

UNIVERSIDADE DE SOROCABA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA, EXTENSÃO E INOVAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Tatiane Pasquoto Stigliani

**NANOPARTÍCULAS BIOGÊNICAS DE TITÂNIO A PARTIR DE *Trichoderma*
harzianum PARA APLICAÇÃO NA ÁREA AGRÍCOLA: SÍNTESE,
CARACTERIZAÇÃO, AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E BIOATIVIDADE.**

Sorocaba/SP

2019

Tatiane Pasquoto Stigliani

NANOPARTÍCULAS BIOGÊNICAS DE TITÂNIO A PARTIR DE *Trichoderma harzianum* PARA APLICAÇÃO NA ÁREA AGRÍCOLA: SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO, AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E BIOATIVIDADE.

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

Orientadora: Dra. Renata de Lima

Sorocaba/SP

2019

Ficha Catalográfica

S874n Stigliani, Tatiane Pasquoto
Nanopartículas biogênicas de titânio a partir de *Trichoderma harzianum* para aplicação na área agrícola : síntese, caracterização, avaliação da toxicidade e bioatividade / Tatiane Pasquoto Stigliani. – 2019.
79 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Renata de Lima
Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de Sorocaba, Sorocaba, SP, 2019.

1. Nanotecnologia. 2. Titânio. 3. *Trichoderma*. 4. Pragas agrícolas – Controle. I. Lima, Renata de, orient. II. Universidade de Sorocaba. III. Título.

Tatiane Pasquoto Stigliani

NANOPARTÍCULAS BIOGÊNICAS DE TITÂNIO A PARTIR DE *Trichoderma harzianum* PARA APLICAÇÃO NA ÁREA AGRÍCOLA: SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO, AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E BIOATIVIDADE.

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

Aprovada em: 12/08/2019

BANCA EXAMINADORA:



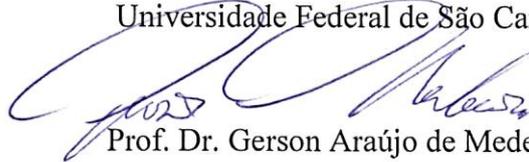
Profa. Dra. Renata de Lima

Universidade de Sorocaba



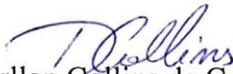
Profa. Dra. Cleoni dos Santos Carvalho

Universidade Federal de São Carlos



Prof. Dr. Gerson Araújo de Medeiros

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho



Prof. Dr. Darllan Collins da Cunha e Silva

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho



Dr. Lucas Bragança

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

*Aos três pilares que sustentam o meu mundo
e fazem toda a loucura valer a pena:
Edilson, Marta e Luiz Gustavo.*

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer em primeiro lugar aos meus pais Edilson e Marta e ao meu marido Luiz Gustavo por toda a paciência que tiveram comigo em todo este tempo de doutorado. Agradeço por permanecerem apoiando as minhas escolhas e por permanecerem acreditando em mim, mesmo quando, muitas vezes, eu mesma tinha dúvidas do quanto conseguiria caminhar. Vocês são a minha fortaleza, e tudo o que faço é POR vocês e PARA vocês.

Gostaria também de agradecer à minha orientadora, Profa. Renata de Lima, por seguir comigo em todo o meu caminho acadêmico, fazendo parte do ciclo completo, e criando uma convivência que vai além de aluno/professor. Obrigada também pela paciência e pela compreensão que teve comigo nos últimos tempos.

Agradeço ao Prof. Leonardo, por permitir o uso das instalações e equipamentos do seu laboratório na Unesp e por sempre contribuir para o enriquecimento do trabalho. Agradeço a ajuda do pessoal da Unesp (Cintia, Mônica, Estefânia e Jhones) a cada nova nanopartícula que eu ia caracterizar, principalmente à Estefânia e ao Jhones pela análise de microscopia eletrônica de varredura.

Agradeço ao Prof. Halley e aos alunos do laboratório da Universidade Estadual de Londrina pelas análises em plantas de soja e pela ajuda com os resultados.

Agradeço também ao pessoal do LABITON: Taís, Natália, Leandro, Mariana, Mariane, Vitória, Bianca, Carlinhos, Diogo e Tatinha, que são a alegria do laboratório, fazendo a rotina ser mais leve. Agradeço especialmente ao Leandro, por ser companheiro de caminhada e mágico na hora de encontrar justamente os artigos que eu mais precisava, e à Tais, por ser amiga, mãe (às vezes quase avó), companheira de raciocínio, ouvinte, cúmplice e até cuidadora. Agradeço à Natália pela ajuda com as análises de MIC e PCR e à Mariana por encarar Londrina sozinha e me ajudar com os resultados. Sem todos vocês eu não conseguiria!

Agradeço a CAPES e a FAPESP pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho e a UNISO pelas instalações e por ser praticamente a minha segunda casa nos últimos 11 anos.

Agradeço aos meus amigos da vida: Rodrigo, Gabriele, Nicolý (com os fofos do Lucas e da Natália), Cyntia, Luiza e Murillo, por toda a parceria, preocupação e

conversas, mas principalmente pela compreensão nas longas ausências. Agradeço também ao Flávio, surpresa boa que a vida me trouxe! Obrigada por tudo o que fez por mim e por me compreender sem que eu nem precise falar!

Agradeço à minha família: Vó Maria, Nona, Tia Marli, Tio Celo, Tio Ka, Lu, Andréia, Dani, Caio, Bruna, Hugo, Nilson, Letícia, Silvana, Carlinho, Gigi e Léo, por sempre estarem próximos, mesmo sem entender muito o que estou fazendo. Agradeço principalmente às minhas crianças: Isabelle, Rafael, Helena, Mateus, Joaquim, Lucas e Alice, por serem fontes inesgotáveis de felicidade e amor! Amo todos vocês!!

Agradeço a todos os que direta e indiretamente me ajudaram na realização deste trabalho, e por fim agradeço a Deus por continuar me fortalecendo e colocando pessoas excepcionais na minha vida, sem as quais eu não seria nem metade do que sou e ainda posso ser.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

(Arthur Schopenhauer)

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi sintetizar NPs biogênicas de titânio a partir do fungo *Trichoderma harzianum*, utilizando diferentes precursores, visando controle de *Sclerotinia sclerotiorum*. As NPs de titânio foram sintetizadas a partir do conteúdo enzimático de *T. harzianum* cultivado com estímulo de *S. sclerotiorum* e sem estímulo, utilizando três diferentes precursores: TiO-II, TiO-IV Anatase e TiO-IV Rutilo. As Nps foram caracterizadas para a obtenção de diâmetro médio, polidispersão, concentração (Nps/mL), potencial zeta (ZP), morfologia e pH. Ao final da síntese foi observado *T. harzianum* remanescente nas suspensões de todas as NPs, então foi avaliada sua viabilidade e crescimento, bem como a bioatividade das NPs no controle de *S. sclerotiorum*. Com base nos resultados, duas nanopartículas foram escolhidas para a análise de citotoxicidade e genotoxicidade em células animais (NPTiOII e NPTiOIVR, ambas sem estímulo). Por fim foi avaliada a ação das Nps de TiOIVR sem estímulo em microrganismos de importância agrícola e bactérias envolvidas como ciclo do nitrogênio no solo, bem como sua ação na morfologia e estresse oxidativo em plantas de soja. As NPs sintetizadas com estímulo apresentaram maior diâmetro médio, sendo 712,9 nm para as NPTiOII, 774,4 nm para as NPTiOIVA e 650,7 nm para as NPTiOIVR, em comparação com as sintetizadas sem estímulo, que apresentaram 459,6 nm para as NPTiOII, 310,1 nm para as NPTiOIVA e 567,4 nm para as NPTiOIVR. Foi observado também maior eletronegatividade nas NPs sintetizadas sem estímulo, com ZPs de -19,33 mV (NPTiOII), -16,40 mV (NPTiOIVA) e -20,2 mV (NPTiOIVR) em comparação com as sintetizadas com estímulo, que apresentaram ZP de -9,41 mV (NPTiOII), -7,53 mV (NPTiOIVA) e -17,10 mV (NPTiOIVR), o que pode ser consequência da produção de maior quantidade e variedade de proteínas pelo *T. harzianum* na presença de *S. sclerotiorum*. Foi observada também a melhor atividade das NPTiOII e NPTiOIVR sem estímulo no crescimento de *T. harzianum* e no controle do fitopatógeno, motivo pelo qual estas Nps foram escolhidas para continuidade das análises. Com relação à citotoxicidade, não foram observadas alterações nas linhagens testadas com e sem exposição à radiação UV, porém foi observado aumento no índice de danos para ambas as NPs apenas na linhagem HaCat, indicando uma maior sensibilidade desta linhagem com relação às demais. Não foram observadas diferenças significativas na morfologia e nos marcadores de estresse oxidativo de plantas de soja, bem como não foi alcançada a concentração de NPTiOIVR capaz de inibir o crescimento de microrganismos de interesse agrícola, porém foi observada uma leve alteração na quantidade e proporção de bactérias do ciclo do nitrogênio no solo. Com base no descrito, foi possível comprovar a viabilidade da técnica aplicada para a síntese de nanopartículas a partir de *T. harzianum*, sua bioatividade no controle de *S. sclerotiorum* e baixa toxicidade, porém são necessários mais estudos acerca deste novo nanomaterial antes da sua aplicação na agricultura.

Palavras-chave: Biossíntese de Nanopartículas. Nanopartículas de Óxidos de Metais. Controle de Pragas. Citotoxicidade. Genotoxicidade. Fitotoxicidade.

ABSTRACT

The aim of this work was to synthesize biogenic titanium NPs from *Trichoderma harzianum* fungus, using different precursors, aiming at controlling *Sclerotinia sclerotiorum*. Titanium NPs were synthesized from the *T. harzianum* enzymatic content cultivated with *S. sclerotiorum* stimulus and without stimulation, using three different precursors: TiO-II, TiO-IV Anatase and TiO-IV Rutile. Nps were characterized to obtain mean diameter, polydispersity, concentration (Nps / mL), zeta potential (ZP), morphology and pH. After the synthesis was observed remnant *T. harzianum* in all NPs suspensions and their growth and viability were evaluated, as well as the bioactivity of the NPs in the control of *S. sclerotiorum*. According to results, two nanoparticles were chosen for the analysis of cytotoxicity and genotoxicity in animal cells (NPTiOII and NPTiOIVR, both without stimulation). Finally, the action of TiOIVR Nps without stimulation in microorganisms of agricultural importance and bacteria involved in nitrogen cycle in the soil was evaluated, as well as its action on morphology and oxidative stress in soybean plants. NPs synthesized with *S. sclerotiorum* stimulus presented means diameters of 712.9 nm for NPTiOII, 774.4 nm for NPTiOIVA and 650.7 nm for NPTiOIVR, larger than those synthesized without stimulus, which presented 459.6 nm for NPTiOIVR. NPTiOII, 310.1 nm for NPTiOIVA and 567.4 nm for NPTiOIVR. Higher electronegativity was also observed in non-stimulated NPs, with ZPs of -19.33 mV (NPTiOII), -16.40 mV (NPTiOIVA) and -20.2 mV (NPTiOIVR) compared to those synthesized with stimulus. ZP of -9.41 mV (NPTiOII), -7.53 mV (NPTiOIVA) and -17.10 mV (NPTiOIVR), which may be a consequence of the increase of protein production by *T. harzianum* in the presence of *S. sclerotiorum*. It was also observed the best activity of NPTiOII and NPTiOIVR without stimulus on *T. harzianum* growth and phytopathogen control, reason why these Nps were chosen for continuity of the analyzes. Regarding cytotoxicity, no changes were observed in the strains tested with and without exposure to UV radiation, but an increase in the damage index for both NPs was observed only in HaCat cell line, indicating higher sensitivity compared to the others. No significant differences in soybean plant morphology and oxidative stress were observed, and the concentration of NPTiOIVR capable of inhibiting the growth of microorganisms of agricultural interest was not achieved, but a slight change in the amount and proportion of nitrogen cycle bacteria was observed. Based on the above, it was possible to prove the viability of the applied technique for the synthesis of nanoparticles from *T. harzianum*, its bioactivity in the control of *S. sclerotiorum* and low toxicity, but further studies on this new nanomaterial are needed before its application in agriculture.

Key words: Nanoparticles Biosynthesis, Pest Control. Metal Oxide Nanoparticles Cytotoxicity. Genotoxicity. Phytotoxicity.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BD - Batata Dextrose

BDA - Batata Dextrose Agar

BHT - Hidroxitolueno Butilado

DLS - Dynamic Light Scattering (Espalhamento Dinâmico de Luz)

DM - Diâmetro Médio

DMSO - Dimetilsulfóxido

EROs - Espécies Reativas de Oxigênio

IC₅₀ - Concentração capaz de inibir o crescimento de 50% das células

ICP-OES - Espectrometria de Emissão Atômica por Plasma Acoplado

KI - Iodeto de Potássio

MDA - Malondialdeído

MET - Microscopia Eletrônica de Transmissão

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

MTT - 3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

NPs - Nanopartículas

NPTiOII - Nanopartículas de Óxido de Titânio II

NPTiOII-CE - Nanopartículas de Óxido de Titânio II Com Estímulo

NPTiOII-SE - Nanopartículas de Óxido de Titânio II Sem Estímulo

NPTiOIVA - Nanopartículas de Óxido de Titânio IV Anatase

NPTiOIVA-CE - Nanopartículas de Óxido de Titânio IV Anatase Com Estímulo

NPTiOIVA-SE - Nanopartículas de Óxido de Titânio IV Anatase Sem Estímulo

NPTiOIVR - Nanopartículas de Óxido de Titânio IV Rutilo

NPTiOIVR-CE - Nanopartículas de Óxido de Titânio IV Rutilo Com Estímulo

NPTiOIVR-SE - Nanopartículas de Óxido de Titânio IV Rutilo Sem estímulo

NTA - Nanoparticles Tracking Analysis (Rastreamento de Nanopartículas)

PBS - Tampão Fosfato Salino

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

PDI - Índice de Polidispersão

PIB - Produto Interno Bruto

TCA - Ácido Tricloroacético

TiO₂ - Dióxido de Titânio

TiO₂NPs - Nanopartículas de Dióxido de Titânio

TiOII - Óxido de Titânio II

TiOIV - Óxido de Titânio IV

UFC - Unidades Formadoras de Colônia

UV - Ultravioleta

ZP - Potencial Zeta

SUMÁRIO

1	<u>INTRODUÇÃO.....</u>	<u>1</u>
2	<u>REVISÃO DE LITERATURA.....</u>	<u>3</u>
2.1	<i>SCLEROTINIA SCLEROTIORUM</i> E A DOENÇA MOFO BRANCO.....	3
2.2	<i>TRICHODERMA HARZIANUM</i>	5
2.3	SÍNTESE BIOGÊNICA DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS.....	7
2.4	NANOPARTÍCULAS DE TITÂNIO.....	8
3	<u>OBJETIVOS.....</u>	<u>10</u>
3.1	OBJETIVO GERAL	10
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
4	<u>ETAPAS DE DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO</u>	<u>11</u>
5	<u>RESULTADOS</u>	<u>12</u>
5.1	ARTIGO 1: SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS BIOGÊNICAS DE TITÂNIO A PARTIR DE <i>TRICHODERMA HARZIANUM</i> NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE PAREDE CELULAR DE <i>SCLEROTINIA SCLEROTIORUM</i> PARA APLICAÇÃO NA AGRICULTURA.	13
5.2	ARTIGO 2: TOXICIDADE DE NANOPARTÍCULAS BIOGÊNICAS DE TITÂNIO SINTETIZADAS A PARTIR DE <i>TRICHODERMA HARZIANUM</i> EM CÉLULAS ANIMAIS, MICRORGANISMOS DE INTERESSE AGRÍCOLA E PLANTAS DE SOJA.	32
5.3	COMPILAÇÃO DE RESULTADOS	58
6	<u>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</u>	<u>59</u>
	<u>REFERÊNCIAS.....</u>	<u>60</u>

1 INTRODUÇÃO

O agronegócio é um dos setores mais importantes da economia brasileira, e compreende atividades agrícolas, pecuárias e florestais, desde a produção primária até a comercialização direta aos consumidores. No terceiro trimestre de 2018 a contribuição do agronegócio no Produto Interno Bruto (PIB) brasileiro foi de R\$ 61,9 bilhões, resultando em um aumento de 2,5% em relação ao mesmo período de 2017, enquanto o PIB acumulado apresentou aumento de apenas 1,3% (IBGE, 2018). Em 2017 a produção de grãos no Brasil atingiu 237,6 milhões de toneladas, produzidas em 61 milhões de hectares e estima-se que até 2028 a safra alcance por volta de 301 milhões de toneladas produzidas em uma área equivalente a 70,7 milhões de hectares (MAPA, 2018).

Os cinco principais grãos produzidos no Brasil são arroz, feijão, milho, soja e trigo, sendo a soja o grão com maior área plantada e maior contribuição no mercado de exportações. A soja (*Glycine max* L.) é uma leguminosa rica em proteínas e de rápido cultivo originária da China (EMBRAPA, 2011; 2014) que pode ser considerada garantia para a alimentação mundial (WWF, 2014; MASUDA e GOLDSMITH, 2009), dado o fato de ser amplamente utilizada pra alimentação humana e animal. De acordo com o boletim da safra 2016/2017 publicado pela Embrapa Soja, a produção mundial deste grão foi de 351,311 milhões de toneladas produzidas em 120,958 milhões de hectares neste período, sendo 113,923 milhões de toneladas produzidas no Brasil, segundo maior produtor mundial. De acordo com as projeções de longo prazo do agronegócio nacional a produção de soja em grãos pode chegar a 155,9 milhões de toneladas no ano de 2028, sendo cerca de 96,5 milhões de toneladas destinadas apenas à exportação (MAPA 2018).

Apesar desta expansão, a soja e várias outras culturas são atualmente afetadas por pragas ocasionando perdas significativas no cultivo, o que gera um fator limitante para o progresso da agricultura, já que reduz consideravelmente a produtividade. Dentre os organismos que causam doenças nessa cultura estão diversas espécies de plantas daninhas, bactérias, nematoides e fungos. Um dos exemplos de pragas que atingem as lavouras de soja é o fungo fitopatogênico *Sclerotinia sclerotiorum*, responsável pela doença conhecida como mofo branco da soja, considerada de grande importância pelas perdas causadas não somente em lavouras de soja como em mais de 400 espécies de plantas, além de apresentar como parte do ciclo de vida uma estrutura de resistência

denominada escleródio (BOLAND e HALL, 1994; PELTIER et al., 2012), responsável pela persistência da contaminação no solo.

A preocupação com a contaminação das lavouras pelo *S. sclerotiorum* deu origem a diversas iniciativas para o seu combate. No Brasil, a reunião da Subcomissão Estadual de Sementes de Soja – CESSOJA/PR realizada em 1981 instruiu produtores para a tomada de medidas de segurança para não aumentar a contaminação das lavouras (HENNING et al., 2010). Outro exemplo é a criação da Iniciativa Nacional Sclerotinia nos Estados Unidos, que fomenta pesquisas para aumentar o conhecimento sobre o fitopatógeno e para o desenvolvimento de novas práticas para o seu controle.

Várias estratégias são utilizadas em conjunto para o controle desta praga, sendo uma delas o uso de fungicidas químicos, os quais podem trazer riscos ao ambiente, principalmente em ecossistemas aquáticos (BELDEN et al., 2010; MALTBY, BROCK e BRINK, 2009). Frente aos problemas citados, uma das alternativas que têm se destacado para o controle de *S. sclerotiorum* é o uso de organismos que atuam como controle biológico. Um exemplo de fungo antagonista é o *Trichoderma harzianum*, que age a partir da competição por espaço e nutrientes, da liberação de substâncias que degradam ou inviabilizam o crescimento do fitopatógeno na rizosfera e ainda a partir do parasitismo (ABDEL-LATEIF, 2017).

Mesmo com as práticas de manejo integrado o problema ainda persiste, o que faz despontar a nanotecnologia como uma nova ferramenta na busca por alternativas para o controle de pragas de forma sustentável e eficiente em relação a fatores abióticos (PARISI; VIGANI; RODRIGUEZ-CEREZO, 2015). A síntese biogênica de nanopartículas é uma destas novas possibilidades, e consiste no uso de extratos de organismos vivos como plantas, bactérias e fungos no papel de agentes redutores e/ou estabilizantes (PRABHU e POULOSE, 2012).

Desta forma, este trabalho visa utilizar a nanotecnologia como complemento ao controle biológico na tentativa de solucionar problemas apresentados ao longo de anos em diferentes estudos. Para isto foi realizada a síntese biogênica de nanopartículas de titânio a partir do agente de controle biológico *Trichoderma harzianum*, para uso na agricultura no combate ao mofo branco, buscando um nanomaterial que apresente efetividade gerando o mínimo de efeitos prejudiciais à vida de uma forma geral.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Sclerotinia sclerotiorum* e a doença mofo branco

O fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary é o causador da doença conhecida como mofo branco, podridão branca, podridão aquosa, entre outros (Purdy, 1979), e pertence ao Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Leotiomycetes, Ordem Helotiales e Família Sclerotiniaceae (Index fungorum, 2019a). Cosmopolita e inespecífico, este fungo pode afetar mais de 408 espécies, desde culturas de importância econômica como soja, feijão, batata, algodão e tomate, até plantas infestantes como caruru, picão preto e serralha (BOLAND e HALL, 1994). Seus efeitos podem ser observados principalmente em regiões de clima úmido, porém sua capacidade de adaptação a diferentes meios o faz presente em todas as regiões produtoras ao redor do mundo.

Como característica dos ascomicetos, *S. sclerotiorum* possui hifas hialinas, septadas, multinucleadas e muito ramificadas, sendo capaz de produzir esporos sexuais conhecidos como ascósporos (SHARMA et al., 2015). Suas hifas costumam desenvolver-se distanciadas, porém quando existe redução da disponibilidade de nutrientes estas se agregam formando uma estrutura de resistência chamada escleródio (Figura 1) (LE TORNEAU, 1979). Os escleródios são aglomerados de micélio que formam uma estrutura composta de três camadas: uma parede espessa e escura rica em melanina, uma parede fina denominada córtex e a medula branca contendo o micélio dormente do fungo, proteínas e carboidratos (SHARMA et al., 2015), e podem ser considerados responsáveis pela persistência da contaminação na lavoura, já que podem permanecer viáveis no solo por um período de até 11 anos (BOLTON et al., 2006).

