

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

Mariana Guilger Casagrande

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*

**Sorocaba/SP
2020**

Mariana Guilger Casagrande

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*

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

Orientadora: Profa. Dra. Renata de Lima

**Sorocaba/SP
2020**

Ficha Catalográfica

Guilger-Casagrande, Mariana
G973n 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* /
Mariana Guilger-Casagrande. – 2020.
132 f. : il.

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

1. Nanopartículas. 2. Nanotecnologia. 3. Prata. 4. Fungos. 5.
Trichoderma harzianum . 6. *Sclerotinia sclerotiorum*. I. Lima, Renata,
orient. II. Universidade de Sorocaba. III. Título.

Mariana Guilger Casagrande

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*

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade de Sorocaba.

Aprovado em: 17/04/2020.

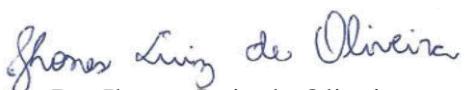
BANCA EXAMINADORA:


Profa. Dra. Renata de Lima
Universidade de Sorocaba (UNISO)


Prof. Dr. Gerson Araújo de Medeiros
Instituto de Ciência e Tecnologia de Sorocaba (UNESP)


Prof. Dr. Hudson Wallace Pereira de Carvalho
Centro de Energia Nuclear na Agricultura Nuclear - USP


Profa. Dra. Angela Faustino Jozala
Universidade de Sorocaba (UNISO)


Dr. Jhones Luiz de Oliveira
Instituto de Ciência e Tecnologia de Sorocaba (UNESP)

*Àqueles que me revelaram a fórmula para sintetizar grandes sonhos:
altas concentrações de fé, amor, determinação, persistência e humildade.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente, e acima de tudo, a Deus pela sensação de suas mãos me amparando ao longo de toda a jornada.

Aos meu avós Quita (*in memorian*) e Mauro (*in memorian*), por me mostrarem que o mundo está sempre a nossa espera para ser conquistado, que o conhecimento não tem limites e que tudo nesta vida deve ser feito com muito amor. E aos meus avós Maria e João (*in memorian*), por encherem seus olhos de orgulho ao ouvirem os relatos sobre minha pesquisa.

Aos meus pais Sirlene e Edmilson, por serem minha base, por me ensinarem que somos capazes de grandes feitos, e que o sucesso é um misto de vontade, esforço e persistência.

Ao meu grande amor Eduardo, por me fazer sorrir, por ser minha paz e equilíbrio, por acreditar em mim e me impulsionar a perseguir meus maiores sonhos.

Aos meus familiares e amigos pelo carinho, apoio e momentos de descontração.

Agradeço a FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - 2016/13692-6) pela bolsa de doutorado concedida e pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho. As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da FAPESP.

À minha orientadora Profa. Dra. Renata de Lima, por me acolher e acreditar em mim, por me incentivar a encarar desafios, por ser minha grande inspiração, sem a qual eu não estaria concretizando este sonho.

Ao Prof. Dr. Leonardo Fernandes Fraceto e aos colegas do Laboratório de Nanotecnologia Ambiental (UNESP) pelo apoio e parceria ao longo de todo o trabalho.

Aos colegas do LABiTOn, pela amizade, companheirismo e cumplicidade. Formamos um belo time do qual eu sinto muito orgulho! Desejo muito sucesso a todos vocês!

Aos membros das bancas de qualificação e defesa, pela prontidão em contribuir para o enriquecimento deste trabalho.

À Universidade de Sorocaba e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pelo acolhimento, conhecimento e experiência.

A todos que contribuíram para o desenvolvimento e conclusão desta tese.

*Eu sou aquela mulher
a quem o tempo
muito ensinou.

Ensinou a amar a vida.
Não desistir da luta.
Recomeçar na derrota.

Renunciar a palavras e pensamentos negativos.
Acreditar nos valores humanos.
Ser otimista.

Creio numa força imanente
que vai ligando a família humana
numa corrente luminosa
de fraternidade universal.

Creio na solidariedade humana.*

(Cora Coralina)

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 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 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*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Capítulo I – Síntese de nanopartículas de prata mediada por fungos: uma revisão

Figura 1 - Mechanisms of biogenic synthesis of silver nanoparticles.	26
Figura 2 - Differences between capped and uncapped silver nanoparticles.	35
Figura 3 - Applications of silver nanoparticles synthesized using fungi.	37

Capítulo II - Biossíntese de nanopartículas de prata empregando *Trichoderma harzianum* com estimulação enzimática para o controle de *Sclerotinia sclerotiorum*

Figura 1 - Physicochemical characterization of the AgNP-TS and AgNP-T nanoparticles. (A) UV-Vis spectra of the nanoparticles and the corresponding filtrates, (B) Hydrodynamic diameters obtained by the DLS technique, (C) Nanoparticle sizes and concentrations obtained by the NTA method.	63
Figura 2 - Specific activities (U/mg) of the hydrolytic enzymes of <i>Trichoderma harzianum</i> present in the nanoparticles and the corresponding filtrates. Statistically significant difference ($p < 0.05$) is indicated by * for comparison of Filt T (filtrate without stimulation) and Filt TS (filtrate with stimulation) and + for comparison of AgNP-T and AgNP-TS. More symbols indicate a higher statistical significance.	64
Figura 3 - Biological activities of the AgNP-TS and AgNP-T nanoparticles (3×10^9 NPs.mL ⁻¹) towards <i>S. sclerotiorum</i> and <i>T. harzianum</i> . (A) Control of mycelium growth and sclerotia, (B) Mycelium diameter, (C) Effect on <i>T. harzianum</i> . Statistically significant difference ($p < 0.05$) is indicated by * for comparison of the exposures to the control (CTR), with ** indicating a higher statistical significance.	65
Figura 4 - Cytotoxicity evaluation of the AgNP-TS and AgNP-T nanoparticles. (A) Tetrazolium reduction test (MTT), (B) Image cytometry determination of cell viability, necrosis, and apoptosis with statistically significant difference ($p < 0.05$) indicated by * for comparison of viability to the control (CTR) and + for comparison of apoptosis to the control (CTR), (C) Trypan blue exclusion test with statistically significant difference ($p < 0.05$) indicated by * for comparison of alive cells to the control (CTR) and + for comparison of dead cells to the control (CTR).	68

Figura 5 - Evaluation of the cytotoxicity and genotoxicity of AgNP-TS and AgNP-T. (A) Relative mitotic index using the *Allium cepa* assay, (B) Relative chromosomal alteration index using the *Allium cepa* assay, (C) Relative DNA damage index using the comet assay. Statistically significant difference ($p < 0.05$) is indicated by * for comparison of the exposures to the control (CTR), with **indicating a higher statistical significance. 69

Capítulo III – Influência do recobrimento de nanopartículas biogênicas de prata na toxicidade e no mecanismo de ação sobre *Sclerotinia sclerotiorum*

Figura 1 – Caracterização físico-química das nanopartículas. A: Espectroscopia UV-Visível das nanopartículas e seus respectivos filtrados. B e C: Diâmetro hidrodinâmico por DLS. D: Acompanhamento da estabilidade por DLS. AgNP-TSC (recobertas, com estímulo); AgNP-TC (recobertas, sem estímulo), AgNP-TS (não-recobertas, com estímulo) e AgNP-T (não-recobertas, sem estímulo)..... 80

Figura 2 – Microscopia de força atômica (AFM) com distribuição de tamanho das nanopartículas recobertas AgNP-TSC (A) e AgNP-TC (B) e não-recobertas AgNP-TS (C) e AgNP-T (D), respectivamente. 82

Figura 3 – Espectros infravermelho por FTIR das nanopartículas recobertas AgNP-TSC, AgNP-TC e não-recobertas AgNP-TS e AgNP-T. 83

Figura 4 – Análise SDS-PAGE das nanopartículas e seus respectivos filtrados e recobrimentos, sendo 1. Marcador de peso molecular Blueye Prestained ladder (Invitrogen) 11-245 kDa, 2. Filtre de *T. harzianum* sem estímulo. 3. Recobrimento sem estímulo. 4. AgNP-TC. 5. AgNP-T. 6. Filtre de *T. harzianum* com estímulo. 7. Recobrimento com estímulo. 8. AgNP-TSC. 9. AgNP-TS. 85

Figura 5 – Atividade específica das enzimas hidrolíticas de *Trichoderma harzianum* (U/mg): N-Acetylglucosaminidase (NAGase), β-1,3-glucanase, Quitinase e Protease ácida. Filt TSC=filtrado com estímulo; Cap TSC= recobrimento com estímulo; TSC=nanopartículas com estímulo recobertas; TS=nanopartículas com estímulo não-recobertas; Filt TC= filtrado sem estímulo; Cap TC= recobrimento sem estímulo; TC= nanopartículas sem estímulo recobertas; T= nanopartículas sem estímulo não-recobertas. Diferença estatística significativa ($p < 0,05$) é indicada por * para comparação entre Filt TC e Filt TSC, £ para Cap TC e Cap TSC, # para TC e TSC, e -- para T e TS. Maior quantidade de símbolos indica maior significância estatística. 87

