode ter permitido o seu melhor crescimento, uma vez que as NpFe-4 com estímulo apresentam um pH menor. De acordo com Melo (1991), o fungo *T. harzianum* acaba apresentando uma maior atividade em solo com pH igual a 6,5.

Devido a atividade equivalente e considerando-se a praticidade de síntese da nanopartícula sem estímulo (NpFe-4) os testes seguintes foram realizados apenas com esta nanopartícula.

5 RESULTADOS

Artigo I – *Trichoderma harzianum* as promoter to the synthesis of iron oxide nanoparticles and its potential applications in plant diseases

Este artigo contém os resultados da avaliação das características físico-químicas, concentração de nanopartículas, cinética de liberação, atividade biológica, atividade enzimática e toxicidade da nanopartícula biogênica de ferro selecionada. Este capítulo será submetido para a revista científica ACS Sustainable Chemistry & Engineering;

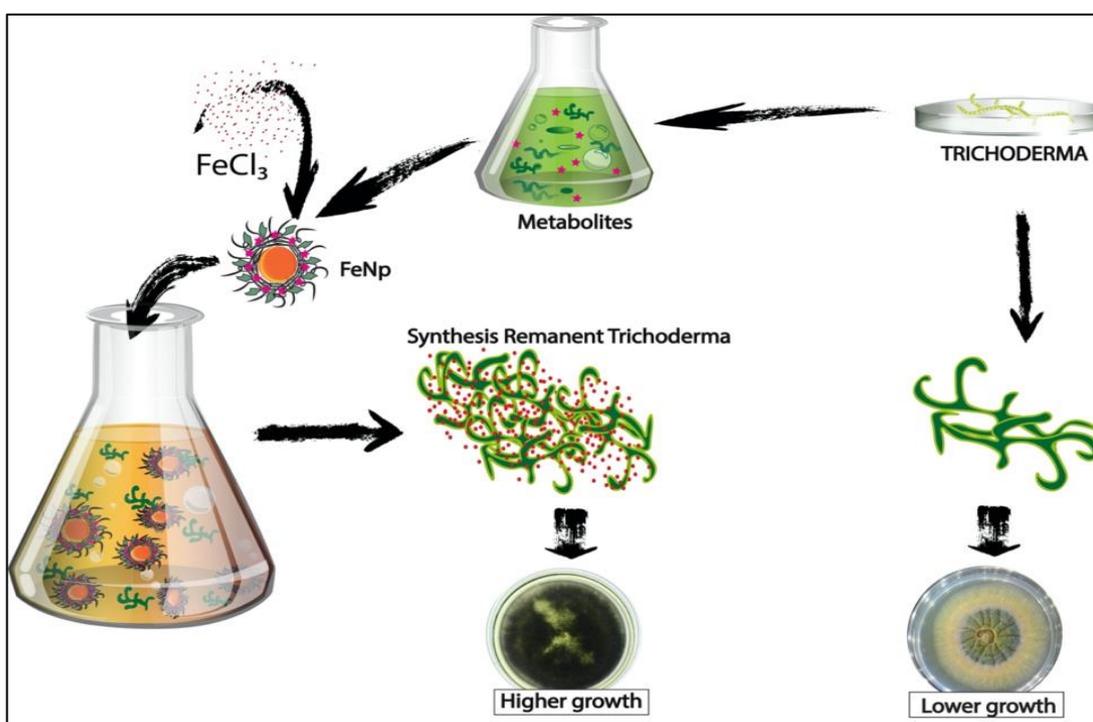
Artigo II – Study of the effects of fungi biogenic iron nanoparticles in plants and soil microbiota

Este artigo é composto pela avaliação da toxicidade das nanopartículas biogênicas de óxido de ferro em plantas de soja, avaliação da concentração inibitória mínima em microrganismos de interesse agrícola e dos efeitos sobre a microbiota do solo. Este capítulo também será submetido em revista científica a ser definida.

5.1 Artigo I - (envio para ACS Sustainable Chemistry & Engineering)

Trichoderma harzianum as promoter to the synthesis of iron oxide nanoparticles and its potential applications in plant diseases

Graphical abstract



Resumo

A síntese biogênica de nanopartículas metálicas pode ser uma opção para solucionar problemas em relação a pragas ou fertilização do solo. Entre os diferentes tipos de nanopartículas metálicas, as nanopartículas de ferro têm apresentado bons resultados, principalmente em relação as questões que envolvem toxicidade, pois trata-se de um micronutriente essencial para todas as plantas, podendo induzir seu crescimento e aumentar os seus níveis de carboidratos, proteínas e clorofila. Este estudo realizou a síntese biológica de nanopartículas de óxido de ferro utilizando como agente redutor o agente de controle biológico *Trichoderma harzianum*. As características físico-químicas das nanopartículas foram avaliadas por meio das técnicas de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Rastreamento de Nanopartículas (NTA), a viabilidade celular foi avaliada utilizando as linhagens celulares V79 (Fibroblasto pulmonar de hamster chinês), HaCaT (Queratinócito humano) e 3T3 (Fibroblasto embrionário de *Swiss* albino) utilizando testes indiretos de atividade mitocondrial e lisossomal, MTT, vermelho neutro, respectivamente e viabilidade direta por azul de tripan. A genotoxicidade foi avaliada através do teste cometa e o teste de *Allium cepa*. Foi também avaliada a atividade biológica das nanopartículas contra o patógeno *Sclerotinia sclerotiorum* (mofo branco) utilizando teste de antagonismo e o efeito das nanopartículas sobre a germinação de sementes de feijão, lentilha e tomate. Os resultados mostraram que as nanopartículas apresentaram diâmetro de 207 ± 2 nm, índice de polidispersão de $0,45 \pm 0,07$ e potencial zeta de 13 ± 2 mV. As nanopartículas biogênicas de óxido de ferro não provocaram alteração na viabilidade celular quando comparadas com células controle e não apresentaram genotoxicidade na concentração de atividade. Além disso, foram capazes de inibir o surgimento de novos escleródios e não afetaram a germinação das sementes testadas. Neste contexto, a síntese biogênica de nanopartículas de óxido de ferro a base de *T. harzianum* se demonstrou adequada para uso no controle de pragas em especial para agricultura mais sustentável.

Introdução

Os métodos de síntese de nanopartículas metálicas podem ser físicos, químicos e biológicos (ALI et al., 2016), sendo que o método biológico se destaca pelo fato de utilizar substâncias biológicas, como extratos de plantas ou metabólitos de bactérias e fungos, em substituição aos reagentes químicos, não ocorrendo a liberação de resíduos tóxicos e o produto final é mais compatível com sistemas biológicos, sendo a síntese considerada sustentável.

As nanopartículas biogênicas metálicas apresentam grande potencial na agricultura, no controle de pragas e como fertilizante, como exemplo, alguns estudos já demonstraram resultados promissores, como nanopartículas de prata sintetizadas a partir de *Aspergillus versicolor* (ELGORBAN et al., 2016) e a partir de *Trichoderma harzianum* (GUILGER-CASAGRANDE et al., 2019; GUILGER et al., 2017), as quais apresentaram atividade contra o fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum*, assim como nanopartículas de titânio sintetizadas a partir de *Aspergillus flavus*, que melhoraram o desenvolvimento de plantas de tomate (RALIYA et al., 2015).

Em relação as nanopartículas de ferro observamos diversos trabalhos que mostram sua utilização em tratamentos ambientais, sejam estas atividade de remoção de cádmio (EHRAMPOUSH et al., 2015), arsênio (PRASAD; GANNDHI; SELVARAJ, 2014), cromo (MAHDAVI et al., 2013; MYSTRIOTI; XENIDIS; PAPASSIOPI, 2015; RAO et al., 2013; TRUSKEWYCZ; SHUKLA; BALL, 2018; XIAO et al., 2016), ou com atividade de catálise e degradação de compostos (HARSHINY; ISWARYA; MATHESWARAN, 2015; HUANG et al., 2014; NJAGI et al., 2011; PLACHTOVÁ et al., 2018; WANG; FANG; MEGHARAJ, 2014). O fato de nanopartículas de ferro serem utilizadas na área ambiental nos mostra que estas têm se tornado uma boa alternativa visto a sua baixa toxicidade para organismos, sendo assim uma opção interessante para o seu uso na agricultura (LI et al., 2015).

Entre as diferentes sínteses biogênicas de nanopartículas metálicas, a síntese utilizando os fungos é de grande interesse, uma vez que tem resultado em produtos para diferentes aplicações, como na área da saúde e agricultura, tendo como vantagens a alta produção de enzimas e proteínas, e são facilmente cultivados em larga escala (GUILGER-CASAGRANDE; DE LIMA, 2019; DAS; THIAGARAJAN, 2012). O fungo *T. harzianum* é utilizado no biocontrole de fitopatógenos como *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani* e *Macrophomina phaseolina* e *Aspergillus niger*, devido a isto, passou a ser um organismo de grande interesse agrícola (FRACETO et al., 2016; GAJERA; VAKHARIA, 2012). Este também apresenta bons resultados como agente redutor em sínteses biogênicas (AHLUWALIA et al., 2014; DEVI et

al., 2013; EL-MOSLAMI et al., 2017). No entanto existem alguns problemas em relação a sua exposição a fatores abióticos como temperatura e incidências de raio ultravioleta (BETTIOL, 2009).

Kheshtzar et al. (2019) sintetizaram nanopartículas a partir de três diferentes extratos de folhas das plantas *Eucalyptus tereticornis*, *Melaleuca nesophila* e *Rosemarinus officinalis*, utilizando FeCl_3 a 0,1 M como precursor metálico e observaram por microscopia eletrônica de transmissão que as nanopartículas foram recobertas por compostos biológicos provenientes do extrato da planta. Ainda no mesmo estudo, por análises de FTIR foi detectado grupamentos de compostos biológicos, confirmando a formação do recobrimento das nanopartículas.

Em outro estudo foram sintetizadas nanopartículas de ferro utilizando chá verde (*Camellia sinensis*), sendo observado posteriormente por microscopia eletrônica de transmissão um material semitransparente na superfície das nanopartículas, o qual foi atribuído aos polifenóis provenientes do chá (MYSTRIOTI; XENIDIS; PAPASSIOPI, 2014). Wang, Fang e Megharaj (2014) observaram que nanopartículas de ferro não apresentaram banda de superfície plasmônica referente ao ferro, segundo os autores a ausência de propriedades metálicas na superfície das nanopartículas é decorrente da presença de um recobrimento de polifenóis proveniente das plantas, envolvendo as nanopartículas. O recobrimento foi comprovado utilizando as técnicas de espectroscopia de energia dispersiva e FTIR, onde foi possível observar os elementos O e C, os quais compõem os polifenóis e outros compostos orgânicos das plantas, e detectar grupamentos de compostos orgânicos como o ácido carboxílico.

O fungo *S. sclerotiorum* é responsável por grandes prejuízos em diversas culturas, atingindo mais de 400 espécies diferentes de plantas (BOLAND; HALL, 1994). Ele produz e secreta diversas substâncias responsáveis pela sua patogenicidade, um exemplo é o ácido oxálico que é capaz de induzir morte celular e produção de espécies reativas de oxigênio em plantas (GODOY et al., 1990; KIM; MIN; DICKMAN, 2008). Além dos danos causados às plantas, o *S. sclerotiorum* forma estruturas de resistência chamadas escleródios, que permitem a sobrevivência do fungo na falta de nutrientes, e são capazes de se manter viáveis por até 8 anos (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006) sendo de grande importância o controle do crescimento desse fitopatógeno.

Desta forma, o presente estudo propôs a síntese biogênica de nanopartículas de óxido de ferro a partir do conteúdo enzimático de *T. harzianum* para o controle de pragas, sua caracterização físico-química (distribuição de tamanho, polidispersão e potencial zeta) e morfológica (microscopia eletrônica de varredura), bem como a avaliação da sua toxicidade

utilizando testes de viabilidade celular, genotoxicidade e efeito sobre a germinação de sementes. Além disso, a atividade biológica das partículas foi avaliada contra o fitopatógeno *S. sclerotiorum*. A partir dos resultados se espera que as partículas de óxido de ferro produzidos com este agente de controle biológico possa ser uma alternativa mais sustentável para o controle de pragas em agricultura.

Material e Métodos

Material

Os materiais utilizados neste trabalho foram cloreto de ferro (III) (Sigma-Aldrich), *Trichoderma harzianum* IBLF006; Ecotrich-Ballagro (10^{10} UFC.g⁻¹, concentração informada pelo fabricante), ágar batata dextrose (Kasvi), caldo batata dextrose (Kasvi), Power Soil® DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories, Inc.), Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), Qubit® dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen), sulfato de magnésio heptahidratado (Synth), sulfato de amônia (Synth), fosfato de potássio monobásico (Synth), ácido cítrico monohidratado (Dinâmica), ágar (Kasvi), tween 80 (Sigma-Aldrich), quitina coloidal (Sigma-Aldrich), púrpura de bromocresol (Synth), nitrato de sódio (Synth), extrato de levedura (Kasvi), carboximetilcelulose (Sigma-Aldrich) Triton X-100 (LGC Biotecnologia), sulfato de amônia (Synth), vermelho congo (Dinâmica), cloreto de sódio (LGC Biotecnologia), MTT (3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma-Aldrich), corante vermelho neutro (Sigma-Aldrich), Dimetilsulfóxido (Dinâmica), as células 3T3, V79 e HaCaT são provenientes do banco de células do Rio de Janeiro, as sementes de feijão e lentilha foram obtidas em mercado local e as sementes de tomate pela Isla. Os demais materiais foram adquiridos em grau analítico.

Métodos

Síntese das nanopartículas biogênicas de óxido de ferro

Inicialmente, foi realizada a cultura de *T. harzianum*, a partir do produto comercial. Para isso, foram preparadas placas contendo meio ágar batata-dextrose (BDA) e 1 mL de suspensão de *T. harzianum* na concentração de 200 mg.mL⁻¹, as placas foram incubadas por 6 dias. A partir dessa cultura, foram transferidos dois discos de micélio de 6 mm para cada 75 mL

de caldo batata-dextrose. A cultura foi mantida ao abrigo da luz, sob agitação orbital a 150 rpm por 12 dias. Ao final do período foi realizado o isolamento da biomassa por filtragem, esta foi pesada e transferida para um volume de água ultrapura dez vezes maior que a massa obtida. A suspensão permaneceu em agitação nas mesmas condições anteriores por 72 horas, após este período o material foi filtrado a vácuo, o material seco foi descartado e o material aquoso utilizado na síntese das nanopartículas (GUILGER et al., 2017). Ao filtrado foi adicionado FeCl_3 para a concentração final de 1mM e essa suspensão foi mantida em agitação por 72 horas.

Caracterização das nanopartículas sintetizadas

Diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta

A caracterização das nanopartículas sintetizadas foi realizada por meio da análise da distribuição de tamanho e PDI obtidos pela técnica de DLS (Espalhamento Dinâmico de Luz) e potencial zeta obtido pela técnica de Microeletroforese, utilizando o analisador de partículas ZS90 (Malvern Instruments). Para a realização das técnicas de DLS e Microeletroforese, as nanopartículas foram diluídas a 0,25 mM (4 vezes) e foram realizadas três leituras para cada amostra a um ângulo fixo de 90° e temperatura de 25 °C.

Distribuição de tamanho e concentração

A concentração em nanopartículas (NP.mL^{-1}) foi obtida pela técnica de Rastreamento de Nanopartículas (NTA, *Nanoparticles Tracking Analysis*), utilizando o equipamento NanoSight LM 10 cell com câmera acoplada ao *software* NanoSight v. 2.3, onde a amostra foi diluída 50 vezes em água ultrapura e, em seguida, analisadas no equipamento. Foram analisadas cerca de $19,3 \pm 1,1$ partículas/frame em cinco replicatas de 60 segundos cada.

Espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Para as análises foram utilizadas as nanopartículas biogênicas de óxido de ferro e o filtrado obtido do fungo. As amostras foram liofilizadas e posteriormente secas em dessecador. A análise foi feita em pastilhas de KBr, produzidas pela prensagem do macerado de KBr contendo 1,5% de amostra. Para obtenção dos espectros foi utilizado um equipamento Jasco FTIR-410 equipado com acessórios para medidas de transmitância, onde foi utilizado o método de reflexão difusa por KBr, em faixa de 400 a 4000 cm^{-1} , empregando 64 varreduras por amostra com resolução de 8 cm^{-1} .

Difração de Raio X (DRX)

Para a realização da análise de DRX, as nanopartículas foram liofilizadas. Os difratogramas foram obtidos através de medidas realizadas no difratômetro Shimadzu modelo XRD-6000, alocado no Departamento de Física e Química da UNESP Ilha Solteira, utilizando como fonte de radiação a linha de emissão do cobre (λ Cu $K\alpha$ = 1,5418Å). Os parâmetros utilizados foram: varredura no ângulo de 5 a 75°, uma velocidade de varredura do ângulo 1°/min com um *step* de 0,02°, voltagem de 30 kV e uma corrente de 40 mA.

Morfologia das nanopartículas por microscopia eletrônica de varredura

A observação da morfologia das nanopartículas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foi realizada com um microscópio eletrônico de varredura (SEM; FEI-Inspect-F50- disponível no LNNano, Campinas) operando com voltagem de aceleração de 2 kV. As amostras foram gotejadas em substrato de silício previamente tratado (*glow discharge*). Depois de seco, o substrato de silício foi colado no porta amostra com fita de carbono, os quais foram submetidos a deposição de filme de carbono com 10 nm de espessura sob atmosfera de argônio. A avaliação da morfologia das nanopartículas foi realizada através da análise de imagens na magnificação 63453x. A distribuição de tamanho foi obtida a partir da análise das imagens utilizando o *software* ImageJ, onde foram medidas 51 nanopartículas.

Atividade biológica das nanopartículas biogênicas de óxido de ferro

Ensaio de cinética de crescimento de *T. harzianum* remanescente

Ao final da síntese foram observados resíduos de micélio na solução, desta maneira verificou-se crescimento em placa de *T. harzianum* a partir desta solução de nanopartículas. Para isto, foram preparadas placas contendo meio ágar BDA e ao centro de cada placa foi colocado um disco de papel de filtro contendo apenas NpFe, NpFe + *T. harzianum*, o filtrado utilizado para a síntese das nanopartículas (Filtrado) e como controle foi utilizado discos contendo apenas *T. harzianum*. As placas foram mantidas a 27° C até o total desenvolvimento do fungo. As imagens foram obtidas através do fotodocumentador em intervalos de tempo 0, 1, 3, 6, 9, 12, 24 e 48 horas. Os resultados foram avaliados através das medidas de área das amostras em diferentes períodos de crescimento, dando início após a visualização do

crescimento de fungo fora do disco (BATISTA et al., 2017). O perfil de desenvolvimento do fungo também foi observado com exposição à radiação ultravioleta (fotoperíodo de 12 horas).