Figura 1: Planta infectada por *Sclerotinia sclerotiorum*. Presença de escleródios destacados pelas setas.



Fonte: Embrapa Soja, Circular Técnica 122.

De acordo com as condições ambientais e a disponibilidade de nutrientes dentro do escleródio, ele pode germinar de duas diferentes formas: miceliogênica e carpogênica (LE TOURNEAU, 1979). A germinação miceliogênica ocorre principalmente em culturas de girassol (BOLTON et al., 2006), e consiste na germinação direta de hifas através da parede do escleródio, as quais inicialmente obtêm nutrientes através de matéria orgânica já em decomposição (PURDY, 1979). A germinação carpogênica, por sua vez, pode ser desencadeada a partir da escassez de nutrientes no escleródio, e consiste na principal forma de infecção por *S. sclerotiorum* na lavoura.

Na germinação carpogênica, corpos de frutificação em formato de taça denominados apotécios são gerados a partir do escleródio em temperaturas entre 10 e 25°C (CLARKSON et al., 2004). Dentro dos apotécios se formam os ascósporos, responsáveis pela disseminação aérea de *S. sclerotiorum*. É possível a germinação de mais de um apotécio em um único escleródio, e estima-se que cada apotécio pode liberar cerca de 1600 ascósporos por hora (BOLTON et al., 2006; CLARKSON et al., 2003).

A partir da liberação dos ascósporos ocorre a infecção aérea das plantas, iniciando-se a partir da colonização de pétalas de flores e folhas senis por estes serem tecidos mais sensíveis, servindo de alimentação rápida para o crescimento micelial e posterior infecção de partes aéreas da planta saudável (PURDY, 1979). A colonização acontece a partir da liberação de enzimas que degradam a parede celular das células hospedeiras, podendo atacar todas as partes da planta (RIOU, FREYSSINET e FEVRE, 1991; BOLTON et al., 2006).

A prática mais efetiva no controle da doença causada por *S. sclerotiorum* é conhecida como manejo integrado, que de acordo com a Diretiva 2009/128/CE da União Europeia, significa a unificação de todas as técnicas disponíveis a fim de manter a contaminação abaixo da necessária para causar dano econômico e ambiental (UNIÃO EUROPÉIA, 2009). Para isto combinam-se o controle cultural, químico e biológico. No controle cultural se destacam o uso de semente de rigorosa qualidade sanitária atingidas com o beneficiamento, a rotação de culturas utilizando plantas não hospedeiras do fitopatógeno, o espaçamento entre as plantas e as fileiras de plantio para facilitar a passagem do ar e do sol contribuindo para o microclima em torno das plantas e principalmente a escolha da época de plantio, evitando ao máximo que o período de floração se dê em épocas frias e chuvosas (STEADMAN, 1979; PELTIER et al., 2012). O controle químico se dá com o uso de fungicidas tanto pela aplicação durante o período de crescimento e floração das plantas quanto pelo tratamento de sementes, evitando a proliferação do fungo pela dispersão de ascósporos e a sua transmissão a partir de micélio dormente em sementes (VIEIRA et al., 2001; McCREARY, 2016; MEYER et al., 2018).

Uma das práticas também adotada no manejo integrado é o uso de agentes de biocontrole, que pode ser caracterizado como o emprego de organismos que antagonizam o fitopatógeno reduzindo a sua concentração (PAL e GARDENER, 2006). Estudos apontam que vários organismos podem ser utilizados como antagonistas no controle biológico de *S. sclerotiorum*, como por exemplo, bactérias do gênero *Bacillus* spp. (RAHMAN et al., 2016) e do gênero *Streptomyces* spp. (FRÓES et al., 2012), fungos como *Coniothyrium minitans* (JING, NAVI e YANG, 2015) e fungos do gênero *Trichoderma*, que apresentam grande potencial no controle de pragas e na promoção do crescimento de plantas (CARVALHO et al., 2015; ZHANG et al., 2016; SUMIDA et al., 2018; MATHEWS, SIVPARSAD e LAING, 2019). Em geral, por possuírem alvos específicos, os agentes de controle biológico são capazes de inibir fitopatógenos por diferentes vias, reduzindo a possibilidade de seleção de organismos resistentes e a contaminação tanto do ambiente como do alimento produzido na lavoura.

2.2 *Trichoderma harzianum*

O fungo *Trichoderma harzianum* pertence ao Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Sordariomycetes, Ordem Hypocreales e Família Hypocreaceae (Index fungorum,

2019b). *Trichoderma* spp. é um gênero de fungos filamentosos cosmopolitas de vida livre que compõem a microbiota do solo principalmente em regiões de rizosfera (HARMAN et al., 2004), colonizando e decompondo restos de matéria celulósica, como madeira e material herbáceo (HOWELL, 2003), e apresentando abundância e crescimento rápido tanto em solos de clima temperado como tropical.

Os fungos *Trichoderma* se reproduzem assexuadamente e, de acordo com Grondona et al. (1997), estes fungos são facilmente cultivados *in vitro*, gerando uma grande quantidade de conídios (esporos formados por mitose na reprodução assexuada) que assumem coloração entre branco e verde, de acordo com a espécie (HOWELL, 2003). Além de grandes colonizadores, são oportunistas e estabelecem relações de simbiose com plantas, agindo como parasitas antagonistas de fitopatógenos e protegendo contra doenças (REINO et al., 2008; VINALE et al., 2009). A espécie *Trichoderma harzianum* (RIFAI, 1969) é o micoparasita filamentoso mais estudado para controle biológico por possuir maior distribuição mundial, facilidade e rapidez no cultivo e principalmente por não ser patogênico para as plantas, sendo considerado o mais eficiente (GRONDONA et al., 1997; ALMEIDA et al., 2007) por apresentar uma combinação entre diversas ações antagonistas do gênero (SCHIRMBÖCK et al., 1994) o que torna possível seu uso no controle de uma grande variedade de fitopatógenos.

O controle deste fitopatógeno se dá basicamente a partir de competição, antibiose e parasitismo. Na competição, como o próprio nome diz, os organismos (fitopatógeno e antagonista) competem pelo mesmo espaço, nutrientes, água, luminosidade, entre outros recursos (ABDEL-LATEIF, 2017). Por serem capazes de obter mais nutrientes do solo, linhagens de *Trichoderma* se destacam em relação aos fitopatógenos (BENITEZ et al., 2004). O controle por antibiose se dá a partir da produção e liberação de metabólitos voláteis e não voláteis durante a colonização pelo antagonista (GRONDONA et al., 1997). Tais substâncias têm o poder de inibir o crescimento micelial dos fitopatógenos (KHALILI et al., 2012), impedir a liberação de esporos, matar suas células e alterar a rizosfera, tornando-a inadequada para a sobrevivência (BENÍTEZ et al., 2004).

Já no controle por parasitismo, o antagonista se alimenta diretamente do fitopatógeno. Inicialmente o antagonista cresce em direção ao fungo fitopatogênico formando apressórios que se enrolam em suas hifas (HARMAN, 2004) degradando a parede das células a partir da ação de um complexo enzimático composto por quitinases,

proteases e β -glucanases (GRONDONA et al., 1997; HOWELL, 2003; VITERBO et al., 2002)

Isolados de *Trichoderma* spp. podem ainda estimular o crescimento de plantas e seus mecanismos de defesa contra patógenos. A melhora no crescimento das plantas se dá a partir do estímulo para produção de hormônios, da solubilização de nutrientes e até pela captação e transporte de minerais em menor disponibilidade no solo (WINDHAM et al., 1986; ALTOMARE et al., 1999; INBAR et al., 1994), promovendo o crescimento das raízes e a saúde da planta (SHARMA et al., 2012). A ativação dos mecanismos de defesa ocorre a partir do contato direto do antagonista com a planta, o que induz a liberação de peptídeos, proteínas e compostos de baixo peso molecular (MASTOURI; BJÖRKMAN; HARMAN, 2006; REINO et al., 2008; SHARMA et al., 2012), os quais a previnem contra novas infecções. Os efeitos antagônicos de *T. harzianum* foram comprovados sobre fitopatógenos como *S. sclerotiorum* (ZANCAN et al., 2012), *Rhizopus stolonifer*, *Bipolaris* sp., *Cladosporium* sp. e *Phoma* sp. (MACHADO e SILVA, 2013), entretanto, existe a necessidade de mais estudos para comprovação de sua efetividade (BENÍTEZ et al., 2004; BROTMAN, GUPTA, VITERBO, 2010; SUPRAPTA et al., 2012).

2.3 Síntese biogênica de nanopartículas metálicas

A nanotecnologia é uma ciência que permanece em expansão mundial pela aplicabilidade em diversas áreas de interesse. Os nanomateriais possuem maior área de superfície quando comparados aos mesmos materiais em estado bruto, o que pode fazer com que apresentem diferentes propriedades ópticas, químicas e magnéticas (KHAN, SAEED e KHAN, 2017), e podem apresentar uma, duas ou até todas as dimensões em escala nanométrica. Nanopartículas são nanomateriais que apresentam características diferenciadas quando reduzidas de seu tamanho, e têm sido estudadas como novas alternativas para aplicação na área biomédica (DARAEI et al., 2014; WANG et al., 2015), ambiental (DAVAR, MAJEDI e MIRZAEI, 2015; FRANCIS et al., 2017), e agrícola (OLIVEIRA et al., 2015; GUILGER et al., 2017).

A síntese de nanopartículas pode ocorrer por duas formas: top-down e bottom-up. A síntese pela abordagem top-down (de cima para baixo) consiste na geração de nanopartículas realizando moagem, irradiação ou decomposição térmica de materiais

em maior escala, sendo conhecida como síntese física, já a abordagem bottom-up (de baixo para cima) é descrita como a construção de nanopartículas, e pode ser realizada a partir de técnicas de redução e sedimentação, com o emprego de agentes redutores e estabilizantes químicos, biológicos e também organismos vivos (KHAN, SAEED e KHAN, 2017). Quando comparadas as técnicas, é possível perceber que as sínteses física e química podem gerar alto custo metodológico, sendo ainda a síntese física capaz de gerar nanopartículas com baixa homogeneidade, e a química de gerar resíduos tóxicos ao ambiente. Diante disto a síntese biológica de nanopartículas parece ser uma alternativa viável para reduzir o custo de produção e minimizar a contaminação desencadeada a partir destas práticas.

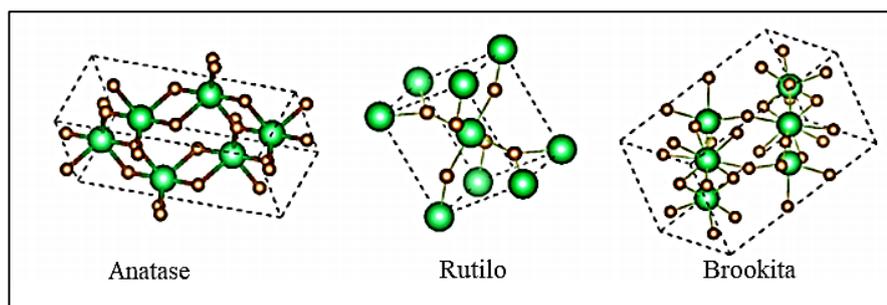
A síntese biológica de nanopartículas, também conhecida como síntese biogênica ou biossíntese, consiste no uso de organismos vivos como biofábricas de nanopartículas (síntese intracelular) ou o uso dos metabólitos produzidos por eles como agentes redutores e/ou estabilizantes (síntese extracelular) (THAKKAR, MHATRE e PARIKH, 2010). Com baixa geração de resíduos esta técnica pode ser considerada sustentável e de baixo custo, pois é capaz de produzir nanopartículas em condições ambientais de temperatura e pressão e sem o uso de compostos químicos como solventes orgânicos.

Vários organismos podem ser utilizados para a síntese biogênica de nanopartículas, entre eles bactérias (RAJESH, DHARANISHANTHI e KANNA, 2015), fungos (BANSAL, KAUR e DUHAN, 2017), leveduras (ROY, SARKAR e GHOSH, 2014) e plantas (DINESH et al., 2015). Dentre os organismos utilizados podem-se destacar os fungos, os quais são excretadores eficientes de enzimas extracelulares podendo ser facilmente manipulados para a produção em larga escala das mesmas, têm baixo custo de produção e podem ainda oferecer biocontrole de pragas, como no caso do *T. harzianum*.

2.4 Nanopartículas de titânio

O titânio é um elemento de transição com número atômico 22 e massa atômica de 47,9 u, tendo a maior utilização na forma de dióxido de titânio (TiO₂) que pode ser encontrado na natureza nas formas cristalinas anatase, rutilo e brookita (Figura 2).

Figura 2: Formas cristalinas do dióxido de titânio.



Fonte: Adaptado de Vitoreti et al., 2017.

O dióxido de titânio é um composto de coloração branca, não tóxico, utilizado na produção de tinta, plástico, papel, borracha, tecido, cosméticos, couro e cerâmica, e também como fotocatalisador (AMPO e KAMAT, 2010). Em escala nanométrica apresenta propriedades diferenciadas como baixo ponto de fusão, propriedades ópticas especiais, alta atividade catalítica e propriedades mecânicas distintas (SIEGEL, 1991). Devido à ausência de toxicidade e suas propriedades biocompatíveis, as nanopartículas de dióxido de titânio, podem ser aplicadas na engenharia de tecidos ósseos e em indústrias farmacêuticas (GERHARDT, JELL e BOCCACCINI, 2007).

Já na área agrícola, o uso de dióxido de titânio tem apresentado efeitos estimulantes, como aumento da produção de biomassa e aumento da taxa fotossintética de plantas (OWOLADE et al., 2008; RALIYA; BISWAS; TARAFDAR, 2014). De acordo com Lyu et al. (2017), dióxido de titânio nanoparticulado pode promover a germinação de sementes, maior absorção de nutrientes pelas raízes, estímulo da atividade enzimática, fortalecimento frente a estresse e conseqüentemente maior rendimento da produção. Estudos mostram a possibilidade da biossíntese de nanopartículas de titânio a partir de diferentes organismos (KIRTHI et al., 2011; RAJAKUMAR et al., 2012a e 2012b; JHA, PRASAD e KULKARNI, 2009), destacando a biossíntese de nanopartículas de titânio como uma boa escolha para possível aplicação na agricultura.

3 OBJETIVOS

3.1 *Objetivo geral*

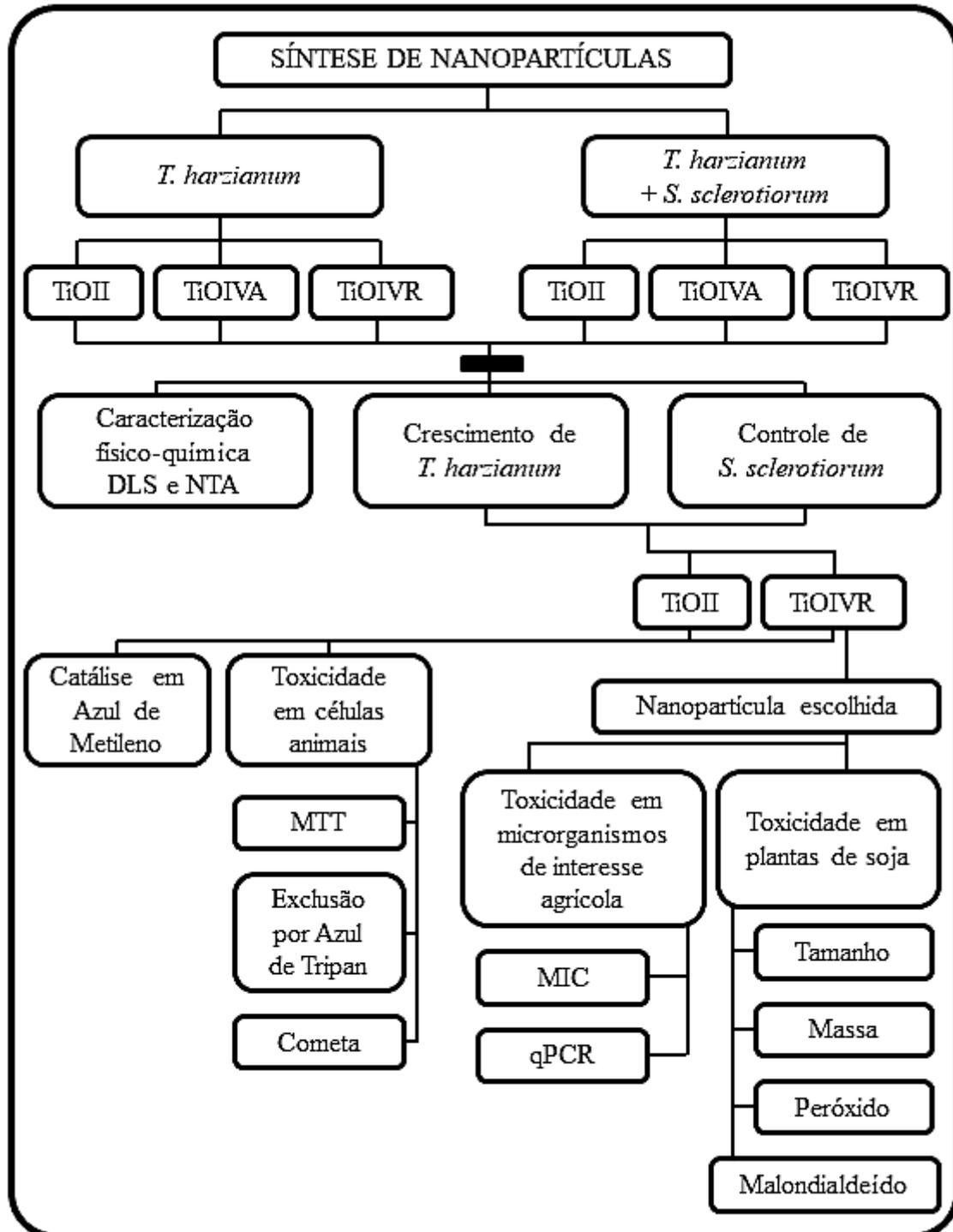
Este trabalho teve como principal objetivo sintetizar 6 diferentes tipos de nanopartículas biogênicas de titânio a partir da espécie de fungo antagonista *Trichoderma harzianum*, utilizando 3 diferentes fontes de precursores visando sua aplicação na área agrícola, bem como avaliar as características físico-químicas das nanopartículas sintetizadas, sua eficiência no controle do fungo fitopatogênico *Sclerotinia sclerotiorum*, e toxicidade em células animais, microrganismos de interesse agrícola e plantas de soja.

3.2 *Objetivos específicos*

- Sintetizar nanopartículas biogênicas de titânio a partir do conteúdo enzimático do fungo *Trichoderma harzianum* cultivado em dois diferentes meios (sem estímulo e com estímulo de *Sclerotinia sclerotiorum*) utilizando três diferentes precursores (Óxido de Titânio II, Óxido de Titânio IV Anatase e Óxido de Titânio IV Rutilo).
- Caracterizar as nanopartículas para definição de distribuição de tamanho, índice de polidispersão, potencial zeta, concentração e morfologia a partir das técnicas de Espalhamento Dinâmico de Luz, Rastreamento de Nanopartículas, Microeletroforese e Microscopia Eletrônica de Transmissão e Varredura.
- Avaliar a citotoxicidade das nanopartículas sobre células animais por meio do ensaio de viabilidade indireta através de avaliação da atividade mitocondrial e viabilidade direta através do ensaio por Exclusão de Azul de Tripán.
- Avaliar a genotoxicidade das nanopartículas sobre células animais por meio do ensaio cometa.
- Avaliar os efeitos das nanopartículas sobre microrganismos de importância agrícola a partir do teste de concentração inibitória mínima e pela técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real utilizando *primers* específicos para bactérias que participam do ciclo do nitrogênio.
- Avaliar a efetividade das nanopartículas no controle do mofo branco *in vitro*, principalmente sobre a germinação de escleródios.
- Avaliar o efeito das nanopartículas sobre plantas de soja

4 ETAPAS DE DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

O fluxograma abaixo dá uma visão geral das etapas de desenvolvimento do trabalho



5 RESULTADOS

Os resultados obtidos neste trabalho são apresentados em forma de dois artigos científicos submetidos a revistas de política editorial seletiva. Tais artigos estão incluídos a seguir:

5.1- Artigo 1 – Submetido ao Journal of Nanobiotechnology (ISSN: 1477-3155)

Síntese de nanopartículas biogênicas de titânio a partir de *Trichoderma harzianum* na presença e ausência de parede celular de *Sclerotinia sclerotiorum* para aplicação na agricultura.

5.2- Artigo 2 – Submetido ao Chemosphere Journal (ISSN: 0045-6535)

Toxicidade de nanopartículas biogênicas de titânio sintetizadas a partir de *Trichoderma harzianum* em células animais, microrganismos de interesse agrícola e plantas de soja.

5.1 ARTIGO 1

Síntese de nanopartículas biogênicas de titânio a partir de *Trichoderma harzianum* na presença e ausência de parede celular de *Sclerotinia sclerotiorum* para aplicação na agricultura.