- Figura 6** – Atividade biológica das nanopartículas AgNP-TSC, AgNP-TS, AgNP-TC e AgNP-T (3×10^9 NP \cdot mL $^{-1}$) sobre *S. sclerotiorum* A: Diâmetro micelial. B: Número de novos escleródios. C: Aspecto visual das culturas. Análise estatística: a. controle x AgNP; b. AgNP x AgNP. Diferentes números indicam diferença estatística significativa, p<0,05. 88
- Figura 7** – Avaliação da citotoxicidade das nanopartículas AgNP-TSC, AgNP-TS, AgNP-TC e AgNP-T. A: Ensaio de redução do tetrazólio (MTT) comparando AgNP-TSC e AgNP-TS; B: Ensaio de redução do tetrazólio (MTT) comparando AgNP-TC e AgNP-T; C: Viabilidade celular, necrose e apoptose por citometria de imagem; D: Ensaio de exclusão do azul de tripan. Análise estatística: Diferentes números indicam diferença estatística significativa, p<0,05. .. 91
- Figura 8** – Avaliação da genotoxicidade de AgNP-TSC, AgNP-TS, AgNP-TC e AgNP-T. A: Índice de alterações cromossômicas pelo ensaio *Allium cepa*. B: Índice de danos no DNA pelo ensaio cometa. Análise estatística: Diferentes números indicam diferença estatística significativa, p<0,05. 92
- Figura 9** – Avaliação dos efeitos das nanopartículas AgNP-TSC, AgNP-TS, AgNP-TC e AgNP-T sobre a germinação de sementes de soja. Análise estatística: a. controle x AgNP. Diferentes números indicam diferença estatística significativa, p<0,05. 93
- Figura 10** – Análise molecular quantitativa de solos expostos as nanopartículas AgNP-TSC, AgNP-TC, AgNP-TS e AgNP-T após 15, 90, 180 e 360 dias. Em A) resultados da quantificação calculada por $2^{-\Delta\Delta ct}$. Em B) resultados das proporções de cada gene analisado. 95
- Capítulo IV – Síntese biogênica de nanopartículas de prata em maior escala, controle de *Sclerotinia sclerotiorum* e avaliação dos efeitos sobre plantas de soja**
- Figura 1** – Caracterização físico-química das nanopartículas sintetizadas em menor e maior escala. A: Diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e potencial zeta. B: Tamanho e concentração em NP \cdot mL $^{-1}$ 116
- Figura 2** - Efeitos inibitórios das nanopartículas sobre o crescimento micelial e a formação de novos escleródios de *S. sclerotiorum* *in vitro*. A: controle; B: AgNP. 116
- Figura 3** – Parâmetros morfológicos das plantas de soja expostas as AgNPs. A: comprimento de parte aérea e raiz; B: massa seca de parte aérea e raiz; C: área foliar; D: aspecto das plantas controle; E: aspecto das plantas expostas às AgNPs. * indica diferença significativa entre plantas expostas às AgNPs e plantas controle, de acordo com teste t de Student (p < 0,05). As barras são médias ± desvio padrão (n = 10). 118

Figura 4 – Efeitos das nanopartículas sobre os parâmetros de trocas gasosas das plantas de soja. A: taxa fotossintética líquida; B: condutância estomática; C: eficiência intrínseca do uso da água. * indica diferença significativa entre plantas expostas às AgNPs e plantas controle, de acordo com teste t de Student ($p < 0,05$). As barras são médias ± desvio padrão (n = 10).	116
Figura 5 – Pigmentos fotossintéticos das plantas de soja cultivadas em solo exposto às nanopartículas. As barras são médias ± desvio padrão (n = 5).	119
Figura 6 – Efeitos das nanopartículas sobre marcadores de estresse oxidativo em raízes e folhas de plantas de soja. A: Peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂); B: malondialdeído (MDA); C: dienos conjugados. * indica diferença significativa entre plantas expostas às AgNPs plantas controle, de acordo com teste t de Student ($p < 0,05$). As barras são médias ± desvio padrão (n = 10).	121
Figura 7 – Efeitos das nanopartículas sobre a expressão de genes envolvidos no processo de lignificação e peroxidação das raízes de soja.	122

LISTA DE TABELAS

Capítulo I – Síntese de nanopartículas de prata mediada por fungos: uma revisão

Tabela 1 - Optimization of the synthesis of silver nanoparticles by fungi.	27
Tabela 2 - Health applications of silver nanoparticles synthesized by fungi.	38
Tabela 3 - Applications of silver nanoparticles synthesized by fungi in agriculture and pests control.	43

Capítulo III - Influência do recobrimento de nanopartículas biogênicas de prata na toxicidade e no mecanismo de ação sobre *Sclerotinia sclerotiorum*

Tabela 1 – Valores de MIC para os microrganismos de importância agrícola expostos às nanopartículas AgNP-TSC, AgNP-TC, AgNP-TS e AgNP-T.	94
--	----

Capítulo IV – Síntese biogênica de nanopartículas de prata em maior escala, controle de *Sclerotinia sclerotiorum* e avaliação dos efeitos sobre plantas de soja

Tabela 1 – Rendimento da síntese de nanopartículas em menor e maior escala.	115
---	-----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AFM	Microscopia de Força Atômica
AgNPs	Nanopartículas de prata
AgNP-T	Nanopartículas de prata não-recobertas, sem estímulo
AgNP-TC	Nanopartículas de prata recobertas, sem estímulo
AgNP-TS	Nanopartículas de prata não-recobertas, com estímulo
AgNP-TSC	Nanopartículas de prata recobertas, com estímulo
AI	Índice de alterações
ANOVA	One-way analysis of variance
ATP	Adenosine triphosphate
CTR	Controle
DLS	Dynamic Light Scattering
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulphoxide
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
Filt T	Filtrate of <i>Trichoderma harzianum</i> without stimulation
Filt TS	Filtrate of <i>Trichoderma harzianum</i> with stimulation
FTIR	espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
IRGA	Analisador portátil de gases por infravermelho
MDA	Malondialdeído
MGYP	Malt Glucose Yeast Peptone
MI	Mitotic Index
MIC	Concentração Inibitória Mínima
MTT	Ensaio de redução do tetrazólio
NADH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide
NAGase	N-acetylglucosaminidase
NTA	Nanoparticles Tracking Analysis
PBS	Phosphate Buffer Saline
PVP	Polivinilpirrolidona
qPCR	Reação em cadeia de polimerase em tempo real
SB	Soma de bases
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
TBARS	Ácido tiobarbitúrico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	18
2.1	Objetivo Geral	18
2.2	Objetivos específicos	18
3	RESULTADOS	20
3.1	CAPÍTULO I – SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA MEDIADA POR FUNGOS: UMA REVISÃO	21
3.2	CAPÍTULO II – BIOSSÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA EMPREGANDO <i>Trichoderma harzianum</i> COM ESTIMULAÇÃO ENZIMÁTICA PARA O CONTROLE DE <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>.....	55
3.3	CAPÍTULO III - INFLUÊNCIA DO RECOBRIMENTO DE NANOPARTÍCULAS BIOGÊNICAS DE PRATA NA TOXICIDADE E NO MECANISMO DE AÇÃO SOBRE <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	76
3.4	CAPITULO IV - SÍNTESE BIOGÊNICA DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA EM MAIOR ESCALA, CONTROLE DE <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> E AVALIAÇÃO DOS EFEITOS SOBRE PLANTAS DE SOJA.....	108
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	128
	REFERÊNCIAS	129
	ANEXO A – REVISÃO DA LITERATURA PUBLICADA NA REVISTA CIENTÍFICA INTERNACIONAL <i>FRONTIERS IN BIOENGINEERING AND BIOTECHNOLOGY</i>, APRESENTADA NO CAPÍTULO I DESTA TESE.....	130
	ANEXO B – ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA CIENTÍFICA INTERNACIONAL <i>SCIENTIFIC REPORTS</i>, APRESENTADO NO CAPÍTULO II DESTA TESE.	131
	ANEXO C – ORIENTAÇÕES DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DA UNIVERSIDADE DE SOROCABA	132

1 INTRODUÇÃO

Com o crescimento da população mundial aumentaram as preocupações quanto à produção de alimentos e o combate à pragas que atingem o setor agrícola, intensificando o uso de agrotóxicos, como por exemplo, os fungicidas químicos (MAJEED *et al.*, 2018). Essas substâncias, apesar de atingirem os fitopatógenos, requerem o uso de altas doses em várias aplicações, sendo liberadas no ambiente e causando impactos à saúde e aos recursos naturais (ZUBROD *et al.*, 2019).

Em paralelo a esse cenário, a nanotecnologia vem se destacando com algumas alternativas que visam solucionar problemas da agricultura e ao mesmo tempo reduzir os impactos ambientais (FRACETO *et al.*, 2016; DUHAN *et al.*, 2017; PRASAD *et al.*, 2017). Dentre os nanomateriais com maiores aplicações as nanopartículas de prata apresentam efeitos inibitórios sobre o desenvolvimento de uma ampla variedade de microrganismos, podendo ser aplicadas para o controle de pragas (BURDÜŞEL *et al.*, 2018; LOO *et al.*, 2018).

Em um estudo prévio de nosso grupo foram sintetizadas nanopartículas de prata por via biogênica utilizando o filtrado do fungo agente de controle biológico *Trichoderma harzianum* e estas apresentaram potencial inibitório sobre a germinação das estruturas de resistência (escleródios) do fungo fitopatogênico *Sclerotinia sclerotiorum* (GUILGER *et al.*, 2017). *T. harzianum* é utilizado no controle biológico de fungos fitopatogênicos que atingem a agricultura e como estimulante dos mecanismos de defesa e crescimento das plantas (SABA *et al.*, 2012). Além dessas aplicações, em alguns estudos, essa espécie foi empregada na síntese de nanopartículas de prata (AHLUWALIA *et al.*, 2014; GUILGER *et al.*, 2017; GHERBAWY *et al.*, 2013). *S. sclerotiorum* (Lib.) de Bary é um fungo fitopatogênico causador da doença mofo branco, responsável por grandes perdas na produção agrícola do Brasil e do mundo, sendo capaz de infectar mais de 450 espécies de plantas. Este fungo desenvolve escleródios que permanecem viáveis no solo por vários anos, iniciando um novo ciclo da doença sempre que as condições se tornam favoráveis (SMOLINSKA e KOWALSKA, 2018).