Para avaliação da cinética as imagens foram analisadas pelo *software* ImageJ. O desenvolvimento do fungo foi avaliado através da equação 1.

$$Liberação(t) = \frac{Área(t) - Área(t_{inicial})}{Área(t \rightarrow \infty) - Área(t_{inicial})} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde Área(t) é a área de crescimento do fungo em determinado tempo, $t_{inicial}$ é o tempo necessário para perceber o crescimento do fungo fora do disco e $t \rightarrow \infty$ é a área total da placa de Petri.

As amostras foram expostas à radiação UV (UVA 400-315 nm/UVB 315-280 nm) em temperatura ambiente (25 °C) e à 20 cm de distância. O ensaio foi realizado em duplicata.

Avaliação da atividade enzimática do fungo remanescente

A atividade da quitinase do fungo remanescente da síntese foi avaliada pela detecção de quitinase positiva em ágar. O meio utilizado foi composto de 0,15 g de roxo de bromocresol, 4,5 g de quitina coloidal, 200 µL de tween 80, 15 g de ágar, 1 g de ácido cítrico monohidratado, 2 gramas de fosfato de potássio, 3 g de sulfato de amônia e 0,3 g de sulfato de magnésio heptahidratado, para 1 L de água ultra pura (AGRAWAL; KOTASTHANE, 2012). Posteriormente o pH da solução foi ajustado para 4,7 e autoclavado à 121 °C por 15 minutos, após a solidificação do meio nas placas de Petri, discos contendo a nanopartícula de ferro e discos contendo o fungo *T. harzianum* (127 µg/mL) foram colocados no meio das placas, que foram incubadas por 5 dias a 25 °C. Após esse período, foi observado a atividade de quitinase através da mudança de coloração do meio de cultura.

A atividade da celulase foi determinada pela quantificação qualitativa (PANSA, 2017). Para isso foi utilizado o meio carboximetilcelulose (CMC) composto de 15 g de ágar, 10 g de carboximetilcelulose, 1 g de extrato de levedura, 0,01 g de sulfato de ferro heptahidratado, 1 g de fosfato de potássio dibásico e 0,5g de nitrato de sódio, suplementado com 1 mL de triton X-100, para 1 L de água ultra pura. Discos contendo a nanopartícula de ferro e discos contendo o fungo *T. harzianum* (127 µg.mL⁻¹) também foram colocados no meio das placas, que foram incubadas por 3 e cinco dias a 30 °C, após o período foi adicionada uma solução de vermelho congo (0,1 % v/v), após 15 minutos a placa foi lavada com solução de NaCl a 1M, evidenciando assim o halo de degradação de celulose.

A atividade quitinolítica foi observada através da mudança de coloração do meio de cultura após o período de incubação do fungo, pois quando ocorre a quebra da quitina em N-acetil glucosamina o pH é alterado, resultando na mudança do amarelo para roxo (AGRAWAL; KOTASTHANE, 2012). Já a avaliação da atividade de celulase pode ser visualizada através das áreas de hidrólise, formadas pela ausência da ligação do vermelho congo com as ligações β -1,4 glicídicas. Essas áreas são indicadas pelos halos formados (FLORENCIO, 2011).

Citotoxicidade e Genotoxicidade

Para a avaliação da cito e genotoxicidade as soluções de nanopartículas foram previamente filtradas utilizando filtro 0,2 μ M.

Viabilidade celular por atividade mitocondrial (MTT)

Para verificar os efeitos citotóxicos das nanopartículas a partir da atividade mitocondrial e determinar o IC_{50} das mesmas foi realizado o ensaio de redução do tetrazólio MTT (3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), utilizando as linhagens celulares V79 (Fibroblasto pulmonar de hamster chinês), HaCaT (Queratinócito humano) e 3T3 (Fibroblasto embrionário de *Swiss* albino).

As células aderentes foram colocadas em placas de 96 poços ($5,0 \times 10^5$ células/mL/poço) e expostas às nanopartículas em concentrações decrescentes ($5,0 \times 10^9$ e $5,0 \times 10^2$ NPs.mL⁻¹) pelo período de 24 horas. Em seguida, o tratamento foi retirado e adicionada solução de MTT (0,5 mg.mL⁻¹) por 3 horas. A análise da absorbância foi realizada com equipamento de leitura de ELISA à 540 nm.

Viabilidade celular por atividade lisossomal (vermelho neutro)

Para verificar os efeitos citotóxicos das nanopartículas a partir da atividade lisossomal e determinar o IC_{50} das mesmas foi realizado o ensaio de vermelho neutro, utilizando as linhagens celulares V79, HaCaT e 3T3.

Para o ensaio de vermelho neutro as células foram expostas às nanopartículas em concentrações decrescentes, como no MTT, por 24 h em placas de 96 poços ($5,0 \times 10^5$ células/mL/poço) e expostas às nanopartículas em concentrações decrescentes ($5,0 \times 10^9$ e $5,0 \times 10^2$ NPs.mL⁻¹) pelo período de 24 horas. Em seguida o meio de cultura foi removido e os poços foram lavados com tampão fosfato de sódio (PBS), seguido de adição de vermelho neutro (50 μ g/mL). As células foram incubadas por duas horas em estufa de CO₂, 37 °C. Após este

período o vermelho neutro foi removido, seguida de adição do revelador (ácido acético:água:álcool, 1:49:50 v:v:v). A análise da absorbância foi realizada com equipamento de leitura de ELISA à 540nm.

Viabilidade celular pelo ensaio de exclusão por azul de Tripán

Neste teste as células não viáveis (mortas) apresentam o rompimento da membrana plasmática, absorvendo o azul de Tripán para o citoplasma, enquanto que as células vivas permanecem intactas. O ensaio de viabilidade celular direta foi realizado a partir da técnica de exclusão do corante azul de Tripán nas linhagens celulares HaCat, 3T3 e V79-4. Inicialmente as células foram expostas as nanopartículas à 5×10^9 NPs.mL⁻¹ por 1h. Em seguida foram homogeneizadas e misturadas a uma solução de azul de Tripán à 0,4% com o volume final de 1:1 (v:v), e transferidas para a câmara hemocitométrica de Neubauer. A contagem de células viáveis e não viáveis (células coradas) foi realizada por microscopia óptica. O cálculo da viabilidade celular (VC) foi determinado por $VC (\%) = \frac{n. \text{ de células viáveis (não coradas)}}{\text{total de células (coradas e não coradas)}} \times 100$ (RAMACHANDRAN; PRASAD, 2008).

Ensaio Cometa

O ensaio cometa foi realizado de acordo com metodologia adaptada de Singh et al. (1988). Devido a não ocorrência de morte celular e não possível determinação de concentração da IC₅₀, as células foram expostas às nanopartículas na concentração de 5×10^9 NP.mL⁻¹ pelo período de 1 h, seguida de homogeneização em agarose de baixo ponto de fusão e aplicadas em lâminas pré-gelificadas com agarose. Após solidificação, as lâminas foram colocadas em solução de lise por 1 h, seguidas de corrida de eletroforese por 20 min (22V, 10W e 300mA), seguidas de coloração utilizando prata. As análises foram realizadas por “*scoring* visual” em microscópio óptico, classificando os danos em diferentes categorias (0, 1, 2, 3 e 4), onde zero e quatro representam o menor e o maior tamanho de cauda, respectivamente (Equação 2).

$$Dano = \frac{(\sum \text{células } 0 \times 0) + (\sum \text{células } 1 \times 1) + (\sum \text{células } 2 \times 2) + (\sum \text{células } 3 \times 3) + (\sum \text{células } 4 \times 4)}{\text{Total de células}}$$

Equação 2

Avaliação das nanopartículas no controle de *S. sclerotiorum* in vitro

Para determinar o potencial das nanopartículas no controle do mofo branco, foram preparadas placas de Petri contendo meio de cultura BDA suplementado com as nanopartículas

biogênicas de óxido de ferro na concentração de $5,0 \times 10^7$ NP.mL⁻¹. Foram preparados também controles contendo apenas meio de cultura BDA e BDA inoculado com *T. harzianum* a 127 µg.mL⁻¹, concentração recomendada para uso no campo para controle desta praga. Após a solidificação do ágar, foi colocado um escleródio viável no centro de cada placa. A cultura foi então incubada em temperatura ambiente (25 °C), com fotoperíodo de 12 horas, por 7 dias. Ao final do período foi observado a germinação dos escleródios, presença de micélio em placa e formação de novos escleródios na placa.

Antagonismo *in vitro*

A atividade biológica das nanopartículas de óxido de ferro sintetizadas foi avaliada em relação ao patógeno *S. sclerotiorum* através do teste de antagonismo *in vitro*. Para a realização do teste, um escleródio do patógeno *S. sclerotiorum* foi colocado em placas de Petri contendo o meio de cultura BDA. Após dois dias, discos contendo a nanopartícula de óxido de ferro e discos contendo o fungo *T. harzianum* (127 µg.mL⁻¹) foram colocados no lado oposto das placas. As placas foram incubadas em temperatura ambiente (25 °C) e o crescimento foi observado por 12 dias.

A avaliação do antagonismo foi realizada através da escala determinada por Bell, Wells e Markham (1982), onde classe 1 = o *Trichoderma* combate completamente o patógeno e é capaz de cobrir toda a superfície da placa; classe 2 = o *Trichoderma* consegue ocupar pelo menos 2/3 da placa; classe 3 = o *Trichoderma* e o patógeno conseguem colonizar, cada um, metade da placa (ou mais que 1/3 e menos que 2/3); classe 4 = o patógeno coloniza pelo menos 2/3 da placa e parece resistir à colonização do *Trichoderma*; classe 5 = o patógeno domina completamente o *Trichoderma* e consegue ocupar completamente a placa. Os fungos do gênero *Trichoderma* são considerados um bom antagonista quando a escala é ≤ 2 , mas não é altamente antagonista quando é ≥ 3 .

Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA, seguida do Tukey's HSD *post hoc test* (variâncias iguais), programa GraphPad Prism8. A significância estatística foi definida como $p < 0,05$.

Resultados e discussão

Síntese e caracterização das nanopartículas de óxido de ferro

A partir das técnicas de espalhamento dinâmico de luz (DLS) e microeletroforese foi possível observar que as nanopartículas apresentaram diâmetro hidrodinâmico médio de 207 ± 2 nm, índice de polidispersão de $0,45 \pm 0,07$ e potencial zeta de 13 ± 2 mV. O baixo valor do potencial zeta poderia indicar baixa estabilidade das nanopartículas, contudo autores tem demonstrado que a estabilidade de nanopartículas biogênicas deve estar associada às macromoléculas que se encontram recobrando as partículas (ABDELRAHIM et al., 2017; BALLOTIN et al., 2016) promovendo assim um efeito como o exercido por tensoativos como agentes estabilizantes em nanopartículas (FARAJI; POURSALEHI; ALIOFKHAZRAEI, 2015; MASOUDIPOUR et al., 2017). A partir da técnica de rastreamento de nanopartículas o tamanho médio das nanopartículas foi de 304 ± 8 nm e a amostra apresentou uma concentração de $1,9 \times 10^{10}$ NPs.mL⁻¹ e o pH final foi igual a 5,0.

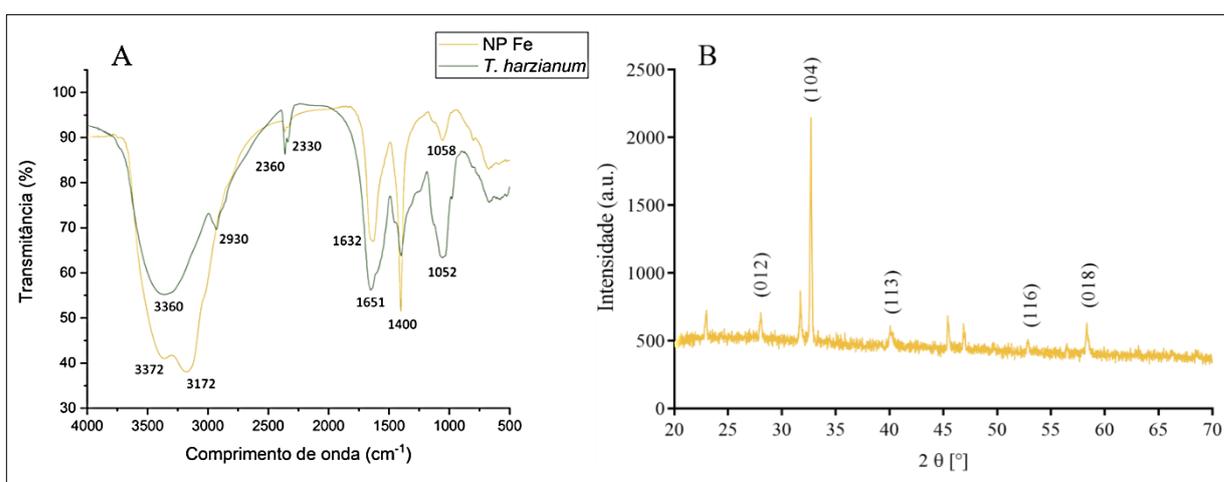
A figura 1A apresenta os espectros de FTIR das nanopartículas biogênicas de óxido de ferro e do filtrado utilizado na sua síntese. A ampla banda de absorção entre 3372 cm⁻¹ e 3172 cm⁻¹ indicam a presença de grupos hidroxila (OH) associados e a ligação N-H de grupos amina (JURIC et al., 2019). A banda em 2930 cm⁻¹ presente no filtrado é referente ao estiramento da ligação C-H de grupos metileno de proteínas (EL-MOSLAMY et al., 2017), enquanto as bandas em 2360 cm⁻¹ e 2330 cm⁻¹ são referentes ao estiramento da ligação CO₂ (UBANDO; CHEN; ONG, 2019), o desaparecimento da banda ou a redução da sua intensidade podem indicar a participação desses grupos na síntese da nanopartícula.

As bandas em 1651 cm⁻¹ e 1632 cm⁻¹ são referentes ao estiramento da ligação C=O do grupo carbonila (KHATAMI et al., 2017), a banda acentuada em 1400 cm⁻¹ pode indicar o estiramento de ligações C-N ou C-C de anéis aromáticos (DESHMUKH; GUPTA; KIM, 2019; EL-MOSLAMY et al., 2017). As bandas por volta de 1055 cm⁻¹ são características de estiramento da ligação C-O de ácido carboxílico, álcool, éster ou éter (ANU et al., 2020; WANG; FANG; MEGHARAJ, 2014). A presença desses grupos, tanto no filtrado quanto na nanopartícula, pode confirmar a presença de *capping* na superfície das nanopartículas biogênicas de óxido de ferro.

A análise por DRX foi realizada para a identificação da estrutura das NpFe, o difratograma mostra a formação de um material cristalino (Figura 1B). A presença dos picos em valores 2θ próximos a $28,0^\circ$, $32,7^\circ$, $40,0^\circ$, $52,8^\circ$ e $58,3^\circ$ referentes aos planos cristalográficos

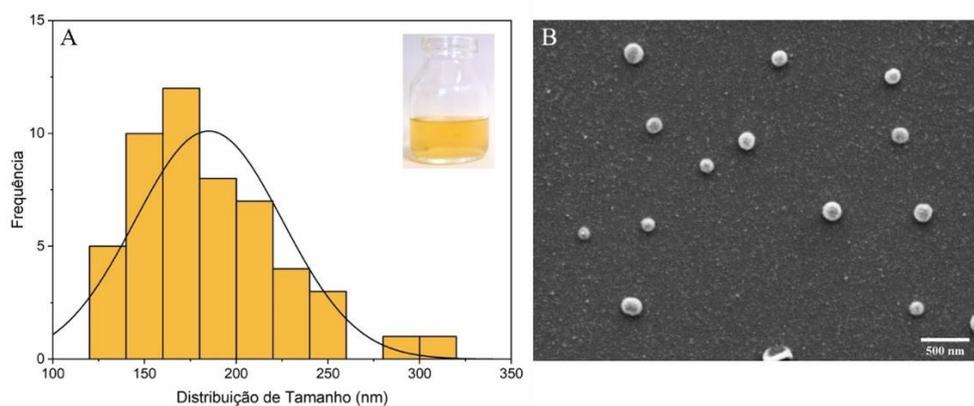
(012), (104), (113), (116) e (018) são característicos de hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) (DAR; SHIVASHANKAR, 2014; HEGAZEY et al., 2019; SANTOS et al., 2017), comprovando a síntese de nanopartículas de hematita a partir de FeCl_3 e *T. harzianum*. Por se tratar de uma síntese biogênica, é possível que aconteça a síntese de mais de um tipo de nanopartícula de ferro, nanopartículas de ferro sintetizadas a partir de chá *oolong* apresentaram picos correspondentes ao ferro zero valente, maghemita e hematita (HUANG et al., 2014).

Figura 1- (A) Espectro infravermelho obtido para as nanopartículas biogênicas de óxido de ferro e o filtrado a partir de *T. harzianum* utilizado para a síntese das nanopartículas. (B) Difratoograma das nanopartículas biogênicas de óxido de ferro.



Ainda, a fim de uma melhor caracterização foram obtidas imagens por microscopia eletrônica. A partir das imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), foi possível notar que as nanopartículas biogênicas de óxido de ferro apresentam uma distribuição de tamanho de 120 a 320 nm com uma média de 185 ± 40 nm (Figura 2A) e possuem morfologia esférica (Figura 2B). O alto índice de polidispersão pode ser confirmado pela variação de tamanho observada na microscopia (Figura 2).

Figura 2 – Análise da morfologia e distribuição de tamanho das nanopartículas de óxido de Ferro (NpFe) por microscopia Eletrônica de Varredura. (A) Distribuição de tamanho pela análise das imagens obtidas pela microscopia. O histograma foi obtido pela análise das imagens pelo *software* ImageJ, foram utilizadas 51 nanopartículas. (B) Morfologia das nanopartículas obtidas utilizando uma magnificação de 63453x.