RESUMO

O estudo de nanomateriais para aplicação na agricultura ganhou espaço nos últimos tempos, com a intenção de aprimorar o controle de pragas na lavoura. Neste contexto, as nanopartículas biogênicas são consideradas boas estratégias por utilizarem produtos biológicos no processo de síntese, diminuindo a geração de resíduos tóxicos e aumentando a especificidade no controle da praga. *Trichoderma harzianum* é um fungo muito utilizado para controle biológico tendo destaque como parte do manejo integrado contra *Sclerotinia sclerotiorum* (causador da doença mofo branco), principalmente devido ao uso de diferentes vias de controle, como a produção de enzimas capazes de degradar a parede celular do fitopatógeno. Com base nisto, o presente trabalho propôs a síntese de diferentes nanopartículas biogênicas de titânio a partir de *T. harzianum* estimulado ou não estimulado por parede celular de *S. sclerotiorum*, sua caracterização físico-química e avaliação da sua atividade no controle do fitopatógeno. As nanopartículas biogênicas de titânio foram sintetizadas a partir do conteúdo enzimático de *T. harzianum* com e sem estímulo de *S. sclerotiorum* e a partir de três precursores de titânio diferentes: Titanium (II) Oxide, Titanium (IV) Oxide Anatase e Titanium (IV) Oxide Rutile. As suspensões de nanopartículas foram caracterizadas utilizando as técnicas de Espalhamento Dinâmico de Luz, Microeletroforese e Rastreamento de Nanopartículas para obtenção de diâmetro, polidispersão, potencial zeta e concentração em nanopartículas/mL. Para constatar a presença de *T. harzianum* residual nas suspensões de nanopartículas, foram realizados ensaios de crescimento deste fungo, e em seguida foi analisada a atividade das nanopartículas no controle de *S. sclerotiorum*. A partir da caracterização foi observado um maior diâmetro e valores de potencial zeta mais negativos nas nanopartículas sintetizadas sem estímulo, o que pode ser devido à maior quantidade e variedade de proteínas produzidas pelo fungo de controle biológico na presença da parede celular do fitopatógeno. Foi observado que todas as nanopartículas sem estímulo possuem maior quantidade de *T. harzianum* residual, com destaque para as sintetizadas sem estímulo a partir de óxido de titânio (IV) Rutilo e óxido de titânio (II), sendo a primeira capaz de carrear a maior quantidade deste fungo e a segunda capaz de estimular seu crescimento. Com relação à atividade no controle de *S. sclerotiorum* foi observado que todas as nanopartículas sintetizadas sem estímulo foram capazes de inibir a germinação de escleródios. Com base no observado, foi possível concluir a efetividade da síntese de nanopartículas de titânio utilizando conteúdo enzimático de *T. harzianum*, a partir dos três tipos de precursor utilizado, com e sem estímulo de parede celular de *S. sclerotiorum*, sendo as nanopartículas sintetizadas sem estímulo as mais eficientes no controle do fitopatógeno, por provavelmente apresentarem ação sinérgica entre as nanopartículas e o fungo *T. harzianum* carreado pelas suspensões.

Palavras-chave: Biossíntese de nanopartículas, Controle de pragas. Nanopartículas de óxido de metal

1 INTRODUÇÃO

Aplicação de nanomateriais na área agrícola, seja como fertilizantes ou para controle de pragas está sendo estudada nos últimos anos (RUI et al., 2016), entre eles estão os nanosensores (WANG et al., 2016), nanocápsulas para liberação controlada de agroquímicos (PASQUOTO-STIGLIANI et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2018; PASCOLI et al., 2019), nanopartículas metálicas (VELMURUGAN et al., 2013) e de óxidos de metais, como o dióxido de titânio, que não apresentaram toxicidade para as plantas, podendo ainda promover seu crescimento (ANDERSEN et al., 2016; LYU et al., 2017). Entre estes diferentes nanomateriais, surge a possibilidade da utilização de nanopartículas biogênicas metálicas na tentativa de solucionar problemas existentes em relação ao controle de pragas e à fertilização do solo. Esta prática possibilita o aproveitamento da sinergia observada nestas nanopartículas devido à formação de capping (recobrimento) em torno do cerne metálico (CHOWDHURY et al., 2014; BALLOTTIN et al., 2016; GUILGER et al., 2017).

A escolha da utilização de *Trichoderma* spp para a síntese de nanopartículas biogênicas se dá em consequência destes fungos serem amplamente utilizados como controle biológico, já que são antagonistas inespecíficos capazes de controlar o crescimento de diversos fitopatógenos. Um dos hospedeiros de *Trichoderma* spp é o fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (HOWELL, 2003), que é capaz de afetar cultivares de destaque econômico, como a soja, feijão, batata, tomate, entre outros (BOLAND e HALL, 1994), causando perdas de até 100% na produção. O fungo *Trichoderma harzianum*, assim como outras espécies deste gênero, promove o controle de pragas a partir da ação conjunta por diferentes vias. Dentre elas estão a competição por nutrientes, a liberação de metabólitos na região da rizosfera da planta deixando-a inadequada para a sobrevivência do hospedeiro, a promoção da resistência sistêmica das plantas à ação de fitopatógenos e também o micoparasitismo, que se dá a partir da produção de enzimas hidrolíticas capazes de degradar a parede celular do fungo hospedeiro (HARMAN et al., 2004).

Os fungos do gênero *Trichoderma* já vêm sendo utilizados na síntese de nanopartículas biogênicas (GUILGER et al., 2017; MISHRA et al., 2014) e são ótimos candidatos, dada a possibilidade de manutenção do conteúdo enzimático bioativo a partir desta técnica. Estudos apontam a possibilidade de reprodução *in vitro* do ambiente necessário para a produção das enzimas envolvidas no controle dos fungos

fitopatógenos, sendo necessária para isto a adição de parede celular do hospedeiro ao meio de cultura destinado ao crescimento de *Trichoderma spp.*, estimulando assim sua produção de quitinases, β -glucanases e proteases (GERALDINE et al., 2013; QUALHATO et al., 2013).

Com base no exposto, o presente trabalho propôs a síntese biogênica de nanopartículas de titânio a partir do conteúdo enzimático de *T. harzianum* com e sem o estímulo de parede celular de *S. sclerotiorum* para futuras aplicações agrícolas.

2 MÉTODOS

2.1 Obtenção de parede celular de *Sclerotinia sclerotiorum*

Foram preparadas placas contendo meio Batata Dextrose Ágar (BDA) às quais foram adicionados escleródios de *S. sclerotiorum*, 1 escleródio por placa (obtidos através de doação de lavouras contaminadas). As placas foram mantidas por 7 dias em temperatura ambiente, com fotoperíodo de 12 horas, em seguida foram transferidos discos de micélio (10 mm) para caldo Batata Dextrose (BD) em uma proporção de 1 disco para cada 50 mL, estes foram mantidos em temperatura ambiente sob agitação constante de 180 rpm por um período de 7 dias.

Após este período o micélio de *S. sclerotiorum* foi separado por filtração, liofilizado e macerado com o uso de nitrogênio líquido, originando um pó ao qual foi adicionada água destilada até a concentração de 5 mg/mL. Esta mistura foi centrifugada a 12000g por 15 minutos e o sobrenadante foi avaliado para a presença de proteína pela técnica de Bradford (1976) a partir da leitura em 595 nm utilizando albumina como padrão. Após centrifugação o sobrenadante foi completamente retirado e o processo de lavagem e centrifugação foi repetido até não serem detectadas proteínas no sobrenadante. A parede celular obtida ao fim do processo foi novamente liofilizada e macerada originando o pó utilizado para induzir a produção de proteínas do fungo *T. harzianum* na síntese de nanopartículas de titânio com estímulo.

2.2 Cultura de *Trichoderma harzianum* e síntese biogênica de nanopartículas de Titânio.

A cultura de *T. harzianum* foi realizada a partir do produto comercial Ecotrich WP (Balagro), na formulação pó molhável 1×10^{10} UFC/g. Foram preparadas placas com meio Ágar Batata-Dextrose (BDA) às quais foi adicionado 1 mL de suspensão de *T. harzianum* na concentração de 200 mg/mL, com auxílio de swab. As placas foram mantidas por 6 dias ao abrigo da luz e em temperatura ambiente.

A seguir, com base na metodologia de Guilger et al., (2017), foi realizada a transferência da cultura para caldo Batata Dextrose (BD). Foram utilizadas duas formas para a síntese de nanopartículas: sem estímulo de *S. sclerotiorum* e com estímulo, sendo que para a síntese de nanopartículas com estímulo foi adicionado 0,5% de parede celular de *S. sclerotiorum* ao caldo BD (GERALDINE et al., 2013). Com uma alça de transferência foram retirados dois discos de micélio de 4 mm de diâmetro de *T. harzianum* do meio BDA e transferidos para 75 mL de caldo BD (com e sem estímulo) e mantido abrigado da luz em agitador a 150 rpm e temperatura ambiente durante 12 dias para crescimento.

Para a obtenção do filtrado aquoso contendo metabólitos de *T. harzianum* foram seguidos os procedimentos descritos por Guilger et al., (2017). Após o período de crescimento, a biomassa de *T. harzianum* foi filtrada, pesada e transferida para água autoclavada em uma proporção de 1:10 (m/v). A biomassa foi mantida na água por 72 horas, sob agitação de 150 rpm, em temperatura ambiente ao abrigo da luz. Após este período a biomassa foi filtrada a vácuo, o material seco foi descartado, mantendo-se o conteúdo aquoso com o produto do metabolismo de *T. harzianum*.

Para a síntese das diferentes nanopartículas de titânio foram utilizados três diferentes precursores: Óxido de Titânio II, Óxido de Titânio IV Anatase e Óxido de Titânio IV Rutilo (Sigma Aldrich Chemistry), os quais foram adicionados ao conteúdo enzimático de *T. harzianum* para obtenção de concentração final de 1 mM. Cada solução foi mantida em agitação por 24 horas a temperatura ambiente até a formação das NPs (KIRTHI et al., 2011), as quais foram armazenadas em temperatura ambiente ao abrigo de luz. Ao final das sínteses as nanopartículas biogênicas obtidas foram nomeadas de acordo com dois critérios de síntese: o precursor utilizado e o meio no qual foram sintetizadas (Quadro 1).

Quadro 1: Quadro de definição da nomenclatura das nanopartículas sintetizadas. Para as NPs sintetizadas utilizando Óxido de Titânio (II) foi utilizada a sigla NPTiOII, enquanto para as NPs sintetizadas a partir de Óxido de Titânio (IV) Anatase, a sigla NPTiOIVA e as NPs sintetizadas a partir de Óxido de Titânio (IV) Rutilo, a sigla NPTiOIVR. Para indicar o meio no qual se desenvolveu a síntese foram acrescentadas as siglas CE para meio com estímulo de *S. sclerotiorum* e SE para as sintetizadas sem estímulo, originando então seis nanopartículas diferentes: NPTiOII-SE, NPTiOII-CE, NPTiOIVA-SE, NPTiOIVA-CE, NPTiOIVR-SE e NPTiOIVR-CE.

Precursor	Solução de metabólitos	
	<i>T. harzianum</i> (SE)	<i>T. harzianum</i> + Parede <i>S. sclerotiorum</i> (CE)
TiO (II)	NPTiOII-SE	NPTiOII-CE
TiO (IV) Anatase	NPTiOIVA-SE	NPTiOIVA-CE
TiO (IV) Rutilo	NPTiOIVR-SE	NPTiOIVR-CE

2.3 Caracterização físico-química das nanopartículas sintetizadas

A caracterização das nanopartículas sintetizadas foi realizada por meio da análise da distribuição de tamanho e índice de polidispersão (PDI) obtidos pela técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS, *Dynamic Light Scattering*), potencial zeta obtido pela técnica de Microeletroforese, concentração em nanopartículas/mL obtida pela técnica de Rastreamento de Nanopartículas (NTA, *Nanoparticles Tracking Analysis*) e pela medida de pH utilizando pHmetro (WRIGHT, 2012; DJURIŠIĆ et al., 2015; ZHANG et al., 2016).

Para a realização das técnicas de DLS e Microeletroforese, as nanopartículas foram diluídas a 50% e foram realizadas três leituras por amostra a partir do equipamento *ZetaSizer Nano ZS 90 (Malvern)* a um ângulo fixo de 90° e temperatura de 25 °C. Já para a técnica de NTA, as amostras foram diluídas 100 vezes e lidas a partir do equipamento *NanoSight LM14* e uma câmera ligada ao *software NanoSight v.2.3*. A medida do pH, por sua vez, foi realizada com as amostras puras e o uso de um pHmetro (GRILLO et al., 2012).

2.4 Avaliação do crescimento de *T. harzianum*

Para verificar o crescimento de *T. harzianum* remanescente presente na suspensão de nanopartículas sintetizadas, foram realizados ensaios divididos em duas partes. Parte A, para a verificação da viabilidade do fungo carregado pelas suspensões, onde cada uma das nanopartículas biogênicas de Titânio (NPTiOII-SE, NPTiOIVA-SE, NPTiOIVR-SE, NPTiOII-CE, NPTiOIVA-CE e NPTiOIVR-CE) foi adicionada separadamente a placas com meio de cultura BDA na concentração de 1×10^8 NPs/mL.

Parte B, para verificação de estímulo do crescimento de *T. harzianum*, onde foram preparadas placas contendo as mesmas concentrações das nanopartículas, porém acrescidas de *T. harzianum* comercial na concentração proporcional à indicada para aplicação em campo) (Quadro 2). Foram preparadas também placas controle contendo *T. harzianum* comercial na concentração proporcional à indicada para uso na lavoura.

Devido à existência de conídios e micélios de *T. harzianum* remanescentes na suspensão final da síntese de NPs, foram preparados os mesmos ensaios, porém com as nanopartículas filtradas em filtros com poros de 0,2 µm.

Quadro 2: Apresentação das amostras utilizadas para a avaliação do crescimento de *T. harzianum* carreado pela suspensão das nanopartículas biogênicas de Titânio.

Parte A: APENAS NANOPARTICULAS				
Precursor	Solução de metabólitos			
	<i>T. harzianum</i> (SE)		<i>T. harzianum</i> + Parede <i>S. sclerotiorum</i> (CE)	
	Não filtrado	Filtrado em 0,2µm	Não filtrado	Filtrado em 0,2 µm
TiO (II)	NPTiOII-SE	NPTiOII-SE	NPTiOII-CE	NPTiOII-CE
TiO (IV) Anatase	NPTiOIVA-SE	NPTiOIVA-SE	NPTiOIVA-CE	NPTiOIVA-CE
TiO (IV) Rutilo	NPTiOIVR-SE	NPTiOIVR-SE	NPTiOIVR-CE	NPTiOIVR-CE
Parte B: NANOPARTICULAS + <i>T. harzianum</i>				
Precursor	Solução de metabólitos			
	<i>T. harzianum</i> (SE)		<i>T. harzianum</i> + Parede <i>S. sclerotiorum</i> (CE)	
	Não filtrado	Filtrado em 0,2 µm	Não filtrado	Filtrado em 0,2 µm
TiO (II)	NPTiOII-SE	NPTiOII-SE	NPTiOII-CE	NPTiOII-CE
TiO (IV) Anatase	NPTiOIVA-SE	NPTiOIVA-SE	NPTiOIVA-CE	NPTiOIVA-CE
TiO (IV) Rutilo	NPTiOIVR-SE	NPTiOIVR-SE	NPTiOIVR-CE	NPTiOIVR-CE

As placas foram mantidas em temperatura ambiente, com fotoperíodo de 12 horas por 7 dias. Após o período de cultura foi avaliado o crescimento de *T. harzianum*.

2.5 Cinética de crescimento de *T. harzianum* carreado pelas nanopartículas de titânio

Após comprovada a presença de *T. harzianum* viável resultante da síntese, foi avaliada a cinética de crescimento deste fungo proveniente de cada suspensão de NPs sintetizadas. Para isto foram preparadas placas de Petri contendo meio de cultura BDA, às quais, no centro de cada placa, foi adicionado um disco de papel filtro autoclavado embebido na suspensão de NPs. Cada um dos testes com nanopartículas foi preparado

separadamente, sendo as placas incubadas em temperatura ambiente com fotoperíodo de 12h. O ensaio foi realizado em triplicata e o crescimento de *T. harzianum* foi acompanhado através de fotos, para posterior avaliação da cinética utilizando o *ImageJ Software*.

Denominou-se tempo zero (T0) o momento no qual foi observado crescimento micelial excedendo os limites do filtro em qualquer uma das amostras. As placas foram fotografadas neste momento (T0) e após os períodos de 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48 e 60 horas. A curva de crescimento foi construída através da área de crescimento relativa do fungo em função do tempo, avaliada e calculada a partir da Equação 1:

$$\text{Área relativa} = \frac{A(T) - A(T0)}{A(F) - A(T0)} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde A(T) é a área no tempo avaliado, A(T0) é a área no tempo zero (considerado o início do crescimento de micélio) e A(F) a área total da placa.

2.6 Avaliação da atividade das nanopartículas contra *S. sclerotiorum in vitro*

Para a realização do ensaio da atividade das nanopartículas, placas de *Petri* foram preparadas contendo meio BDA suplementado com as diferentes nanopartículas biogênicas na concentração de 1×10^8 NPs/mL. O ensaio foi realizado de três formas: utilizando nanopartículas puras; utilizando nanopartículas após serem filtradas (0,2 µm) e utilizando nanopartículas autoclavadas. Também foram preparadas placas controles contendo *T. harzianum* comercial na concentração proporcional à indicada para uso no campo.

Em todas as formas testadas, após solidificação do meio de cultura foi adicionado 1 escleródio por placa, sendo o controle realizado apenas com a adição do escleródio em meio BDA. As placas foram mantidas em temperatura ambiente, com fotoperíodo de 12 horas por 7 dias, todo o experimento foi realizado em triplicata. Após o período de cultura foram observados o crescimento de micélio e a geração de novos escleródios.

2.7 Análise estatística

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

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Síntese e caracterização das nanopartículas de titânio

O diâmetro hidrodinâmico médio (DM), o índice de polidispersão (PDI), potencial zeta (ZP), a concentração e o pH de cada nanopartícula sintetizada foram determinados logo após a síntese, sendo os resultados apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Características físico-químicas das nanopartículas biogênicas de titânio, sendo **DM:** Diâmetro hidrodinâmico Médio; **PDI:** Índice de Polidispersão e **ZP:** Potencial Zeta.

AMOSTRA	pH	D.M. (nm)	PDI	Z.P (mV)	CONCENTRAÇÃO (NPs/mL)
NPTiOII-SE	6,41	459,6 ± 29,6	0,538 ± 0,10	-19,33 ± 0,47	6,02x10 ⁹ ± 7,02x10 ⁸
NPTiOII-CE	6,54	712,9 ± 9,5	0,514 ± 0,03	-9,41 ± 1,00	4,88x10 ⁹ ± 1,25x10 ⁹
NPTiOIVA-SE	7,31	310,1 ± 1,5	0,228 ± 0,03	-16,40 ± 1,39	4,19x10 ¹⁰ ± 2,44x10 ¹⁰
NPTiOIVA-CE	6,52	774,4 ± 20,1	0,438 ± 0,04	-7,53 ± 0,44	5,39x10 ⁹ ± 8,55x10 ⁸
NPTiOIVR-SE	7,41	567,4 ± 58,1	0,741 ± 0,08	-20,20 ± 3,15	6,80x10 ⁹ ± 1,37x10 ⁹
NPTiOIVR-CE	6,56	650,7 ± 46,7	0,535 ± 0,09	-17,10 ± 0,79	1,86x10 ¹⁰ ± 3,28x10 ⁹

De acordo com a Tabela 1 é possível observar que as seis diferentes nanopartículas sintetizadas apresentaram pH entre 6,4 e 7,4. Como o pH considerado ideal para a irrigação está entre 6,5 e 8,4 (ALMEIDA, 2010), as nanopartículas podem ser consideradas com boa condição de pH para uso na agricultura a partir da aplicação por quimigação, técnica que utiliza a água de irrigação como veículo para a aplicação de agroquímicos como fertilizantes, herbicidas e fungicidas para melhor cobertura da área tratada e redução de custos com a produção a partir do aproveitamento de maquinário e mão de obra (VIEIRA et al., 2001; MIORINI, RAETANO e EVERHART, 2017).

Nanopartículas biogênicas são importantes, pois ao serem sintetizadas a partir de um produto biológico, são capazes de carrear suas proteínas em uma estrutura conhecida como *capping*, que fica na parte externa da partícula como um recobrimento, conferindo estabilidade e especificidade às mesmas (DURÁN et al., 2011). Acredita-se

que o mesmo ocorra nas nanopartículas sintetizadas neste estudo, com diferença apenas na interação existente entre o *capping* e a partícula, já que os precursores utilizados não reagem e as proteínas são provavelmente adsorvidas na superfície de partículas de óxido de titânio já dispersas.

Observando o diâmetro médio apresentado pelas nanopartículas biogênicas de titânio é possível notar um aumento das nanopartículas sintetizadas em meio com estímulo quando comparadas às sintetizadas em meio sem estímulo, o que pode ser consequência da presença de maior quantidade de proteínas produzidas pelo fungo *T. harzianum* quando estimulado pela parede de *S. sclerotiorum*, as quais consequentemente formariam um maior recobrimento.

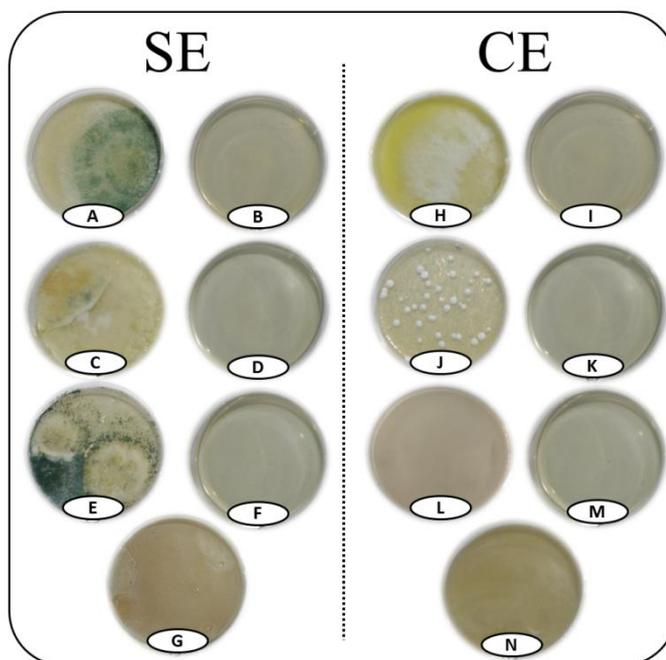
Em relação ao potencial zeta, as nanopartículas sem estímulo apresentaram maior eletronegatividade, indicando diferenças em relação às características do *capping* existente como recobrimento. Normalmente o ZP é um dado utilizado para prever a estabilidade da suspensão de nanopartículas, pois quanto menor a carga em módulo, maior a probabilidade de aglomeração e agregação destas. Na síntese biogênica vemos que a estabilidade das nanopartículas está relacionada também à presença de recobrimento (GURUNATHAN et al., 2009; SURESH et al., 2012), o que pode aumentar a estabilidade das nanopartículas sintetizadas com estímulo.

A concentração das nanopartículas biogênicas sintetizadas, obtida pela técnica de NTA, nos mostra que a síntese a partir do conteúdo enzimático de *T. harzianum* tem um bom rendimento, ficando em níveis entre 10^9 e 10^{10} NPs/mL.