Diante do exposto, fazem-se necessários estudos visando o desenvolvimento de estratégias para o controle deste, e de outros fitopatógenos, de uma forma mais efetiva e ecologicamente amigável, explorando o potencial de ciências atuais e promissoras como a nanotecnologia. Desta forma, a presente tese traz alguns estudos que visam contribuir e agregar conhecimento para esta questão. Com base em nosso levantamento da literatura, apresentado em forma de revisão no capítulo I, não há outros estudos avaliando a composição do

recobrimento de nanopartículas biogênicas sintetizadas a partir de *T. harzianum* com o objetivo de direcioná-las para o controle de pragas agrícolas.

A tese está dividida em quatro capítulos que apresentam artigos científicos publicados ou a serem submetidos em revistas científicas internacionais. O capítulo I traz uma revisão da literatura sobre a síntese de nanopartículas metálicas por fungos, os mecanismos envolvidos, processos de otimização e aplicações. O capítulo II apresenta um estudo no qual nanopartículas de prata foram sintetizadas de forma direcionada para o controle do fungo fitopatogênico *S. sclerotiorum*, por meio do estímulo da atividade de enzimas hidrolíticas de *T. harzianum* em contato com a parede celular do fitopatógeno. O capítulo III apresenta um artigo que dá continuidade ao estudo do capítulo II com foco em investigar a composição e a importância do recobrimento das nanopartículas para a atividade biológica no controle de *S. sclerotiorum*. O capítulo IV traz um estudo no qual foi realizada a síntese de nanopartículas de prata a base de *T. harzianum* em maior escala e foram avaliados os possíveis efeitos dessas nanopartículas sobre a morfologia e fisiologia de plantas de soja.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

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.

2.2 Objetivos específicos

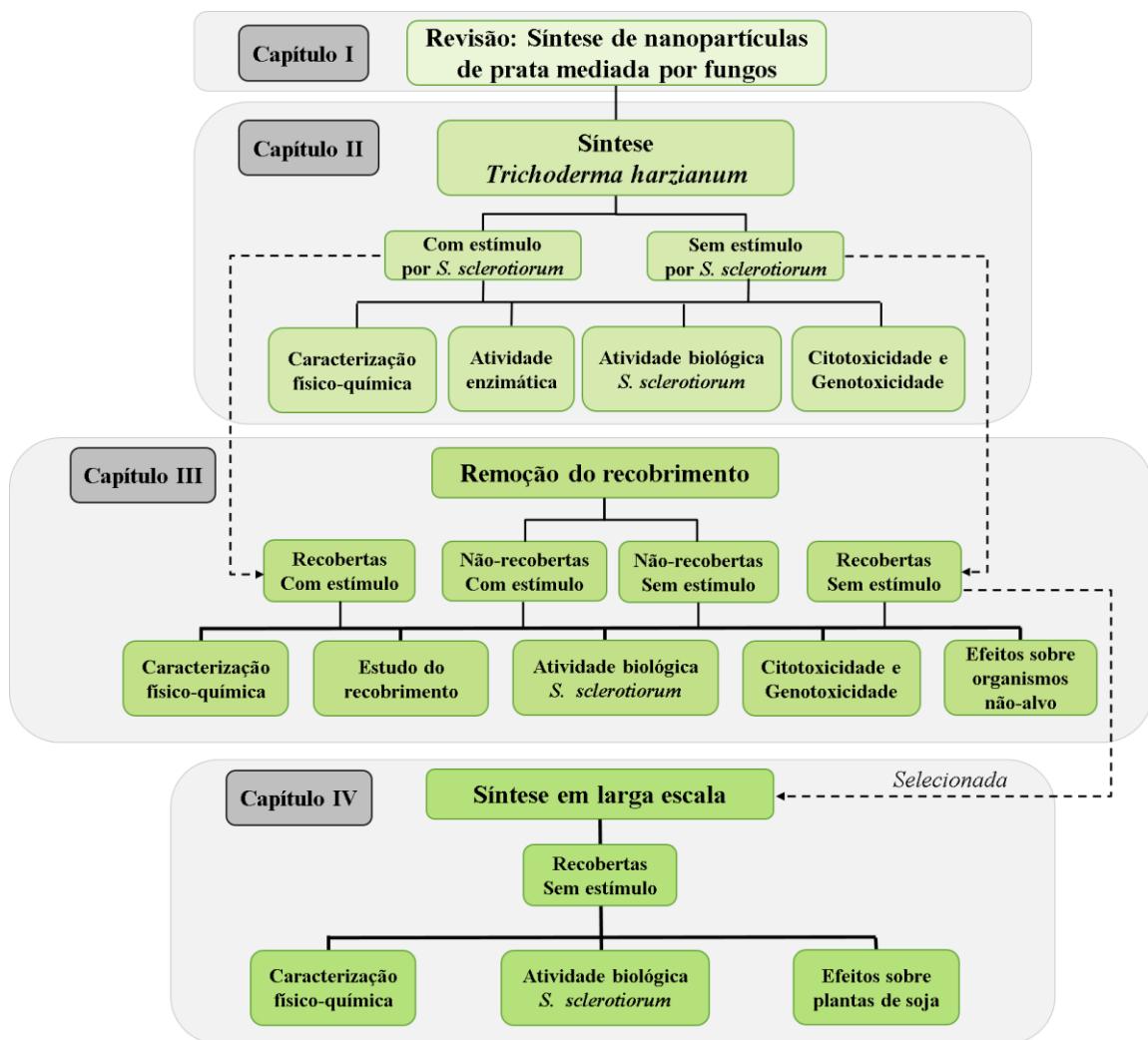
- Sintetizar nanopartículas de prata utilizando o filtrado do fungo *T. harzianum* na presença e ausência da parede celular do fitopatógeno *S. sclerotiorum*, visando estimular a produção de enzimas hidrolíticas.
- Confirmar a ocorrência da síntese e realizar a caracterização físico-química das nanopartículas por meio das técnicas de espectroscopia UV-Visível, espalhamento dinâmico de luz, microeletroforese, rastreamento de nanopartículas, medição de pH e microscopia de força atômica.
- Remover o recobrimento de parte das nanopartículas para investigar sua composição e importância por meio das análises SDS-PAGE, atividade de enzimas hidrolíticas de *T. harzianum* e FTIR, bem como demais comparações entre nanopartículas recobertas e não-recobertas.
- Avaliar a citotoxicidade e genotoxicidade das nanopartículas sobre as linhagens celulares 3T3, HaCat e V79 e a espécie vegetal *Allium cepa* por meio dos ensaios de viabilidade celular por atividade mitocondrial (MTT), viabilidade celular, apoptose e necrose por citometria de imagem, viabilidade celular com azul de Tripan, cometa e *Allium cepa*.
- Avaliar a efetividade das nanopartículas no controle de *S. sclerotiorum*, principalmente sobre a germinação de escleródios *in vitro*.
- Avaliar os efeitos das nanopartículas sobre a germinação de sementes de soja.
- Avaliar a concentração inibitória mínima (MIC) das nanopartículas sobre diferentes microrganismos de importância agrícola (*Bradyrhizobium japonicum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus thuringiensis* e *Beauveria bassiana*.).

- Avaliar os efeitos das nanopartículas sobre a microbiota do solo pela técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real utilizando primers de bactérias do ciclo do nitrogênio.
- Selecionar a amostra de nanopartículas mais viável em relação ao processo de síntese e atividade biológica, realizar a síntese dessa nanopartícula em maior escala e avaliar os efeitos sobre plantas de soja por meio de análises de morfologia, trocas gasosas e estresse oxidativo.

3 RESULTADOS

Os resultados da presente tese foram divididos em quatro capítulos, sendo que cada capítulo compreende um artigo científico. O resumo gráfico abaixo apresenta os principais procedimentos e análises realizados em cada capítulo.

Estrutura da tese apresentando os principais procedimentos e análises



3.1 CAPÍTULO I – SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA MEDIADA POR FUNGOS: UMA REVISÃO

O capítulo I comprehende um artigo de revisão no qual são apresentados estudos que envolvem a síntese de nanopartículas de prata utilizando fungos, destacando as diferentes possibilidades para a otimização da síntese, bem como as vantagens da alternativa biogênica em comparação com outros métodos, e da utilização de fungos em relação a outros organismos. O artigo apresenta também uma descrição dos mecanismos de síntese e algumas aplicações dessas nanopartículas nas áreas da saúde e agricultura, no controle de bactérias patogênicas e fitopatógenos, visando incentivar a realização de mais estudos.

GUILGER-CASAGRANDE, M.; LIMA, R. Synthesis of silver nanoparticles mediated by fungi: A review. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 7, p. 1-16, 2019.

Synthesis of Silver Nanoparticles Mediated by Fungi: A Review

Guilger-Casagrande, M.¹; Lima, R.^{1*}

¹Laboratory for Evaluation of the Bioactivity and Toxicology of Nanomaterials, University of Sorocaba, Sorocaba, São Paulo, Brazil.

ABSTRACT

The use of fungi as reducing and stabilizing agents in the biogenic synthesis of silver nanoparticles is attractive due to the production of large quantities of proteins, high yields, easy handling, and low toxicity of the residues. Furthermore, this synthesis process coats the nanoparticles with biomolecules derived from the fungus, which can improve stability and may confer biological activity. The aim of this review is to describe studies in which silver nanoparticles were synthesized using fungi as reducing agents, discussing the mechanisms and optimization of the synthesis, as well as the applications. The literature shows that various species of fungus have potential for use in biogenic synthesis, enabling the production of nanoparticles with different characteristics, considering aspects such as their size, surface charge, and morphology. The synthesis mechanisms have not yet been fully elucidated, although it is believed that fungal biomolecules are mainly responsible for the process. The synthesis can be optimized by adjusting parameters such as temperature, pH, silver precursor concentration, biomass amount, and fungus cultivation time. Silver nanoparticles synthesized using fungi enable the control of pathogens, with low toxicity and good biocompatibility. These findings open perspectives for future investigations concerning the use of these nanoparticles as antimicrobials in the areas of health and agriculture.