Estudos mostram que nanopartículas de ferro biogênicas podem apresentar uma média de tamanho menor quando comparadas as nanopartículas obtidas neste trabalho. Nanopartículas de ferro a partir de extrato de *Camellia sinensis* apresentaram diâmetro de 5-15 nm (HOAG et al., 2009). Já nanopartículas obtidas a partir do extrato de alga marrom apresentaram diâmetro de 18 nm (MAHDAVI et al., 2013). O tamanho das nanopartículas de ferro a partir de extrato de tangerina foi de 50 a 200 nm, dependendo da concentração de extrato usado na síntese (EHRAMPOUSH et al., 2015) e nanopartículas de ferro sintetizadas através do fungo *A. alternata*, apresentaram diâmetro de 9 nm (MOHAMED et al., 2015).

Porém, diferentes fatores podem ser responsáveis pelo tamanho diferenciado das nanopartículas, entre eles o pH e concentração do sal utilizado, concentração do extrato, temperatura, assim como o tempo necessário para completar a síntese. Os diferentes tamanhos podem estar também relacionados com o *capping* formado durante a síntese, sendo as nanopartículas de maior tamanho as que apresentam um maior *capping*. Este fato foi constatado também em nanopartículas de prata, que de acordo com Lee e Jun (2019), os diferentes tamanhos das nanopartículas de prata dependem das condições de síntese, assim como da espécie do fungo utilizado e o *capping* formado.

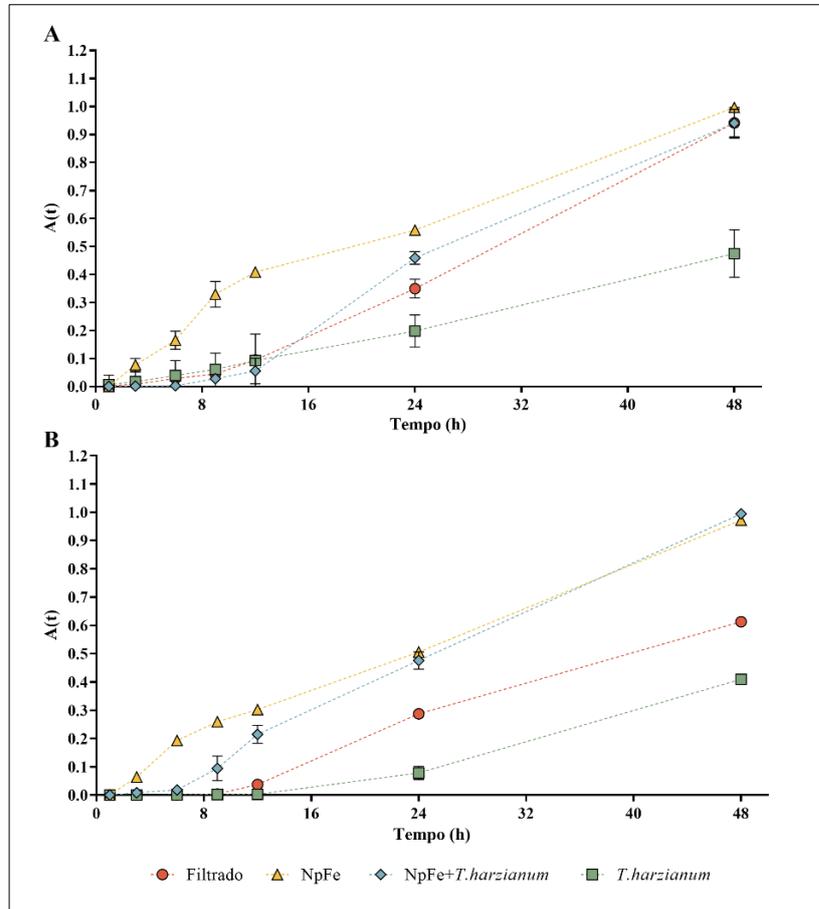
Atividade biológica das nanopartículas biogênicas de óxido de ferro

Ensaio de cinética de crescimento de *T. harzianum* remanescente

Ao iniciar as análises com as nanopartículas foi observada presença de conídios remanescentes da síntese, porém em quantidade ínfima, desta maneira uma análise da capacidade de crescimento deste fungo foi realizada. Os poucos conídios remanescentes apresentaram um crescimento rápido quando colocados em placas. Os resultados dos perfis de desenvolvimento podem ser observados na Figura 3, onde os resultados mostram a área de crescimento do fungo.

O fungo *T. harzianum* comercial mostrou um crescimento mais lento quando comparado com o fungo remanescente na síntese das NpFe, demonstrando que a nanopartícula é capaz de estimular o seu crescimento. Também é possível observar que as placas contendo NpFe + *T. harzianum* apresentam crescimento semelhante às placas contendo apenas NpFe.

Figura 3 – Resultados do ensaio de cinética de crescimento com ou sem exposição à radiação ultravioleta (UV) em NpFe, NpFe com *T. harzianum*, filtrado e o fungo *T. harzianum*. **(A)** Sem exposição à UV; **(B)** Com exposição à UV. Onde $A(t)$ indica a área de crescimento do fungo em determinado tempo. É possível perceber que o crescimento do *Trichoderma* foi reduzido quando exposto à radiação UV, enquanto o *Trichoderma* a partir da NpFe se manteve inalterado.



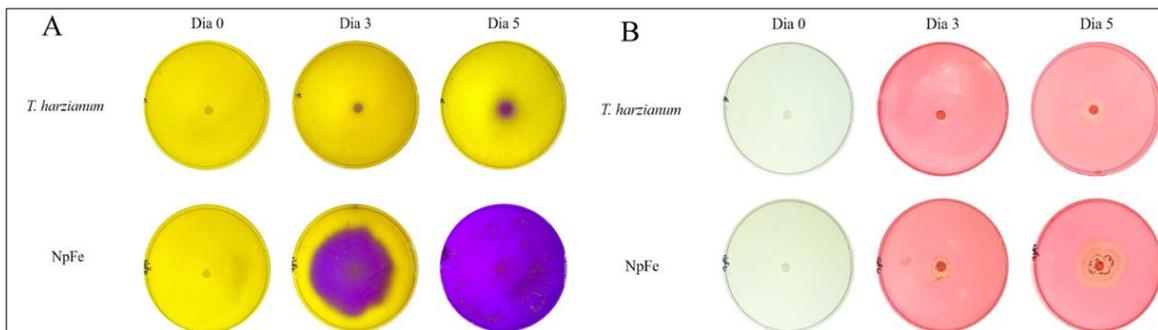
Após a exposição à radiação ultravioleta foi possível observar que o fungo comercial apresentou um desenvolvimento ainda mais lento quando comparada com o desenvolvimento do fungo remanescente na nanopartícula, o qual não foi afetado com a exposição à radiação ultravioleta. Vale lembrar que a concentração de *T. harzianum* comercial é muito superior à concentração do fungo remanescente nas nanopartículas.

Atividade enzimática do fungo remanescente

No período de 3 dias de incubação, o fungo remanescente na síntese das NpFe apresentou uma atividade quitinolítica muito maior que a do *T. harzianum* comercial. Após o período de 5 dias o *T. harzianum* comercial mostrou baixa atividade e a placa contendo as NpFe exibiu alteração total de cor no meio de cultura, indicando alta atividade quitinolítica do *T. harzianum* a partir das NpFe (Figura 4A), onde a maior atividade de enzimas pode contribuir no melhor controle de pragas. Em relação a formação de halo no ensaio de celulase foi possível

observar após 5 dias que a placa com as NpFe apresentou uma maior colônia e, conseqüentemente, um maior halo quando comparada a colônia a partir do *T. harzianum* comercial (Figura 4B).

Figura 4 –Em (A) Resultados de atividade de quitinase por detecção de quitinase positiva em ágar pra *T. harzianum* e para NpFe por 3 e 5 dias de incubação. Em (B) Resultados de atividade de celulase por detecção qualitativa em ágar pra *T. harzianum* e para NpFe por 3 e 5 dias de incubação.



Um estudo mostra que doze isolados de *Trichoderma* (*T. harzianum*, *T. viride* e *T. virens*) foram testados contra *Aspergillus niger* e quando expostos ao antagonista as cepas de *Trichoderma* apresentaram maior produção de quitinase, β -1,3-glucanase e protease, indicando a participação dessas enzimas no combate de fitopatógenos (GAJERA; VAKHARIA, 2012). Isolados de *Trichoderma* a partir da rizosfera de plantas de tabaco também apresentaram maior atividade das enzimas quitinase e β -1,3-glucanase quando o meio foi suplementado com parede celular de *Sclerotium rolfsii*, e foram capazes de hidrolisar o micélio do fitopatógeno (RAO, RAJU; RAVISANKAR, 2016). A quitina e protease produzidas por diversos fungos, inclusive o *Trichoderma* sp., também apresentaram atividade ovicida e inibitória sobre ovos de *Hyalomma dromedarii*, permitindo o seu uso no controle de carrapatos dos camelos, evitando o uso de produtos químicos (HABEEB; ASHRY; SAAD, 2017).

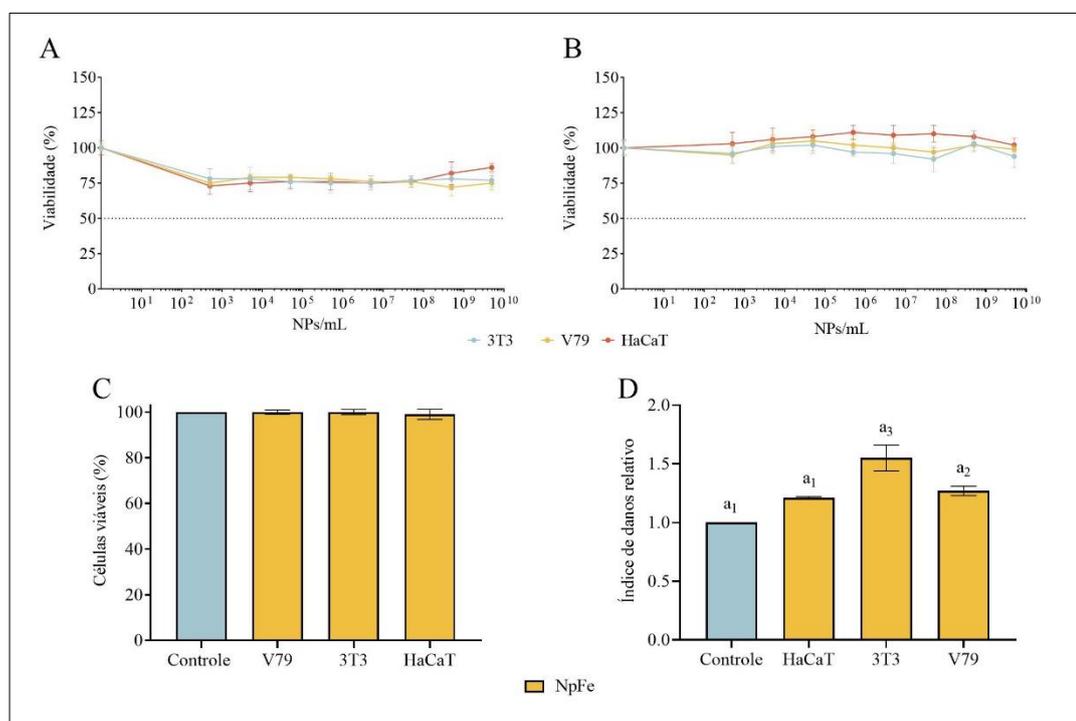
Saravanakumar et al. (2016) mostraram que ao silenciar dois genes responsáveis pela produção de celulase do *T. harzianum* presente nas raízes de plantas de milho, as plantas apresentaram uma redução na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). No entanto, permitiu que o patógeno *Curvularia luneta* colonizasse uma maior área das folhas de milho, indicando que a celulase é capaz de acionar o sistema de defesa das plantas.

Citotoxicidade e Genotoxicidade

Os resultados para a análise de MTT podem ser observados na Figura 5A, onde não foram obtidos valores de IC₅₀ sobre nenhuma das linhagens celulares expostas. Tal resultado

indica baixa citotoxicidade das nanopartículas na faixa de concentrações de exposição, dentre as quais está a concentração de interesse para controle de *S. sclerotiorum* ($5,0 \times 10^7$ NPs/mL). O mesmo foi observado no ensaio de vermelho neutro (Figura 5B). Tal resultado confirma baixa citotoxicidade das nanopartículas na faixa de concentrações de exposição. Para avaliar a viabilidade celular direta pela integridade da membrana celular foi utilizado o ensaio de exclusão por azul de Tripán. Os resultados mostraram que a viabilidade celular foi próxima de 100% em todas as linhagens celulares expostas (Figura 5C), indicando também uma baixa citotoxicidade das nanopartículas biogênicas de óxido de ferro.

Figura 5 – Viabilidade das células V79, HaCaT e 3T3 expostas a NpFe pelo ensaio de atividade mitocondrial MTT (A) e ensaio de atividade lisossomal vermelho neutro (B). Viabilidade das células V79, HaCaT e 3T3 expostas a NpFe pelo ensaio de azul de Tripán (C). Avaliação da genotoxicidade das NpFe sobre as células na concentração 5×10^9 NPs.mL⁻¹ pelo ensaio cometa (D). A diferença estatística significativa considerada é $p < 0,05$, números iguais não representam diferença significativa e números distintos representam.



Embora não existam muitos estudos sobre a citotoxicidade de nanopartículas biogênicas de ferro, Fatemi et al. (2018) mostraram resultados dos efeitos de nanopartículas de óxido de ferro sintetizadas a partir de *Bacillus cereus* em células 3T3 e MCF-7 através do MTT e perceberam toxicidade dependente da concentração. Shukla et al. (2015) compararam os efeitos citotóxicos entre nanopartículas de óxido de ferro sem recobrimento e recobertas com quitosana através do MTT, utilizando as células HeLa, A549 e HeK293, e constataram que as nanopartículas recobertas apresentam menor toxicidade, possivelmente pela diminuição da liberação de íons de ferro.

Nanopartículas de óxido de ferro funcionalizadas com curcumina também se mostraram menos tóxicas e demonstraram proteção contra um agente inflamatório em células HUVEC (BHANDARI et al., 2016). Em outros trabalhos avaliando a citotoxicidade de nanopartículas de óxido de ferro não recobertas, elas apresentam toxicidade dependendo da concentração/dose (BELLUSCI et al., 2014; BHATTACHARYA et al., 2009). Seabra et al. (2014) estudaram a citotoxicidade e genotoxicidade de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro de síntese química revestidas com pequenas moléculas contendo tiol, como ácido mercaptosuccínico (MSA) ou ácido meso-2,3-dimercaptosuccínico (DMSA) em linhagens 3T3, células de linfócitos humanos e células de ovário de hamster (CHO) e células de câncer de mama (MCF-7), os resultados demonstraram que as nanopartículas de óxido de ferro magnético com revestimento tiol têm poucos efeitos tóxicos nas células.

O resultado da análise cometa mostrou que as NpFe não apresentaram potencial genotóxico para a linhagem celular HaCaT. No entanto, foi observado um aumento de danos significativo em relação ao controle nas linhagens 3T3 e V79 na concentração de exposição realizada, a qual foi 100x maior que a concentração de atividade para controle da *S. sclerotiorum*, sendo que a 3T3 apresentou maior sensibilidade (Figura 5D).

Nanopartículas de óxido de ferro recobertas com um derivado de ramnose apresentaram danos no DNA de células BALB/3T3 em doses acima de 250 µg/mL (PAOLINI et al., 2016). Nanopartículas de óxido de ferro também apresentaram genotoxicidade nas linhagens IMR-90 e BEAS-2B (BHATTACHARYA et al., 2009), mas não apresentaram genotoxicidade em MH-S e A549 (FREYRIA et al., 2012; KARLSSON et al., 2008), indicando que algumas linhagens celulares podem ser mais sensíveis que as outras.

Os resultados da avaliação dos efeitos genotóxicos utilizando *Allium cepa* mostraram que as NpFe sintetizadas não apresentaram alterações significativas do índice mitótico relativo em relação ao controle, no entanto a exposição ao *T. harzianum* causou uma redução significativa no índice mitótico (Figura 1S). A fitotoxicidade avaliada através de germinação não apresentou alterações significativas entre os índices de germinação, em relação ao controle, em nenhuma das sementes (Figura 2S), indicando que a nanopartícula biogênica de óxido de ferro não interferiu na germinação das sementes de feijão, lentilha e tomate.

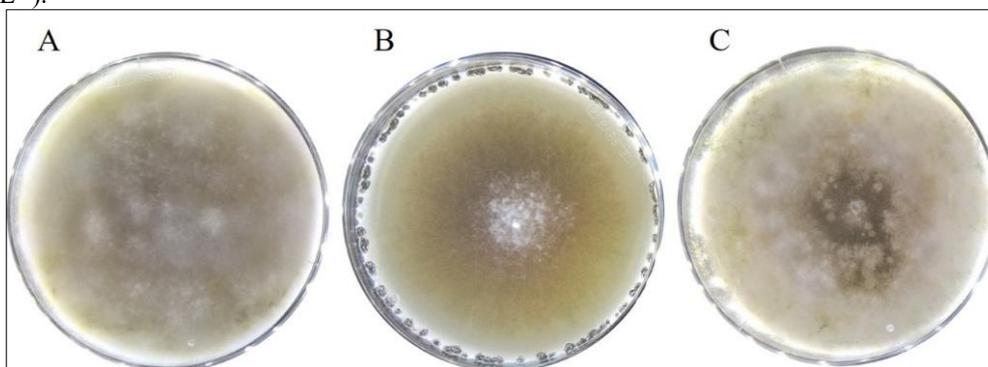
Ruttikay-Nedecky et al. (2017) apresentaram vários estudos onde nanopartículas de ferro também não apresentaram interferência na germinação de plantas como amendoim (*Arachis hypogaea*), feijão mungo (*Vigna radiata*), espinafre (*Spinacea oleracea*) e soja

(*Glycine max*). Sementes de *Lolium perene* L. e *Curcubita mixta* não tiveram a germinação afetada quando expostas à nanopartículas de Fe_3O_4 (WANG et al., 2011) e o mesmo aconteceu com sementes de *Arachis hypogaea* expostas à nanopartículas ferro zero-valente (Fe^0), indicando uma baixa toxicidade do ferro (LI et al., 2015).