3.2 Avaliação do crescimento de *T. harzianum* carregado pela suspensão das nanopartículas sintetizadas

A partir da observação da presença de *T. harzianum* residual nas suspensões de nanopartículas, foi realizado um ensaio para a comprovação da viabilidade deste fungo nas suspensões e a avaliação do seu crescimento. (Figura 1).

Figura 3: Avaliação do crescimento de *T. harzianum* carreado pela suspensão das nanopartículas biogênicas de Titânio. **A:** NPTiOII-SE não filtradas; **B:** NPTiOII-SE filtradas; **C:** NPTiOIVA-SE não filtradas; **D:** NPTiOIVA-SE filtradas; **E:** NPTiOIVR-SE não filtradas; **F:** NPTiOIVR-SE filtradas; **G:** *T. harzianum* comercial, **H:** NPTiOII-CE não filtradas; **I:** NPTiOII-CE filtradas; **J:** NPTiOIVA-CE não filtradas; **K:** NPTiOIVA-CE filtradas; **L:** NPTiOIVR-CE não filtradas; **M:** NPTiOIVR-CE filtradas; **N:** *T. harzianum* comercial. **Grupo SE:** Nanopartículas sintetizadas sem estímulo; **Grupo CE:** Nanopartículas sintetizadas com estímulo.



De acordo com os resultados, as nanopartículas sintetizadas sem estímulo (SE) e não filtradas apresentaram crescimento de *T. harzianum* (Figuras 1A, 1C e 1E), sendo a NPTiOIVR-SE (Figura 1E) a que apresentou maior crescimento. Já as mesmas nanopartículas, quando filtradas ($0,2 \mu\text{m}$) não apresentaram crescimento do fungo (Figuras 1B, 1D e 1F), resultados que comprovam que o *T. harzianum* presente nas placas tem origem na suspensão de nanopartículas biogênicas, provenientes do que pode ser chamado de “remanescente de síntese”.

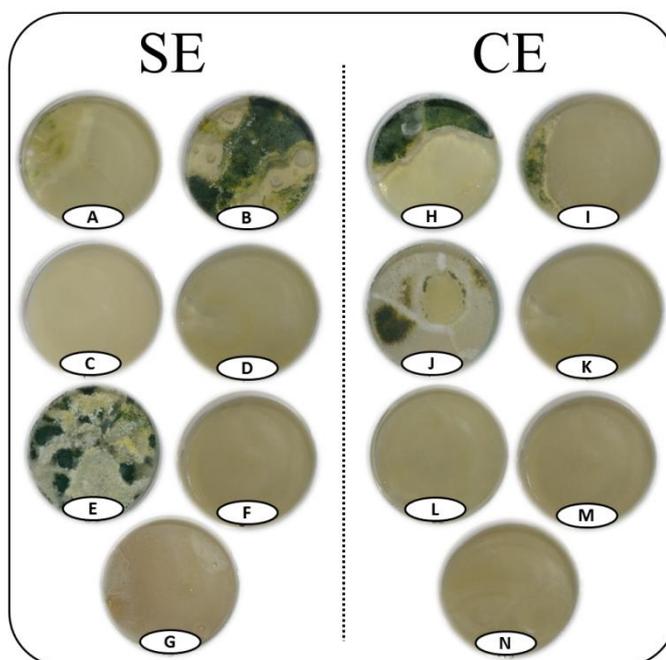
Ao avaliarmos os resultados apresentados pelas nanopartículas com estímulo (CE), é possível perceber crescimento micelial de *T. harzianum* a partir das NPTiOII-CE e NPTiOIVA-CE não filtradas (Figuras 1H e 1J), porém após filtração ($0,2 \mu\text{m}$) estas não apresentaram crescimento de *T. harzianum* (Figuras 1I e 1K), resultado semelhante ao observado nas nanopartículas sem estímulo.

Também foi observado que as nanopartículas NPTiOIVR-CE, não apresentaram crescimento micelial de *T. harzianum* mesmo sem passarem pelo processo de filtração (Figura 1L), o que sugere que esta contenha uma quantidade mínima de *T. harzianum* resultante da síntese.

3.3 Avaliação dos efeitos das nanopartículas sobre o crescimento de *T. harzianum*

Foram preparadas também placas combinando as nanopartículas com o fungo *T. harzianum* comercial, com o objetivo de avaliar a possibilidade das nanopartículas biogênicas de Titânio terem ação estimulante no crescimento deste fungo quando utilizado nas culturas (Figura 2).

Figura 4: Avaliação dos efeitos das nanopartículas sobre o crescimento de *T. harzianum*. **A:** NPTiOII-SE não filtradas; **B:** NPTiOII-SE filtradas; **C:** NPTiOIVA-SE não filtradas; **D:** NPTiOIVA-SE filtradas; **E:** NPTiOIVR-SE não filtradas; **F:** NPTiOIVR-SE filtradas; **G:** *T. harzianum* comercial; **H:** NPTiOII-CE não filtradas; **I:** NPTiOII-CE filtradas; **J:** NPTiOIVA-CE não filtradas; **K:** NPTiOIVA-CE filtradas; **L:** NPTiOIVR-CE não filtradas; **M:** NPTiOIVR-CE filtradas; **N:** *T. harzianum* comercial. **Grupo SE:** Nanopartículas sintetizadas sem estímulo; **Grupo CE:** Nanopartículas sintetizadas com estímulo. Todas as placas tiveram acréscimo de *T. harzianum* comercial na concentração proporcional à indicada para uso no campo.



Ao observarmos os resultados apresentados pelas nanopartículas sem estímulo (SE), pode-se notar que quando comparadas ao controle de *T. harzianum* comercial (Figura 2G), as nanopartículas NPTiOII-SE (Figuras 2A e 2B) e NPTiOIVR-SE (Figura 2E) se destacam pela maior quantidade de fungo observada, sendo que, provavelmente a síntese de NPTiOIVR-SE apresenta uma maior quantidade de *T. harzianum* residual. Esta hipótese pode ser confirmada ao analisarmos a ação da mesma amostra após o processo de filtração (Figura 2F), a qual não apresentou maior crescimento em relação ao controle. Ao analisarmos os resultados apresentados pelas NPTiOII-SE é possível supor que as próprias nanopartículas sejam capazes de induzir a proliferação do fungo

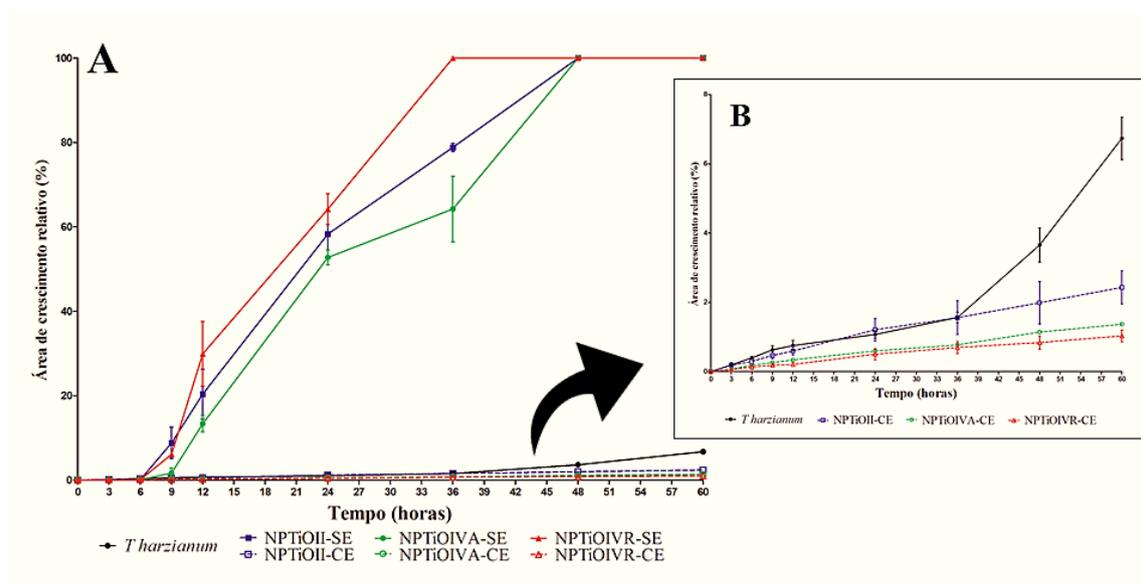
T. harzianum, pois ao compararmos a ação destas nanopartículas filtradas (Figura 2B) e não filtradas (Figura 2A), ambas apresentaram maior crescimento do fungo em relação ao controle, sendo maior o crescimento na placa com nanopartículas filtradas do que na placa com nanopartículas não filtradas.

Com relação às placas nas quais foram utilizadas as nanopartículas com estímulo (CE) em conjunto com *T. harzianum* comercial, pode-se notar maior crescimento micelial deste fungo em relação ao controle (Figura 2N) a partir das NPTiOII-CE (Figuras 2H e 2I) e NPTiOIVA-CE (Figura 2J), sendo as NPTiOII-CE as únicas capazes de, após filtração, estimular o crescimento do fungo adicionado em conjunto no ensaio.

3.4 Cinética de crescimento de *T. harzianum* carregado pelas nanopartículas de titânio

A avaliação do crescimento de *T. harzianum* carregado pelas nanopartículas de titânio em função do tempo resultou em curvas de crescimento deste fungo representadas pela área da placa ocupada por micélio (Figura 3).

Figura 5: Crescimento de *T. harzianum* em relação ao tempo de ensaio em horas. Área de crescimento relativa às NPTiOII com e sem estímulo; NPTiOIVA com e sem estímulo; NPTiOIVR com e sem estímulo e suspensão de *T. harzianum* comercial na concentração de 0,127 mg/mL para fins de comparação.



De acordo com as curvas de crescimento, todas as nanopartículas sintetizadas sem o estímulo de *S. sclerotiorum* (SE) apresentaram maior crescimento de *T. harzianum* quando comparadas às nanopartículas sintetizadas com estímulo. Pode-se

destacar também que, dentre as três nanopartículas sem estímulo, observa-se uma maior velocidade no crescimento das NPTiOIVR-SE, sugerindo que estas possuam uma maior quantidade de *T. harzianum* residual, o que está de acordo com o resultado apontado pelo ensaio de viabilidade e crescimento deste fungo carreado pelas nanopartículas.

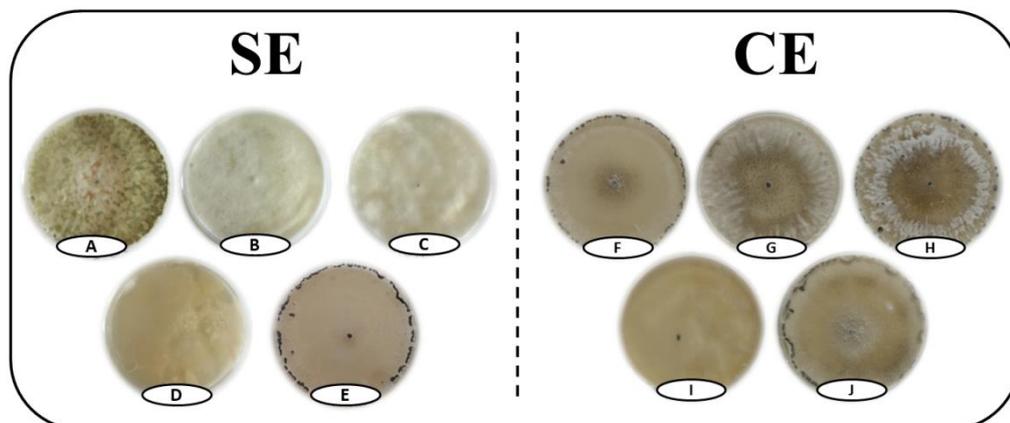
Estudos comprovam que a promoção do crescimento de *T. harzianum* na presença de parede celular do fitopatógeno pode estimular a maior produção de enzimas líticas, as quais desempenham papel fundamental no controle biológico (GERALDINE et al., 2013; QUALHATO et al., 2013). Portanto, uma possível explicação para o menor crescimento de *T. harzianum* a partir das nanopartículas com estímulo seria o deslocamento de recursos energéticos do fungo para a produção de metabólitos responsáveis pelo controle biológico do fitopatógeno quando estimulado pela parede celular, resultando em uma redução da proliferação celular e consequentemente em uma menor concentração de *T. harzianum* residual.

A partir da comparação com o crescimento apresentado pelo fungo *T. harzianum* comercial na concentração indicada para uso na lavoura, é possível destacar que as nanopartículas sintetizadas com estímulo apresentaram crescimento equivalente ao fungo comercial por até 36 horas de ensaio. Em contrapartida, a partir deste período foi observado aumento no crescimento de *T. harzianum* comercial, enquanto as nanopartículas com estímulo mantiveram crescimento constante e as nanopartículas sem estímulo, principalmente as NPTiOIVR-SE, apresentaram o máximo de crescimento possível para o ensaio.

3.5 Avaliação da atividade das nanopartículas contra *S. sclerotiorum* *in vitro*

Os resultados obtidos na avaliação da atividade mostraram que as placas contendo meio BDA, suplementado com as três nanopartículas sintetizadas sem estímulo, não apresentaram germinação de *S. sclerotiorum* (Figuras 4A, 4B e 4C), destacando o crescimento de *T. harzianum*, o qual provavelmente colonizou o escleródio, inativando-o. Foi possível observar também a geração de uma média de 91,3 novos escleródios nas placas controle de *S. sclerotiorum* (Figura 4E), enquanto não houve germinação dos escleródios nas placas contendo *T. harzianum* comercial na concentração proporcional à indicada para uso no campo (Figura 4D).

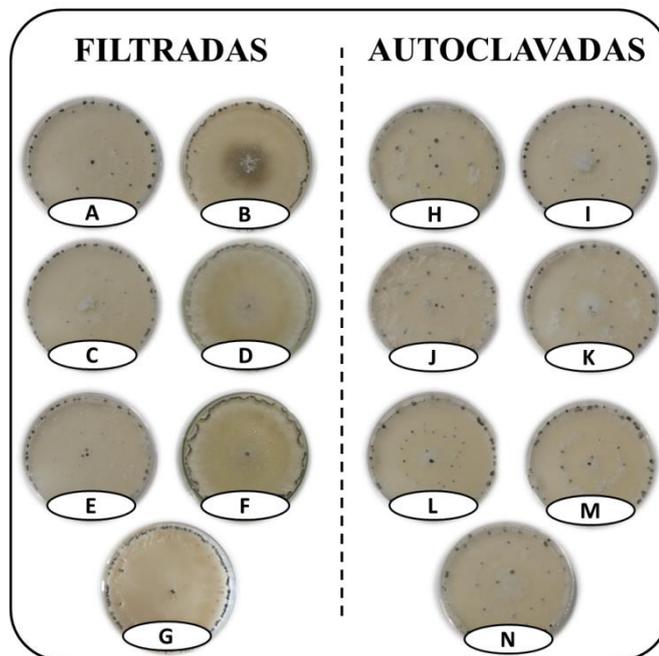
Figura 6: Avaliação da atividade das nanopartículas de titânio puras no controle de *S. sclerotiorum*. **A:** NPTiOII-SE, **B:** NPTiOIVA-SE, **C:** NPTiOIVR-SE, **D:** *T. harzianum* comercial, **E:** *S. sclerotiorum* em meio BDA, **F:** NPTiOII-CE, **G:** NPTiOIVA-CE, **H:** NPTiOIVR-CE, **I:** *T. harzianum* comercial, **J:** *S. sclerotiorum* em meio BDA. **Grupo SE:** Nanopartículas sintetizadas sem estímulo; **Grupo CE:** Nanopartículas sintetizadas com estímulo.



Os resultados apresentados pelas nanopartículas puras sintetizadas com estímulo de *S. sclerotiorum* (Figuras 4F, 4G e 4H) mostraram que todas as placas apresentaram germinação do escleródio, com grande crescimento micelial e surgimento de novos escleródios, sendo em média 54 para NPTiOII-CE (Figura 4A, do Grupo CE), 5 para NPTiOIVA-CE (Figura 4B, do Grupo CE) e 56 para NPTiOIVR-CE (Figura 4C, do Grupo CE), não ocorrendo a maior especificidade no controle do mofo branco, como era esperado em relação à síntese com estímulo.

Com relação à atividade das nanopartículas filtradas e autoclavadas, foi possível observar que estas não foram capazes de inibir a germinação do escleródio (Figura 5), não apresentando diferenças no crescimento do fitopatógeno e geração de novos escleródios em comparação com as placas controle.

Figura 7: Avaliação da atividade das nanopartículas de titânio no controle de *S. sclerotiorum* filtradas (0,2 µm) e autoclavadas. **A:** NPTiOII-SE filtradas, **B:** NPTiOII-CE filtradas, **C:** NPTiOIVA-SE filtradas, **D:** NPTiOIVA-CE filtradas, **E:** NPTiOIVR-SE filtradas, **F:** NPTiOIVR-CE filtradas, **G:** *T. harzianum* comercial, **H:** NPTiOII-SE autoclavadas, **I:** NPTiOII-CE autoclavadas, **J:** NPTiOIVA-SE autoclavadas, **K:** NPTiOIVA-CE autoclavadas, **L:** NPTiOIVR-SE autoclavadas, **M:** NPTiOIVR-CE autoclavadas, **N:** *T. harzianum* comercial.



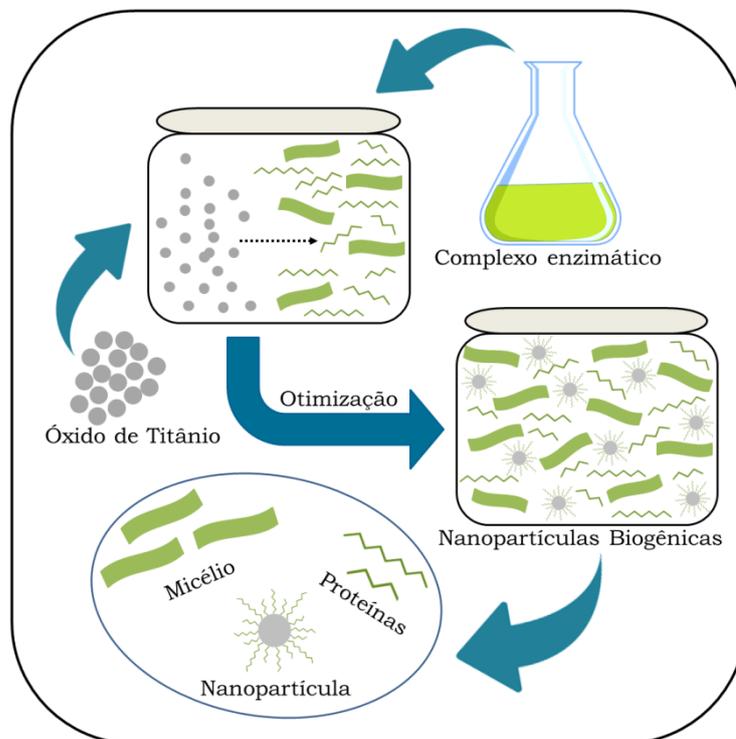
Possivelmente a ação inibitória de germinação do escleródio se deve à sinergia entre a ação das nanopartículas e o crescimento do fungo *T. harzianum* residual carregado pela suspensão de nanopartículas biogênicas de Titânio. A hipótese possível para as nanopartículas sintetizadas com estímulo não serem capazes de inibir a germinação de escleródios seria a de que, com a menor quantidade de *T. harzianum* residual demonstrada pelos ensaios de crescimento, a ação conjunta entre este fungo e as nanopartículas diminua, reduzindo sua efetividade no controle de *S. sclerotiorum*.

3.6 Proposta de mecanismos de síntese das nanopartículas de Titânio

A síntese biogênica de nanopartículas metálicas em geral é proposta como a ação dos metabólitos do organismo utilizado como redutores e estabilizantes no processo (DURAN et al., 2011; HIETZSCHOLD et al., 2019). Porém, como os precursores utilizados neste trabalho não sofrem reação pode-se supor que o mecanismo de síntese ocorra a partir da dispersão do óxido de titânio em conteúdo enzimático de *T. harzianum*, seguido de adsorção de proteínas do fungo na superfície das partículas, resultando em suspensões contendo nanopartículas de óxido de titânio recobertas por

proteínas sintetizadas pelo fungo, juntamente com proteínas livres (não adsorvidas na superfície das nanopartículas) e micélio e conídios de *T. harzianum*. de acordo com a Figura 6.

Figura 8: Hipótese proposta para a síntese de nanopartículas biogênicas de titânio a partir do complexo enzimático de *T. harzianum* utilizando três diferentes precursores: Óxido de Titânio II, Óxido de Titânio IV Anatase e Óxido de Titânio IV Rutilo.



Desta forma este trabalho tenta elucidar como nanopartículas biogênicas podem ser sintetizadas a partir de compostos que não formam íons e não apresentam redução enzimática, como no caso da nanopartícula de prata ou ferro.

CONCLUSÃO

De acordo com os resultados apresentados neste trabalho foi possível constatar a viabilidade da técnica aplicada para a síntese biogênica de nanopartículas de Titânio a partir do fungo *Trichoderma harzianum* utilizando dois tipos de meio de síntese: com estímulo de *Sclerotinia sclerotiorum* e sem estímulo, e partindo de três tipos de precursores de Titânio: TiO (II), TiO (IV) Anatase e TiO (IV) Rutilo.

Foi possível observar o carregamento de *T. harzianum* residual nas suspensões de nanopartículas, principalmente referente à síntese sem o estímulo. Estas partículas foram capazes de inibir a germinação do fitopatógeno e conseqüentemente a geração de

novos escleródios, o que sugere que a ação no controle do fungo ocorra a partir da sinergia entre as nanopartículas de titânio e o *T. harzianum* residual carregado pelas mesmas, porém mais estudos são necessários para avaliar a possibilidade de uso destes novos nanomateriais no controle da praga em lavoura.

AGRADECIMENTOS:

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, bem como financiamento da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – processo 2017/13328-5).