Keywords: biogenic synthesis, silver nanoparticles, fungi, biological activity, biomolecules

INTRODUCTION

Among the different types of metallic nanoparticles, silver nanoparticles can be highlighted for their broad-spectrum antimicrobial potential (Prabhu and Poulose, 2012; Rai *et al.*, 2014; Gupta *et al.*, 2017; Loo *et al.*, 2018). These nanoparticles adhere to the cell walls and membranes of microorganisms and may reach the cell interior. They damage the cellular structures, induce the production of reactive oxygen species, and alter the mechanisms of signal transduction (Kim *et al.*, 2011; Dakal *et al.*, 2016). Several studies report applications in which good results have been obtained using silver nanoparticles for the control of pathogenic microorganisms in the areas of health and agriculture (Burduşel *et al.*, 2018; Mishra and Singh, 2015; Kim *et al.*, 2012).

The commonest method used to produce silver nanoparticles is chemical synthesis, employing reagents whose function is to reduce the silver ions and stabilize the nanoparticles.

These reagents are toxic and can present risks to health and the environment (Ahmed *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016), which has led to increasing interest in biogenic synthesis methods. Such processes enable nanoparticles to be obtained that present lower toxicity, better physicochemical characteristics, and higher stability (Iravani *et al.*, 2014; Sharma *et al.*, 2015).

Biogenic synthesis of nanoparticles can be performed using organisms such as bacteria, fungi, and plants, or the byproducts of their metabolism, which act as reducing and stabilizing agents (Durán *et al.*, 2011; Sharma *et al.*, 2015). These nanoparticles are capped with biomolecules derived from the organism used in the synthesis, which can improve stability and may present biological activity (Ballotin *et al.*, 2016). Biogenic synthesis is relatively simple, clean, sustainable, and economical, and provides greater biocompatibility in the uses of nanoparticles (Gholami-Shabani *et al.*, 2014).

The synthesis of silver nanoparticles using bacteria involves cultivating the organisms in a suitable medium, followed by contact of the bacteria or their metabolites with a silver nitrate (AgNO_3) solution (Singh *et al.*, 2015). When the synthesis is performed using plants, aqueous extracts are prepared from the leaves, stems, or roots, followed by the addition of silver nitrate solution (Rheder *et al.*, 2018). The use of fungi to synthesize silver nanoparticles involves culturing the fungus on agar, followed by transfer to a liquid medium. The biomass produced is subsequently transferred to water for release of the compounds that act in the synthesis. After filtration, the biomass is discarded and silver nitrate is added to the filtrate (Costa Silva *et al.*, 2017; Ottoni *et al.*, 2017; Mekkawy *et al.*, 2017; Guilger *et al.*, 2017).

The purpose of this review is to provide an overview of the main published studies concerning the use of fungi for the biogenic synthesis of silver nanoparticles, as well as the applications of these materials in different areas. The synthesis mechanisms are discussed, together with methods to optimize the processes and the importance of cappings on the nanoparticles.

Given the problems caused by pathogenic microorganisms, there is a continuing search for more effective techniques for their control. The emergence of nanotechnology has led to increasing interest in the antimicrobial properties of silver nanoparticles and in exploring environmentally friendly ways in which they can be used most effectively.

BIOGENIC SYNTHESIS OF SILVER NANOPARTICLES

Most of the conventional methods used to produce nanoparticles have disadvantages such as the use of toxic chemicals and the generation of waste, which can cause environmental

pollution (Ahmed *et al.*, 2016; Iravani *et al.*, 2014). Consequently, in recent years there has been increasing interest in eco-friendly synthesis methods. The methods involve the use of organisms including bacteria, fungi, and plants, which can reduce metal salts and enable the formation of nanoparticles that present the desired size and morphology (Azmath *et al.*, 2016). The production of nanoparticles by biological reduction of metals is an option that can be considered clean, nontoxic, and environmentally acceptable (Banu and Balasubramanian, 2014a).

Fungi are attractive agents for biogenic synthesis of silver nanoparticles, because they offer high tolerance to metals and are easy to handle. They also secrete large quantities of extracellular proteins that contribute to the stability of the nanoparticles (Balaji *et al.*, 2009; Du *et al.*, 2015; Netala *et al.*, 2016). Advantages of fungal cultures over bacterial systems are that they provide good biomass production and do not require additional steps to extract the filtrate (Gade *et al.*, 2008). Compared to synthesis using plants, the mycelial mass of fungi is more resistant to agitation and pressure, so it is more suitable for large-scale syntheses (Velusamy *et al.*, 2016). Furthermore, by adjusting culture conditions such as time, temperature, pH, and quantity of biomass, among others, it is possible to manipulate the metabolism of fungi so as to obtain nanoparticles with the desired characteristics, such as specific size and morphology (Zielonka and Klimek-Ochab, 2017).

Biogenic synthesis of silver nanoparticles mediated by fungi

Fungi have excellent potential for the production of many compounds that can be used in different applications. Around 6,400 bioactive substances are known to be produced by microscopic filamentous fungi (ascomycetes and imperfect fungi) and other fungal species (Bérdy, 2005). These organisms are widely used as reducing and stabilizing agents, due to their heavy metal tolerance and capacity to internalize and bioaccumulate metals. Furthermore, fungi can be easily cultivated on a large scale (“nanofactories”) and can produce nanoparticles with controlled size and morphology (Gade *et al.*, 2008; Ahluwalia *et al.*, 2014; Azmath *et al.*, 2016; Khan *et al.*, 2017). Fungi have advantages over other microorganisms, in that they produce large quantities of proteins and enzymes, some of which can be used for the fast and sustainable synthesis of nanoparticles (Vahabi *et al.*, 2011; Alghuthaymi *et al.*, 2015).

The mechanism of biogenic synthesis of nanoparticles using fungi may be intracellular or extracellular. In the case of intracellular synthesis, the metal precursor is added to the mycelial culture and is internalized in the biomass. Consequently, extraction of the

nanoparticles is required after the synthesis, employing chemical treatment, centrifugation, and filtration to disrupt the biomass and release the nanoparticles (Molnár *et al.*, 2018; Castro-Longoria *et al.*, 2011; Rajput *et al.*, 2016). In extracellular synthesis, the metal precursor is added to the aqueous filtrate containing only the fungal biomolecules, resulting in the formation of free nanoparticles in the dispersion. This last method is most widely used, since no procedures are required to release the nanoparticles from the cells (Sabri *et al.*, 2016; Azmath *et al.*, 2016; Costa Silva *et al.*, 2017; Gudikandula *et al.*, 2017). Nonetheless, the nanoparticle dispersion must be purified in order to eliminate fungal residues and impurities, which can be achieved using methods such as simple filtration, membrane filtration, gel filtration, dialysis, and ultracentrifugation (Qidwai *et al.*, 2018; Ashrafi *et al.*, 2013; Yahyaei and Pourali, 2019).

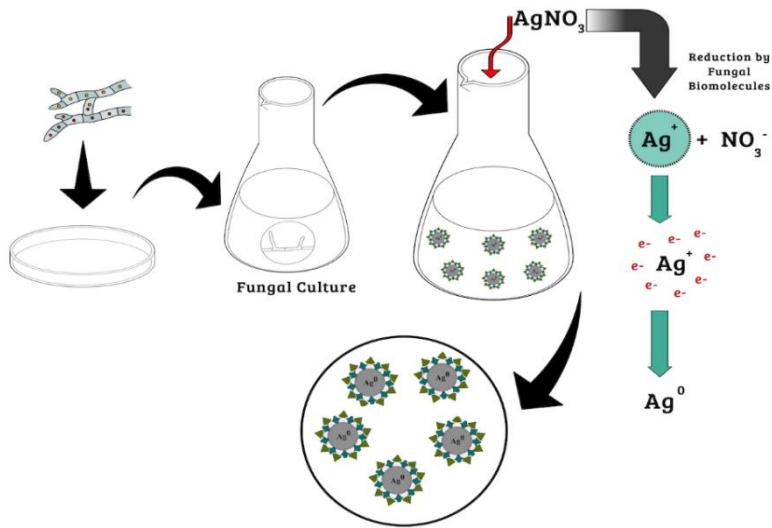
SYNTHESIS MECHANISMS

How does extracellular synthesis of silver nanoparticles by fungi occur?

Although many studies have been published concerning the biogenic synthesis of silver nanoparticles using fungi, the specific mechanisms involved have not yet been fully elucidated. It is known that extracellular synthesis of nanoparticles occurs according to reactions in which the enzymes present in the fungal filtrate act to reduce silver ions, producing elemental silver (Ag^0) at a nanometric scale. After the reaction, the color of the filtrate changes and UV-Visible spectroscopy can be used to observe surface plasmon resonance bands reflecting alteration of the optical properties of the material (Ahmad *et al.*, 2003). The absorbance wavelengths of these bands vary in the range from 400 to 450 nm, with an absorbance peak at a longer wavelength indicating the presence of larger nanoparticles (Elamawi *et al.*, 2018). The size depends on the synthesis conditions such as fungus species, temperature, pH, and dispersion medium, as well as the presence of cappings on the nanoparticles (Khandel and Shahi, 2018; Lee and Jun, 2019). The color of the dispersion is also directly related to the surface plasmon resonance, which varies according to the size and absorbance of the nanoparticles (Adeeyo and Odiyo, 2018; Bhangale *et al.*, 2019; Lee and Jun, 2019).

Many biomolecules can react with silver ions and act in the synthesis, such as those associated with the complex pathways involving electron transfer during the conversion of NADPH/NADH to $\text{NADP}^+/\text{NAD}^+$ (Thakkar *et al.*, 2010; Gudikandula *et al.*, 2017). Nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) and NADH-dependent nitrate reductase enzymes are considered to be most important in the biogenic synthesis of metallic nanoparticles (Baymiller *et al.*, 2017; Zomorodian *et al.*, 2016) (Figure 1).