Avaliação das nanopartículas no controle de *S. sclerotiorum* in vitro

Os resultados mostraram que as nanopartículas biogênica de óxido de ferro na concentração de $5,0 \times 10^7$ NPs.mL⁻¹ apresentaram potencial para o controle do crescimento micelial e da formação de novos escleródios de *S. sclerotiorum*, uma vez que, apresenta o crescimento de *T. harzianum* remanescente do processo de síntese, o qual predominou a placa, não permitindo o crescimento do fitopatógeno (Figura 6A). O controle apresentou uma grande quantidade de escleródios novos (Figura 6B) e o *T. harzianum* comercial também foi capaz de inibir o crescimento micelial do mofo branco e a geração de novos escleródios (Figura 6C).

Figura 6 - Resultados do ensaio de avaliação do potencial inibitório das nanopartículas contra o fungo fitopatógeno *S. sclerotiorum*. (A) NpFe a $5,0 \times 10^7$ NP.mL⁻¹; (B) controle *S. sclerotiorum* e (C) controle *T. harzianum* ($127 \mu\text{g.mL}^{-1}$).



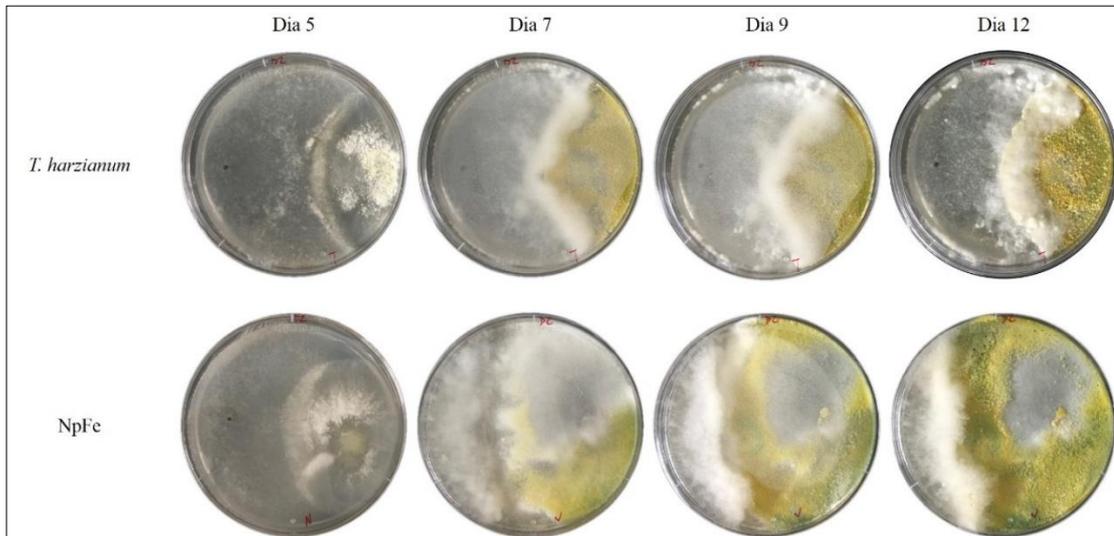
Antagonismo in vitro

Os resultados mostram que o fungo comercial *T. harzianum* apresentou classe 3 na escala de classificação de antagonismo, uma vez que o *T. harzianum* apresentou crescimento em 1/3 da placa (Figura 7 – dia 12).

O fungo carregado pelas nanopartículas de óxido de ferro por apresentar um crescimento mais rápido foi capaz de controlar o crescimento do fitopatógeno *S. sclerotiorum*, apresentando classe 2 no período de 12 dias, de acordo com a escala de Bell, Wells e Markham

(1982), nos dois casos o fungo ainda foi capaz de inibir a germinação de escleródios. Após esse período não foram observadas alterações no crescimento de ambos os fungos.

Figura 7 – Resultados do ensaio de antagonismo *in vitro* para o fungo comercial *T. harzianum* e para as NpFe (lado direito da placa) contra o fungo fitopatígeno *S. sclerotiorum* (lado esquerdo da placa).



A diferença nas escalas dos fungos indica que a nanopartícula foi capaz de proteger e estimular o crescimento do *T. harzianum* mesmo na presença do antagonista *S. sclerotiorum*, sendo este o motivo do controle. Logo as nanopartículas estimulam o desenvolvimento do *Trichoderma* remanescente na nanopartícula e este, devido seu crescimento acelerado, consegue segurar com maior eficácia o mofo branco.

O *T. harzianum* tem sido utilizado no controle de *S. sclerotiorum*, através do micoparasitismo, sendo capaz de reduzir a produção de micélio e escleródios do fitopatígeno (ABDULLAH; ALI; SULEMAN, 2008, INBAR; MENENDEZ; CHET, 1996; ZHANG et al., 2016). Além deste, o *T. harzianum* também apresenta atividade contra outros fitopatógenos. Asran-Amal et al. (2010) isolaram cinco cepas de *T. harzianum* e testaram o seu potencial no controle biológico de três fitopatógenos. Neste trabalho, o *T. harzianum* foi capaz de inibir 77,9% do crescimento de *Macrophomina phaseolina*, 76,5% do crescimento do *Fusarium solani* e 59,2% do crescimento de *Rhizoctonia solani*.

Mendoza et al. (2015) isolaram 16 cepas de *Trichoderma* spp. sendo 14 de *T. harzianum*, 1 de *T. virens* e 1 de *T. koningiopsis*, onde todas as cepas foram capazes de inibir o crescimento de *M. phaseolina*. No entanto, foi possível observar que o *T. koningiopsis* agiu por hiperparasitismo, crescendo sobre o antagonista, assim como observado no *T. harzianum* a partir da NpFe. Apesar de muito eficiente no controle biológico contra diversos patógenos, o *T. harzianum* apresenta sensibilidade a fatores abióticos como temperatura, umidade e radiação

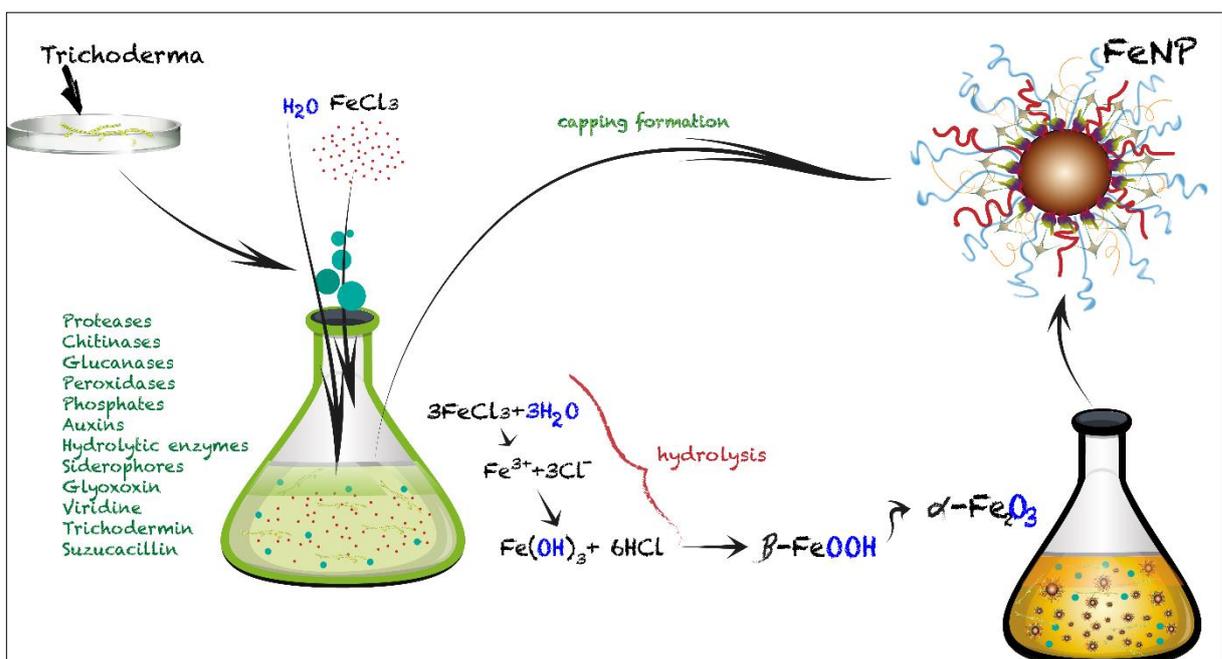
UV (BETTIOL, 2009). O fungo a partir da NpFe se mostrou mais resistente à exposição a UV, sendo uma eficaz solução para os fatores que prejudicam sua ação como organismo de controle biológico.

Proposta do mecanismo de síntese das nanopartículas de α -Fe₂O₃ e atividade

Ao final da síntese, a solução de nanopartículas apresentou um tom alaranjado claro devido a presença de nanopartículas de α -Fe₂O₃, as quais apresentam um *capping* formado provavelmente por biomoléculas e metabolitos secundários provenientes do *Trichoderma* utilizado como estabilizante, pois nanopartículas de ferro sintetizadas por via biológica em geral apresentam recobrimento formado por biomoléculas presentes no extrato ou filtrados utilizados para a síntese, como mostrado por diferentes autores (MAO et al., 2011; PARK et al., 2016; SPIZZO et al., 2017).

Para a formação da nanopartícula sugere-se que o FeCl₃ em água (proveniente do filtrado obtido com o fungo) sofra hidrólise, seguida de associação do Fe⁺³ com oxigênio presente na solução formando Fe₂O₃. Imediatamente após formação de Fe₂O₃ os metabolitos existentes na solução se organizam formando o *capping* nas nanopartículas estabilizando a reação (Figura 8). Ao final da síntese também foi observada uma quantidade ínfima de conídios.

Figura 8 – Esquema proposto da síntese das nanopartículas obtidas neste estudo. As biomoléculas liberadas pelo fungo, que estão presentes no filtrado, são utilizadas na formação do *capping* das nanopartículas de óxido de ferro, conferindo estabilidade.



Conclusão

A síntese de nanopartículas de óxido de ferro a partir do filtrado de *T. harzianum* é viável e mostrou existir permanência do fungo (*T. harzianum*) após a finalização da síntese, o que denominamos de *T. harzianum* residual. Os resultados mostraram que este fungo remanescente foi o responsável pelo controle do fitopatógeno *S. sclerotiorum*, inibindo o crescimento do mesmo e a germinação de novos escleródios. O *T. harzianum* carreado nas nanopartículas apresentou melhor desenvolvimento, mesmo quando exposto à radiação UV, e maior produção de enzimas quando comparado com o *T. harzianum* comercial.

As nanopartículas biogênicas de óxido de ferro não apresentaram citotoxicidade nas linhagens celulares testadas, no entanto induziram baixa genotoxicidade em fibroblastos (3T3 e V79) em maiores concentrações de nanopartículas, também não causaram redução do índice de germinação das sementes avaliadas.

Sabemos da importância de novos estudos para assegurar a segurança do uso dessas nanopartículas na área agrícola, porém os resultados aqui obtidos mostram ser promissores para a sua aplicação no controle de pragas na agricultura.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – Processo nº 2017/20932-6; nº 2017/21004-5 e nº 2017/21004-5). Os autores gostariam de agradecer ao LNNano pelo apoio técnico durante o trabalho de microscopia eletrônica.

Referências

- ABDELRAHIM, K. et al. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using *Rhizopus stolonifer*. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 24, n. 1, p. 208–216, 2017.
- ABDULLAH, M. T.; ALI, N. Y.; SULEMAN, P. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary with *Trichoderma harzianum* and *Bacillus amyloliquefaciens*. **Crop Protection**, v. 27, n. 10, p. 1354–1359, 2008.
- AGRAWAL, T.; KOTASTHANE, A. S. Chitinolytic assay of indigenous *Trichoderma* isolates collected from different geographical locations of Chhattisgarh in Central India. **SpringerPlus**, v. 1, n. 1, p. 73, 2012.

- AHLUWALIA, V. et al. Green synthesis of silver nanoparticles by *Trichoderma harzianum* and their bio-efficacy evaluation against *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae*. **Industrial Crops and Products**, v. 55, p. 202–206, 2014.
- ALI, A. et al. Synthesis, characterization, applications, and challenges of iron oxide nanoparticles. **Nanotechnology, Science and Applications**, v. 9, p. 49–67, 2016.
- ANU, K. et al. Biogenesis of selenium nanoparticles and their anti-leukemia activity. **Journal of King Saud University - Science**, 2020.
- ASRAN-AMAL, A. et al. *In vitro* antagonism of cotton seedlings fungi and characterization of chitinase isozyme activities in *Trichoderma harzianum*. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 17, n. 2, p. 153–157, 2010.
- BALLOTTIN, D. et al. Elucidating Protein Involvement in the Stabilization of the Biogenic Silver Nanoparticles. **Nanoscale Research Letters**, v. 11, 2016.
- BATISTA, D. P. C. et al. Encapsulation and release of *Beauveria bassiana* from alginate–bentonite nanocomposite. **RSC Advances**, v. 7, n. 42, p. 26468–26477, 2017.
- BELL, D. K.; WELLS, H. D.; MARKHAM, C. R. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. **Phytopathology**, v. 72, n. 4, p. 379–382, 1982.
- BELLUSCI, M. et al. Biodistribution and acute toxicity of a nanofluid containing manganese iron oxide nanoparticles produced by a mechanochemical process. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 1919–1929, 2014.
- BETTIOL, W. **Biocontrole de doenças de plantas uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009.
- BHANDARI, R. et al. Single step synthesis, characterization and applications of curcumin functionalized iron oxide magnetic nanoparticles. **Materials Science and Engineering: C**, v. 67, p. 59–64, 2016.
- BHATTACHARYA, K. et al. Titanium dioxide nanoparticles induce oxidative stress and DNA-adduct formation but not DNA-breakage in human lung cells. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 6, n. 1, p. 17, 2009.
- BOLAND, G. J.; HALL, R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 16, n. 2, p. 93–100, 1994.
- BOLTON, M. D.; THOMMA, B. P. H. J.; NELSON, B. D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. **Molecular Plant Pathology**, v. 7, n. 1, p. 1–16, 2006.
- DAR, M. I.; SHIVASHANKAR, S. A. Single crystalline magnetite, maghemite, and hematite nanoparticles with rich coercivity. **The Royal Society of Chemistry**, v. 4, p. 4105–4113, 2014.

DAS, K.; THIAGARAJAN, P. Mycobiosynthesis of metal nanoparticles. **International Journal of Nanotechnology**, v. 1, p. 10, 2012.

DESHMUKH, A. R.; GUPTA, A.; KIM, B. S. Ultrasound Assisted Green Synthesis of Silver and Iron Oxide Nanoparticles Using Fenugreek Seed Extract and Their Enhanced Antibacterial and Antioxidant Activities. **BioMed Research International**, v. 2018, p. 1-14, 2019.

DEVI, T. et al. Biosynthesis of silver nanoparticles from *Trichoderma* species. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 51, p. 543-547, 2013.

EHRAMPOUSH, M. H. et al. Cadmium removal from aqueous solution by green synthesis iron oxide nanoparticles with tangerine peel extract. **Journal of Environmental Health Science and Engineering**, v. 13, 2015.

ELGORBAN, A. Extracellular synthesis of silver nanoparticles using *Aspergillus versicolor* and evaluation of their activity on plant pathogenic fungi. **Mycosphere**, v. 7, n. 6, p. 844–852, 2016.

EL-MOSLAMY, S. H. et al. Applying Taguchi design and large-scale strategy for mycosynthesis of nano-silver from endophytic *Trichoderma harzianum* SYA.F4 and its application against phytopathogens. **Scientific Reports**, v. 7, p. srep45297, 2017.

FARAJI, M.; POURSALEHI, R.; ALIOFKHAZRAEI, M. The Effect of Surfactant on Colloidal Stability, Oxidation and Optical Properties of Aluminum Nanoparticles Prepared via Dc Arc Discharge in Water. **Procedia Materials Science**, 5th International Biennial Conference on Ultrafine Grained and Nanostructured Materials, UFGNSM15. v. 11, p. 684–688, 2015.

FATEMI, M. et al. Extracellular biosynthesis of magnetic iron oxide nanoparticles by *Bacillus cereus* strain HMH1: Characterization and *in vitro* cytotoxicity analysis on MCF-7 and 3T3 cell lines. **Journal of Biotechnology**, v. 270, p. 1–11, 2018.

FISKESJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, n. 1, p. 99–112, 1985.

FLORENCIO, C. Microrganismos Produtores de Celulases: Seleção de Isolados de *Trichoderma* spp. 86, 2011.

FRACETO, L. F. et al. Nanotechnology in Agriculture: Which Innovation Potential Does It Have? **Frontiers in Environmental Science**, v. 4, 2016.

FREYRIA, F. S. et al. Hematite Nanoparticles Larger than 90 nm Show No Sign of Toxicity in Terms of Lactate Dehydrogenase Release, Nitric Oxide Generation, Apoptosis, and Comet Assay in Murine Alveolar Macrophages and Human Lung Epithelial Cells. **Chemical Research in Toxicology**, v. 25, n. 4, p. 850–861, 2012.

- GAJERA, H. P.; VAKHARIA, D. N. Production of lytic enzymes by *Trichoderma* isolates during *in vitro* antagonism with *Aspergillus niger*, the causal agent of collar rot of peanut. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 43–52, 2012.
- GODOY, G. et al. Use of mutants to demonstrate the role of oxalic acid in pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* on *Phaseolus vulgaris*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 37, n. 3, p. 179–191, 1990.
- GUILGER, M. et al. Biogenic silver nanoparticles based on *Trichoderma harzianum*: synthesis, characterization, toxicity evaluation and biological activity. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. srep44421, 2017.
- GUILGER-CASAGRANDE, M. et al. Biosynthesis of silver nanoparticles employing *Trichoderma harzianum* with enzymatic stimulation for the control of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. srep14351, 2019.
- GUILGER-CASAGRANDE, M.; DE LIMA, R. Synthesis of Silver Nanoparticles Mediated by Fungi: A Review. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 7, 2019.
- HABEEB, S. M.; ASHRY, H. M.; SAAD, M. M. Ovicidal effect of chitinase and protease enzymes produced by soil fungi on the camel tick *Hyalomma dromedarii* eggs (Acari:Ixodidae). **Journal of Parasitic Diseases**, v. 41, n. 1, p. 268–273, 2017.
- HARSHINY, M.; ISWARYA, C. N.; MATHESWARAN, M. Biogenic synthesis of iron nanoparticles using *Amaranthus dubius* leaf extract as a reducing agent. **Powder Technology**, v. 286, p. 744–749, 2015.
- HEGAZEY, R. M. et al. Facile fabrication of hematite nanoparticles from Egyptian insecticide cans for efficient photocatalytic degradation of rhodamine B dye. **Journal of Materials Research and Technology**, 2019.
- HOAG, G. E. et al. Degradation of bromothymol blue by ‘greener’ nano-scale zero-valent iron synthesized using tea polyphenols. **Journal of Materials Chemistry**, v. 19, n. 45, p. 8671–8677, 2009.
- HUANG, L. et al. Synthesis of iron-based nanoparticles using oolong tea extract for the degradation of malachite green. **Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy**, v. 117, p. 801–804, 2014.
- INBAR, J.; MENENDEZ, A.; CHET, I. Hyphal interaction between *Trichoderma harzianum* and *Sclerotinia sclerotiorum* and its role in biological control. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 28, n. 6, p. 757–763, 1996.
- JURIC, S. et al. Physicochemical properties and release characteristics of calcium alginate microspheres loaded with *Trichoderma viride* spores. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 18, n. 11, p. 2534-2548, 2019.