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, O. A. Qualidade da água de irrigação. Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, 2010. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/26783/1/livro-qualidade-agua.pdf>. Acesso em: 18 Nov. 2018.
- ANDERSEN, C. P., et al. Germination and early plant development of ten plant species exposed to titanium dioxide and cerium oxide nanoparticles. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 35, n. 9, p. 2223-2229, 2016.
- BALLOTTIN, D., et al. Elucidating protein involvement in the stabilization of the biogenic silver nanoparticles. **Nanoscale Research Letters**, v. 11, p. 1-9, 2016.
- BOLAND, G.J.e HALL, R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 16, p. 93-108, 1994.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 7, n. 72, p. 248-254, 1976.
- CHOWDHURY, S., BASU, A. e KUNDU, S. Green synthesis of protein capped silver nanoparticles from phytopathogenic fungus *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid with antimicrobial properties against multidrug-resistant bacteria. **Nanoscale Research Letters**, v. 9, n. 1, p. 1-11, 2014.
- DJURIŠIĆ, A. B., et al. Toxicity of metal oxide nanoparticles: Mechanisms, characterization, and avoiding experimental artefacts. **Small Journal**, v. 11, n. 1, p. 26-44, 2015.

- DURÁN, N. et al, Mechanistic aspects in the biogenic synthesis of extracellular metal nanoparticles by peptides, bacteria, fungi and plants. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.90, p. 1609-1624, 2011.
- FEIZI, H., et al. Impact of bulk and nanosized titanium dioxide (TiO₂) on wheat seed germination and seedling growth. **Biological Trace Element Research**, v. 146, p. 101-106, 2012.
- 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, p. 308-316, 2013.
- GRILLO, R., et al. Poly (epsilon-caprolactone) nanocapsules As Carrier Systems for Herbicides: Physico-Chemical Characterization and Genotoxicity Evaluation. **Journal of Hazardous Materials**, v. 231, p. 1-9, 2012.
- GUILGER, M., et al. Biogenic silver nanoparticles based on *Trichoderma harzianum*: synthesis characterization, toxicity evaluation and biological activity, **Scientific Reports**, V. 7, 2017
- GURUNATHAN, S. et al. Biosynthesis, purification and characterization of silver nanoparticles using *Escherichia coli*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 74, p. 328–335, 2009.
- HARMAN, G. E., et al. *Trichoderma* species – oportuistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p. 43-56, 2004.
- HIETZSCHOLD, S. et al. Does nitrate reductase play a role in silver nanoparticle synthesis? Evidence of NADPH as the sole reducing agent. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 7, p. 8070-8076, 2019.
- HOWELL, C. R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. **Plant Diseases**, v. 87, n. 1, p. 4 -10, Jan. 2003.
- KIRTHI, A. V., et al. Biosynthesis of titanium dioxide nanoparticles using bacterium *Bacillus subtilis*. **Materials Letters**, v. 65. p. 2745–2747, 2011.
- LYU, S. et al. Titanium as a beneficial Element for crop production. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, Artigo 597, 2017.
- MIORINI, T. J. J., RAETANO, C. G. e EVERHART, S. E. Control of white mold of dry bean and residual activity of fungicides applied by chemigation. **Crop Protection**, v. 94, p. 192-202, 2017.
- MISHRA, A. et al. Biocatalytic and antimicrobial activities of gold nanoparticles synthesized by *Trichoderma* sp. **Bioresource Technology**, v. 166, p. 235-242, 2014.
- OLIVEIRA, J. L. et al. Geraniol encapsulated in chitosan/gum arabic nanoparticles: A promising system for pest management in sustainable agriculture. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, p. 5325-5334, 2018.

PASCOLI, M. et al. Neem oil based nanopesticide as an environmentally-friendly formulation for applications in sustainable agriculture: An ecotoxicological perspective. **Science of the Total Environment**, v. 677, p. 57-67, 2019.

PASQUOTO-STIGLIANI, T., et al. Nanocapsules containing Neem (*Azadirachta Indica*) Oil: Development, characterization, and toxicity evaluation. **Scientific Reports**, v.7, 2017.

QUALHATO, T. F. et al. Mycoparasitism studies of *Trichoderma* species against three phytopathogenic fungi: evaluation of antagonism and hydrolytic enzyme production. **Biotechnol. Lett.**, v. 35, pç. 1461-1468, 2013.

RUI, M., et al. Iron Oxide nanoparticles as a potential iron fertilizer for peanut (*Arachis hypogaea*). **Frontiers in Plant Science**, v. 7, 2016.

SURESH, A. K. et al. Cytotoxicity induced by engineered silver nanocrystallites is dependent on surface coatings and cell types. **Langmuir**, v. 28, p. 2727-2735, 2012.

VELMURUGAN, P., et al. Pine cone-mediated green synthesis of silver nanoparticles and their antibacterial activity against agricultural pathogens. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 97, p. 361-368, 2013.

VIEIRA, R. F., et al. Fungicidas aplicados via água de irrigação no controle do mofo branco no feijoeiro e incidência do patógeno na semente. **Fitopatol. bras.**, v. 26, n. 4, p. 770-773, 2001.

WANG, S., et al. A novel upconversion luminescence turn-on nanosensor for ratiometric detection of organophosphorus pesticides. **RSC Advances**, 2016.

WRIGHT, M. Nanoparticle Tracking Analysis for the multiparameter characterization and counting of nanoparticle suspensions. *In*: Soloviev, M. (ed.). **Nanoparticles in Biology and Medicine: Methods and Protocols**, Methods in Molecular Biology. Springer, 2012, p.511-524.

ZHANG, F., et al. Biocontrol potential of *Trichoderma harzianum* isolate T-aloe against *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 100, p. 64-74, 2016.

5.2 ARTIGO 2

Toxicidade de nanopartículas biogênicas de titânio sintetizadas a partir de *Trichoderma harzianum* em células animais, microrganismos de interesse agrícola e plantas de soja.

RESUMO

Com o aumento de produtos contendo nanopartículas de óxido de titânio na sua composição, o estudo da toxicidade que essas partículas podem desencadear se torna primordial para seu uso com segurança. Sabe-se que as características físico-químicas e morfológicas das nanopartículas tem papel fundamental na atividade e toxicidade que elas apresentam, desta forma, o presente trabalho propôs a síntese de nanopartículas biogênicas de titânio baseadas no fungo *Trichoderma harzianum* para uso como controle de praga na lavoura, sua caracterização físico-química e avaliação da sua toxicidade em células animais, microrganismos de importância agrícola e plantas de soja. Duas nanopartículas foram sintetizadas a partir de filtrado contendo metabólitos de *T. harzianum* utilizando dois diferentes precursores: Titanium Oxide II (TiOII) e Titanium Oxide IV Rutile (TiOIVR), seguidas da caracterização físico-química para a avaliação de Diâmetro Médio (DM) e Polidispersão (PDI), Potencial Zeta (ZP), concentração (NPs/mL), morfologia e pH. Foi então avaliada a citotoxicidade das mesmas com e sem exposição à radiação ultravioleta a partir dos ensaios de viabilidade celular por atividade mitocondrial e exclusão por Azul de Tripán. A genotoxicidade foi mensurada utilizando ensaio cometa em células animais. A ação das nanopartículas de TiOIVR nos microrganismos *Bacillus thuringiensis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bradyrhizobium japonicum* e *Beauveria bassiana* foi avaliada pela técnica de Concentração Mínima Inibitória (MIC) e, para melhor compreensão dos efeitos em bactérias do ciclo do nitrogênio, foi realizada a quantificação de genes específicos através de qPCR (PCR real time). A ação das nanopartículas também foi avaliada utilizando parâmetros bioquímicos e morfológicos em plantas de soja. As nanopartículas de TiOII apresentaram pH 6,35, 478,6 nm (DM), 0,667 (PDI), -23,4 mV (ZP) e $2,2 \times 10^{10}$ Nps/mL; as de TiOIVR apresentaram pH 7,54, 469,8 nm (DM), 0,797 (PDI), -25,7 mV (ZP) e $1,9 \times 10^{10}$ Nps/mL. Ambas as nanopartículas apresentaram morfologia esférica e carreamento de *T. harzianum* viável remanescente da síntese. Não foram observadas diferenças significativas na viabilidade de células animais expostas a ambas as nanopartículas com e sem exposição à radiação UV, destacando sua baixa indução de citotoxicidade. Foi possível notar o aumento na genotoxicidade em células da linhagem HaCat para ambas as nanopartículas, porém o mesmo não foi observado nas demais linhagens celulares utilizadas (V79-4 e 3T3). A exposição às nanopartículas de TiOIVR não gerou diferenças significativas na morfologia e estresse oxidativo em plantas de soja nem foi capaz de inibir o crescimento de diferentes microrganismos de interesse agrícola, porém apresentou leve alteração em relação à quantidade e proporção de genes bacterianos relacionados ao ciclo do Nitrogênio. Os resultados mostram que as

nanopartículas apresentam características interessantes para sua aplicação na área agrícola, porém existe a necessidade de maiores estudos para a segurança da aplicação futura deste nanomaterial.

Palavras-chave: Nanopartículas de óxidos de metais. Citotoxicidade. Genotoxicidade. Fitotoxicidade.

1 INTRODUÇÃO

O Dióxido de titânio é um dos minerais mais abundantes no planeta, e pode ser encontrado nas formas cristalinas anatase, rutilo e brookita, sendo as duas primeiras as mais utilizadas comercialmente. Seu uso é intenso em vários setores industriais, como por exemplo o de eletrônicos e cosméticos, sendo considerado biologicamente inerte em humanos e animais. Nos últimos tempos, nanopartículas de dióxido de titânio (TiO_2NPs) têm sido amplamente produzidas e utilizadas em produtos que participam da vida diária das pessoas, como tintas e corantes (ŠTENGL, BAKARDJIEVA e MURAFI, 2009), cosméticos, principalmente protetores solares (PARK e KANG, 2005), aditivos alimentares (CHEN et al., 2013), tratamento de efluentes (HU et al., 2016), em biomateriais para implantes (WU et al., 2012) e como fotocatalizadores (TAHIR e AMIN, 2015).

O uso de nanopartículas vem despontando na agricultura, com destaque para aplicações como nanofertilizantes, nanobiosensores e controle de pragas (PRASAD, KUMAR e PRASAD, 2014; SINGH et al., 2018), sendo o dióxido de titânio em escala nanométrica uma opção que têm recebido atenção nesta área, por apresentar aumento na germinação e crescimento de plantas em comparação com o material bulk (FEIZI et al., 2012; AZIMI, FEIZI e KHAJEH HOSSEINI, 2013; FEIZI et al., 2013a).

Logo, devido a crescente produção de TiO_2NPs , é consenso a necessidade de estudos sobre seu mecanismo de ação e propriedades toxicológicas. A exposição a estas nanopartículas pode ser ocupacional, a partir do trabalho na produção industrial ou a partir do uso de produtos nos quais elas estão presentes na formulação (BHATTACHARYA et al., 2009; MÁRQUEZ-RAMIREZ et al., 2012), o que torna importante a discussão dos potenciais riscos oferecidos pela exposição por diferentes vias, como a dérmica, oral e pulmonar.

O dióxido de titânio possui propriedade fotocatalítica, o que significa a capacidade de geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) a partir da absorção de energia luminosa. Com isto, este material pode gerar toxicidade a partir da indução de estresse oxidativo, principalmente em escala nanométrica, dado o aumento da área de superfície em relação ao material bulk (PARK et al., 2011; MORLANDO et al., 2018). A agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) aponta o pó de TiO₂ inalado como possível substância carcinogênica em animais, enquanto os estudos da toxicidade de nanopartículas em humanos revela evidências conflitantes, podendo este material receber a descrição de “possível carcinogênico em humanos” (IARC, 2010). O conflito entre as informações acerca da toxicidade de TiO₂NPs é mostrado em diferentes estudos como de Chen, Yan e Li (2014), onde os autores discutem que este conflito possa ser explicado pela grande variedade de nanopartículas com diferentes características que foram utilizadas como objeto dos diferentes estudos. Uma vez que cada nanopartícula assume características únicas de acordo com o método empregado para a sua síntese, como tamanho, carga e morfologia, é imprescindível correlacionar os dados da toxicidade apresentada com a caracterização da partícula utilizada pelo estudo, tornando assim os dados mais precisos e diminuindo os conflitos de literatura.

Nanopartículas biogênicas normalmente são descritas como menos tóxicas que aquelas sintetizadas por via química, por utilizarem produtos biológicos no seu preparo (SINGH et al., 2016). Babitha e Korrapati (2013) demonstraram que nanopartículas biogênicas de dióxido de titânio não ocasionaram morte de fibroblastos embrionários de camundongos (NIH/3T3), entretanto poucos trabalhos são desenvolvidos para avaliar a toxicidade destes nanomateriais em organismos não alvos.

O trabalho aqui apresentado mostra a síntese de nanopartículas biogênicas de titânio a partir do fungo de controle biológico *Trichoderma harzianum*, sua caracterização físico-química e morfológica bem como a avaliação da sua toxicidade em linhagens de células animais, microrganismos de interesse agrícola e plantas de soja.

2 Material e Método

2.1 Material

Para a síntese das nanopartículas foi utilizado *T. harzianum* (*Ecotrich WP*) adquirido da empresa *Balagro* e os precursores de titânio: *Titanium (II) Oxide* e *Titanium (IV) Oxide Rutile* foram adquiridos da empresa *Sigma-Aldrich*.

Os microrganismos *Bacillus thuringiensis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bradyrhizobium japonicum* e *Beauveria bassiana* utilizados no ensaio de Concentração Mínima Inibitória foram obtidos através de doações de diferentes grupos de pesquisa, e para as análises da citotoxicidade e genotoxicidade foram utilizadas três linhagens celulares (Tabela 1) obtidas através do Banco de Células do Rio de Janeiro.

Tabela 1: Linhagens celulares utilizadas para a realização dos ensaios de citotoxicidade e genotoxicidade: espécie, origem/código de catálogo e características técnicas.

Linhagem Celular	Espécie	Origem	Características Técnicas
HaCat	<i>Homo sapiens</i>	BCRJ Código 0341	Tecido: Pele Tipo Celular: Queratinócito
V79-4	<i>Cricetulus griseus</i> (Hamster chinês)	BCRJ Código 0244	Tecido: Pulmão Tipo Celular: Fibroblasto
3T3 – Swiss albino	<i>Mus musculus</i> (Swiss albino)	BCRJ Código 0017	Tecido: Embrionário Tipo Celular: Fibroblasto

2.2 Síntese e Caracterização das nanopartículas de Titânio

Para a síntese das nanopartículas de titânio inicialmente foi realizada a cultura de *Trichoderma harzianum* comercial em placas de Petri de 10 cm de diâmetro contendo meio Batata Dextrose Ágar (BDA) por 6 dias, em temperatura ambiente ao abrigo de luz. Em seguida a cultura foi transferida para caldo Batata Dextrose (BD), utilizando a superfície total de duas placas para cada litro de BD, e mantida sob agitação de 150 rpm por 12 dias (GUILGER et al., 2017).

Após este período a biomassa foi separada por filtração e transferida para água na proporção de 1:10 (g:mL), onde foi mantida por 3 dias sob agitação constante de 150 rpm. Ao final do terceiro dia foi realizada a filtração a vácuo do material, e o conteúdo enzimático do fungo foi dividido em 2 partes, às quais foram acrescidas dos precursores Óxido de Titânio e Óxido de Titânio IV Rutilo (*Sigma Aldrich Chemistry*) separadamente na concentração final de 1mM. As duas suspensões foram mantidas sob agitação pelo período de 24 horas sendo posteriormente armazenadas em temperatura

ambiente ao abrigo de luz até a realização das análises (DURÁN et al., 2007; KIRTHI et al., 2011).

Ao final da síntese as nanopartículas de Óxido de Titânio II (NPTiOII) e de Óxido de Titânio IV Rutilo (NPTiOIVR) foram caracterizadas para a obtenção de diâmetro e polidispersão pela técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS), potencial zeta pela técnica de Microeletroforese, pH com o uso de phmetro e concentração em Nanopartículas/mL pela técnica de Rastreamento de Nanopartículas (NTA).

2.3 Microscopias Eletrônicas de Transmissão (MET) e Varredura (MEV)

Para a análise por MET, uma gota da suspensão de nanopartículas foi adicionada a uma grade de cobre e tratada com uma gota de solução aquosa de uranila a 2% (p/p). Em seguida, a grade permaneceu em repouso, em temperatura ambiente, até a completa secagem das amostras e posterior análise em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss –LEO 906, pertencente ao Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia/Unicamp, o qual opera com tensão de 60 kV, com filamento de tungstênio e é equipado com a câmera CCD e *software* de captura de imagens *iTEM*, da Olympus.

A observação da morfologia das nanopartículas por MEV foi realizada com um microscópio eletrônico de varredura (FEI-Inspect-F50- 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 cola 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 em diferentes ampliações.

2.4 Ensaio de catálise do corante azul de metileno na presença de radiação ultravioleta

Para a avaliação da possível ação catalítica das nanopartículas de titânio na presença de radiação UV, estas foram adicionadas a uma solução de Azul de Metileno 20 mg/L na proporção de 1:2 (suspensão de nanopartículas:corante) e expostas à

radiação UVC (Lâmpada OSRAM PURITEC HNS UV-C 30W) a uma distância de 12 cm por 30 minutos. O ensaio foi realizado em triplicata e foi utilizada água ultrapura como controle negativo e nanopartículas comerciais TiO₂ P-25 nas concentrações 80 µg/mL e 2mg/mL como controles positivos por estas serem capazes de degradar o corante na presença de radiação UV (LAKSHMI, RENGANATHAN e FUJITA, 1995). Ao final do período as amostras foram centrifugadas a 15.557 g por 15 minutos para a retirada das nanopartículas. A ação catalítica na degradação do corante foi avaliada a partir da leitura do sobrenadante de cada amostra a 664 nm em leitor de placas ELISA (Readwell PLATE, ROBONIK) (KUMAR et al., 2014).

2.5 Avaliação da toxicidade das nanopartículas em células animais

2.5.1 Irradiação ultravioleta

Para as análises de citotoxicidade na presença de radiação ultravioleta, as células foram pré-incubadas com as nanopartículas em meio de cultura sem indicador de pH (vermelho de fenol) a 37°C e 5% de CO₂ por 30 minutos, e então expostas à radiação UVC (Lâmpada OSRAM PURITEC HNS UV-C 30W, comprimento de onda dominante: 254 nm) por 10 minutos a uma distância de 12 cm da superfície das suspensões (CORDEIRO, LEITE e DEZOTTI, 2004; GEORGE et al., 2014), e então incubadas novamente pelo período necessário para cada ensaio.

2.5.2 Avaliação da citotoxicidade a partir da atividade mitocondrial

Para a avaliação de citotoxicidade a partir da atividade mitocondrial, foi utilizada a técnica de redução do sal MTT (3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) com e sem exposição à radiação UV. Para montagem do experimento foram plaqueadas suspensões das linhagens HaCat, V79-4 e 3T3 contendo $0,5 \times 10^5$ células/mL e estas foram mantidas até aderência e estabilização da cultura. Após este período as células foram expostas por 24 horas às nanopartículas biogênicas de titânio filtradas (0,2 µm) em uma faixa de concentrações entre 0,06 e $2,1 \times 10^9$ NPs/mL (PASQUOTO-STIGLIANI et al., 2017). Para a avaliação da citotoxicidade das nanopartículas com exposição à UV, após realizada a irradiação as placas foram mantidas em incubadora por mais 24 horas.

Ao final do período de exposição os poços foram lavados com tampão fosfato-salino (PBS) estéril, a solução de MTT 0,5 mg/mL foi adicionada aos poços e as placas permaneceram na incubadora por aproximadamente 3h. Após este período a solução de MTT foi descartada, adicionou-se Dimetilsulfóxido (DMSO) e a leitura foi realizada a 540 nm em leitor de placas ELISA (Readwell PLATE, ROBONIK). Todos os testes foram realizados em sextuplicatas para cada concentração testada. A análise dos resultados foi realizada a partir do cálculo de viabilidade relativa, tomando como 100% de viabilidade a média dos valores de absorbância obtidos no controle negativo.

2.5.3 Viabilidade celular pelo ensaio de exclusão por Azul de Tripán

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 expostas ou não à radiação UV. Desta forma, as células foram expostas às NPTiOII e NPTiOIVR filtradas (0,2 µm) nas concentrações de 1×10^9 e 1×10^8 Nps/mL por uma hora e então foi adicionada uma solução de Azul de Tripán 0,4% na proporção de 1:1 v/v. Para a avaliação da toxicidade apresentada pelas nanopartículas com exposição à radiação UV foi realizada a irradiação e as células foram mantidas por mais 30 minutos em incubadora a 37°C e 5% de CO₂. A leitura foi realizada em microscópio óptico e o percentual de células vivas foi calculado utilizando a Equação 1 (RAMACHANDRAN e PRASAD, 2008).

$$\frac{\text{Número de células viáveis}}{\text{Total de células (viáveis + não viáveis)}} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

2.5.4 Ensaio Cometa

O ensaio cometa foi realizado de acordo com metodologia adaptada de Singh et al. (1988), onde as células foram expostas às NPTiOII e NPTiOIVR filtradas em poro de 0,2 µm nas concentrações de 1×10^9 e 1×10^8 Nps/mL por uma hora seguidas de homogeneização em agarose *low melting* 0,8%, estas foram distribuídas em lâmina de vidro contendo uma camada de agarose de ponto de fusão normal 1,5%. Todo o experimento. Foi realizado em triplicata.

Após o preparo das lâminas foi realizada a lise celular a 4°C, seguida de lavagem das lâminas e transferência para a cuba de eletroforese contendo tampão de

corrida a 4°C, estas permaneceram em descanso por 20 min e em seguida foi realizada a corrida (20 min em 30V, 300mA e 10W). Após a corrida as lâminas foram lavadas em solução neutralizadora por mais 5 min e deixadas para secar *overnight* em temperatura ambiente (PASQUOTO-STIGLIANI et al., 2017).

Para a coloração das lâminas com prata, as lâminas foram inicialmente lavadas com água destilada e secas, seguidas da fixação e nova lavagem e secagem em temperatura ambiente, após 24h as lâminas foram coradas. As análises foram realizadas por “*scoring visual*” em microscópio ótico, classificando os danos em 5 diferentes categorias, sendo dano zero (D0) a ausência de danos e dano quatro (D4) a maior incidência de danos (COLLINS; FLEMING; GEDIK, 1994).

2.6 Ação das nanopartículas em microrganismos de interesse agrícola e microrganismos responsáveis pelo ciclo de nitrogênio.