Figure 1. Mechanisms of biogenic synthesis of silver nanoparticles.



In recent work, Hietzschold *et al.* (2019) showed that nanoparticle synthesis occurred by the action of NADPH, without any need for the nitrate reductase enzyme. This is particularly interesting, since it leads to the possibility of using different organisms for the synthesis of nanoparticles, without the necessary condition of reductase enzyme production. However, Durán *et al.* (2005) synthesized silver nanoparticles using *Fusarium oxysporum* and suggested that the reduction of silver ions was due to the action of the nitrate reductase enzyme and anthraquinones. In another study, using purified nitrate reductase and phytochelatins from the same fungus, it was found that extracellular NADPH-dependent nitrate reductase enzymes and quinones were responsible for the formation of nanoparticles (Kumar *et al.*, 2007).

Optimization of silver nanoparticles synthesis

Although the synthesis of silver nanoparticles using fungi is simple and effective, the parameters employed in the procedure must be optimized in order to achieve good monodispersity, stability, and biocompatibility of the particles (Balakumaran *et al.*, 2015). Given that a wide variety of fungi have potential for use in the synthesis, it is important to consider their individual characteristics and to optimize the synthesis conditions accordingly (Ottoni *et al.*, 2017).

Parameters such as agitation, temperature, light, and culture and synthesis times differ depending on the fungus used and can also be adjusted in order to obtain the desired nanoparticle characteristics. Control of nanoparticle size and shape requires adjustment of the parameters used for both cultivation of the fungus and the synthesis process (Birla *et al.*, 2013).

Studies have found that changes in temperature, concentration of the metal precursor, pH, culture medium, and amount of biomass can be used to obtain nanoparticles with different physicochemical characteristics (Birla *et al.*, 2013; Liang *et al.*, 2017; Rajput *et al.*, 2016; Saxena *et al.*, 2016). Table 1 shows some studies in which silver nanoparticles were produced using different fungal species and synthesis conditions.

Table 1 – Optimization of the synthesis of silver nanoparticles by fungi.

Fungus	Type of parameter	Optimized conditions	Nanoparticle characteristics	Reference
<i>Trichoderma harzianum</i>	Temperature and concentration of AgNO ₃	40°C 1 mM AgNO ₃	51.10 nm -17.19 mV Spherical	Ahluwalia <i>et al.</i> (2014)
<i>Fusarium oxysporum</i>	Culture media, quantity of biomass, light intensity, pH, temperature, and concentration of AgNO ₃	MGYP 6 g of biomass 190.7 Lux and sun light pH 9 and 11 40°C and 60°C 1.5 mM AgNO ₃	10–20 nm 30 mV Spherical	Birla <i>et al.</i> (2013)
<i>Colleotrichum</i> sp. ALF2-6	Temperature and pH	50°C-80°C Alkaline pH	5-60 nm Myriad shapes	Azmath <i>et al.</i> (2016)
<i>Aspergillus oryzae</i> (MTCC No. 1846)	Temperature, pH and concentration of AgNO ₃	90°C pH 10 1 mM AgNO ₃	7-27 nm Spherical	Phanjom and Ahmed (2017)
<i>Rhizopus stolonifer</i>	Temperature and concentration of AgNO ₃	40°C 10 mM AgNO ₃	2.86 nm Spherical	AbdelRahim <i>et al.</i> (2017)
<i>Aspergillus fumigatus</i> BTCB10	Temperature, fungal culture age, quantity of biomass, pH, concentration of AgNO ₃ , ratio of cell-free filtrate/silver nitrate	25°C 7 days of culture 7 g of biomass pH 6 1 mM AgNO ₃ cell-free filtrate/silver nitrate 3:2	322.8 nm PDI 0.278 Spherical	Shahzad <i>et al.</i> (2019)
<i>Fusarium oxysporum</i>	Temperature, quantity of biomass, pH and	50°C 11 g of biomass pH 6	5-13 nm Spherical	Husseiny <i>et al.</i> (2015)

	concentration of AgNO_3 ,	10 mM AgNO_3		
<i>Trichoderma viride</i>	Temperature	27°C	2-4 nm Spherical	Fayaz <i>et al.</i> (2009)
<i>Isaria fumosorosea</i>	Temperature, pH and agitation	30°C pH 8.5 150 rpm	51.31-111.02 nm Spherical	Banu and Balasubramanian (2014b)
<i>Guignardia mangifera</i>	Temperature, quantity of biomass, pH and concentration of AgNO_3	30°C 10 g of biomass pH 7 1 mM AgNO_3	5-30 nm Spherical	Balakumaran <i>et al.</i> (2015)
<i>Duddingtonia flagans</i>	Temperature and pH	60°C pH 10	30-409 nm -28,655 mV Spherical	Costa Silva <i>et al.</i> (2017)
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Temperature, quantity of biomass and agitation	28°C 10 g of biomass Without agitation	24.43 nm PDI 0.420 -19,7 mV Spherical	Elamawi <i>et al.</i> (2018)
<i>Penicillium purpurogenum</i>	pH and concentration of AgNO_3	pH 8 1 mM AgNO_3	8-10 nm Spherical	Nayak <i>et al.</i> (2011)
<i>Epicoccum nigrum</i>	Temperature, pH and concentration of AgNO_3	55°C Alkaline pH 1 mM AgNO_3	1-22 nm Spherical or near to spherical	Qian <i>et al.</i> (2013)
<i>Penicillium oxalicum</i>	pH	pH 12	36.53 nm 0.273 -25.9 mV	Du <i>et al.</i> (2015)
<i>Arthroderra fulvum</i>	Temperature, pH, concentration of AgNO_3 and time of reaction	55°C pH 10 1.5 mM AgNO_3 12 hours	20.56 nm PDI 0.27 Spherical	Xue <i>et al.</i> (2016)
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> MTCC 8785	Culture media, quantity of biomass, concentration of AgNO_3 , pH and temperature	Potato dextrose broth 10 gm of biomass 2 mM AgNO_3 pH 11 80°C	10-15 nm Spherical	Saxena <i>et al.</i> (2016)

<i>Fusarium oxysporum</i>	Concentration of AgNO ₃ and quantity of biomass	5 mM AgNO ₃ 4.96 g/L of biomass	25-50 nm Almost spherical	Korbekandi <i>et al.</i> (2013)
<i>Fusarium oxysporum</i>	Temperature culture media	28°C Modified medium for nitrate reductase	24 nm PDI 0.23 Spherical	Hamedi <i>et al.</i> (2017)
<i>Rhizoctonia solani</i>	Culture media	Potato Glucose Broth	2-22 nm Spherical	Ashrafi <i>et al.</i> (2013)
<i>Penicillium oxalicum</i> GRS-1	Temperature, quantity of biomass, concentration of AgNO ₃ and pH	60°C 25g of biomass 1.5 mM AgNO ₃ pH 7	10-40 nm Spherical	Rose <i>et al.</i> (2019)

Effect of temperature

The temperature used in the synthesis of silver nanoparticles employing fungi can affect parameters such as the speed of the synthesis and the size and stability of the nanoparticles (Elamawi *et al.*, 2018).

In synthesis performed using the filtrate of *Trichoderma harzianum*, Ahluwalia *et al.* (2014) observed that the synthesis rate increased as the temperature was increased up to 40 °C, which was considered the ideal temperature. In other work using the filtrate of *Fusarium oxysporum*, higher protein secretion by the fungal biomass was observed at temperatures between 60 and 80 °C, with progressive increases of the synthesis rate and surface plasmon absorbance as the temperature increased (Birla *et al.*, 2013). In synthesis using the endophytic fungus *Colleotrichum* sp. ALF2-6, Azmath *et al.* (2016) found that the reaction rate increased at higher temperatures, with the synthesis being completed within 20 min at temperatures above 50 °C. In the work by Phajom and Ahmed (2017), using *Aspergillus oryzae* (MTCC no. 1846), a higher temperature also increased the rate of synthesis, with temperatures of 30, 50, 70, and 90 °C resulting in the synthesis being concluded in 6 h, 1 h, 45 min, and 20 min, respectively, while no synthesis occurred at 10 °C. In the work of AbdelRahim *et al.* (2017), no synthesis of silver nanoparticles was observed using the filtrate of *Rhizopus stolonifer* at 80 or 10 °C, which was attributed to denaturation or inactivation of enzymes and other molecules.

Although most studies have reported faster rates of synthesis at higher temperatures, it is important to take into account the quality of nanoparticles. In addition to influencing the

synthesis rate, the temperature can affect nanoparticle size and stability. In the work of AbdelRahim *et al.* (2017), nanoparticles were obtained with sizes of 2.86, 25.89, and 48.43 nm, at temperatures of 40, 20, and 60 °C, respectively, with the smallest size observed at the intermediate temperature. Shanzad *et al.* (2019) synthesized nanoparticles using the fungus *Aspergillus fumigatus* BTCB10, obtaining a size of 322.8 nm at 25 °C and increasing size as the temperature was increased, reaching 1073.45 nm at 55 °C. The size increase was attributed to the aggregation of nanoparticles at higher temperature. Elsewhere, Husseiny *et al.* (2015) used the fungus *Fusarium oxysporum* and found that the nanoparticle size decreased as the temperature was increased to 50 °C, with the smallest size (30.24 nm) at this temperature. In the work by Fayaz *et al.* (2009), using the fungus *Trichoderma viride*, the nanoparticle size was also found to decrease as the synthesis temperature increased.

