

*TRABALHO COMPLETO CONTENDO ARTIGOS CIENTÍFICOS. AGUARDANDO A PUBLICAÇÃO DOS RESULTADOS!

Título: “NANOPARTÍCULAS BIOGÊNICAS DE PRATA BASEADAS EM *Trichoderma harzianum*: DIFERENTES CONDIÇÕES DE SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, AVALIAÇÃO DA CITO/GENOTOXICIDADE E POTENCIAL INIBITÓRIO DE *Sclerotinia sclerotiorum*”

Autor: Mariana Guilger Casagrande

Orientadora: Prof.^a Dra. Renata de Lima

RESUMO

A síntese biogênica de nanopartículas de prata empregando fungos vem se destacando como uma alternativa promissora. Os fungos produzem grande quantidade de proteínas, enzimas e metabólitos secundários que atuam na síntese e formam um recobrimento ao redor das nanopartículas, o qual confere estabilidade e pode contribuir para a atividade contra microrganismos patogênicos. O presente estudo teve como objetivo sintetizar nanopartículas de prata a partir do filtrado do fungo *Trichoderma harzianum* e analisar sua potencial aplicação no controle do fungo fitopatogênico *Sclerotinia sclerotiorum* e os efeitos sobre plantas de soja. Para tanto, a síntese das nanopartículas foi realizada utilizando filtrados de *T. harzianum* com e sem estímulo da atividade de enzimas hidrolíticas pela parede celular de *S. sclerotiorum*. Em seguida foi realizada a remoção do recobrimento das nanopartículas para comparar nanopartículas recobertas e não-recobertas, obtendo quatro diferentes amostras, que foram analisadas quanto aos parâmetros físico-químicos. Os ensaios SDS-PAGE, ensaios de atividade de enzimas hidrolíticas de *T. harzianum* e a análise FTIR foram realizados para investigar as características dos recobrimentos. Também foram realizados ensaios com linhagens celulares e organismos não-alvo (germinação da soja, microrganismos de importância agrícola e microbiota do solo envolvida no ciclo do nitrogênio) visando a avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade das nanopartículas. A atividade biológica das nanopartículas para o controle de *S. sclerotiorum* foi avaliada *in vitro*, utilizando meio de cultura suplementado com as nanopartículas. Para investigar os efeitos sobre a soja, foi realizado plantio em solo previamente exposto às nanopartículas e após o crescimento foram avaliados parâmetros relacionados à morfologia, trocas gasosas e estresse oxidativo. A síntese e a remoção do recobrimento foram bem-sucedidas, sendo confirmadas por UV-Visível e FTIR. Foram observadas alterações nos parâmetros físico-químicos, principalmente ao comparar nanopartículas recobertas e não-recobertas, tendo ocorrido um aumento no diâmetro

*TRABALHO COMPLETO CONTENDO ARTIGOS CIENTÍFICOS. AGUARDANDO A PUBLICAÇÃO DOS RESULTADOS!

destas últimas, que pode indicar agregação e perda da estabilidade. Pelo ensaio SDS-PAGE, bandas de proteína em comum foram identificadas para os filtrados e seus respectivos recobrimentos, confirmando que as proteínas do filtrado permanecem envolvendo as nanopartículas. Também foi observada atividade específica de enzimas hidrolíticas de *T. harzianum* nos filtrados, recobrimentos e nanopartículas recobertas. Quanto à citotoxicidade e genotoxicidade, as nanopartículas recobertas apresentaram menores efeitos para as linhagens celulares e organismos não-alvo em comparação com as não-recobertas. Em relação ao controle de *S. sclerotiorum*, as nanopartículas recobertas sintetizadas com estímulo mostraram maior potencial inibitório sobre o crescimento micelial, entretanto ambas inibiram o desenvolvimento de novos escleródios, enquanto as nanopartículas não-recobertas não apresentaram efetividade. Foram observadas algumas alterações nos parâmetros morfológicos e fisiológicos das plantas de soja expostas as nanopartículas, porém estas podem estar relacionadas a uma possível resposta adaptativa. Os resultados indicam o potencial de nanopartículas de prata biogênicas para o controle de fitopatógenos, com efeitos bastante reduzidos sobre organismos não-alvo, de uma forma mais ambientalmente amigável em relação a produtos convencionais, sendo promissores pois abrem caminho para novas investigações em direção à aplicação desse tipo de nanomaterial no controle de fitopatógenos que afetam a produção agrícola.