O ensaio para a avaliação da concentração mínima das nanopartículas capaz de inibir o crescimento de microrganismos de interesse agrícola foi realizado utilizando *Bacillus thuringiensis* (QI et al., 2016), *Pseudomonas aeruginosa* (JHA et al., 2009), *Bradyrhizobium japonicum* (MEENA et al., 2018) e *Beauveria bassiana* (McKINNON et al., 2016). Os diferentes microrganismos foram incubados a 35°C por 24h em placas de 96 poços contendo meio de cultura *Müller Hinton* suplementado com as NPTiOIVR em concentrações entre 0,06 e $2,1 \times 10^9$ NPs/mL (PASQUOTO-STIGLIANI et al., 2017). Ao final do período foi adicionado o corante Resazurin (6,75 mg/mL/poço) e as placas foram incubadas por mais 24h. Os ensaios foram realizados em triplicata para cada amostra, sendo preparados dois tipos de controle (microrganismos sem nanopartículas e 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.

Para verificar possíveis diferenças na população da microbiota responsável pelo ciclo de nitrogênio no solo exposto às NPTiOIVR, foi realizada a análise molecular das bactérias do solo, utilizando genes diretamente envolvidos neste ciclo. Inicialmente o solo foi peneirado e separado em alíquotas de 10 g em tubos cônicos, aos quais foram adicionados 2,6 mL das suspensões de NPTiOIVR na concentração de 1×10^8 NPs/mL. Foi preparada também uma amostra contendo *T. harzianum* na concentração

proporcional à de uso no campo e um controle negativo, ao qual foi adicionada apenas água (HJELMSØ, et al., 2014).

A extração de DNA foi realizada utilizando o kit *Power Soil® DNA Isolation Kit* (MoBio Laboratories) conforme orientações do fabricante. Inicialmente foi realizada a extração de DNA de uma amostra do solo antes da exposição (denominado de solo zero), indicativo das condições iniciais. As extrações de DNA das amostras de solo foram realizadas 5 e 300 dias após a exposição. A quantificação do material genético total foi realizada por fluorescência (*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 dos genes das bactérias responsáveis pelo ciclo do nitrogênio foi realizada por reação em cadeia de polimerase em tempo real (qPCR) utilizando primers para genes os específicos (*Bacterial ammonium monooxygenase*, *Nitrogenase reductase*, *Cu-containing nitrite reductase*, *Nitrite reductase*, *Nitrate reductase*, *Nitrous oxide reductase* e *Nitratereductase*), sendo as amostras e genes avaliados em triplicata pelo equipamento termociclador *Step One SYSTEM*, com as condições de 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.

2.7 Ação das nanopartículas em plantas de soja

As avaliações dos efeitos das nanopartículas sobre a soja (*Glycine max*) foram realizadas na Universidade Estadual de Londrina. A soja foi cultivada em vasos plásticos com diâmetro de 14 cm, em solo de baixa fertilidade previamente tratado com as NPTiOIVR na proporção de $3,82 \times 10^{13}$ Nps/m² (proporção obtida a partir da concentração de atividade das nanopartículas no controle de *Sclerotinia sclerotiorum* – dados não apresentados) Foram plantadas 5 sementes por vaso, com 6 repetições, sendo utilizado como controle o mesmo solo sem exposição às nanopartículas. As plantas foram mantidas em casa de vegetação em temperatura ambiente e condições naturais de umidade e luminosidade, sendo irrigadas diariamente, pelo período de 25 dias após o plantio, com aplicação de solução nutritiva na metade do período. Após este período foi avaliada a morfologia das plantas a partir do comprimento da parte aérea, comprimento

da raiz, área foliar, massa fresca e massa seca (após secagem em estufa a 60°C por 72 horas) da raiz e da parte aérea, bem como quantificados os marcadores de estresse oxidativo peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e malondialdeído (MDA – produto de peroxidação lipídica).

Para a realização das análises de estresse oxidativo, inicialmente foi preparado um extrato a partir da maceração de 0,1 g dos tecidos vegetais (raiz e folha) em nitrogênio líquido e adição de 1 mL de solução gelada de Ácido Tricloroacético (TCA) 0,2 % em metanol, seguida de centrifugação a 16.971 g e 4°C por 5 minutos, descartando-se o precipitado. Na análise de peróxido, 100 µL do extrato foi adicionado a 500 µL de tampão de reação composto por Iodeto de Potássio (KI) 1M e Tampão Fosfato de Potássio (PBS) pH 7,5 (4:1), seguido de agitação leve e incubação no gelo por 1 hora na ausência de luz. Ao fim do período foi realizada a leitura da absorbância em microplaca transparente utilizando o equipamento VICTOR TM 3 (*Perkin Elmer, Turku, Finland*) no comprimento de onda de 390 nm (ALEXIEVA et al., 2001). Já na análise de peroxidação lipídica pelo método de Espécies Reativas do Ácido Tiobarbitúrico (TBARS), 40 µL do extrato foi adicionado a 200 µL de tampão de reação composto por 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 em placa preta utilizando o equipamento VICTOR TM 3 (*Perkin Elmer, Turku, Finland*) no comprimento de excitação de 530 nm e emissão de 550 nm (CAMEJO, WALLIN e 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.

2.8 Análise estatística

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

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização Físico-química

As nanopartículas foram caracterizadas após a síntese e os dados de pH, diâmetro médio (DM), polidispersão (PDI), potencial zeta (ZP) e concentração em Nanopartículas/mL (NPs/mL) demonstram que as NPTiOII e as NPTiOIVR apresentam similaridade nas características físico-químicas (Tabela 2).

Tabela 2: Características físico-químicas das nanopartículas de titânio. **DM:** Diâmetro médio, **PDI:** Índice de polidispersão e **ZP:** Potencial Zeta.

AMOSTRA	pH	DM (nm)	PDI	ZP (mV)	CONCENTRAÇÃO (NPs/mL)
NPTiOII	6,35	478,6 ± 49,6	0,667 ± 0,05	-23,4 ± 0,92	2,20X10 ¹⁰ ± 2,75x10 ⁹
NPTiOIVR	7,54	469,8 ± 52,2	0,797 ± 0,08	-25,7 ± 1,64	1,91X10 ¹⁰ ± 2,36x10 ⁹

Nanopartículas biogênicas são conhecidas por possuírem recobrimento originado do organismo utilizado na síntese, o que pode explicar diâmetros de 478,6 nm e 469,8 nm apresentados pelas NPTiOII e NPTiOIVR, respectivamente, já que o fungo *T. harzianum* produz uma grande quantidade de metabólitos, que podem aumentar o diâmetro das partículas a partir do recobrimento.

Com relação ao potencial zeta, descreve-se que quanto maior a carga da partícula em módulo, menor a probabilidade de aglomeração e agregação, aumentando a estabilidade. As NPTiOII e NPTiOIVR apresentam ZP de -23,4 e -25,7 respectivamente, que seriam considerados bons valores para este parâmetro, porém acredita-se que a estabilidade de nanopartículas biogênicas seja menos relacionada com a carga da partícula, tendo maior relação com o seu recobrimento. A concentração dada em NPs/mL foi obtida com síntese prevista para concentração de 80mg/L de TiO₂, porém acredita-se que esta concentração esteja mais baixa, uma vez que, em análises utilizando a técnica de Espectrometria de Emissão Atômica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES) não foi possível a detecção da concentração TiO₂ para ambas as nanopartículas, o que sugere que estas estejam a uma concentração inferior a 0,1 mg/L.

Como os precursores de titânio utilizados na síntese das nanopartículas não sofrem reação pode-se sugerir que a síntese ocorra a partir da dispersão do precursor no

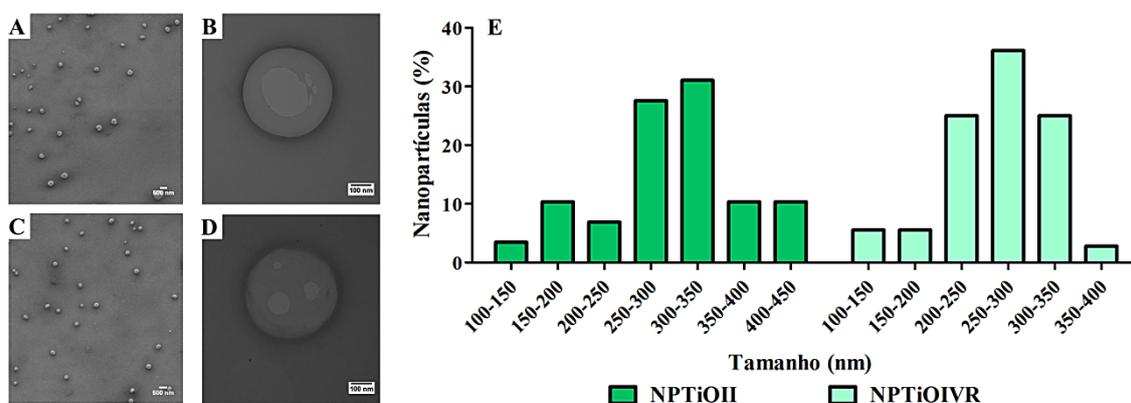
conteúdo enzimático de *T. harzianum*, seguida da adsorção de metabólitos na superfície das partículas, o que explicaria o alto valor de polidispersão apresentado por ambas as nanopartículas, já que pelo processo de dispersão pode ocorrer uma menor homogeneidade no tamanho das partículas originadas.

Foi observada também a presença de *T. harzianum* viável remanescente da síntese nas suspensões de ambas as nanopartículas, o que indica que estas não apresentaram toxicidade ao fungo de controle biológico e possam ser utilizadas em conjunto com formulações comerciais que contenham este fungo e já são empregadas na lavoura.

3.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e Varredura (MEV)

As análises por microscopia eletrônica de transmissão e microscopia eletrônica de varredura foram realizadas a fim de observar a morfologia das nanopartículas biogênicas de titânio, sendo as micrografias apresentadas na Figura 1.

Figura 1: Micrografias obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura e Transmissão das nanopartículas biogênicas de titânio. **A:** NPTiOII por MEV, magnificação de 20320x (escala 500nm). **B:** NPTiOII por MET, magnificação de 100x(escala 100nm), **C:** NPTiOIVR por MEV, magnificação de 21219x (escala 500nm), **D:** NPTiOIVR por MET, magnificação de 100x (escala 100nm).

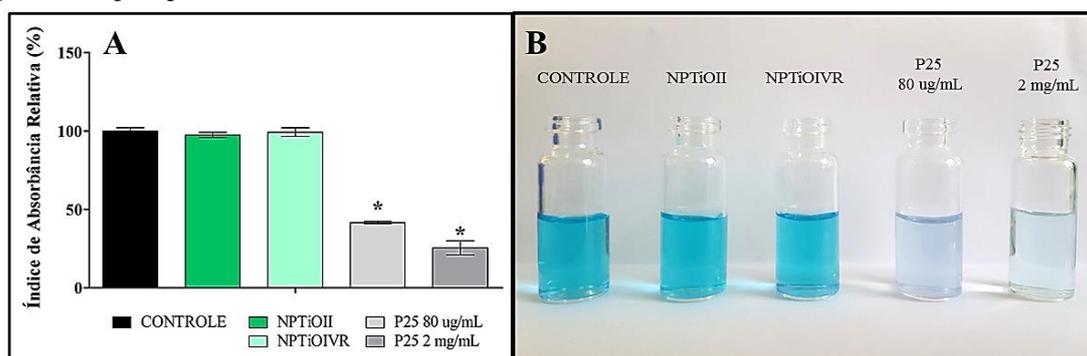


Ao avaliarmos as micrografias das nanopartículas é possível notar a similaridade entre ambas na morfologia esférica, o que pode ser observado tanto pela técnica de MEV (Figuras 1A e 1C) quanto pela técnica de MET (Figuras 1B e 1D), com diâmetros de 430 nm para as NPTiOII-SE (Figura 1B) e 425 nm para as NPTiOIVR-SE (Figura 1D).

3.3 Ação catalítica das nanopartículas na presença de radiação UV

Nanopartículas de dióxido de titânio são descritas como catalíticas na presença de radiação ultravioleta (WEIR et al., 2012), o que as confere a capacidade de degradação de corantes industriais, como o azul de metileno (LAKSHMI, RENGANATHAN e FUJITA, 1995). Com base nisto, foi avaliada a capacidade catalítica das NPTiOII e NPTiOIVR expostas à radiação UV, e os resultados são apresentados na Figura 2.

Figura 2: Ação catalítica das nanopartículas de titânio expostas à radiação UVC. * Indica diferença significativa para $p < 0,05$.

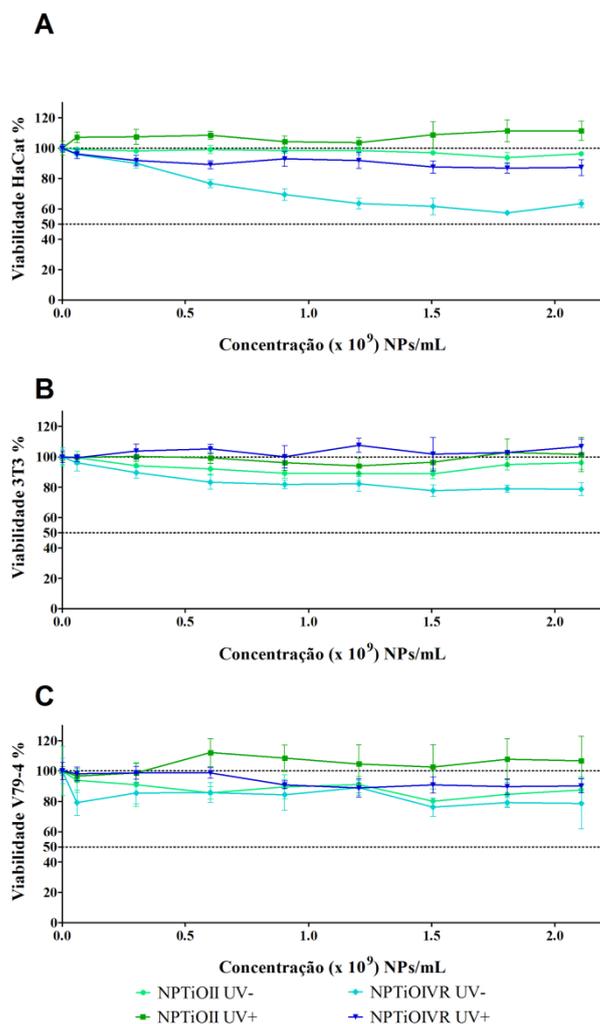


É possível perceber que não houve diferença entre a absorbância obtida pelo controle contendo apenas o corante azul de metileno e as absorbâncias obtidas pelas nanopartículas de titânio biogênicas sintetizadas, enquanto as nanopartículas de titânio comerciais (P25) apresentaram queda de mais de 50% na absorbância. Estes resultados sugerem que as NPTiOII e NPTiOIVR não são capazes de catálise sob as condições aplicadas, o que pode se dar pelo fato destas nanopartículas biogênicas possuírem recobrimento, reduzindo a ação catalítica, bem como pelo fato da forma cristalina anatase ser descrita na literatura como a forma mais utilizada para esta ação devido seu maior potencial de fotorreação (CHEN et al., 2007).

3.4 Avaliação da citotoxicidade a partir da atividade mitocondrial

Este estudo avaliou a viabilidade indireta das nanopartículas biogênicas de Titânio NPTiOII e NPTiOIVR a partir da técnica da redução do sal tetrazólio (MTT) em três linhagens celulares diferentes: queratinócitos – HaCat (Figura 3A), fibroblasto embrionário – 3T3 (Figura 3B) e fibroblastos pulmonares – V79-4 (Figura 3C) com e sem exposição à luz ultravioleta.

Figura 3: Avaliação da ação das nanopartículas biogênicas de titânio em concentrações entre 0,06 e 2,1 x 10⁹ Nps/mL na viabilidade celular pela técnica da redução do tetrazólio (MTT) em diferentes linhagens celulares com (UV+) e sem (UV-) exposição à radiação ultravioleta. **A:** HaCat , **B:** 3T3 e **C:** V79-4.



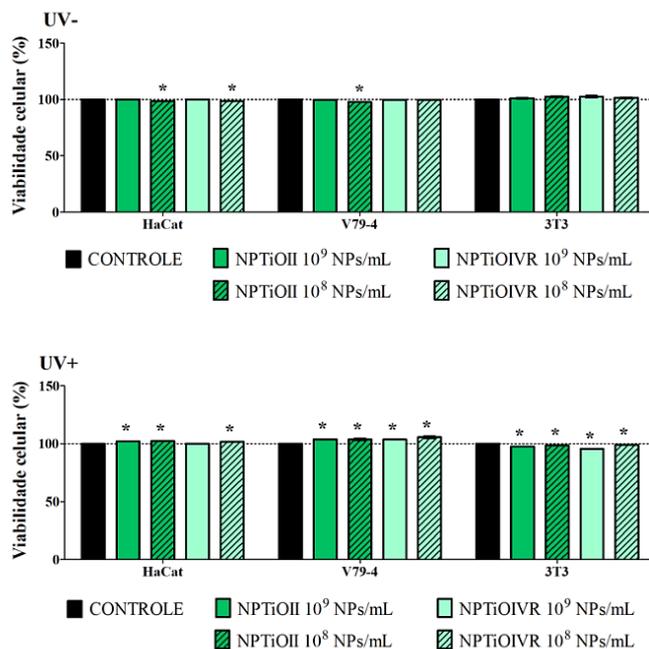
De acordo com os resultados apresentados é possível observar que não foi alcançado o IC₅₀ (concentração capaz de matar 50% das células expostas, indicativo de toxicidade) nas concentrações testadas (as quais foram limitadas devido à concentração de síntese das nanopartículas) tanto para as células expostas à luz UV, como as não expostas. Isto pode ser um indicativo de baixa toxicidade das nanopartículas quando em contato com as linhagens celulares utilizadas. Park et al. (2008) demonstraram o aumento da citotoxicidade de células de epitélio de brônquios humanos de acordo com o aumento da concentração de nanopartículas de dióxido de titânio, entretanto as maiores concentrações testadas também não foram suficientes para obtenção de IC₅₀, atingindo pouco mais de 60% de viabilidade no período de uma hora de exposição.

O Dióxido de titânio em nanoescala é amplamente utilizado em protetores solares e cosméticos por possuir um alto índice de refração, sendo a forma cristalina rutilo a mais utilizada (JAROENWORALUCK et al., 2006; WEIR et al., 2012). Ao compararmos os resultados apresentados pelas nanopartículas com e sem exposição à radiação UV é possível perceber um aumento na viabilidade relativa nas células das três linhagens após exposição, com destaque para as NPTiOIVR na linhagens de queratinócitos HaCat (Figura 3A) e fibroblastos 3T3 (Figura 3B), sugerindo que estas nanopartículas possam oferecer uma ação protetiva aos prejuízos causados pela radiação ao metabolismo celular do sal MTT.

3.5 Viabilidade celular por exclusão de Azul de Tripán

Os resultados de viabilidade celular direta por exclusão do Azul de Tripán mostraram que as nanopartículas não apresentaram citotoxicidade para as linhagens testadas nas concentrações 1×10^8 e 1×10^9 NPs/mL, com e sem exposição à radiação UV (Figura 4). As concentrações utilizadas no ensaio foram baseadas na atividade das nanopartículas na inibição de *Sclerotinia sclerotiorum* (dados não apresentados).

Figura 4: Análise da viabilidade celular direta por exclusão do Azul de Tripán de células expostas às nanopartículas biogênicas de titânio nas concentrações 1×10^9 e 1×10^8 Nps/mL com e sem exposição à radiação UV. * Indica diferença significativa para $p < 0,05$.



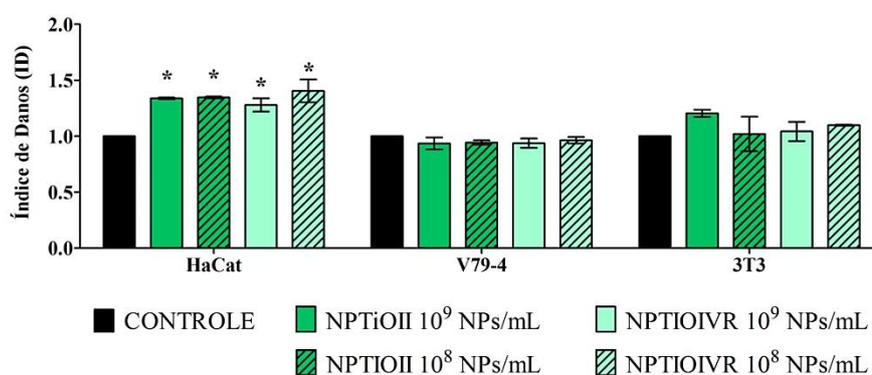
Resultados semelhantes foram descritos por Hanot-Roy et al. (2016), nos quais células de carcinoma pulmonar foram expostas a uma ampla faixa de concentrações de nanopartículas de dióxido de titânio (5, 200 e 800 $\mu\text{g/mL}$) e não apresentaram níveis significativos de citotoxicidade.

De acordo com Morlando et al. (2018), a capacidade catalítica do dióxido de titânio na presença de radiação UV, principalmente em nanoescala, pode aumentar a produção de EROs, induzindo uma maior citotoxicidade. Desta forma, pode-se sugerir que o fato das nanopartículas NPTiOII e NPTiOIVR não apresentarem ação catalítica pode ser uma explicação para estas não induzirem diferenças na toxicidade com e sem exposição à radiação UV. Outra explicação para a similaridade na viabilidade celular com e sem exposição à radiação UV é o fato de nanopartículas biogênicas possuírem um revestimento originado dos metabólitos do organismo utilizado na síntese, fato que pode diminuir a ação fotocatalítica das partículas, como destacado em estudo que aponta uma menor ação fotocatalítica de nanopartículas de dióxido de titânio recobertas com o polímero natural quitosana (MORLANDO et al., 2018).

3.6 Ensaio Cometa

O potencial genotóxico das nanopartículas de titânio foi avaliado utilizando as linhagens celulares HaCat (queratinócitos), 3T3 (fibroblastos embrionários) e V79-4 (fibroblastos pulmonares), e os resultados são apresentados na Figura 5.

Figura 5: Genotoxicidade a partir do ensaio do cometa em células expostas às nanopartículas biogênicas de titânio nas concentrações 1×10^9 e 1×10^8 Nps/mL. * Indica diferença significativa para $p < 0,05$.



Os resultados mostram a não ocorrência de índice de danos significativo em relação ao controle para as linhagens V79-4 e 3T3, sendo a linhagem celular HaCat mais sensível à ação de ambas as nanopartículas.