These different results indicate that the effect of temperature on the size and stability of the nanoparticles synthesized varies according to the fungus species used. Banu and Balasubramanian (2014b) reported that 30 °C was the optimum temperature for production of high stability silver nanoparticles using *Isaria fumosorosea*. Balakumaran *et al.* (2015) also found that this was the optimum temperature for synthesis of nanoparticles using the fungus *Guignardia mangifera*. In the work of Costa Silva *et al.* (2017), using *Duddingtonia flagans*, the optimum synthesis temperature was 60 °C. These differences in the effect of the synthesis temperature occur even within the same fungal genus. *Trichoderma longibrachiatum* presented a specific synthesis temperature of 28 °C, with no production of nanoparticles at 23 or 33 °C (Elamawi *et al.*, 2018), while *Trichoderma viride* presented viable synthesis at temperatures of 10, 27, and 40 °C (Fayaz *et al.*, 2009).

The occurrence of synthesis of nanoparticles by some fungal species at high temperatures indicates that electrons can be transferred from free amino acids to silver ions. However, very high temperatures, between 80 and 100 °C, lead to denaturation of the proteins that compose the nanoparticle capping. This denaturation alters the nucleation of Ag⁺ ions, with the nanoparticles aggregating and increasing in size (Birla *et al.*, 2013). According to Husseiny *et al.* (2015), unsuitable temperatures lead to increased nanoparticle size and loss of stability, due to the low activity of the enzymes involved in the synthesis.

Effect of pH

Adjustment of the synthesis pH can be used to control certain characteristics of the nanoparticles. Nayak *et al.* (2011) reported that the conformation of nitrate reductase enzymes

could be altered according to the concentration of protons in the reaction medium, leading to alteration of the morphology and size of the nanoparticles. At higher pH, there is greater competition between protons and metal ions for establishing bonds with negatively charged regions, resulting in greater success of synthesis at alkaline pH (Sintubin *et al.*, 2009).

Qian *et al.* (2013) observed that alkaline pH favored the synthesis of silver nanoparticles when AgNO₃ was added to the filtrate of the fungus *Epicoccum nigrum*. Du *et al.* (2015) found that a more alkaline pH resulted in a shorter synthesis time and smaller nanoparticle size distribution and polydispersity index values. These characteristics indicate improved stability, due to the electrostatic repulsion of anions present in the dispersion (Gurunathan *et al.*, 2009). Synthesis employing *Colleotrichum* sp. ALF2-6 at alkaline pH and a higher temperature of 50 °C was faster than at lower pH and was completed in around 20 min (Azmath *et al.*, 2016). In the synthesis performed by Birla *et al.* (2013), using *Fusarium oxysporum*, maximum nanoparticle production occurred between pH 9 and 11, with lower production at pH 7 and formation of aggregates between pH 3 and 5. However, Husseiny *et al.* (2015), using the same fungus, found that the nanoparticle synthesis rate decreased as the pH was increased, which was suggested to be due to lower activity of the reductases responsible for the synthesis at higher pH.

Some studies have reported successful syntheses at neutral or slightly alkaline pH. Nanoparticles synthesized using *Isaria fumosorosea* at pH 8.5 showed better physicochemical characteristics, compared to nanoparticles synthesized at pH 4.5 and 6.5 (Banu and Balasubramanian, 2014b). In synthesis using *Guignardia mangiferae*, no color change was observed between pH 1 and 4, while coloration started to appear at pH 5 and 6. As the pH was increased, the intensity of the dispersion increased, with the nanoparticles presenting greater monodispersion and stability at pH 7 (Balakumaran *et al.*, 2015).

Effect of AgNO₃ concentration

In most of the studies employing fungi for extracellular synthesis of silver nanoparticles, AgNO₃ was used at a concentration of 1 mM (Xue *et al.*, 2016; Saxena *et al.*, 2016). In some cases, a lower metal precursor concentration resulted in a smaller nanoparticle size and an improved dispersion (Kaviya *et al.*, 2011; Phanjom and Ahmed, 2017). However, other studies obtained smaller sizes when intermediate AgNO₃ concentrations were used. AbdelRahim *et al.* (2017), employing the fungus *Rhizopus stolonifer*, obtained the smallest nanoparticle size (2.86 nm) at 10 mM AgNO₃, while sizes of 54.67 and 14.23 nm were obtained at 100 and 1 mM,

respectively. Similar results were reported by Husseiny *et al.* (2015), using *Fusarium oxysporum*.

Phanjom and Ahmed (2017) studied the synthesis of nanoparticles using *Aspergillus oryzae* and different AgNO₃ concentrations between 1 and 10 mM. It was observed that at AgNO₃ concentrations up to 8 mM, the nanoparticles presented sizes between 7.22 and 17.06 nm, while the size increased to 45.93 and 62.12 nm at AgNO₃ concentrations of 9 and 10 mM, respectively. This effect was attributed to the lack of functional groups available for the reaction when the metal precursor concentration was increased.

In addition to the effect on nanoparticle size, the AgNO₃ concentration is related to the quantity of nanoparticles produced. In a study employing *Fusarium oxysporum*, it was found that the quantity of nanoparticles increased as the precursor concentration was increased between 0.1 and 1.5 mM, while no differences were observed at higher concentrations (Birla *et al.*, 2013). Similar results were reported elsewhere for syntheses employing *Penicillium purpurogenum* (Nayak *et al.*, 2011) and *Fusarium oxysporum* (Korbekandi *et al.*, 2013).

These findings suggest that there is a limit to the concentration of AgNO₃ used, in order to obtain nanoparticles with satisfactory physicochemical characteristics. The addition of excess amounts of metal ions results in very large nanoparticles with irregular morphology (AbdelRahim *et al.*, 2017), due to competition between the silver ions and functional groups from the fungus filtrate (Shahzad *et al.*, 2019). As the concentration of the metal precursor increases, so also does the intensity of color of the dispersion (Ahluwalia *et al.*, 2014; Phanjom and Ahmed, 2017). In addition, a higher concentration of AgNO₃ may lead to greater toxicity (Balakumaran *et al.*, 2015).

Effect of the culture medium

It is known that microorganisms present different responses, depending on the culture medium and the cultivation conditions. Changes in these conditions result in the synthesis of different metabolites and proteins (Costa Silva *et al.*, 2017).

In nanoparticle synthesis using fungi, a culture medium containing substrate specific for the enzymes that act in the synthesis can induce their production and release by the fungus, enhancing the reduction of silver and the formation of nanoparticles (Husseiny *et al.*, 2015). In the work by Hamedi *et al.* (2017), *Fusarium oxysporum* was cultivated in a culture medium modified to induce nitrate reductase enzyme activity (0.35% yeast extract, 1% peptone, 0.35% potassium nitrate, and 1.5% glucose), as well as in malt glucose yeast peptone (MGYP) medium

without enzyme induction (0.3% malt extract, 1% glucose, 0.3% yeast extract, and 0.5% peptone). The nanoparticle dispersions produced using the filtrate from the fungus cultivated in the enzyme induction medium presented higher concentrations and smaller sizes of the nanoparticles, which was attributed to stimulation of the enzymatic activity by the nitrogen source in the modified medium, hence increasing nanoparticle production.

Different behaviors were observed in studies in which different media were tested for the cultivation of fungi. Saxena *et al.* (2016) synthesized silver nanoparticles using *Sclerotinia sclerotiorum* cultivated in various broths, with the highest nanoparticle production achieved using potato dextrose medium. In work by Costa Silva *et al.* (2017), using the fungus *Duddingyonia flagans* for the synthesis of silver nanoparticles, the biomass was transferred to pure water and to water containing insect carapaces as a natural source of chitin (a substrate for fungal enzymes). The filtrate supplemented with chitin contained around three times more protein and presented higher nanoparticle production.

Birla *et al.* (2013) tested ten different media for cultivation of *Fusarium oxysporum*, obtaining higher production of silver nanoparticles using the filtrate from the fungus cultivated in MGYP medium. Conversely, Ashrafi *et al.* (2013) found that the same medium inhibited the production of silver nanoparticles using the filtrate from *Rhizoctonia solani*, while the synthesis was successful when potato dextrose medium was used to cultivate the fungus. It was suggested that the activity of the enzyme responsible for the reduction process could have been inhibited by a component of the medium.

Effect of the quantity of biomass

The amount of biomass used can affect the synthesis and characteristics of silver nanoparticles. Some studies have reported higher nanoparticle production using lower biomass concentrations, while others have found higher synthesis rates using higher concentrations (Balakumaran *et al.*, 2015; Birla *et al.*, 2013; Korbekandi *et al.*, 2013; Elamawi *et al.*, 2018).

Balakumaran *et al.* (2015) used the filtrate obtained from 10, 20, and 30 g quantities of *Guignardia mangiferae* biomass in 100 mL of water, obtaining silver nanoparticles with better physicochemical characteristics when the lowest biomass concentration was used. Shahzad *et al.* (2019) evaluated the use of 1, 4, 7, and 10 g quantities of *Aspergillus fumigatus* BTCB10 biomass, observing greater production, smaller size, and better dispersion of the nanoparticles when the synthesis was based on the use of 7 g of biomass. In the work of Rose *et al.* (2019), employing *Penicillium oxalicum*, greater nanoparticle production was obtained using a higher

biomass concentration, which was attributed to greater release of the nitrate reductase enzyme by the mycelium. Saxena *et al.* (2016) observed higher silver nanoparticle production when the amount of *Sclerotinia sclerotiorum* biomass was increased. Birla *et al.* (2013) reported the existence of a relationship between the amount of biomass and the release of biomolecules responsible for the synthesis.

Despite the differences in the amount of biomass used, depending on the fungus species employed, it can be concluded that successful synthesis of nanoparticles necessitates a suitable balance between the amount of organic material, derived from the fungus, and the amount of metal precursor (Phanjom and Ahmed, 2017; Shahzad *et al.*, 2019).

In summary, it is clear that different synthesis conditions can result in different characteristics of the nanoparticles, as well as success or failure of the synthesis. However, the effects of the different parameters remain unclear, requiring further detailed studies for each organism used. It is also important to define the desired physicochemical characteristics of the nanoparticles, in order to establish the parameters used in the synthesis, such as temperature, pH, and time, among others. The optimization of synthesis techniques should enable the achievement of fast large-scale nanoparticle production. This opens avenues for the use of these nanomaterials to solve problems such as bacterial resistance to antibiotics and phytopathogens that affect agricultural production.