Palavras-chave: Nanopartículas de prata. *Trichoderma harzianum*. *Sclerotinia sclerotiorum*.

ABSTRACT

The biogenic synthesis of silver nanoparticles employing fungi has emerged as a promising alternative. Fungi produce large amounts of proteins, enzymes and secondary metabolites which act in the synthesis and form a capping around the nanoparticles, which provides stability and can contribute to biological activity against pathogenic microorganisms. The aim of the present study was to synthesize silver nanoparticles with the filtrate of the fungus *Trichoderma harzianum* and analyze its potential application for the control of the phytopathogenic fungus *S. sclerotiorum* and the effects on soybean plants. For this purpose, the synthesis of the nanoparticles was performed using the filtrates of *T. harzianum* with and without stimulation of the activity of hydrolytic enzymes by the cell wall of *S. sclerotiorum*. Then, the cappings of the nanoparticles were removed in order to compare capped and uncapped nanoparticles, obtaining four

*TRABALHO COMPLETO CONTENDO ARTIGOS CIENTÍFICOS. AGUARDANDO A PUBLICAÇÃO DOS RESULTADOS!

different samples, which were analyzed for physico-chemical parameters. SDS-PAGE assay, hydrolytic enzymes activity assays and FTIR analysis were performed to investigate the characteristics of the cappings. Assays with cell lines and non-target organisms (soybean germination, microorganisms of agricultural importance and soil microbiota involved in nitrogen cycle) were performed to evaluate the cytotoxicity and genotoxicity of the nanoparticles. The biological activity of the nanoparticles for the control of *S. sclerotiorum* was evaluated *in vitro* using culture medium supplemented with the nanoparticles. To investigate the effects on soybean, planting was performed in soil previously exposed to the nanoparticles and after growth the parameters related to morphology, gas exchanges and oxidative stress were evaluated. The synthesis and capping removal were successful, confirmed by UV-Visible and FTIR. Changes in physico-chemical parameters were observed, mainly when comparing capped and uncapped nanoparticles, with an increase in the diameter of the latter, which may indicate aggregation and loss of stability. Through SDS-PAGE the same protein bands were identified in the filtrates and respective cappings, confirming that the proteins from the filtrate remain capping the nanoparticles. Specific activity of *T. harzianum* hydrolytic enzymes were also observed in the filtrates, cappings and capped nanoparticles. In regard to the cytotoxicity and genotoxicity, the capped nanoparticles showed minor effects on the cell lines and non-target organisms in comparison with the uncapped ones. Regarding the control of *S. sclerotiorum*, the capped nanoparticles synthesized with stimulation showed a greater inhibitory potential on the mycelial growth, however both the capped ones inhibited the development of new sclerotia, while the uncapped nanoparticles did not show effectiveness. Some alterations were observed in morphological and physiological parameters of soybean plants exposed to the nanoparticles, however it may be related to a possible adaptive response. The results indicate the potential of the biogenic silver nanoparticles for the control of phytopathogens, with minor effects on non-target organisms, in a more environmental friendly way in comparison with conventional products, being promising since it opens a way for new investigations towards the application of this kind of nanomaterial in the control of phytopathogens which affect agricultural production.

Keywords: Silver nanoparticles. *Trichoderma harzianum*. *Sclerotinia sclerotiorum*.