- KARLSSON, H. L. et al. Copper Oxide Nanoparticles Are Highly Toxic: A Comparison between Metal Oxide Nanoparticles and Carbon Nanotubes. **Chemical Research in Toxicology**, v. 21, n. 9, p. 1726–1732, 2008.
- KHATAMI, M. et al. Leishmanicidal Activity of Biogenic Fe₃O₄ Nanoparticles. **Scientia Pharmaceutica**, v. 85, n. 36, p. 1-9, 2017.
- KHESHTZAR, R. et al. Optimization of reaction parameters for the green synthesis of zero valent iron nanoparticles using pine tree needles. **Green Processing and Synthesis**, v. 8, n. 1, p. 846-855, 2019.
- KIM, K. S.; MIN, J.-Y.; DICKMAN, M. B. Oxalic Acid Is an Elicitor of Plant Programmed Cell Death during *Sclerotinia sclerotiorum* Disease Development. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 21, n. 5, p. 605–612, 2008.
- LEE, S. H.; JUN, G. H. Silver Nanoparticles: Synthesis and Application for Nanomedicine. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 4, p. 865, 2019.
- LI, X. et al. Stimulation of Peanut Seedling Development and Growth by Zero-Valent Iron Nanoparticles at Low Concentrations. **PLOS ONE**, v. 10, n. 4, p. e0122884, 2015.
- MAHDAVI, M. et al. Green Biosynthesis and Characterization of Magnetic Iron Oxide (Fe₃O₄) Nanoparticles Using Seaweed (*Sargassum muticum*) Aqueous Extract. **Molecules**, v. 18, n. 5, p. 5954–5964, 2013.
- MAO, D. et al. Hierarchically Mesoporous Hematite Microspheres and Their Enhanced Formaldehyde-Sensing Properties. **Small**, v. 7, n. 5, p. 578-582, 2011.
- MASOUDIPOUR, E. et al. Surfactant effects on the particle size, zeta potential, and stability of starch nanoparticles and their use in a pH-responsive manner. **Cellulose**, v. 24, n. 10, p. 4217–4234, 2017.
- MENDOZA, J. L. H. et al. Antibiosis of *Trichoderma* spp. strains native to northeastern Mexico against the pathogenic fungus *Macrophomina phaseolina*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 4, p. 1093–1101, 2015.
- MOHAMED, M. I. et al. Nanotoxic Profiling of Novel Iron Oxide Nanoparticles Functionalized with Perchloric Acid and SiPEG as a Radiographic Contrast Medium. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–7, 2015.
- MYSTRIOTI, C.; XENIDIS, A.; PAPASSIOPI, N. Reduction of hexavalent chromium with polyphenol-coated nano zero-valent iron: column studies. **Desalination and Water Treatment**, v. 56, n. 5, p. 1162–1170, 2015.
- NJAGI, E. C. et al. Biosynthesis of Iron and Silver Nanoparticles at Room Temperature Using Aqueous Sorghum Bran Extracts. **Langmuir**, v. 27, n. 1, p. 264–271, 2011.

OLIVEIRA, J. L. DE et al. Zein Nanoparticles as Eco-Friendly Carrier Systems for Botanical Repellents Aiming Sustainable Agriculture. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 6, p. 1330–1340, 2018.

PANSA, C.C. *Trichoderma* spp. de solos da Floresta Amazônica como fonte de enzimas celulolíticas. Text, Universidade de São Paulo, 2017.

PAOLINI, A. et al. Rhamnose-coated superparamagnetic iron-oxide nanoparticles: an evaluation of their *in vitro* cytotoxicity, genotoxicity and carcinogenicity. **Journal of Applied Toxicology**, v. 36, n. 4, p. 510–520, 2016.

PARK, C. et al. Synthesis of Mesoporous α -Fe₂O₃ Nanoparticles by Non-ionic Soft Template and Their Applications to Heavy Oil Upgrading. **Scientific Reports**, v. 6, p. srep39136, 2016.

PLACHTOVÁ, P. et al. Iron and Iron Oxide Nanoparticles Synthesized with Green Tea Extract: Differences in Ecotoxicological Profile and Ability To Degrade Malachite Green. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 6, n. 7, p. 8679–8687, 2018.

PRASAD, K. S.; GANDHI, P.; SELVARAJ, K. Synthesis of green nano iron particles (GnIP) and their application in adsorptive removal of As(III) and As(V) from aqueous solution. **Applied Surface Science**, v. 317, p. 1052–1059, 2014.

RALIYA, R. et al. Mechanistic evaluation of translocation and physiological impact of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles on the tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plant. **Metallomics**, v. 7, n. 12, p. 1584–1594, 2015.

RAMACHANDRAN, S.; PRASAD, N. R. Effect of ursolic acid, a triterpenoid antioxidant, on ultraviolet-B radiation-induced cytotoxicity, lipid peroxidation and DNA damage in human lymphocytes. **Chemico-Biological Interactions**, v. 176, n. 2, p. 99–107, 2008.

RAO, A. et al. Removal of hexavalent chromium ions by *Yarrowia lipolytica* cells modified with phyto-inspired Fe₀/Fe₃O₄ nanoparticles. **Journal of Contaminant Hydrology**, v. 146, p. 63–73, 2013.

RAO, K. L. N.; RAJU, K.; RAVISANKAR, H. Cultural conditions on the production of extracellular enzymes by *Trichoderma* isolates from tobacco rhizosphere. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 25–32, 2016.

RUTTKAY-NEDECKY, B. et al. Nanoparticles based on essential metals and their phytotoxicity. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 15, n. 1, p. 33, 2017.

SANTOS, T. R. T. et al. Development of α and γ -Fe₂O₃ decorated graphene oxides for glyphosate removal from water, **Environmental Technology**, v. 40, n. 9, p. 1118-1137, 2017.

SARAVANAKUMAR, K. et al. Cellulase from *Trichoderma harzianum* interacts with roots and triggers induced systemic resistance to foliar disease in maize. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. srep35543, 2016.

- SEABRA, A. B. et al. Preparation, Characterization, Cytotoxicity, and Genotoxicity Evaluations of Thiolated- and S-Nitrosated Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles: Implications for Cancer Treatment. **Chemical Research in Toxicology**, v. 27, n. 7, p. 1207–1218, 2014.
- SHUKLA, S. et al. *In vitro* toxicity assessment of chitosan oligosaccharide coated iron oxide nanoparticles. **Toxicology Reports**, v. 2, p. 27–39, 2015.
- SINGH, N. P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, n. 1, p. 184–191, 1988.
- SINGH, P.; RAJA, R. B. Biological synthesis and characterization of silver nanoparticles using the fungus *Trichoderma harzianum*. **Asian J. Exp. Biol. Sci.**, v.2, p. 600–605, 2011.
- SPIZZO, F. et al. Synthesis of Ferrofluids Made of Iron Oxide Nanoflowers: Interplay between Carrier Fluid and Magnetic Properties. **Nanomaterials**, v. 7, n. 11, p. 373, 2017.
- TRUSKEWYCZ, A.; SHUKLA, R.; BALL, A. S. Phytofabrication of Iron Nanoparticles for Hexavalent Chromium Remediation. **ACS Omega**, v. 3, n. 9, p. 10781–10790, 2018.
- UBANDO, A. T.; CHEN, W.; ONG, H. C. Iron oxide reduction by graphite and torrefied biomass analyzed by TG-FTIR for mitigating CO₂ emissions. **Energy**, v. 180, n. 1, p. 968–977, 2019.
- WANG, H. et al. Physiological effects of magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles on perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) and pumpkin (*Cucurbita mixta*) plants. **Nanotoxicology**, v. 5, n. 1, p. 30–42, 2011.
- WANG, Z.; FANG, C.; MEGHARAJ, M. Characterization of Iron–Polyphenol Nanoparticles Synthesized by Three Plant Extracts and Their Fenton Oxidation of Azo Dye. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 2, n. 4, p. 1022–1025, 2014.
- XIAO, Z. et al. Plant-mediated synthesis of highly active iron nanoparticles for Cr (VI) removal: Investigation of the leading biomolecules. **Chemosphere**, v. 150, p. 357–364, 2016.
- ZHANG, F. et al. Biocontrol potential of *Trichoderma harzianum* isolate T-aloe against *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. **Plant physiology and biochemistry: PPB**, v. 100, p. 64–74, 2016.

Material suplementar - *Trichoderma harzianum* as promoter to the synthesis of iron oxide nanoparticles and its potential applications in plant diseases

Ensaio de *Allium cepa*

O ensaio de *A. cepa* foi realizado com base na metodologia descrita por Fiskesjö (1985), na qual as raízes de *A. cepa* foram expostas às nanopartículas na concentração de $5,0 \times 10^7$ NPs.mL⁻¹ e a uma solução de *T. harzianum* a 127 µg.mL⁻¹ pelo período de 24 h, e em seguida fixadas em etanol:ácido acético (3:1 v:v). Após fixação as raízes foram hidrolisadas com HCl 1M (60°C), e coradas com reativo de Schiff. As lâminas foram preparadas por esmagamento da região meristemática das raízes com corante Carmim acético 2%. A análise foi realizada por contagem das células, considerando as fases da divisão celular e os danos presentes nessas fases. As amostras foram analisadas em triplicata e foi utilizado um controle negativo, no qual as raízes foram expostas à água destilada.

Para a avaliação foram calculados os índices mitóticos (nº de células em divisão/nº total de células) e índice de alterações cromossômicas (nº de células com danos encontrados/nº de células em divisão). Também foram calculados os índices relativos, onde cada índice obtido foi dividido pelo índice encontrado no controle.

Fitotoxicidade

Avaliação dos efeitos das nanopartículas sobre a germinação de sementes

Com o objetivo de verificar a viabilidade das sementes expostas as NpFe, foi realizado um teste de germinação de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris*), lentilha (*Lens culinaris*) e tomate (*Solanum lycopersicum*), culturas que podem ser afetadas pelo fitopatógeno *S. sclerotiorum*.

Para o teste as sementes de feijão, lentilha e tomate, inicialmente foram esterilizadas por imersão em hipoclorito de sódio 2 % por 15 minutos. A seguir estas foram lavadas e tratadas com as suspensões de NpFe a $5,0 \times 10^7$ NP.mL⁻¹, *T. harzianum* a 127 µg.mL⁻¹ e um controle apenas com água ultrapura também foi preparado. Vinte sementes foram colocadas em contato com 15 mL das suspensões, e permaneceram em agitação a 150 rpm por 1 hora. As sementes foram então transferidas para placas de Petri contendo uma camada de ágar (1,5% m/v). As placas foram cobertas e mantidas no escuro a 25°C. Após 5 dias, as sementes foram removidas das placas para verificar o índice de germinação de cada placa, cada tratamento foi preparado em triplicata (OLIVEIRA et al., 2018). A partir do número de sementes germinadas observadas

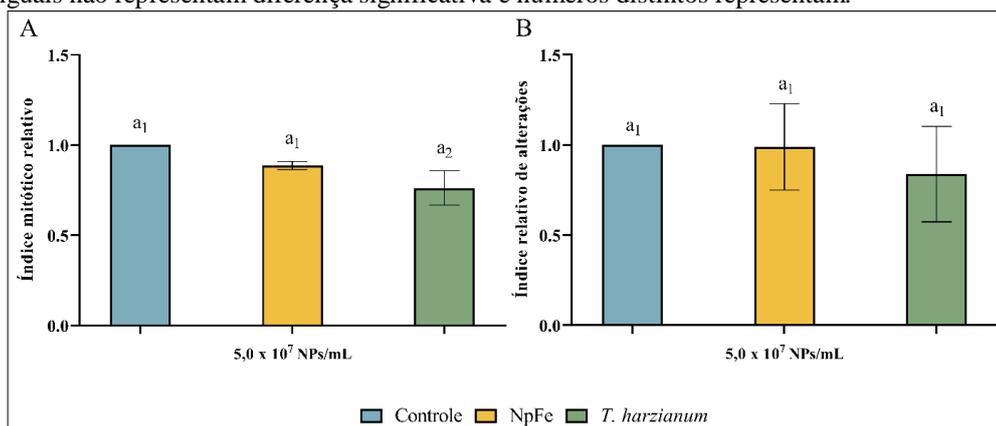
ao final do teste, foi calculado um índice de germinação (n° sementes germinadas na placa/ n° sementes totais na placa).

Resultados

Ensaio de *Allium cepa*

Para verificação dos efeitos genotóxicos das nanopartículas e possíveis alterações nos índices mitóticos foi realizado o ensaio *A. cepa*, onde os resultados mostraram que as NpFe sintetizadas não apresentaram alterações significativas do índice mitótico relativo em relação ao controle. No entanto, a exposição ao *T. harzianum* causou uma redução significativa no índice mitótico (Figura 1A). Em relação ao índice de alterações, nenhuma das amostras apresentou diferença significativa em relação ao controle (Figura 1B).

Figura 1S – Avaliação da genotoxicidade das nanopartículas biogênicas de óxido de ferro. (A) Índice mitótico. (B) Índice de alterações cromossômicas. A diferença estatística significativa considerada é $p < 0,05$, números iguais não representam diferença significativa e números distintos representam.

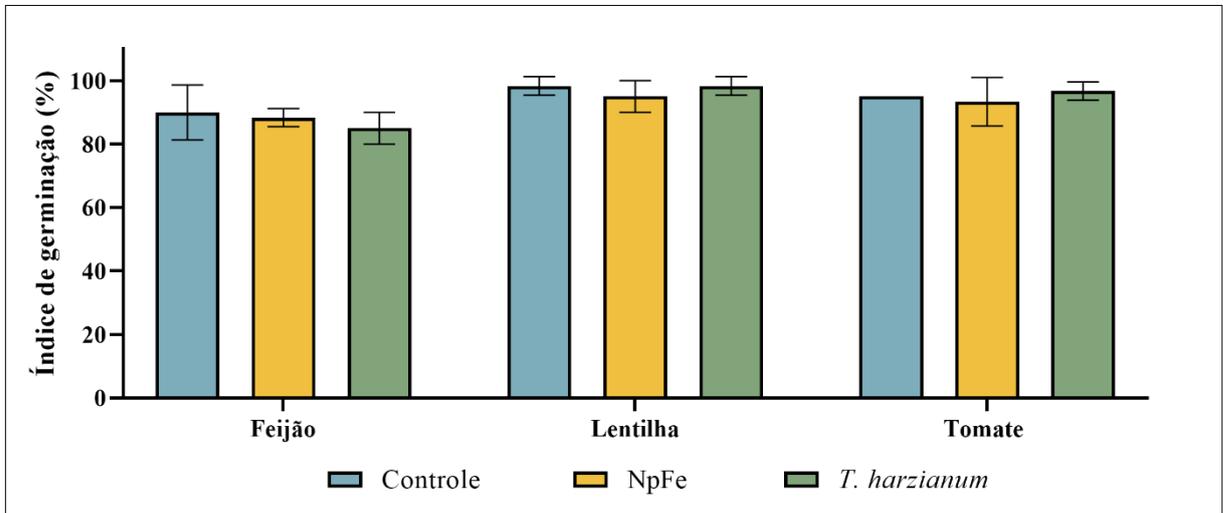


Fitotoxicidade

Avaliação dos efeitos das nanopartículas sobre a germinação

Não foram observadas alterações significativas entre os índices de germinação, em relação ao controle, em nenhuma das sementes (Figura 2), indicando que a nanopartícula biogênica de óxido de ferro não interferiu na germinação das sementes de feijão, lentilha e tomate.

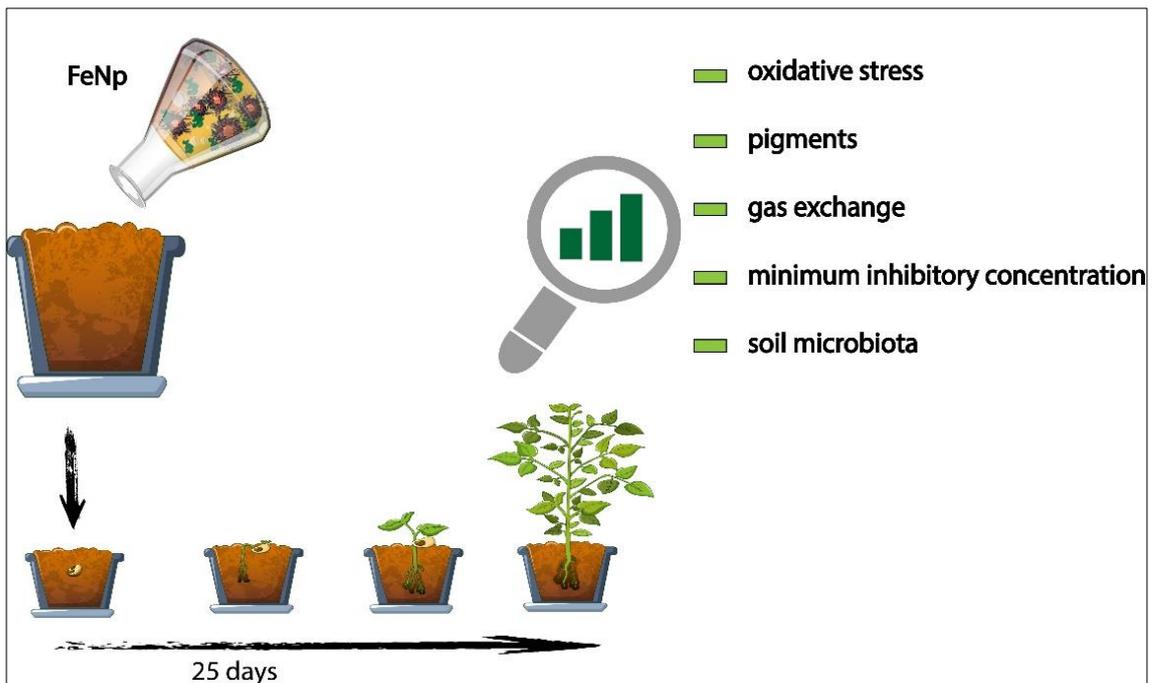
Figura 2S - Índice de germinação de sementes de feijão, lentilha e tomate expostas às nanopartículas biogênicas de óxido de ferro. A diferença estatística significativa considerada é $p < 0,05$, no entanto, para esse ensaio, as diferenças não foram significativas.