Importance of capping and stabilization of the nanoparticles

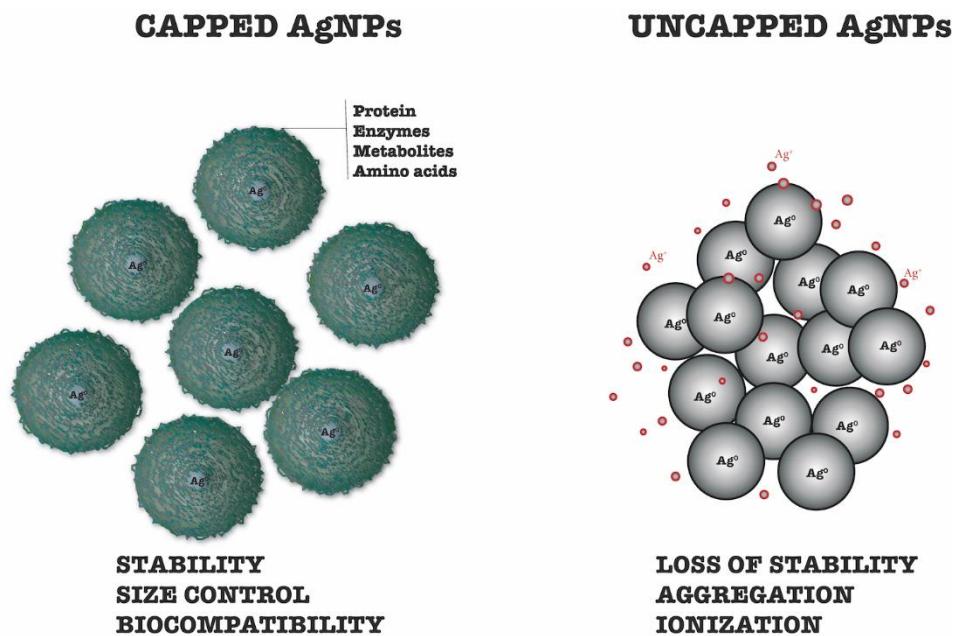
The synthesis of nanoparticles by non-biogenic methods requires an additional step in which polymers and surfactants are used to coat their surfaces. This process, known as functionalization, employs biomolecules that facilitate the anchoring of desired substances on the nanoparticle surfaces (Mout *et al.*, 2012). In the case of biogenic synthesis, formation of the capping occurs simultaneously with formation of the nanoparticles, employing biomolecules derived from the organism used in the synthesis, so no additional steps are required (Chowdhury *et al.*, 2014).

Biomolecules derived from the reducing organism have high capacities for binding to metals, with proteins and amino acid residues binding to the nanoparticle surfaces to form cappings that confer stability and prevent particle agglomeration and aggregation (Gopinath *et al.*, 2012; Basavaraja *et al.*, 2008). The binding of proteins at the surfaces, with consequent stabilization, may involve free amino groups or cysteine residues. Stabilization can also be provided by mycelial cell wall enzymes present in the filtrate, whose negative carboxyl groups

provide electrostatic attraction (Gole *et al.*, 2001; Husseiny *et al.*, 2015). According to Gurunathan *et al.* (2009), the stability of silver nanoparticles is also provided by nucleophilic OH⁻ ions that are adsorbed on the surfaces, preventing aggregation and contributing to the synthesis of smaller nanoparticles by providing electrons for the reduction of silver ions.

In addition to conferring stability to the nanoparticles, the protein capping resulting from biogenic synthesis can act in the anchoring of drugs and genetic material for subsequent transport into cells (Hu *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2016). The nontoxic organic composition of the capping means that it is biocompatible, which can increase the rate of internalization and retention of nanoparticles (Rodrigues *et al.*, 2013; Mohanta *et al.*, 2018) (Figure 2).

Figure 2. Differences between capped and uncapped silver nanoparticles.



Despite their importance, there have been few studies of the cappings on biogenic nanoparticles. Gade *et al.* (2008) detected sulfur atoms in samples of silver nanoparticles synthesized using *Aspergillus niger*, indicative of the presence of proteins enveloping the nanoparticles. Chowdhury *et al.* (2014) used scanning electron microscopy to detect the presence of cappings on biogenic silver nanoparticles. The nanoparticles were spherical, polydispersed, and were not in direct contact, even within aggregates, indicating good stability. The SDS-PAGE protein electrophoresis technique was employed to characterize the extracellular fungal proteins associated with the nanoparticles. Molecular weight bands between 50 and 116 kDa were attributed to proteins responsible for synthesis and stabilization

of the nanoparticles. Both the filtrate and the capping removed from nanoparticles showed a band at 85 kDa, which corresponded to a protein that was suggested to be responsible for the stability of the nanoparticles.

Elgorban *et al.* (2016) synthesized biogenic silver nanoparticles and confirmed the presence of a capping by microscopic analyses. The use of transmission electron microscopy revealed a thin layer of organic material surrounding the particles. Signals corresponding to oxygen and carbon were observed using scanning electron microscopy, indicating the presence of organic compounds derived from the filtrate, which were adsorbed on the nanoparticle surfaces.

Devi and Joshi (2015) synthesized silver nanoparticles using the endophytic fungi *Aspergillus tamarii*, *Aspergillus niger*, and *Penicillium ochrochloron*. UV-Vis absorption analysis revealed peaks at 419, 430, and 430 nm, respectively. A peak at 280 nm was attributed to the presence in the filtrate of amino acid residues such as tryptophan and tyrosine, which were secreted by the fungi.

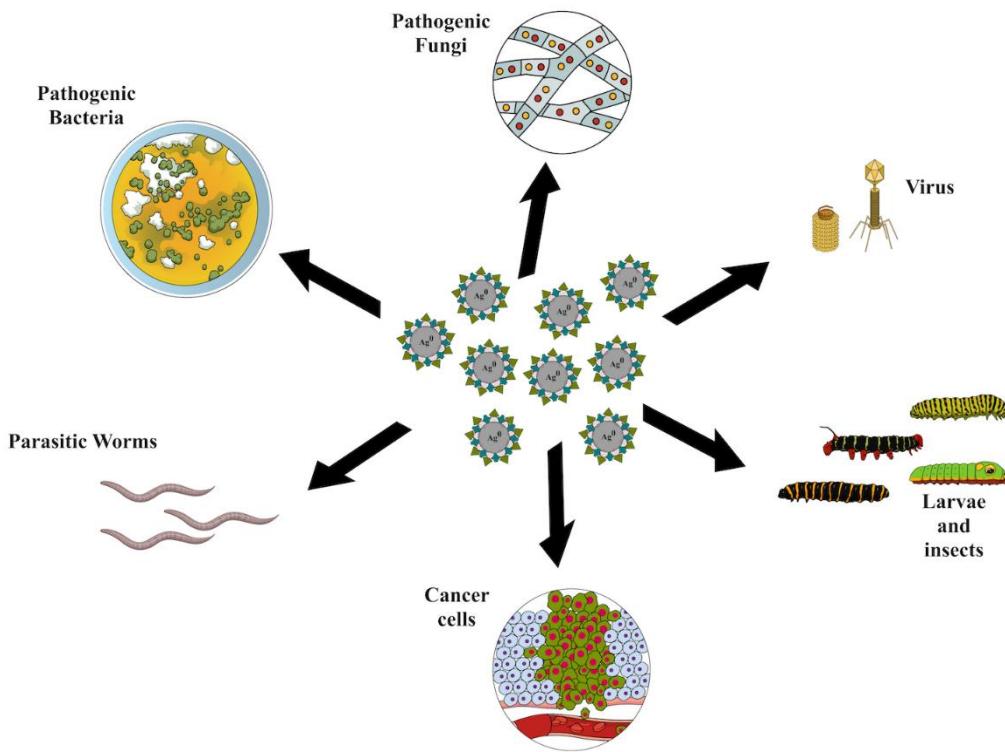
Given the importance of the cappings on biogenic nanoparticles, future studies are needed to investigate their compositions and biological activities. The use of synergy between nanometric silver and biomolecule cappings active against specific pathogens is likely to be a development in the near future.

APPLICATIONS

Silver nanoparticles synthesized using fungi have various potential applications in the areas of health, agriculture, and pest control. There are no reports concerning the better or worse activities of biogenic nanoparticles synthesized from different sources, such as fungi, bacteria, or plants. However, synthesis based on fungi may be advantageous in terms of production, due to the large quantities of metabolites produced. Another factor to consider is the capacity of fungi to produce antibiotics that could be contained in the capping and act in synergy with the nanoparticle core.

Many studies of biogenic synthesis of nanoparticles using fungi have shown results that are promising for the application of these systems in controlling pathogenic fungi and bacteria, combating cancer cells and viruses, and providing larvicidal and insecticidal activities (Figure 3).

Figure 3. Applications of silver nanoparticles synthesized using fungi.



Health applications

Several studies have described the use of biogenic silver nanoparticles for applications in the area of health, involving the control of bacteria and fungi. Bacterial growth is directly inhibited by the nanoparticles, which contact the cell wall and cause progressive metabolic responses, with the production of reactive oxygen species (Gudikandula *et al.*, 2017).

The size of nanoparticles is one of the factors determining their antimicrobial potential, since smaller nanoparticles have greater effects (Lu *et al.*, 2013). Small nanoparticles can penetrate the bacterial cell membrane and damage the respiratory chain, alter permeability, cause DNA and RNA damage, affect cell division, and lead to cell death (Rai *et al.*, 2009; Morones *et al.*, 2005). Nanoparticles also interact with the thiol groups of essential enzymes, releasing Ag⁺ ions that form complexes with nucleotides, damaging the microorganism DNA and inhibiting the activity of DNases (Li *et al.*, 2010; Baker and Satish, 2012).