Bhattacharya et al. (2009) descreveram ausência de genotoxicidade após a exposição de fibroblastos pulmonares e células de epitélio bronquiais a nanopartículas de óxido de titânio Anatase, enquanto os resultados expostos por Patel, Patel e Bakshi (2017) reportaram aumento significativo nos danos de DNA gerados pela exposição de células sanguíneas a nanopartículas de dióxido de titânio obtidas por síntese química nas concentrações de 25, 75 e 125 μM . Resposta semelhante foi relatada por Armand et al. (2016), onde células de carcinoma pulmonar expostas a nanopartículas de dióxido de titânio (também obtidas por síntese química) em baixas concentrações, embora por longos períodos, foram genotóxicas. Koka e Duman (2018) reportaram dano no DNA dose-dependente e tempo-dependente causados por nanopartículas biogênicas de titânio sintetizadas a partir do extrato da folha de *Mentha aquática*.

Tais resultados demonstram a importância da investigação da toxicidade de nanopartículas relacionando-as com suas características físico-químicas, pois de acordo com a forma com que foi sintetizada e com as características e propriedades que possui, cada nanopartícula é única, podendo apresentar diferentes comportamentos em relação à toxicidade.

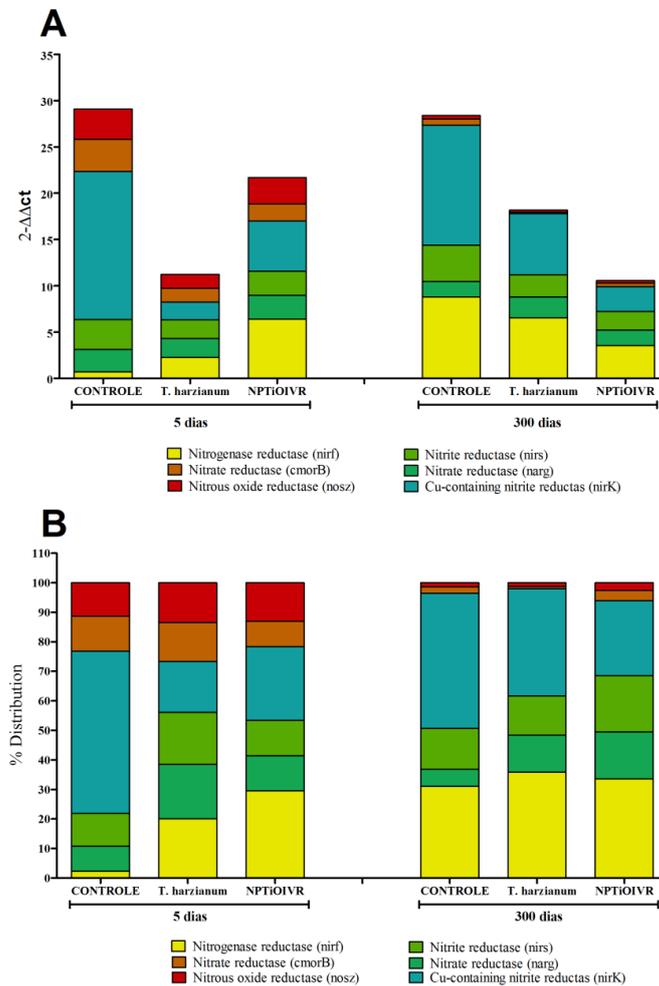
3.7 Ação das nanopartículas em microrganismos de interesse agrícola

Devido ao melhor desempenho nos testes preliminares apenas as nanopartículas NPTiOIVR foram utilizadas para avaliação de microrganismos.

Diferentes microrganismos têm recebido destaque na agricultura, seja no uso como agente de controle biológico de pragas ou como promotores do crescimento das plantas através de mutualismo. A partir do ensaio de Concentração Mínima Inibitória, não foi observada inibição do crescimento de nenhum dos microrganismos testados (*Bacillus thuringiensis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bradyrhizobium japonicum* e *Beauveria bassiana*), nem mesmo na maior concentração possível para o ensaio ($2,1 \times 10^9$ Nps/mL), indicando baixa toxicidade do nanomaterial a estes microrganismos.

Com relação à quantificação molecular por qPCR de genes envolvidos com o ciclo do Nitrogênio, foi possível observar uma diminuição na quantidade de bactérias no solo tratado com as NPTiOIVR e com o fungo de controle biológico *T. harzianum* em relação ao controle após 5 e 300 dias (Figura 6A).

Figura 6: Análise molecular de genes envolvidos no ciclo do Nitrogênio em solo exposto às NPTiOIVR na concentração 1×10^8 Nps/mL ou *T. harzianum* na concentração proporcional à indicada para uso na lavoura. A: Quantidade dos genes analisados nas amostras, B: Proporção dos genes analisados nas amostras.



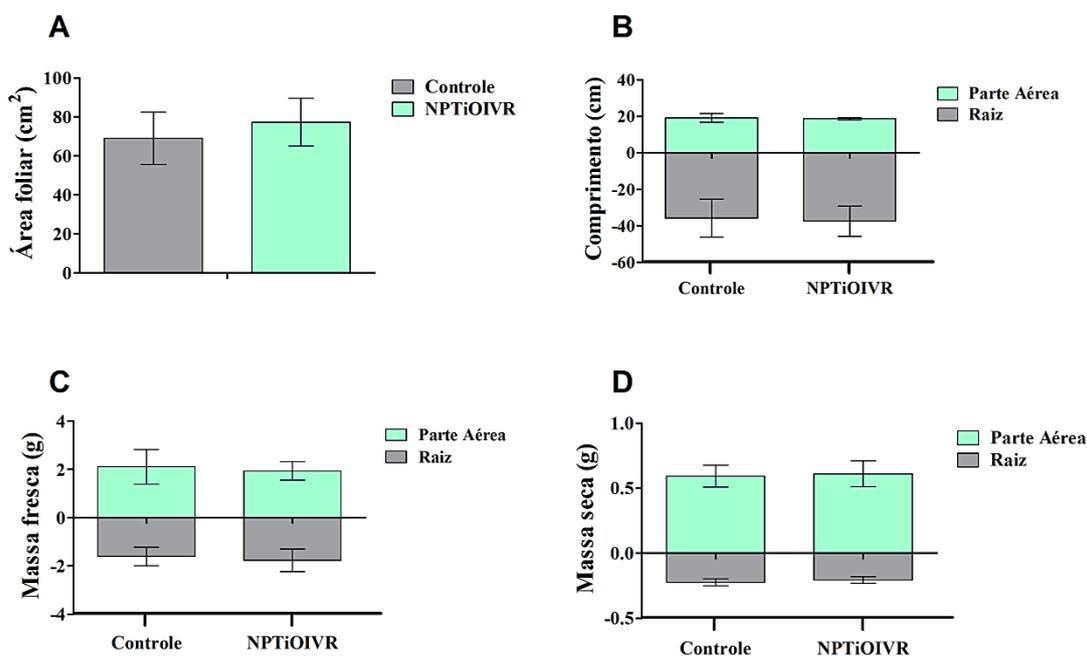
Quando analisada a proporção das bactérias quantificadas nas amostras de solo (Figura 6B), foi possível notar que o solo que recebeu as nanopartículas apresentou similaridade àquele que recebeu o fungo *T. harzianum* comercial em todo o período do ensaio, o que pode ser explicado pelo carreamento do fungo remanescente da síntese pelas nanopartículas. Pode-se notar também que após 5 dias da exposição houve um aumento na quantidade de bactérias fixadoras de Nitrogênio (representadas pelo gene nirf) e redução na quantidade de bactérias denitrificantes (representadas pelo gene nirK) em relação ao controle, resultados semelhantes aos descritos por Simonin et al. (2016), que descrevem uma cascata de efeitos negativos nos microrganismos denitrificantes após forte impacto causado por TiO₂NPs em bactérias nitrificantes, porém o mesmo foi observado para solos expostos apenas a *T. harzianum* comercial.

Ao atingir 300 dias após a exposição, a diferença entre as proporções dos genes nos solos tratados em relação ao controle diminuiu, indicando possível recuperação do solo à exposição das nanopartículas e do fungo *T. harzianum*, porém a quantificação aponta uma diminuição de bactérias no solo tratado com as NPTiOIVR, o que pode ser devido ao possível acúmulo de amônia no solo, desequilibrando o pH e causando toxicidade às bactérias.

3.8 Ação das nanopartículas em plantas de soja

De acordo com os resultados apresentados pelas plantas de soja foi possível notar que as NPTiOIVR não apresentaram influência significativa nos parâmetros observados (Figuras 7 e 8).

Figura 7: Análises morfológicas das plantas de soja expostas às NPTiOIVR na proporção de $3,82 \times 10^3$ Nps/m². **A:** Comprimento da parte aérea e raiz, **B:** Área Foliar, **C:** Massa Fresca e **D:** Massa seca.

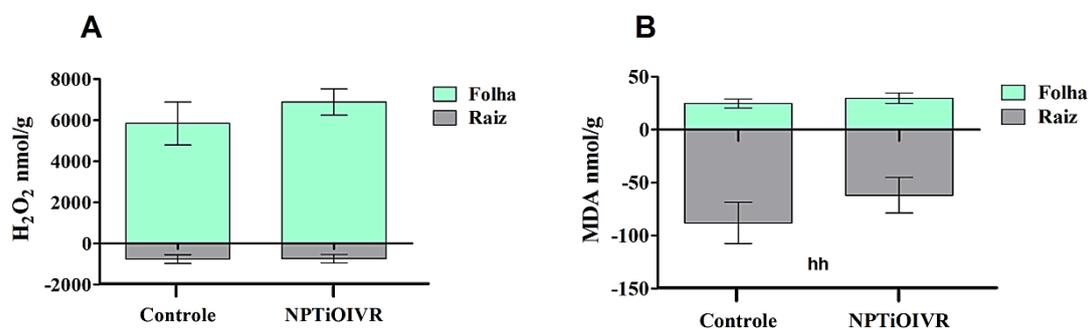


A análise morfológica das plantas expostas às NPTiOIVR pode ser utilizada como indicativo de fitotoxicidade induzida pelas partículas. Com base nos resultados é possível constatar que não houve diferença significativa na área foliar (Figura 6A), no comprimento da raiz e parte aérea (Figura 6B), bem como na massa fresca e seca da raiz e parte aérea das plantas de soja (Figuras 6C e 6D). Diversos estudos demonstram que a exposição a TiO₂NPs não induz diferenças significativas no comprimento de raiz e parte aérea de plantas como tomate, erva-doce, trigo, pepino, milho e soja (FEIZI et al.,

2013b; MAHMOODZADEH, AGHILI e NABAVI, 2013; SONG et al., 2013; ANTISARI et al., 2015; ANDERSEN et al., 2016), porém com relação à biomassa das plantas testadas, há relatos de estudos nos quais não houve diferença significativa (SONG et al., 2013; ANTISARI et al., 2015) e estudos nos quais houve aumento da biomassa até uma concentração limite e diminuição da biomassa em concentrações maiores (SONG et al., 2012; FEIZI et al., 2013b; MAHMOODZADEH, AGHILI e NAVABI, 2013), o que não foi observado neste estudo. Mahmoodzadeh, Nabavi e Kashefi (2013) relataram aumento na germinação e no crescimento de plântulas de canola até mesmo em altas concentrações de TiO₂NPs (1200 e 1500 mg/L), o que pode acontecer devido a geração de EROs pelas partículas, aumentando a resistência da semente ao estresse e promovendo a penetração de uma quantidade maior de água e oxigênios, que são necessários para o aumento do crescimento (KHOT et al., 2012).

Não foram observadas diferenças significativas também em marcadores de estresse oxidativo nas plantas expostas às NPTiOIVR (Figura 8).

Figura 8: Análises de marcadores de estresse oxidativo em plantas de soja expostas às NPTiOIVR na proporção de $3,82 \times 10^3$ Nps/m². **A:** Peróxidos e **B:** Peroxidação Lipídica.



Estudos apontam aumento na geração de EROs a partir da ação de nanopartículas de titânio, o que desencadeia estresse oxidativo e possivelmente toxicidade. Song et al. (2012) descreveram o aumento de estresse oxidativo e consequente peroxidação lipídica na espécie de planta aquática *Lemna minor* de acordo com o aumento da concentração de TiO₂NPs, enquanto que Foltête et al. (2011), utilizando nanopartículas de titânio recobertas com hidróxido de alumínio e filmes de Dimeticona para uso em filtro solar, não verificaram diferenças no estresse oxidativo em plantas de feva-comum (*Vicia faba*).

Os resultados apresentados pelas NPTiOIVR sugerem que estas nanopartículas não são capazes de gerar estresse oxidativo em plantas de soja, o que possivelmente

aconteça devido a presença do recobrimento originário do fungo *T. harzianum*, e concorda com os resultados de morfologia das plantas e toxicidade em células animais.

CONCLUSÃO

Foi possível constatar que as nanopartículas de titânio sintetizadas a partir do conteúdo enzimático de *T. harzianum* tendo como precursores o Óxido de Titânio II (NPTiOII) e o Óxido de Titânio IV Rutilo (NPTiOIVR) não foram capazes de induzir citotoxicidade nas linhagens celulares testadas mesmo quando expostas a radiação ultravioleta nas maiores concentrações possíveis, o que pode ser relacionado ao fato de possuírem recobrimento proveniente do fungo utilizado na síntese. Foi observada também a indução de genotoxicidade por ambas as nanopartículas apenas em células de queratinócitos (HaCat), indicando maior sensibilidade desta linhagem em relação às demais.

As NPTiOIVR não foram capazes de induzir alterações morfológicas como tamanho e massa, ou alterar marcadores de estresse oxidativo em plantas de soja. Estas nanopartículas também não foram capazes de inibir o crescimento de *Bacillus thuringiensis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bradyrhizobium japonicum* e *Beauveria bassiana*, porém a exposição a elas induziu alterações na quantidade e proporção de genes de bactérias do ciclo do Nitrogênio no solo. Mesmo que tenha sido observada uma recuperação das bactérias após 300 dias em exposição, destaca-se a importância dos estudos toxicológicos deste trabalho e a necessidade de futuros estudos acerca da aplicação deste nanomaterial no controle de pragas na lavoura.

AGRADECIMENTOS:

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, bem como financiamento da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – processo 2017/13328-5). Os autores gostariam de agradecer ao LNNano pelo apoio técnico durante o trabalho de microscopia eletrônica.

REFERÊNCIAS

- ALEXIEVA, V. et al. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. **Plant, Cell and Environment**, v. 24, p. 1337-1344, 2001.
- ARMAND, L., et al. Long-term exposure of A549 cells to titanium dioxide nanoparticles induces DNA damage and sensitizes cells towards genotoxic agents. **Nanotoxicology**, v. 10, n.7, p. 913-923, 2016.
- ANTISARI, L. V. et al. Uptake and translocation of metals and nutrients in tomato grown in soil polluted with metal oxide (CeO₂, Fe₃O₄, SnO₂, TiO₂) or metallic (Ag, Co, Ni) engineered nanoparticles. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, p. 1841-1853, 2015.
- AZIMI, R. FEIZI, H. e KHAJEH HOSSEINI, M. Can bulk and nanosized titanium dioxide particles improve seed germination features on wheatgrass (*Agropyron desertorum*). **Notulae Scientia Biologicae**, v. 5, n. 3, p. 325-331, 2013.
- BABITHA, S e KORRAPATI, P. S. Biosynthesis of titanium dioxide nanoparticles using a probiotic from coal fly ash effluent. **Materials Research Bulletin**, v. 48, p. 4738-4742, 2013.
- 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. 17, 2009.
- BOYD, R. D.; PICHAIMUTHU, S.K; CUENAT, A. New approach to inter-technique comparisons for nanoparticle size measurements; using atomic force microscopy, nanoparticle tracking analysis and dynamic light scattering. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**, v. 387, p. 35-42, 2011.
- CAMEJO, G., WALLIN, B. e ENOJÄRVI, M. Analysis of oxidation and antioxidants using microtiter plates. In: Armstrong, D. (editor). **Free radical and antioxidants protocols**. New Jersey: Humana Press; 1998. P. 377-387.
- CHEN, X. D. et al. Roles of anatase and rutile TiO₂ nanoparticles in photooxidation of polyurethane. **Polymer Testing**, v. 26, p. 202-208, 2007.
- CHEN, X., et al. Characterization and preliminary toxicity assay of Nano-Titanium Dioxide Additive in sugar-coated chewing gum. **Small journal**, v. 9, n. 9-10, p. 1765-1774, 2013.
- CHEN, T., YAN, J. e LI, Y. Genotoxicity of titanium dioxide nanoparticles. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 22, p. 95-104, 2014.
- COLLINS, A. R., FLEMING, I. M. e GEDIK, C. M. In vitro repair of oxidative and ultraviolet-induced DNA damage in supercoiled nucleoid DNA by human cell extract. **Biochimica and Biophysica Acta (BBA) – Gene Structure and Expression**, v. 1219, p. 724-727, 1994.

- CORDEIRO, A. C. S.; LEITE, S. G. F. e DEZOTTI, M. Inativação por oxidação fotocatalítica de *Escherichia coli* e *Pseudomonas sp.* **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 689-694, 2004.
- DURÁN, N. et al. Antibacterial effect of nanoparticles produced by fungal process on textile fabrics and their effluent treatment. **J. Biomed. Nanotechnol.**, v. 3, n. 2, p. 203-208, 2007.
- EBERLE, A. L., et al. High-resolution, high-throughput imaging with a multibeam scanning electron microscope. **Journal of Microscopy**, v. 259, n. 2, p. 114-120, 2015.
- FEIZI, H., et al. Impact of bulk and nanosized titanium dioxide (TiO₂) on wheat seed germination and seedling growth. **Biological Trace Element Research**, v. 146, p. 101-106, 2012.
- FEIZI, H. et al. Comparative effects of nanosized and bulk titanium dioxide concentrations on medicinal plant *Salvia officinalis* L. **Annual Review & Research in Biology**, v. 3, n. 4, p. 814-824, 2013a.
- FEIZI, H. et al. Phytotoxicity and stimulatory impacts of nanosized and bulk titanium dioxide on fennel (*Foeniculum vulgare* Mill). **Chemosphere**, v. 91, p. 506-511, 2013b.
- FOLTÊTE, A. S. et al. Environmental impact of sunscreen nanomaterials: Ecotoxicity and genotoxicity of altered TiO₂ nanocomposites on *Vicia faba*. **Environmental Pollution**, v. 159, p. 2515-2522, 2011.
- GEORGE, S., et al. Differential effect of solar light in increasing the toxicity of silver and titanium dioxide nanoparticles to a fish cell line and Zebra Fish embryos. **Environmental Science & Technology**, v. 48, p. 6374-6382, 2014.
- GUILGER, M., et al. Biogenic silver nanoparticles based on *Trichoderma harzianum*: synthesis characterization, toxicity evaluation and biological activity, **Scientific Reports**, V. 7, 2017
- HANOT-ROY, M., et al. Oxidative stress pathways involved in cytotoxicity and genotoxicity of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles on cells constitutive of alveolo-capillary barrier *in vitro*. **Toxicology in Vitro**, v. 33, p. 125-135, 2016.
- HU, L., et al. Treatment of landfill leachate using immobilized *Phanerochaete chrysosporium* loaded with nitrogen-doped TiO₂ nanoparticles. **Journal of Hazardous Materials**, v. 301, p. 106-118, 2016.
- IARC. International Agency for Research on Cancer. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: **VOLUME 93, Carbon Black, Titanium Dioxide, and Talc**. Lyon, 2010.
- JAROENWORALUCK, A. et al. Characteristics of silica-coated TiO₂ and its UV absorption for sunscreen cosmetic applications. **Surface and Interface Analysis**, v. 38, p. 473-477, 2006.
- KHOT, L. R. et al. Applications of nanomaterials in agricultural production and crop protection. **Crop Protection**, v. 35, p. 64-70, 2012.

- KIRTHI, A. V., *et al.* Biosynthesis of titanium dioxide nanoparticles using bacterium *Bacillus subtilis*. **Materials Letters**, v. 65. p. 2745–2747, 2011.
- KOCA, F. D. e DUMAN, F. Genotoxic and cytotoxic activity of green synthesized TiO₂ nanoparticles. **Applied Nanoscience**, p. 1-9, 2018.
- KUMAR, B., *et al.* Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) oil for one pot synthesis of silver nanocatalyst: An ecofriendly approach. **Industrial Crops and Products**, v. 58, p. 238-243, 2014.
- LAKSHMI, S.; RENGANATHAN, R. e FUJITA, S. Study on TiO₂-mediated photocatalytic degradation of methylene blue. **Journal of Protochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 88, p. 163-167, 1995.
- LYU, S. *et al.* Titanium as a beneficial Element for crop production. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, Artigo 597, 2017.
- MAHMOODZADEH, H., AGHILI, R. e NAVABI, M. Physiological effects of TiO₂ nanoparticles on wheat (*Triticum aestivum*). **Technical Journal of Engineering and Applied Sciences**, v. 3, n. 14, p. 1365-1370, 2013.
- MAHMOODZADEH, H., NAVABI, M., KASHEFI, H. Effect of nanoscale titanium dioxide nanoparticles on the germination and growth of canola (*Brassica napus*). **Journal of Ornamental and Horticultural Plants**, v. 3, n. 1, p. 25-32, 2013.
- MÁRQUEZ-RAMIREZ, S. G., *et al.* Titanium dioxide nanoparticles inhibit proliferation and induce morphological changes and apoptosis in glial cells. **Toxicology**, v. 302, p. 146-156, 2012.
- McKINNON, A. C. *et al.* *Beauveria bassiana* as an endophyte: a critical review on associated methodology and biocontrol potential. **BioControl**, v. 62, p. 1-17, 2017.
- MEENA, R. S. *et al.* Response and interaction of *Bradyrhizobium japonicum* and arbuscular mycorrhizal fungi in the soybean rhizosphere. **Plant Growth Regulation**, v.84, p. 207-223, 2018.
- MORLANDO, A. *et al.* Suppression of the photocatalytic activity of TiO₂ nanoparticles encapsulated by chitosan through a spray-drying method with potential for use in sunblocking applications. **Powder Technology**, v. 329, p. 252-259, 2018.
- OWOLADE, O.; OGUNLETI, D. Effects of titanium dioxide on the diseases, development and yield of edible cowpea. **Journal of Plant Protection Research**, 2008.
- PARK, O. K. e KANG, Y. S. Preparation and characterization of silica-coated TiO₂ nanoparticle. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**, v. 257, p. 261-265, 2005.
- PARK, E. J., *et al.* Oxidative stress and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. **Toxicology Letters**, v. 180, p. 222-229, 2008.