5.2 Artigo II

Study of the effects of fungi biogenic iron nanoparticles in plants and soil microbiota

Graphical abstract



Resumo

As nanopartículas biogênicas de ferro podem ser uma opção para o auxílio no controle de pragas ou fertilização do solo no setor agrícola. Estas possuem como característica a sinergia entre o cerne metálico e as biomoléculas encontradas em seu revestimento, as quais são oriundas do organismo utilizado para a síntese. Como o ferro é considerado um metal de baixa toxicidade para os organismos em geral, devido a sua biocompatibilidade, é considerado como uma alternativa ao uso de fertilizantes ou agrotóxicos. Podendo contribuir para sanar os problemas existentes, como por exemplo, a toxicidade e o controle de pragas. Este estudo avaliou os efeitos de nanopartículas biogênicas de óxido de ferro a partir de *Trichoderma harzianum* em plantas de soja, através de parâmetros como morfologia, estresse oxidativo, pigmentos e trocas gasosas, em bactérias de interesse agrícola (*Bacillus thuringiensis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bradyrhizobium japonicum*) e o fungo *Beauveria bassiana*, assim como a microbiota do solo relacionada ao ciclo do nitrogênio. As nanopartículas causaram poucas alterações nas plantas de soja, sendo registrado apenas um aumento na área foliar e induziram um aumento de peróxido nas folhas, não acompanhado de aumento na peroxidação lipídica. O crescimento dos microrganismos não foi afetado pela exposição às nanopartículas e a microbiota do solo não apresentou grandes alterações. Os resultados indicam potencial de aplicação na agricultura das nanopartículas biogênicas de óxido de ferro, porém maiores estudos são necessários para garantir sua aplicação segura.

Introdução

As nanopartículas de ferro podem ser utilizadas em diversas áreas como biomedicina, tratamentos ambientais e agricultura, seja como biossensores, praguicidas ou fertilizantes (ALI

et al., 2016; XU et al., 2014), devido a sua utilização e futuras possibilidades, a sua resposta ao ambiente e organismos deve ser avaliada. Em geral as nanopartículas de ferro são conhecidas por apresentar menor toxicidade, e na área agrícola, em alguns casos são capazes de melhorar o desempenho de plantas (RUI et al., 2016). No entanto, em concentrações muito altas podem ser prejudiciais (BOMBIN et al., 2015; LI et al., 2015), pois podem se agregar e impedir a passagem de nutrientes para as plantas.

Além da concentração, os diferentes tipos de nanopartículas de ferro podem variar em relação a sua toxicidade. Nanopartículas de ferro zero valente se mostraram mais tóxicas que nanopartículas de óxido de ferro sobre *Chlorella pyrenoidosa*, e entre as nanopartículas de óxido de ferro, as de Fe₃O₄ foram mais tóxicas que as de Fe₂O₃, além disso quanto menor o tamanho da nanopartícula de ferro zero valente, maior a sua toxicidade (LEI et al., 2016).

Em relação ao tipo de síntese, as nanopartículas de síntese biológica em geral são mais estáveis e consideradas sustentáveis por não apresentarem resíduos químicos. A síntese biológica também resulta em nanopartículas que sofrem menor agregação no ambiente, além da possibilidade de alteração de suas propriedades e atividade dependendo do agente biológico utilizado, o qual pode dar origem a diferentes revestimentos denominados de *capping*. A maioria das nanopartículas biogênicas de ferro descritas na literatura são designadas para tratamentos ambientais, como a degradação de compostos tóxicos (EHRAMPOUSH et al., 2015; PLACHTOVÁ et al., 2018; TRUSKEWYCZ; SHUKLA; BALL, 2018; XIAO et al., 2016), atividade antioxidante (DESHMUKH; GUPTA; KIM, 2019) e atividade antimicrobiana (DANIEL et al., 2012; MOHAMED et al., 2015; PATRA et al., 2017).

Buscando verificar os efeitos das nanopartículas de óxido de ferro sintetizadas a partir de *Trichoderma harzianum* (NpFe) no ambiente, este trabalho avalia a possível toxicidade em plantas de soja, microrganismos de interesse agrícola e avalia seus efeitos sobre a microbiota do solo responsável pelo ciclo de nitrogênio, através de análises de genes específicos.

Método

Síntese e Caracterização das nanopartículas de óxido de ferro

As nanopartículas de óxido de ferro (NpFe) utilizadas para este trabalho foram sintetizadas por via biogênicas utilizando *Trichoderma harzianum* e apresentam as

características a seguir: Diâmetro médio $185,0 \pm 4,0$ nm pela Microscopia Eletrônica de Varredura, índice de polidispersão de $0,4 \pm 0,1$, potencial zeta de $13,5 \pm 2,0$ mV e pH de 5,0.

Ação das nanopartículas em plantas de soja

As avaliações dos efeitos das NpFe sobre a soja (*Glycine max*) foram realizadas na Universidade Estadual de Londrina (UEL). A soja foi cultivada em vasos plásticos com diâmetro de 14 cm, em solo de baixa fertilidade previamente tratado com as NpFe na proporção de $2,35 \times 10^{11}$ Nps/m², quantidade utilizada para o controle de *S. sclerotiorum*. Foram plantadas 5 sementes por vaso, com 5 repetições, sendo utilizado como controle o mesmo solo sem exposição às nanopartículas.

O solo apresentava pH de 5,8 e era composto por 4 g/dm³ de matéria orgânica, 7 mg/dm³ de fósforo, 0,04 cmolc/dm³ de potássio, 0,8 cmolc/dm³ de cálcio, 0,7 cmolc/dm³ de magnésio, cmolc/dm³ de H+Al₂, 1,5 cmolc/dm³ de SB (soma de bases), 3,5 cmolc/dm³ de CTC (capacidade de troca de cátions), V% (porcentagem de saturação por base) de 44, 9 mg/dm³ de enxofre, 0,08 mg/dm³ de boro, 0,1 mg/dm³ de cobre, 1 mg/dm³ de ferro, 0,2 mg/dm³ de manganês e 0,2 mg/dm³ de zinco.

As plantas foram mantidas em casa de vegetação em temperatura ambiente (25°C) e condições naturais de umidade e luminosidade, sendo irrigadas diariamente, pelo período de 25 dias, com aplicação de 50 mL de solução nutritiva (composta por 1 mM KH₂PO₄, 4 mM Ca(NO₃)₂.4H₂O, 2 mM K₂SO₄, 4 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgSO₄.7H₂O, 92,5 µM H₃BO₃, 18 µM MnCl₂.4H₂O, 1,5 µM ZnCl₂, 0,56 µM Na₂MoO₄.2H₂O, 0,66 µM CuCl₂.2H₂O, 100 µM FeSO₄) na metade desse período.

Análise da morfologia das plantas

Na análise de morfologia das plantas de soja, as medidas de comprimento da parte aérea, comprimento da raiz, área foliar e massa seca da raiz e da parte aérea foram realizadas e posteriormente.

Estresse oxidativo

Para a realização das análises de estresse oxidativo as amostras foram previamente preparadas realizando a maceração de 100 mg dos tecidos vegetais (raiz ou folha) em nitrogênio líquido e adição de 1 mL de solução a 4 °C de ácido tricloroacético (TCA) 0,2 % em metanol, seguida de centrifugação a 12000 rpm e 4 °C por 5 minutos, apenas o sobrenadante foi utilizado.

Para a análise de peróxido de hidrogênio, 100 µL do sobrenadante foi adicionado a 500 µL de iodeto de potássio (KI) 1M e tampão fosfato de potássio (PBS) pH 7,5 (4:1), onde foi incubado por 1 hora no gelo e na ausência de luz. Ao fim do período foi realizada a leitura da absorbância (390 nm) em placas de 96 poços utilizando o equipamento VICTOR TM 3 (*Perkin Elmer, Turku, Finland*) (ALEXIEVA et al., 2001).

A análise de peroxidação lipídica pelo método TBARS, 40 µL do sobrenadante foi adicionado a 200 µL de tampão de reação (PBS pH 7,5, TCA 50% e hidroxitolueno butilado (BHT) 1mM em etanol 95% (14:5:1)), seguido de adição de 75 µL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 1,3% em NaOH 0,3% e incubação em estufa a 60°C por 1 hora. Ao final do período foi realizada a leitura da fluorescência (excitação de 530 nm e emissão de 550 nm) em placas de 96 poços utilizando o equipamento VICTOR TM 3 (*Perkin Elmer, Turku, Finland*) (CAMEJO; WALLIN; ENOJÄRVI, 1998). Para ambas as análises foram utilizados padrões para curva de calibração (H₂O₂ para análise de peróxido e MDA para análise de peroxidação lipídica) e água como branco.

Para a análise de dienos conjugados, os tecidos vegetais foram macerados em nitrogênio líquido. Posteriormente, foi adicionado 1 mL de etanol 96% gelado e as amostras foram transferidas para *ependorfs* de 2 mL e colocadas no gelo. Em seguida, foi realizada centrifugação a 12000 rpm, à 4°C por 20 minutos e leitura em espectrofotômetro nos comprimentos de onda 234 nm e 500 nm.

Pigmentos

Para a avaliação dos pigmentos de clorofila a, clorofila b e carotenoides, 0,05 g do tecido vegetal foi macerado em nitrogênio líquido e adicionados 5 mL de uma solução de acetona + tampão fosfato de sódio, mantendo as amostras em gelo. Foi então realizada agitação em *vortex* seguida de centrifugação a 4000 rpm por 10 minutos. As leituras dos sobrenadantes

foram realizadas em cubetas de quartzo nos seguintes comprimentos de onda: 663 nm, 646 nm e 470 nm.

Baseada nas absorvâncias obtidas nos comprimentos de onda acima citados foi possível realizar a quantificação de clorofila a (Equação 1), clorofila b (Equação 2) e carotenoides (Equação 3).

$$\text{Clorofila } a = 12,25 \times A_{663} - 2,79 \times A_{646} \quad \text{Equação 1}$$

$$\text{Clorofila } b = 21,5 \times A_{646} - 5,1 \times A_{663} \quad \text{Equação 2}$$

$$\text{Carotenoides} = \frac{1000 \times A_{470} - 1,82 \times \text{Clorofila } a - 85,02 \times \text{Clorofila } b}{198} \quad \text{Equação 3}$$

Onde A663, A646 e A470 corresponde aos valores de absorvância dos respectivos comprimentos de onda.

Trocas gasosas

As análises de fotossíntese foram realizadas anteriormente a coleta das plantas utilizando um analisador portátil de trocas gasosas por infravermelho (Irga) modelo LICOR 6400 XT. Para as análises foram escolhidas duas folhas íntegras e expandidas de cada replicata. Por meio dessas análises foram obtidos os dados: taxa de fotossíntese, condutância estomática, concentração intercelular de CO₂, transpiração, eficiência no uso da água, eficiência intrínseca no uso da água e carboxilação.

Concentração mínima inibitória (MIC)

O teste de concentração inibitória mínima (MIC) foi realizado conforme metodologia de Palomino et al. (2002), o objetivo do teste foi avaliar a atividade das nanopartículas nestes microrganismos de importância na área agrícola: *Bacillus thuringiensis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bradyrhizobium japonicum* e *Beauveria bassiana*.

Os microrganismos foram cultivados por 24h, em seguida foram transferidos para placas de 96 poços em uma concentração de 5×10^5 UFC/mL, e expostos às nanopartículas em concentrações decrescentes entre $5,0 \times 10^9$ a $5,0 \times 10^2$ NPs/mL. Após incubação (37 °C por 24 h) foi adicionada solução de Resazurina (6,75 mg/mL) e as placas foram incubadas por mais 24 horas. Os ensaios foram realizados em duplicata para cada amostra e foram preparados dois

tipos de controle, o primeiro contendo os microrganismos sem nanopartículas e o segundo contendo meio de cultura sem microrganismos.

A análise dos resultados foi realizada visualmente, sendo a mudança da cor azul para rosa considerada o indicativo de crescimento dos microrganismos, uma vez que na presença de células viáveis, o resazurin é reduzido a resorufin, causando uma mudança na coloração, passando de azul para rosa, permitindo a detecção do crescimento de microrganismos sem a necessidade de espectrofotômetro.

Análise molecular da microbiota do solo

Para verificar possíveis alterações na microbiota responsável pelo ciclo de nitrogênio no solo exposto às nanopartículas biogênicas de óxido de ferro, foi realizada a análise molecular do solo utilizando genes diretamente envolvidos neste ciclo. Inicialmente o solo foi peneirado e separado em alíquotas de 10 g em tubos de propileno de 50 mL. Foram preparadas uma amostra controle (apenas solo), amostra de solo exposto à nanopartícula na concentração de $5,0 \times 10^7$ NPs/mL e uma amostra contendo *T. harzianum* na concentração proporcional à de uso no campo. Adicionou-se água até a saturação de 60%. Após finalização do preparo do microcosmo este foi coberto e mantido no escuro em temperatura ambiente (25°C) (HJELMSØ et al., 2014).

A extração de DNA foi realizada utilizando o *Power Soil® DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories)*. No dia da exposição foi extraído o DNA da amostra sem tratamento (solo zero), indicativo das condições iniciais. As extrações de DNA das amostras de solo foram realizadas nos intervalos de 15 e 360 dias após a exposição. O DNA extraído foi quantificado utilizando *Qubit 3.0 Fluorometer*, com o *Qubit ds DNA BR Assay Kit (Invitrogen)* e a partir das concentrações de DNA obtidas as amostras foram diluídas para a concentração final de 100 ng/mL.

A quantificação de genes de bactérias do ciclo do nitrogênio foi realizada por reação em cadeia de polimerase em tempo real (qPCR) utilizando primers específicos para esses genes, sendo as amostras e genes avaliados em duplicata pelo equipamento termociclador *Step One SYSTEM*. Os primers utilizados são referentes a genes específicos envolvidos com o ciclo do nitrogênio (*Bacterial ammonium monooxygenase*, *Nitrogenasereductase*, *Cu-containing nitrite reductase*, *Nitrite reductase*, *Nitrate reductase*, *Nitrous oxide reductase* e *Nitratereductase*) com as condições para a amplificação descritas por Maruyama et al. (2016). Para a

quantificação relativa do DNA foi utilizado o 16S rRNA como gene referência para as bactérias, e como amostra controle foi utilizado o DNA do solo zero extraído no início do experimento.

Análise estatística

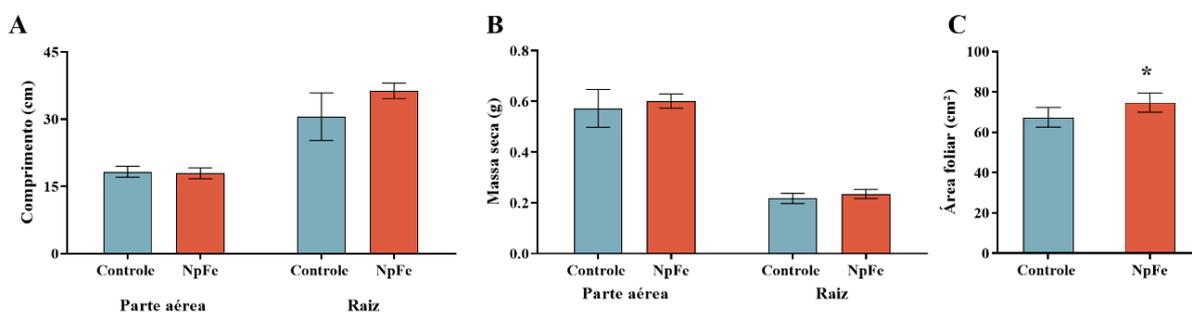
A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA, seguida do Tukey's HSD *post hoc test* (variâncias iguais), programa *GraphPad Prism*. Para a análise de qPCR foi utilizado $\Delta\Delta C_t$. A significância estatística foi definida como $p < 0,05$.

Resultados e discussão

Ação das nanopartículas em plantas de soja

Os resultados de análise morfológica das plantas mostram que as medidas de comprimento de parte aérea e raiz (Figura 1A) e massa seca (Figura 1C) das plantas de soja submetidas ao tratamento com nanopartículas biogênicas de óxido de ferro não apresentaram diferenças significativas quando comparadas com o controle negativo. Já os dados de área foliar foram significativamente maiores para as nanopartículas biogênicas de óxido de ferro quando comparados com o controle negativo (Figura 1B).

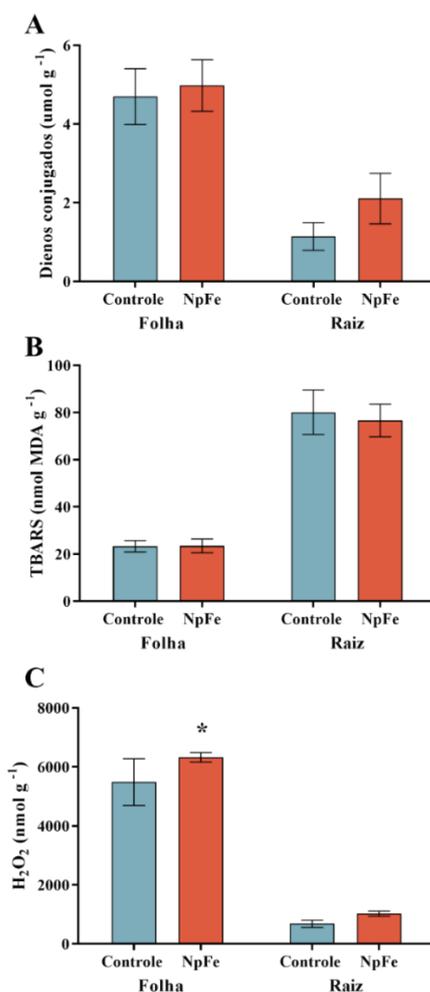
Figura 1 – Análises morfológicas das plantas de soja expostas às NpFe na proporção de $2,35 \times 10^{11}$ NPs/m². (A) Comprimento da parte aérea e raiz; (B) Área foliar; (C) Massa seca da parte aérea e raiz. Onde $p < 0,05$.



As análises de estresse oxidativo mostraram que as nanopartículas biogênicas de óxido de ferro apenas induziram um aumento significativo de peróxido nas folhas (Figura 2C) não acompanhado de um aumento na peroxidação lipídica (Figura 2B). Não foram observadas diferenças significativas de dienos conjugados entre as plantas tratadas com nanopartículas biogênicas de óxido de ferro e o controle negativo (Figura 2A). A presença do peróxido de hidrogênio em plantas é um indicativo da produção de espécies reativas de oxigênio que podem

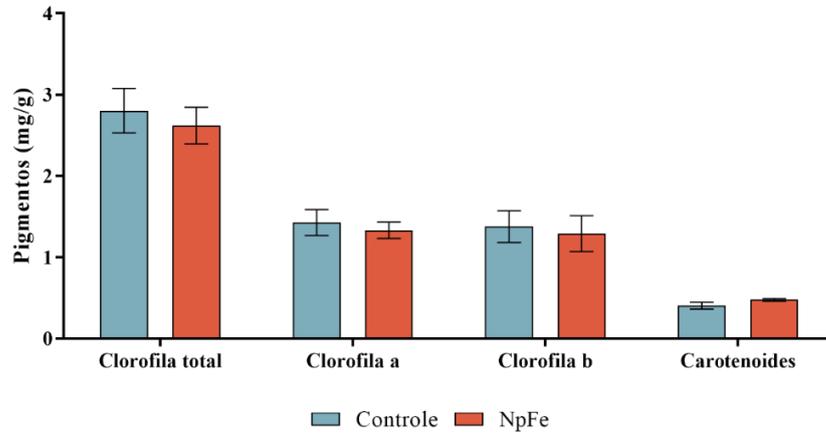
levar à morte celular em altas quantidades, no entanto baixas quantidades de peróxido de hidrogênio podem induzir mecanismos de proteção na planta (ALEXIEVA et al., 2001; GECHEV et al., 2006).

Figura 2 – Análises de marcadores de estresse oxidativo em plantas de soja expostas às NpFe na proporção de $2,35 \times 10^{11}$ NPs/m². **(A)** Dienos Conjugados das folhas e raiz; **(B)** Peroxidação lipídica das folhas e raiz; **(C)** Peróxidos das folhas e raiz.



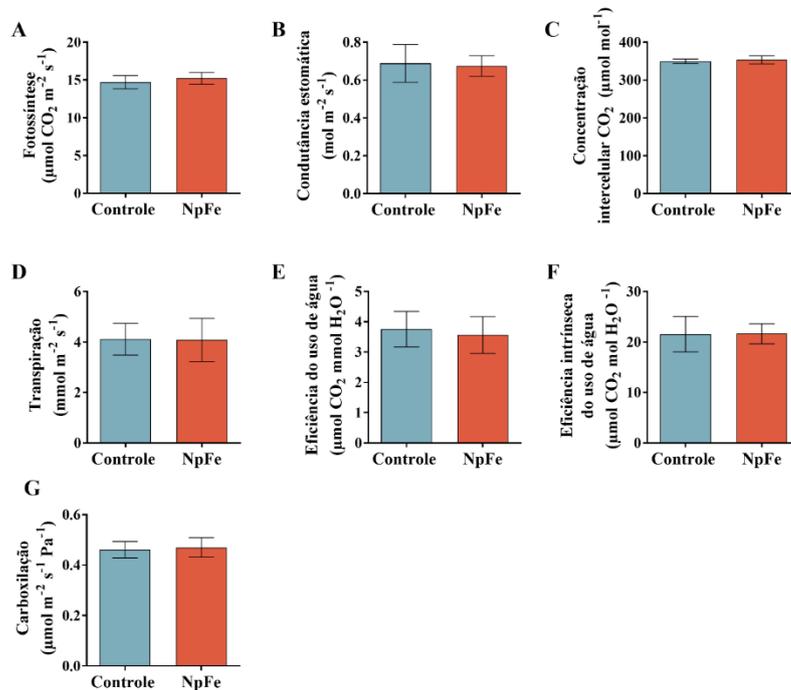
Em relação a quantificação de pigmentos, os resultados não apresentaram diferenças significativas entre as plantas tratadas com as nanopartículas biogênicas de óxido de ferro e o controle negativo (Figura 3).

Figura 3 – Análises da quantidade de clorofila total, clorofila a, clorofila b e carotenoides das plantas de soja expostas às NpFe na proporção de $2,35 \times 10^{11}$ NPs/m².



Da mesma forma que a quantificação de pigmentos das folhas, os resultados das análises de troca gasosa não apresentaram diferenças significativas em nenhum dos parâmetros avaliados (Figura 4).

Figura 4 – Análises de trocas gasosas das plantas de soja expostas às NpFe na proporção de $2,35 \times 10^{11}$ NPs/m². (A) Fotossíntese; (B) Condutância estomática; (C) Concentração intercelular de CO₂; (D) Taxa de transpiração; (E) Eficiência do uso da água; (F) Eficiência intrínseca do uso da água; (G) Taxa de carboxilação.



Nanopartículas de ferro testadas em *Lolium perene L.* e *Curcubita mixta* não causaram alterações significativas nas medidas do comprimento da parte aérea e raiz das plantas e induziram estresse oxidativo (WANG et al., 2011), assim como neste trabalho. Outros efeitos das nanopartículas de ferro como a redução no comprimento das raízes de *Arabidopsis thaliana*

(BOMBIN et al., 2015) ou a promoção do crescimento de *Arachis hypogaea* (LI et al., 2015; RUI et al., 2016) foram registrados em outros trabalhos, onde os efeitos negativos das nanopartículas de ferro em plantas geralmente se dá devido ao seu acúmulo e agregação na raiz, impedindo o transporte de nutrientes.

Aumentos no nível de estresse oxidativo e de clorofila foram observados em folhas de plantas de melancia (*Citrulus lanatus*) expostas à nanopartículas de ferro (WANG et al., 2016). O aumento de clorofila em plantas expostas à nanopartículas de ferro também foi observado em *Arachis hypogaea* (RUI et al., 2016) e em *Citrus máxima* dependendo da concentração utilizada (HU et al., 2017). No entanto, neste trabalho não foram observadas alterações significativas nos níveis de clorofila das plantas. Ghafariyan et al. (2013) também não observaram diferença na eficiência da fotossíntese de plantas de soja expostas à nanopartículas de ferro em sistema hidropônico. Plantas de arroz inoculadas com *Trichoderma* sp. apresentaram um aumento na taxa de fotossíntese, condutância estomática, transpiração, concentração intracelular de CO₂, e eficiência de uso da água (DONI et al., 2014).

Concentração mínima inibitória (MIC)

A partir do teste foi possível observar que as nanopartículas não inibiram o crescimento dos microrganismos em nenhuma das concentrações testadas, incluindo a concentração de interesse ($5,0 \times 10^7$ NPs/mL), indicando baixa toxicidade das nanopartículas sobre estes microrganismos.

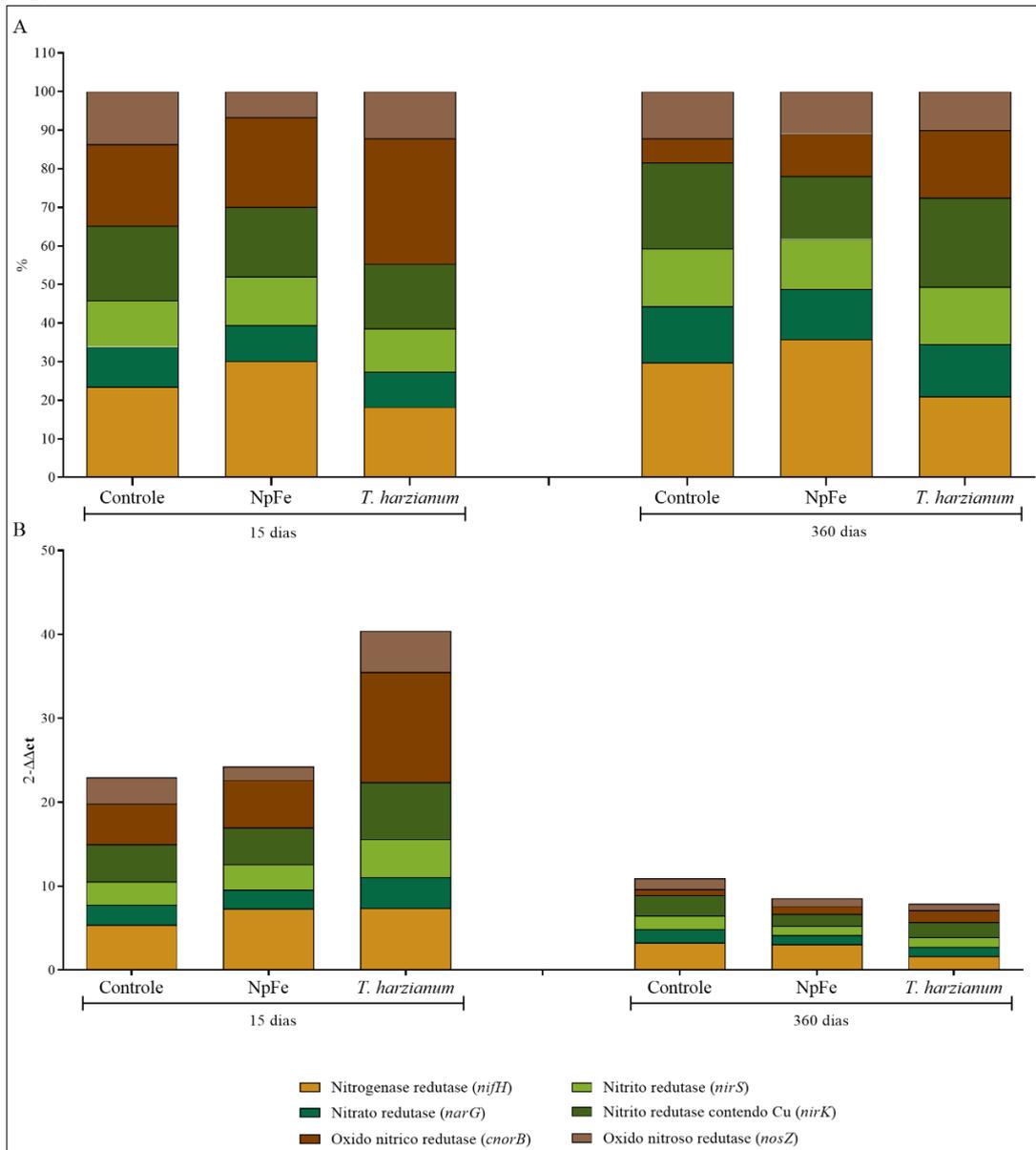
Entretanto outras nanopartículas biogênicas de ferro, sintetizadas a partir de outros organismos, apresentaram potencial antimicrobiano contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (MOHAMED et al., 2015) e contra patógenos humanos (*E. coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas fluorescens*, *B. subtilis* e *S. aureus*) (DANIEL et al., 2012), indicando que os diferentes recobrimentos influenciam na atividade das nanopartículas.

Análise molecular da microbiota do solo

Através da quantificação molecular por qPCR, foi possível obter a quantidade das diferentes bactérias pertencentes ao ciclo do nitrogênio em cada um dos solos tratados. Obteve-

se uma quantificação relativa dos genes das etapas de fixação e desnitrificação em relação ao gene *16s* (Figura 5B), e também é possível observar a proporção dos diferentes genes em cada um dos solos (Figura 5A).

Figura 5 – Análise molecular dos genes das bactérias envolvidas no ciclo do nitrogênio em solo exposto às NpFe na concentração $5,0 \times 10^7$ NPs/mL ou *T. harzianum* na concentração indicada para uso na lavoura, após 15 dias e 360 dias de exposição. (A) Distribuição percentual de cada um dos genes; (B) Quantificação relativa dos genes por qPCR.



É possível notar que os solos tratados com nanopartículas biogênicas de óxido de ferro e *T. harzianum* apresentaram perfis similares ao controle após o período de 15 e 360 dias, indicando que não prejudicaram a microbiota envolvida no ciclo do nitrogênio. Após o período de 360 dias é possível notar uma queda na quantidade de bactérias, no entanto o mesmo

acontece no controle, a redução da quantidade de bactérias pode estar envolvida com a mudança da umidade do solo após esse período.

Em um estudo realizado por Guilger et al. (2017) onde foi avaliado o efeito de nanopartículas de prata sintetizadas a partir de *T. harzianum* na microbiota do solo, após o período de 360 dias houve o aumento na quantidade de bactérias envolvidas no ciclo do nitrogênio, no entanto as nanopartículas causaram alterações na proporção entre bactérias das etapas da nitrificação, fixação e desnitrificação.

Não existem muitos estudos sobre o efeito das nanopartículas de ferro sobre a microbiota envolvida no ciclo do nitrogênio. Burke et al. (2015) avaliaram os efeitos de nanopartículas de óxido de ferro e de dióxido de titânio na rizosfera de plantas de soja, e perceberam que as nanopartículas de óxido de ferro carregadas positivamente aumentaram a quantidade de bactérias fixadoras de nitrogênio enquanto as nanopartículas de dióxido de titânio tiveram um impacto negativo. As nanopartículas de óxido de ferro também tiveram efeitos positivos na atividade metabólica bacteriana, aumentando o seu potencial de nitrificação (HE et al., 2016).

Conclusão

As nanopartículas biogênicas de óxido de ferro não apresentaram alterações significativas nas plantas de soja, apenas um aumento de área foliar e aumento de peróxido nas folhas. É sabido que as nanopartículas de ferro podem apresentar efeitos positivos ou negativos nas plantas, dependendo da concentração utilizada, neste caso a concentração de ferro utilizada é muito baixa, principalmente quando comparada com outros estudos.

Estudos mostram que algumas cepas de *Trichoderma* spp. podem ajudar no crescimento de plantas, no entanto, algumas cepas são melhores para o controle biológico, como é o caso da cepa utilizada para a síntese das nanopartículas de óxido de ferro deste trabalho.

As bactérias de importância agrícola (*Bacillus thuringiensis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bradyrhizobium japonicum*) e o fungo *B. bassiana*, assim como as bactérias envolvidas no ciclo do nitrogênio não foram afetadas pela exposição às nanopartículas biogênicas de óxido de ferro, indicando que as nanopartículas podem ser utilizadas no controle de fitopatógenos, minimizando o impacto no ambiente, mostrando uma boa alternativa aos agrotóxicos.

A utilização de nanopartículas metálicas na área agrícola ainda é algo novo e sofre preconceito em relação a toxicidade, porém devemos lembrar que nanopartículas biogênicas carregam características diferenciadas e podem apresentar sinergia com os metabolitos utilizados, o que confere a estas atividade diferenciada, podendo ser mais específicas no combate a patógenos e não apresentando os efeitos observados de algumas nanopartículas de síntese química. Desta maneira seria interessante uma melhor avaliação destas nanopartículas visando a possibilidade da sua utilização no controle de pragas ou fertilização do solo, sendo uma ferramenta a mais para enfrentar os problemas atuais existentes na área.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP –Processo nº 2017/20932-6 e nº 2017/21004-5).

Referências

- ALEXIEVA, V. et al. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. **Plant, Cell & Environment**, v.24, p.1337–1344, 2001.
- ALI, A. et al. Synthesis, characterization, applications, and challenges of iron oxide nanoparticles. **Nanotechnology, Science and Applications**, v. 9, p. 49–67, 2016.
- BOMBIN, S. et al. Developmental and Reproductive Effects of Iron Oxide Nanoparticles in *Arabidopsis thaliana*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 10, p. 24174–24193, 2015.
- BURKE, D. J. et al. Iron Oxide and Titanium Dioxide Nanoparticle Effects on Plant Performance and Root Associated Microbes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 10, p. 23630–23650, 2015.
- CAMEJO, G.; WALLIN, B.; ENOJÄRVI, M. Analysis of Oxidation and Antioxidants Using Microtiter Plates. In: ARMSTRONG, D. (Ed.). **Free Radical and Antioxidant Protocols**. Methods in Molecular Biology™. Totowa, NJ: Humana Press, 1998. v. 108p. 377–387, 1998.
- DANIEL, S. C. G. et al. Biosynthesis of Cu, ZVI, and Ag nanoparticles using *Dodonaea viscosa* extract for antibacterial activity against human pathogens. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 15, n. 1, p. 1319, . 2012.
- DESHMUKH, A. R.; GUPTA, A.; KIM, B. S. Ultrasound Assisted Green Synthesis of Silver and Iron Oxide Nanoparticles Using Fenugreek Seed Extract and Their Enhanced Antibacterial and Antioxidant Activities. **BioMed Research International**, v. 2019, p. 1–14, 2019.