- PARK, H., et al. Comparison of cellular effects of titanium dioxide nanoparticles with different photocatalytic potential in human keratinocyte, HaCaT cells. **Molecular & Cellular Toxicology**, v. 7, p. 67-75, 2011.
- PASQUOTO-STIGLIANI, T., et al. Nanocapsules containing Neem (*Azadirachta Indica*) Oil: Development, characterization, and toxicity evaluation. **Scientific Reports**, v.7, 2017.
- PATEL, S., PATEL, P. e BAKSHI, S. R. Titanium dioxide nanoparticles: an in vitro study of DNA binding, chromosome aberration assay, and comet assay. **Cytotechnology**, 2017.
- PRASAD, R.; KUMAR, V. e PRASAD, K. S. Nanotechnology in sustainable agriculture: Present concerns and future aspects. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 6, p. 705-713, 2014.
- QI, J., et al. Potential of entomopathogenic *Bacillus thuringiensis* as plant growth promoting rhizobacteria and biological control agents for tomato *Fusarium* wilt. **International Journal of Environmental & Agriculture Research**, v. 2, p. 55-63, 2016.
- RALIYA, R.; BISWAS, P.; TARAFDAR, J.C. TiO₂ nanoparticle biosynthesis and its physiological effect on mung bean (*Vigna radiata* L.). **Biotechnology Reports**, v. 5, p. 22-26, 2014.
- RAMACHANDRAN, S. e 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, p. 99-107, 2008.
- SIMONIN, M. et al. Titanium dioxide nanoparticles strongly impact soil microbial function by affecting archaeal nitrifiers. **Scientific Reports**, v. 6, 2016.
- SINGH, N. P., et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, p. 184-191, 1988.
- SINGH, P., et al. Biological synthesis of nanoparticles from plants and microorganisms. **Trends in Biotechnology**, v. 34, n. 7, p. 588-599, 2016.
- SINGH, H. B., et al (Ed.). **Emerging trends in agri-nanotechnology: Fundamental and applied aspects**. Boston: CAB International, 2018.
- SONG, G. et al. Physiological effect of anatase TiO₂ nanoparticles on *Lemna minor*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 31, 2012.
- SONG, U. et al. Functional analyses of nanoparticle toxicity: A comparative study of the effects of TiO₂ and Ag on tomatoes (*Lycopersicon esculentum*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 93, p. 60-67, 2013.
- ŠTENGL, V., BAKARDJIEVA, S e MURAFKA, N. Preparation and photocatalytic activity of rare Earth doped TiO₂ nanoparticles. **Materials Chemistry and Physics**, v. 114, p. 217-226, 2009.

TAHIR, M. e AMIN, N. S. Indium-doped TiO₂ nanoparticles for photocatalytic CO₂ reduction with H₂O vapors to CH₄. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 162, p. 98-109, 2015.

WEIR, A. et al. Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products. **Environmental Science & Technology**, v. 46, p. 2242-2250, 2012.

WU, X., et al. Nano-TiO₂/PEEK bioactive composite as a bone substitute material: *in vitro* and *in vivo* studies. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 1215-1225, 2012.

5.3 COMPILAÇÃO DE RESULTADOS

Quadro 1: Resumo dos resultados apresentados pelas nanopartículas nos dois artigos apresentados anteriormente.

NANOPARTÍCULAS		ARTIGO 1						ARTIGO 2	
		TiOII-SE	TiOII-CE	TiOIVA-SE	TiOIVA-CE	TiOIVR-SE	TiOIVR-CE	TiOII	TiOIVR
Caracterização das nanopartículas	DM (nm)	459,6 ± 29,6	712,9 ± 9,5	310,1 ± 1,5	774,4 ± 20,1	567,4 ± 58,1	650,7 ± 46,7	478,6 ± 49,6	469,8 ± 52,2
	ZP (mV)	-19,33 ± 0,47	-9,41 ± 1,00	-16,40 ± 1,39	-7,53 ± 0,44	-20,20 ± 3,15	-17,10 ± 0,79	-23,4 ± 0,92	-25,7 ± 1,64
	PDI	0,538 ± 0,10	0,514 ± 0,03	0,228 ± 0,03	0,438 ± 0,04	0,741 ± 0,08	0,535 ± 0,09	0,667 ± 0,05	0,797 ± 0,08
	Concentração (NPs/mL)	6,02x10 ⁹ ± 7,02x10 ⁸	4,88x10 ⁹ ± 1,25x10 ⁹	4,19x10 ¹⁰ ± 2,44x10 ¹⁰	5,39x10 ⁹ ± 8,55x10 ⁸	6,80x10 ⁹ ± 1,37x10 ⁹	1,86x10 ¹⁰ ± 3,28x10 ⁹	2,20x10 ¹⁰ ± 2,75x10 ⁹	1,91x10 ¹⁰ ± 2,36x10 ⁹
	Morfologia	-----	-----	-----	-----	-----	-----	Esférica	Esférica
Bioatividade	Crescimento de <i>T.harzianum</i>	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM
	Controle de <i>S.sclerotiorum</i>	SIM*	NÃO	SIM*	NÃO	SIM*	NÃO	SIM*	SIM*
Toxicidade em células animais	Citotoxicidade	-----	-----	-----	-----	-----	-----	NÃO	NÃO
	Genotoxicidade	-----	-----	-----	-----	-----	-----	HaCat	HaCat
Catálise de Corante		-----	-----	-----	-----	-----	-----	NÃO	NÃO
Toxicidade em microrganismos de interesse agrícola	Efeito Inibitório		-----	-----	-----	-----	-----	-----	NÃO
	Ciclo do nitrogênio	Quantidade	-----	-----	-----	-----	-----	-----	SIM
		Proporção	-----	-----	-----	-----	-----	-----	SIM
Fitotoxicidade em plantas de soja	Morfologia		-----	-----	-----	-----	-----	-----	NÃO
	Estresse oxidativo		-----	-----	-----	-----	-----	-----	NÃO

*Concentração mínima para efeito: 1x10⁸ Nps/mL

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados apresentados nos dois artigos gerados por este trabalho, foi possível constatar a viabilidade da técnica utilizada para a síntese de nanopartículas biogênicas de titânio com o uso de três diferentes precursores de titânio (Óxido de Titânio II, IV Anatase e IV Rutilo) a partir do conteúdo enzimático de *T. harzianum* estimulado e não estimulado pela parede celular de *S. sclerotiorum* para a produção de enzimas hidrolíticas de combate ao fitopatógeno. Foi possível constatar também que dentre as nanopartículas sintetizadas, as NPTiOII-SE e NPTiOIVR-SE foram as que apresentaram melhor crescimento de *T. harzianum* remanescente da síntese e consequente melhor ação na inibição da germinação miceliogênica de *S. sclerotiorum*.

Desta forma, estas nanopartículas foram escolhidas para análises de toxicidade em células animais, as quais não indicaram citotoxicidade mesmo sob radiação ultravioleta, mas apresentaram genotoxicidade apenas na linhagem HaCat, indicando maior sensibilidade desta em relação às demais utilizadas.

Foi observado também que as NPTiOIVR não foram capazes de induzir alterações morfológicas ou gerar estresse oxidativo em plantas de soja, inibir o crescimento de *Bacillus thuringiensis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bradyrhizobium japonicum* e *Beauveria bassiana*, porém foi observada alteração na quantidade de bactérias em solos expostos às nanopartículas e leve alteração na proporção de genes de bactérias do ciclo do nitrogênio no solo quando comparadas ao solo controle.

Frente ao exposto, existe a necessidade de maiores estudos com relação à toxicidade de novos nanomateriais em diferentes organismos alvo e não-alvo, para garantir a segurança da sua utilização na área agrícola.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-LATEIF, K. S. *Trichoderma* as biological control weapon against soil borne plant pathogens. **African Journal of Biotechnology**, v. 16, n. 50, p. 2299-2306, 2017.
- ALMEIDA, F. B. R. et al. Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* strains against *Rhizoctonia solani*: evaluation of coiling and hydrolytic enzyme production. **Biotechnol Lett**, v. 29, p. 1189-1193, 2007.
- ALTOMARE, C. et al. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 7, p. 2926-2933, 1999.
- AMPO, M. e KAMAT, P. V. **Environmentally benign photocatalysts**. New York: Springer, 2010.
- ÁVILA, Z. R., et al. Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. antagônicos a *Sclerotium rolfsii* e *Sclerotinia sclerotiorum*. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento n. 117, EMBRAPA, Brasília, 2005.
- BANSAL, P., KAUR, P. e DUHAN, J. S. Biogenesis of silver nanoparticles using *Fusarium pallidoroseum* and its potential against human pathogens. **Annals of Biology**, v. 33, n. 2, p. 180-185, 2017.
- BELDEN, J. et al. Acute toxicity of fungicide formulations to amphibians at environmentally relevant concentrations. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 29, n. 11, p. 2477-2480, 2010.
- BENÍTEZ, T. et al. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, Barcelona-Spain, v. 7, p. 249-260, 2004.
- BOLAND, G.J. e HALL, R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 16, p. 93-108, 1994.
- BOLTON, M. D.; THOMMA, B. P. H. J.; NELSON, B. D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Barry: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. **Molecular Plant Pathology**, v. 7 (1), p. 1-16, 2006.

BROTMAN, Y.; GUPTA, J. K.; VITERBO, A. *Trichoderma*. **Current Biology**., v. 20, p. 390-391, 2010.

CARVALHO, D. D. C., et al. Biological control of White mold by *Trichoderma harzianum* in common bean under field conditions. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 50, n. 12, p. 1220-1224, 2015.

CLARKSON, J. P., et al. Ascospore release and survival in *Sclerotinia sclerotiorum*. **Mycological Research**, v. 107, n. 2, p. 213-222, 2003

CLARKSON, J. P., et al. Forecastin *Sclerotinia* disease on lettuce: toward developing a prediction model for carpogenic germination of sclerotia. **Phytopathology**, v. 94, n. 3, p. 268-279, 2004.

DARAEI, H., et al. Application of gold nanoparticles in biomedical and drug delivery. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, p. 1-13, 2014.

DAVAR, F., MAJEDI, A. e MIRZAEI, A. Green synthesis of ZnO nanoparticles and its application in the degradation of some dyes. **Journal of American Ceramic Society**, v. 98, n. 6, p. 1739-1746, 2015.

DINESH, D., et al. Mosquitocidal and antibacterial activity of green-synthesized silver nanoparticles from *Aloe vera* extracts: towards an effective tool against the malaria vector *Anopheles stephensi*? **Parasitology Research**, v. 114, p. 1519-1529, 2015.

EMBRAPA. Árvore do conhecimento Agroenergia. Soja. Agência Embrapa de Informação Tecnológica. AGEITEC. Disponível em <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agroenergia/arvore/CONT000fbl23vmz02wx5eo0sawqe3vtdl7vi.html>. Acesso em 15 jun. 2014.

EMBRAPA. Evolução e Perspectivas de Desenvolvimento Econômico Associadas com a Produção de Soja nos Contextos Mundial e Brasileiro. Documentos, n. 319, p. 1-67, 2011.

FRANCIS, S., et al. Green synthesis and characterization of gold and silver nanoparticles using *Mussaenda glabrata* leaf extract and their environmental applications to dye degradation. **Environmental Science and Pollution Research**, 2017.

FRÓES, A., et al. Selection of a *Streptomyces* strain able to produce cell wall degrading enzymes and active against *Sclerotinia sclerotiorum*. **The Journal of Microbiology**, v. 50, n. 5, p. 798-806, 2012.

GERHARDT, L.C.; JELL, G.M.R.; BOCCACCINI, A.R. Titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles filled poly(D,L lactic acid) (PDLLA) matrix composites for bone tissue engineering. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 18, p. 1287–1298, 2007.

GRONDONA, I. et al. Physiological and Biochemical Characterization of *Trichoderma harzianum*, a Biological Control Agent against Soilborne Fungal Plant Pathogens. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 8, p. 3189-3198, Ago. 1997.

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

HARMAN, G. E., et al. *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p. 43-56, 2004.

HARMAN, G. E. Overview of Mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, v. 96, n. 2, p. 190-194, 2006.

HENNING, A. A.; FRANÇA NETO, J. B.; KRZYŻANOWSKI, F. C.; LORINI, I. Importância do tratamento de sementes de soja com fungicidas na safra de 2010/2011, ano de “La Niña”. Circular técnica n. 82, EMBRAPA, Londrina, Out. 2010.

HOWELL, C. R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. **Plant Diseases**, v. 87, n. 1, p. 4 -10, Jan. 2003.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Contas Nacionais Trimestrais: Indicadores de Volume e Valores Correntes. Disponível em https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/2121/cnt_2018_3tri.pdf. Acesso em 30 dez. 2018.

INBAR, J. et al, Plant growth enhancement and disease control by *Trichoderma harzianum* in vegetable seedlings grown under commercial conditions. **European Journal of Plant Pathology**, v. 100, p. 337-346, 1994.

INDEX FUNGORUM. Disponível em <http://www.indexfungorum.org/names/NamesRecord.asp?RecordID=212553> . Acesso em 07 jan. 2019a.

INDEX FUNGORUM. Disponível em <http://www.indexfungorum.org/names/NamesRecord.asp?RecordID=340299>. Acesso em 07 jan. 2019b.

JHA, A. K., PRASAD, K., KULKARNI, A. R. Synthesis of TiO₂ nanoparticles using microorganisms. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 71, p. 226-229, 2009.

JING, L., NAVI, S. S. e YANG, X. Effects of colonization by different strains of *Coniothirium minitans* on the viability of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 25, n. 4, 2015.

KHALILI, E. et al. Biological Control of Rice Brown Spot with Native Isolates of Three Trichoderma species. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 297-305, 2012.

KHAN, I., SAEED, K. e KHAN, I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. **Arabian Journal of Chemistry**, 2017.

KIRTHI, A. V., et al. Biosynthesis of titanium dioxide nanoparticles using bacterium *Bacillus subtilis*. **Materials Letters**, v. 65. p. 2745–2747, 2011.

LE TOURNEAU, D. Morphology, Cytology, and Physiology of *Sclerotinia* species in culture. **Phytopathology**, v. 69, n. 8, p.887-890, 1979

LYU, S. et al. Titanium as a beneficial Element for crop production. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, Artigo 597, 2017.

MACHADO, D. F. M. e SILVA, A. C. F. *Trichoderma* no controle *in vitro* de fungos presentes em diásporos de *Gochmatia polymorpha*. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 36, n. 2, p. 182-191, 2013.

MALTBY, L., BROCK, T. C. M., BRINK, P. J. V. D. Fungicide risk assessment for aquatic ecosystems: Importance of interspecific variation, toxic mode of action, and exposure regime. **Environmental Science & Technology**, v. 43, p. 7556-7563, 2009.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Projeções do Agronegócio: Brasil 2017/18 a 2027/28 – Projeções de Longo Prazo. Disponível em http://www.agricultura.gov.br/assuntos/politica-agricola/todas-publicacoes-de-politica-agricola/projecoes-do-agronegocio/banner_site-03-03-1.png/view. Acesso em 30 dez. 2018.

MASTOURI, F.; BJÖRKMAN, T.; HARMAN, G. E. *Trichoderma harzianum* Enhances Antioxidant Defense of Tomato Seedlings and Resistance to Water Deficit. **MPMI**, v. 25, n. 9, p. 1264-1271, 2012.

MASUDA, T. e GOLDSMITH, P. D. World Soybean Production: Area Harvested, Yield, and Long-Term Projections. **International Food and Agribusiness Management Review**, v.12, p.143-162, 2009.

MATHEWS, J. R., SIVPARSAD, B. J. e LAING, M. D. Greenhouse evaluation of *Trichoderma harzianum* for the control of Sclerotinia wilt (*Sclerotinia sclerotiorum*) of sunflower, **South African Journal of Plant and Soil**, v. 36, n. 1, p. 69-72, 2019.

McCREARY, C. M., et al. Fungicide efficacy of dry bean white mold [*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Barry, causal organism] and economic analysis at moderate to high disease pressure. **Crop Protection**, v. 82, p. 75-81, 2016.

MEYER, M. C., et al. Eficiência de fungicidas para controle de mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) em soja, na safra 2017/18. Circular técnica n. 140, EMBRAPA, Londrina, Jul. 2018.

OLIVEIRA, J. L., et al. Solid lipid nanoparticles co-loaded with Simazine and Atrazine: Preparation, characterization, and evaluation of herbicidal activity, **Journal of Agricultural and food chemistry**, v. 63, p. 422-432, 2015.

OWOLADE, O.; OGUNLETI, D. Effects of titanium dioxide on the diseases, development and yield of edible cowpea. **Journal of Plant Protection Research**, v. 48, n. 3, p. 329-335, 2008.

PAL, K. K. e GARDENER, B. M. Biological control of Plant Pathogens. **The Plant Health Instructor**, p. 1-25, 2006.

PARISI, C., VIGANI, M. e RODRIGUEZ-CEREZO, E. Agricultural nanotechnologies: What are the current possibilities? **Nano Today**, v. 10, p. 124-127, 2015.

PELTIER, A. J., et al. Biology, Yield loss and Control of Sclerotinia Stem Rot of Soybean. **Journal of Integrated Pest Management**, v. 3, n. 2, p. 1-7, 2012.

PRABHU, S.; POULOSE, E. K. Silver Nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. **International Nano Letters**, v. 2, n. 32, p. 1-10, 2012.

PURDY, L. H. *Sclerotinia sclerotiorum*: History, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution, and impact. **Phytopathology**, v. 69, n. 8, p. 875-880, 1979.

RAHMAN, M. M. E., et al. Suppressive effects of *Bacillus* spp on mycelia, apothecia and sclerotia formation of *Sclerotinia sclerotiorum* and potential as biological control of white mold on mustard. **Australian Plant Pathology**, v. 45, p. 103-117, 2016.

RAJAKUMAR, G. et al. *Eclipta prostate* leaf aqueous extract mediated synthesis of titanium dioxide nanoparticles. **Material Letters**, v. 68, p. 115-117, 2012a.

RAJAKUMAR, C. et al. Fungus-mediated biosynthesis and characterization of TiO₂ nanoparticles and their activity against pathogenic bacteria. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 91, p. 23-29, 2012b.

RAJESH, S., DHARANISHANTHI, V. e KANNA, A. V. Antibacterial mechanism of biogenic silver nanoparticles of *Lactobacillus acidophilus*. **Journal of Experimental Nanoscience**, v. 10, n. 15, p. 1143-1152, 2015.

RALIYA, R.; BISWAS, P.; TARAFDAR, J.C. TiO₂ nanoparticle biosynthesis and its physiological effect on mung bean (*Vigna radiata* L.). **Biotechnology Reports**, v. 5, p. 22-26, 2014.

REINO, J. L. et al. Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. **Phytochem Rev.**, v. 7, p. 89-123, 2008.

RIFAI, M. A. A revision of the genus *Trichoderma*. **Mycol. Pap.**, v. 116, p. 1-56, 1969.

RIOU, C., FREYSSINET, G. e FEVRE, M. Production of cell wall-degrading enzymes by the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 5, p. 1478-1484, 1991.

ROY, K., SARKAR, C. K. e GHOSH, C. K. Photocatalytic activity of biogenic silver nanoparticles synthesized using yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) extract. **Applied Nanoscience**, 2014.

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**, Washington-NY (USA), v. 60, p. 4364-4370, 1994.

SHARMA, P. et al. Field Demonstration of *Trichoderma harzianum* as a Plant Growth Promoter in Wheat (*Triticum aestivum* L.). **Journal of Agricultural Science**, v. 4, n. 8, p. 6-73, 2012.

SHARMA, P., et al. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Barry causing Sclerotinia rot in oilseed *Brassicas*: A review. **Journal of Oilseed Brassica**, v. 6, p. 1-44, 2015.

SIEGEL, R. W. Cluster assembly of hierarchical nanostructures. **MRS Proceedings**, **255**, 1991.

STEADMAN, J. R. Control of plant diseases caused by *Sclerotinia* species. **Phytopathology**, v. 69, n. 8, p. 904-907, 1979

SUMIDA, C. H., et al. *Trichoderma asperelloides* antagonism to nine *Sclerotinia sclerotiorum* strains and biological control of white mold disease in soybean plants. **Biocontrol Science and Technology**, v. 28, n.2, p. 142-156, 2018.

SUPRAPTA, D. N. Potential of Microbial Antagonists as Biocontrol Agents Against Plant Fungal Pathogens. **J. ISSAAS**, v. 18, n. 2, p. 1-8, 2012.

THAKKAR, K. N., MHATRE, S. S. e PARIKH, R. Y. Biological synthesis of metallic nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 6, p. 257-262, 2010.

UNIÃO EUROPÉIA. DIRECTIVA 2009/129/CE DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO de 21 de Outubro de 2009 que estabelece um quadro de acção a nível comunitário para uma utilização sustentável dos pesticidas. Art. 3º. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:02009L0128-20091125&from=EN>. Acesso em 24 de jun. 2019.

VIEIRA, R. F., et al. Fungicidas aplicados via água de irrigação no controle do mofo branco no feijoeiro e incidência do patógeno na semente. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, n. 4, p. 770-773, 2001.

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, p. 705–711, 2009.

VITERBO, A. et al. Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* spp. in the biocontrol of fungal plant pathogens. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 81, p. 549-556, 2002.

VITORETI, A. B. F. et al. Aplicação de dióxido de Titânio em Células Solares. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 4, 2017.

WANG, Y., et al. Mesoporous sílica nanoparticles in drug delivery and biomedical applications. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 11, n. 2, p. 313-327, 2015.

WINDHAM, M. T., ELAD, Y., BAKER, R. A mechanism for increasing plant growth induced by *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, v. 76, n. 5, p. 518-521, 1986.

WWF. 2014. The growth of Soy: Impacts and Solutions. (O crescimento da soja: impactos e soluções) WWF International (secretariado internacional da Rede WWF), em Gland, na Suíça.

ZANCAN, W. L. A. et al. Mycelial Growth, Production and Germination of Sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* in the presence of fungicides and *Trichoderma harzianum*. **Bioscience Journal**, v.28, n.5, p. 782-789, 2012.

ZHANG, F., et al. Biocontrol potential of *Trichoderma harzianum* isolate T-aloe against *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 100, p. 64-74, 2016.