- DONI, F. et al. Physiological and growth response of rice plants (*Oryza sativa* L.) to *Trichoderma* spp. inoculants. **AMB Express**, v. 4, n. 1, p. 45, 2014.
- EHRAMPOUSH, M. H. et al. Cadmium removal from aqueous solution by green synthesis iron oxide nanoparticles with tangerine peel extract. **Journal of Environmental Health Science and Engineering**, v. 13, 2015.
- GECHEV, T. S. et al. Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. **BioEssays**, v. 28, n. 11, p. 1091-1101, 2006.
- GHAFAFIYAN, M. H. et al. Effects of Magnetite Nanoparticles on Soybean Chlorophyll. **Environmental Science & Technology**, v. 47, n. 18, p. 10645–10652, 2013.
- HE, S. et al. Different responses of soil microbial metabolic activity to silver and iron oxide nanoparticles. **Chemosphere**, v. 147, p. 195–202, 2016.
- HJELMSØ, M. H. et al. High-resolution melt analysis for rapid comparison of bacterial community compositions. **Applied and environmental microbiology**, v. 80, n. 12, p. 3568–3575, 2014.
- HU, J. et al. Comparative impacts of iron oxide nanoparticles and ferric ions on the growth of *Citrus maxima*. **Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)**, v. 221, p. 199–208, 2017.
- LEI, C. et al. Toxicity of iron-based nanoparticles to green algae: Effects of particle size, crystal phase, oxidation state and environmental aging. **Environmental Pollution**, v. 218, p. 505–512, 2016.
- LI, X. et al. Stimulation of Peanut Seedling Development and Growth by Zero-Valent Iron Nanoparticles at Low Concentrations. **PLOS ONE**, v. 10, n. 4, p. e0122884, 2015.
- MARUYAMA, C. R. et al. Nanoparticles Based on Chitosan as Carriers for the Combined Herbicides Imazapic and Imazapyr. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. srep19768, 2016.
- MOHAMED, M. I. et al. Nanotoxic Profiling of Novel Iron Oxide Nanoparticles Functionalized with Perchloric Acid and SiPEG as a Radiographic Contrast Medium. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–7, 2015.
- MUTURI, E. J. et al. Effect of pesticides on microbial communities in container aquatic habitats. **Scientific Reports**, v. 7, p. srep44565, 2017.
- PALOMINO, J.-C. et al. Resazurin Microtiter Assay Plate: Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2720–2722, 2002.
- PATRA, J. K. et al. Proteasome inhibitory, antioxidant, and synergistic antibacterial and anticandidal activity of green biosynthesized magnetic Fe₃O₄ nanoparticles using the aqueous extract of corn (*Zea mays* L.) ear leaves. **Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology**, v. 45, n. 2, p. 349–356, 2017.
- PLACHTOVÁ, P. et al. Iron and Iron Oxide Nanoparticles Synthesized with Green Tea Extract: Differences in Ecotoxicological Profile and Ability To Degrade Malachite Green. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 6, n. 7, p. 8679–8687, 2018.

RUI, M. et al. Iron Oxide Nanoparticles as a Potential Iron Fertilizer for Peanut (*Arachis hypogaea*). **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 815, 2016.

TRUSKEWYCZ, A.; SHUKLA, R.; BALL, A. S. Phytofabrication of Iron Nanoparticles for Hexavalent Chromium Remediation. **ACS Omega**, v. 3, n. 9, p. 10781–10790, 2018.

WANG, H. et al. Physiological effects of magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles on perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) and pumpkin (*Cucurbita mixta*) plants. **Nanotoxicology**, v. 5, n. 1, p. 30–42, 2011.

WANG, Y. et al. *In vitro* assessment of physiological changes of watermelon (*Citrullus lanatus*) upon iron oxide nanoparticles exposure. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 108, p. 353–360, 2016.

XIAO, Z. et al. Plant-mediated synthesis of highly active iron nanoparticles for Cr (VI) removal: Investigation of the leading biomolecules. **Chemosphere**, v. 150, p. 357–364, 2016.

XU, J.-K. et al. Bio and Nanomaterials Based on Fe₃O₄. **Molecules**, v. 19, n. 12, p. 21506–21528, 2014.

6 CONCLUSÕES GERAIS

Foi possível realizar a síntese de nanopartículas biogênicas de óxido de ferro através de cinco metodologias diferentes, todas as sínteses foram eficazes e resultaram em nanopartículas com diferentes características físico-químicas.

Após serem testadas para o controle do fitopatógeno *S. sclerotiorum*, a nanopartícula escolhida foi a NpFe-4, pois apresentou melhor atividade fungicida. Após a escolha da nanopartícula, foi realizada uma síntese utilizando filtrado de *T. harzianum* estimulado com parede de *S. sclerotiorum*, visando obter um maior número de enzimas e assim um nanopartícula com melhor atividade. No entanto a atividade das nanopartículas com e sem estímulo foram semelhantes e devido a uma maior praticidade da síntese de NpFe-4 sem estímulo, esta foi a escolhida para dar seguimento às demais análises.

O *T. harzianum* carreado nas nanopartículas apresentou melhor desenvolvimento, mesmo quando exposto à radiação UV, permitindo uma maior ação contra o fitopatógeno *S. sclerotiorum* e maior produção de enzimas quando comparado com o *T. harzianum* comercial.

As nanopartículas biogênicas de óxido de ferro não apresentaram citotoxicidade nas linhagens testadas em nenhuma das concentrações e apresentaram genotoxicidade em fibroblastos (V79 e 3T3) na concentração $5,0 \times 10^9$ NPs/mL.

Em relação à fitotoxicidade, as nanopartículas induziram apenas um aumento no estresse oxidativo de folhas de plantas de soja e aumento da área foliar, os outros parâmetros avaliados não mostraram alterações significativas. As bactérias de importância agrícola e presentes no ciclo do nitrogênio também não foram afetadas quando expostas às nanopartículas biogênicas de óxido de ferro.

Os resultados apresentados mostram que as nanopartículas biogênicas de óxido de ferro utilizando *Trichoderma harzianum* como agente estabilizante apresenta indícios de ser uma nanopartícula eficiente no controle de pragas e de baixa toxicidade, podendo ser uma opção viável para auxiliar na atividade agrícola.

7 REFERÊNCIAS

- AHLUWALIA, V. et al. Green synthesis of silver nanoparticles by *Trichoderma harzianum* and their bio-efficacy evaluation against *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae*. **Industrial Crops and Products**, v. 55, p. 202–206, 2014.
- ARIF, N. et al. Current Trends of Engineered Nanoparticles (ENPs) in Sustainable Agriculture: An Overview. **Journal of Environmental & Analytical Toxicology**, v. 6, n. 5, p. 1000397, 2016.
- ASLI, S.; NEUMANN, P. M. Colloidal suspensions of clay or titanium dioxide nanoparticles can inhibit leaf growth and transpiration via physical effects on root water transport. **Plant, Cell & Environment**, v. 32, n. 5, p. 577–584, 2009.
- BETTIOL, W. **Biocontrole de doenças de plantas uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009.
- BOMFIM, M. P. et al. Avaliação antagonista *in vitro* e *in vivo* de *Trichoderma* spp. a *Rhizopus stolonifer* em maracujazeiro amarelo. **Summa Phytopathologica**, v. 36, n. 1, p. 61–67, 2010.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 248–254, 1976.
- BURKE, D. J. et al. Iron Oxide and Titanium Dioxide Nanoparticle Effects on Plant Performance and Root Associated Microbes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 10, p. 23630–23650, 2015.
- CHEKLI, L. et al. Assessing the aggregation behaviour of iron oxide nanoparticles under relevant environmental conditions using a multi-method approach. **Water Research**, v. 47, n. 13, p. 4585–4599, 2013.
- DANIEL, S. C. G. et al. Biosynthesis of Cu, ZVI, and Ag nanoparticles using *Dodonaea viscosa* extract for antibacterial activity against human pathogens. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 15, n. 1, p. 1319, 2012.
- DIMKPA, C. O. Can nanotechnology deliver the promised benefits without negatively impacting soil microbial life? **Journal of Basic Microbiology**, v. 54, n. 9, p. 889–904, 2014.
- DURÁN, N. et al. Antibacterial Effect of Silver Nanoparticles Produced by Fungal Process on Textile Fabrics and Their Effluent Treatment. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v.3, p. 203-208, 2007.
- EALIAS, A. M.; JOSE, J. V.; SARAVANAKUMAR, M. P. Biosynthesised magnetic iron nanoparticles for sludge dewatering via Fenton process. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 21, p. 21416–21430, 2016.
- EHRAMPOUSH, M. H. et al. Cadmium removal from aqueous solution by green synthesis iron oxide nanoparticles with tangerine peel extract. **Journal of Environmental Health Science and Engineering**, v. 13, 2015.

EUROPEAN COMMISSION. Communication from the commission to the European Parliament, the Council and the European Economic and Social Committee. **Committee Second Regulatory Review on Nanomaterials**, 2012

FRACETO, L. F. et al. Nanotechnology in Agriculture: Which Innovation Potential Does It Have? **Frontiers in Environmental Science**, v. 4, 2016.

GERALDINE, A. M. et al. Cell wall-degrading enzymes and parasitism of sclerotia are key factors on field biocontrol of white mold by *Trichoderma* spp. **Biological Control**, v. 67, n. 3, p. 308–316, 2013.

GUILGER, M. et al. Biogenic silver nanoparticles based on *Trichoderma harzianum*: synthesis, characterization, toxicity evaluation and biological activity. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. srep44421, 2017.

GUILGER-CASAGRANDE, M. et al. Biosynthesis of silver nanoparticles employing *Trichoderma harzianum* with enzymatic stimulation for the control of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. srep14351, 2019.

GVEROSKA, B.; ZIBEROSKI, J. *Trichoderma harzianum* as a biocontrol agent against *Alternaria alternata* on tobacco. **Applied Technologies and Innovations**, v. 7, n. 2, p. 67–76, 2012.

HARSHINY, M.; ISWARYA, C. N.; MATHESWARAN, M. Biogenic synthesis of iron nanoparticles using *Amaranthus dubius* leaf extract as a reducing agent. **Powder Technology**, v. 286, p. 744–749, 2015.

HOAG, G. E. et al. Degradation of bromothymol blue by 'greener' nano-scale zero-valent iron synthesized using tea polyphenols. **Journal of Materials Chemistry**, v. 19, n. 45, p. 8671–8677, 2009.

KELLER, A. A. et al. Global life cycle releases of engineered nanomaterials. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 15, n. 6, p. 1692, 2013.

KHALILI, E. et al. Biological control of rice brown spot with native isolates of three *Trichoderma* species. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 297–305, 2012.

KHOT, L. R. et al. Applications of nanomaterials in agricultural production and crop protection: A review. **Crop Protection**, v. 35, p. 64–70, 2012.

KUMAR, K. et al. Biobased green method to synthesise palladium and iron nanoparticles using *Terminalia chebula* aqueous extract. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 102, p. 128–133, 2013.

LAMBREVA, M. D. et al. Erratum to: Potential of carbon nanotubes in algal biotechnology. **Photosynthesis Research**, v. 128, n. 1, p. 107–108, 2016.

LEONG, W. H., et al. Application, monitoring and adverse effects in pesticide use: the importance of reinforcement of good agricultural practices (GAPs). **Journal of Environmental Management**, v. 260, p. 109987, 2020.

LOO, S.-L. et al. Bactericidal Mechanisms Revealed for Rapid Water Disinfection by Superabsorbent Cryogels Decorated with Silver Nanoparticles. **Environmental Science & Technology**, v. 49, n. 4, p. 2310–2318, 2015.

- LOWRY, G. V. et al. Environmental Occurrences, Behavior, Fate, and Ecological Effects of Nanomaterials: An Introduction to the Special Series. **Journal of Environmental Quality**, v. 39, n. 6, p. 1867–1874, 2010.
- MACHADO, D. F. M.; SILVA, A. C. F. *Trichoderma* no controle *in vitro* de fungos presentes em diásporos de *Gochnatia polymorpha*. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 36, n. 2, p. 182-191, 2013.
- MACHADO, S. et al. Application of green zero-valent iron nanoparticles to the remediation of soils contaminated with ibuprofen. **Science of The Total Environment**, v. 461–462, p. 323–329, 2013.
- MAHDAVI, M. et al. Green Biosynthesis and Characterization of Magnetic Iron Oxide (Fe₃O₄) Nanoparticles Using Seaweed (*Sargassum muticum*) Aqueous Extract. **Molecules**, v. 18, n. 5, p. 5954–5964, 2013.
- MAHMOODZADEH, H. et al. Effect of Nanoscale Titanium Dioxide Particles on the Germination and Growth of Canola (*Brassica napus*) **J. Ornamental and Horticultural Plants**, v. 3, p. 25-32, 2013.
- MELO, C. P. DE; PIMENTA, M. Nanociências e nanotecnologia. **Parcerias Estratégicas**, v. 9, n. 18, p. 09-22–22, 2010.
- MELO, I. S. Potencialidades de utilização de *Trichoderma* spp. no controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W., org. **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: CNPDA/EMBRAPA, p.135-156, 1991.
- MITCHELL, A. D.; TAYLOR, I. E. P. Cell-wall Proteins of *Aspergillus niger* and *Chaetomium globosum*. **Journal of General Microbiology**, v. 59, n. 1, p. 103–109, 1969.
- MOHAMED, M. I. et al. Nanotoxic Profiling of Novel Iron Oxide Nanoparticles Functionalized with Perchloric Acid and SiPEG as a Radiographic Contrast Medium. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–7, 2015.
- MORTEZA, E. et al. Study of photosynthetic pigments changes of maize (*Zea mays* L.) under nano TiO₂ spraying at various growth stages. **SpringerPlus**, v. 2, n. 1, p. 247, 2013.
- NAIR, R.; KUMAR, D. S. Plant Diseases—Control and Remedy Through Nanotechnology. In: TUTEJA, N.; GILL, S. S. (Eds.). **Crop Improvement Under Adverse Conditions**. New York, NY: Springer, p. 231–243, 2013.
- NJAGI, E. C. et al. Biosynthesis of Iron and Silver Nanoparticles at Room Temperature Using Aqueous Sorghum Bran Extracts. **Langmuir**, v. 27, n. 1, p. 264–271, 2011.
- OKAFOR, F. et al. Green Synthesis of Silver Nanoparticles, Their Characterization, Application and Antibacterial Activity. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 10, n. 10, p. 5221–5238, 2013.
- PLACHTOVÁ, P. et al. Iron and Iron Oxide Nanoparticles Synthesized with Green Tea Extract: Differences in Ecotoxicological Profile and Ability To Degrade Malachite Green. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 6, n. 7, p. 8679–8687, 2018.

POŠĆIĆ, F. et al. Effects of Cerium and Titanium Oxide Nanoparticles in Soil on the Nutrient Composition of Barley (*Hordeum vulgare* L.) Kernels. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 13, n. 6, p. 577, 2016.

RALIYA, R. et al. Mechanistic evaluation of translocation and physiological impact of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles on the tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plant. **Metallomics**, v. 7, n. 12, p. 1584–1594, 2015.

SAITO, L. R. et al. Aspectos dos efeitos do fungo *Trichoderma* spp. no biocontrole de patógenos de culturas agrícolas. **Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia**, v.2, n.3 p.203-208, 2009.

SCHIRMBÖCK, M. et al. Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 12, p. 4364–4370, 1994.

SCHUSTER, A.; SCHMOLL, M. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 3, p. 787–799, 2010.

SERVIN, A. D. et al. Synchrotron Verification of TiO₂ Accumulation in Cucumber Fruit: A Possible Pathway of TiO₂ Nanoparticle Transfer from Soil into the Food Chain. **Environmental Science & Technology**, v. 47, n. 20, p. 11592–11598, 2013.

SIDDIQI, K. S. et al. Biogenic Fabrication of Iron/Iron Oxide Nanoparticles and Their Application. **Nanoscale Research Letters**, v. 11, n. 1, p. 498, 2016.

SINGH, P.; RAJA, R. B. Biological synthesis and characterization of silver nanoparticles using the fungus *Trichoderma harzianum*. **Asian J. Exp. Biol. Sci.** v. 2, p. 600–605, 2011.

SINGH, P. et al. Biological Synthesis of Nanoparticles from Plants and Microorganisms. **Trends in Biotechnology**, v. 34, n. 7, p. 588–599, 2016.

TARAFDAR, J. C.; RALIYA, R. Rapid, Low-Cost, and Ecofriendly Approach for Iron Nanoparticle Synthesis Using *Aspergillus oryzae* TFR9. **Journal of Nanoparticles**, p. 5, 2013.

TRUSKEWYCZ, A.; SHUKLA, R.; BALL, A. S. Phytofabrication of Iron Nanoparticles for Hexavalent Chromium Remediation. **ACS Omega**, v. 3, n. 9, p. 10781–10790, 2018.

VINALE, F. et al. Factors affecting the production of *Trichoderma harzianum* secondary metabolites during the interaction with different plant pathogens. **Letters in Applied Microbiology**, v. 48, n. 6, p. 705–711, 2009.

WANG, H. et al. Physiological effects of magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles on perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) and pumpkin (*Cucurbita mixta*) plants. **Nanotoxicology**, v. 5, n. 1, p. 30–42, 2011.

WANG, Y. et al. *In vitro* assessment of physiological changes of watermelon (*Citrullus lanatus*) upon iron oxide nanoparticles exposure. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 108, p. 353–360, 2016.

WANG, Z.; FANG, C.; MEGHARAJ, M. Characterization of Iron–Polyphenol Nanoparticles Synthesized by Three Plant Extracts and Their Fenton Oxidation of Azo Dye. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 2, n. 4, p. 1022–1025, 2014.

WHITELEY, C. M. et al. Challenges in assessing release, exposure and fate of silver nanoparticles within the UK environment. **Environmental Science: Processes & Impacts**, v. 15, n. 11, p. 2050–2058, 2013.

WIESNER, M. R. et al. Meditations on the ubiquity and mutability of nano-sized materials in the environment. **ACS nano**, v. 5, n. 11, p. 8466–8470, 2011.

XU, J.-K. et al. Bio and Nanomaterials Based on Fe₃O₄. **Molecules**, v. 19, n. 12, p. 21506–21528, 2014.

YEDIDIA, I.; BENHAMOU, N.; CHET, I. Induction of Defense Responses in Cucumber Plants (*Cucumis sativus* L.) by the Biocontrol Agent *Trichoderma harzianum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 3, p. 1061–1070, 1999.

ZANCAN, W. L. A. et al. Crescimento micelial, produção e germinação de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* na presença de fungicidas químicos e *Trichoderma harzianum*. **Biosc. J.**, v. 28, n.5, p. 782-789, 2012.

ZHENG, L. et al. Effect of nano-TiO₂ on strength of naturally aged seeds and growth of spinach. **Biological Trace Element Research**, v. 104, n. 1, p. 83–91, 2005.

ZHU, M.-T. et al. Comparative study of pulmonary responses to nano- and submicron-sized ferric oxide in rats. **Toxicology**, v. 247, n. 2, p. 102–111, 2008.

ZUVERZA-MENA, N. et al. Exposure of engineered nanomaterials to plants: Insights into the physiological and biochemical responses-A review. **Plant Physiology and Biochemistry**, Effects of Nanomaterials in Plants. v. 110, p. 236–264, 2017.