Materials with antifungal potential (such as biogenic silver nanoparticles) that are obtained from sustainable sources can be inexpensive and safe options for the treatment of systemic and surface fungal infections, enabling the control of resistant fungi (Ashajyothi *et al.*, 2016). The large surface area of silver nanoparticles and the release of ions can contribute to

high antimicrobial activity. The toxic ions bind to proteins containing sulfur, affecting cell permeability and leading to alteration of the DNA replication process. The inactivation of some enzymes is also caused by the binding of nanoparticles with thiol groups. This inactivation leads to oxidative stress, which influences electron transport and protein oxidation (Fátima *et al.*, 2016; Reidy *et al.*, 2013; Rai *et al.*, 2014).

Table 2 shows some studies in which silver nanoparticles synthesized from different fungal species were employed for health issues.

Table 2 – Health applications of silver nanoparticles synthesized by fungi.

Synthesis source	Bioactivity	Target organism	Effective concentration	Reference
<i>Macrophomina phaseolina</i>	Antibacterial	Multidrug resistant strains of <i>Escherichia coli</i>	0.51; 0.36; 0.25; 0.10 and 0.05 µg/mL (concentration-dependent)	(Chowdhury <i>et al.</i> , 2014)
<i>Aspergillus tubingensis</i> and <i>Bionectria ochroleuca</i>	Antibacterial	<i>Candida</i> sp. and <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.11–1.75 µg/mL (0.28 µg/mL (<i>P. aeruginosa</i>))	(Rodrigues <i>et al.</i> , 2013)
<i>Rhizopus arrhizus IPT1011</i> ; <i>Rhizopus arrhizus IPT1013</i> ; <i>Trichoderma gamsii IPT853</i> ; <i>Aspergillus niger IPT856</i>	Antibacterial	<i>E. coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> and <i>P. aeruginosa</i>	1.0; 5.0; 10; 50 and 100 µg/mL	(Ottoni <i>et al.</i> , 2017)
<i>Fusarium verticillioides</i>	Antibacterial	<i>S. aureus</i> and <i>E. coli</i>	5 and 10 mM	(Mekkawy <i>et al.</i> , 2017)
<i>Alternaria</i> sp.	Antibacterial	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> and <i>Serratia marcescens</i>	5, 10, 15, 20 and 25 mg/mL (concentration-dependent)	(Singh <i>et al.</i> , 2017)
<i>Penicillium aculeatum</i> Su1	Antibacterial	<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i> and <i>Candida albicans</i>	50, 100 and 200 µg/mL	(Liang <i>et al.</i> , 2017)

(concentration-dependent)				
<i>Pleurotus cornucopiae var. citrinopileatus</i>	Antifungal	<i>Candida</i> spp.	20, 40 and 60 mg/well	(Owaid <i>et al.</i> , 2015)
<i>Inonotus obliquus</i>	Antibacterial and antiproliferative in cancer cells	<i>E. coli</i> KCTC 2441 and A549 (lung cancer) and MCF-7 (breast cancer)	30 µL/disk	(Nagajyothi <i>et al.</i> , 2014)
<i>Pleurotus djamor var. roseus</i>	Antiproliferative in cancer cells	PC3 cells (Prostate cancer)	10-40 µg/mL	(Raman <i>et al.</i> , 2015)
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> MTCC8785	Antibacterial	<i>E. coli</i> and <i>S. aureus</i>	100, 200 and 400 ppm	(Saxena <i>et al.</i> , 2016)
<i>Colletotrichum sp. ALF2-6</i>	Antibacterial	<i>E. coli</i> , <i>Salmonella typhi</i> , <i>B. subtilis</i> and <i>S. aureus</i>	50 µg/mL (<i>S. aureus</i>) and 100 µg/mL (others)	(Azmath <i>et al.</i> , 2016)
<i>Penicillium chrysogenum</i> and <i>Aspergillus oryzae</i>	Antifungal	<i>Trichophyton rubrum</i>	<i>P. chrysogenum</i> 0.5 µg/mL and <i>A. oryzae</i> >7.5 µg/mL	(Pereira <i>et al.</i> , 2014)
<i>Schizophyllum radiatum</i>	Antibacterial	<i>B. subtilis</i> and <i>Salmonella paratyphi</i>	60 µL/well	(Metuku <i>et al.</i> , 2014)
<i>Trichophyton rubrum</i> , <i>T. mentagrophytes</i> and <i>Microsporum canis</i>	Antifungal	<i>C. albicans</i>	4 µg/mL	(Moazen et al., 2012)
<i>Aspergillus flavus</i>	Synergism with conventional antibiotics against multidrug-resistant bacteria	<i>Bacillus</i> spp., <i>Micrococcus luteus</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter baumanii</i> and <i>Krebsiella pneumoniae</i>	100 ppm	(Naqvi <i>et al.</i> , 2013)
<i>Penicillium italicum</i>	Antibacterial and antifungal	Multidrug-resistant <i>S. aureus</i> , <i>Shewanella putrefaciens</i> and <i>C. albicans</i>	25 µL/disk	(Nayak <i>et al.</i> , 2018)

<i>Arthroderra fulvum</i>	Antifungal	<i>Candida</i> sp. and <i>Aspergillus</i> sp.	0.125–4.00 µg/mL	(Xue <i>et al.</i> , 2016)
<i>Aspergillus versicolor</i>	Antibacterial	<i>S. aureus</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i> and <i>K. Pneumoniae</i>	1 mg/mL	(Netala <i>et al.</i> , 2016)
<i>Aspergillus terreus</i>	Antibacterial	<i>Salmonella typhi</i> , <i>S. aureus</i> and <i>E. coli</i>	11.43 µg/mL -308 µg/mL	(Rani <i>et al.</i> , 2017)
<i>Fusarium oxysporum</i>	Antifungal	<i>Candida</i> spp and <i>Cryptococcus</i> spp	<i>Candida</i> spp 0.84-1.68 µg/mL and <i>Cryptococcus</i> spp 0.42-0.84 µg/mL	(Ishida <i>et al.</i> , 2014)

Ahluwalia *et al.* (2014) synthesized silver nanoparticles using *Trichoderma harzianum*, which were used to control the bacteria *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae* *in vitro*. The inhibition rates were concentration-dependent, with the gram-negative bacterium (*K. pneumoniae*) showing higher sensitivity. Balakumaran *et al.* (2015) reported the potential of silver nanoparticles synthesized using the fungus *Guignardia mangiferae* for the control of gram-negative bacteria, with effects including increased permeability, alteration of membrane transport, and release of nucleic acids.

The lower effects of silver nanoparticles towards gram-positive bacteria may be because the peptidoglycans that compose the cell wall act as a barrier that prevents internalization of the nanoparticles (Shrivastava *et al.*, 2007). However, in some studies, the nanoparticles exhibited inhibitory effects against this bacterial type. In evaluation of the antimicrobial activity of silver nanoparticles synthesized using *Aspergillus niger*, Gade *et al.* (2008) observed inhibitory effects against the bacteria *E. coli* and *S. aureus* that were equivalent to those of the antibiotic gentamicin, with the gram-positive bacterium (*S. aureus*) showing higher sensitivity.

Silver nanoparticles have also been used in combination with antibiotics and antifungals, representing a possible solution to the problem of resistance towards these drugs used in the health area. Bhat *et al.* (2015) synthesized silver nanoparticles using *Candida albicans* and evaluated their effects when used alone or in combination with the antibiotic ciprofloxacin against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Vibrio*

cholerae, and *Proteus vulgaris*. It was found that the activity of the antibiotic increased when it was used together with the nanoparticles, while the latter also showed antimicrobial potential when they were used alone.

Fátima *et al.* (2016) evaluated the antimicrobial and antifungal activities of silver nanoparticles synthesized using the filtrate from *Aspergillus flavus*. The nanoparticles were effective in controlling the bacteria *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus*, with *B. subtilis* and *E. coli* being most sensitive. The activity was concentration-dependent, with better results achieved using the nanoparticles in combination with the antibiotic tetracycline, rather than on their own. Concentration-dependent activity of the nanoparticles was also observed against the fungi *Aspergillus niger* and *Trichoderma harzianum*.

Gudikandula *et al.* (2017) used silver nanoparticles synthesized from the fungi *Trametes ljubarsky* and *Ganoderma enigmaticum* for the control of gram-positive and gram-negative bacteria (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Salmonella paratyphi*). Both types of nanoparticle were effective in controlling all the bacteria.

Ibrahim and Hassan (2016) synthesized silver nanoparticles using *Alternaria alternata*, which were capped with butyl acrylate and applied on cotton to inhibit the proliferation of microorganisms. At all the concentrations tested, the nanoparticle-treated cotton presented high antimicrobial activity against *E. coli* and *S. aureus*, achieving 99.9% inhibition. Biogenic silver nanoparticles can also be effective against resistant microorganisms. For example, Singh *et al.* (2014) used an optimized synthesis process employing *Penicillium* sp. to produce silver nanoparticles that showed potential for the control of multidrug-resistant *E. coli* and *S. aureus*.

In addition to their antimicrobial potential, biogenic silver nanoparticles can exert effects on tumor cells. Husseiny *et al.* (2015) evaluated the antibacterial and antitumor potential of silver nanoparticles synthesized using *Fusarium oxysporum*. The nanoparticles were effective in controlling *E. coli* and *S. aureus*, as well as a tumor cell line. A low IC₅₀ value (121.23 µg cm³) for MCF-7 cells (human breast adenocarcinoma) was obtained following exposure of the cells to the nanoparticles, indicating high cytotoxicity and the potential for tumor control. The effect was attributed to the involvement of the silver nanoparticles in disruption of the mitochondrial respiratory chain, which led to the production of reactive oxygen species and hindered the synthesis of adenosine triphosphate (ATP), consequently damaging the nucleic acids (Husseiny *et al.*, 2015).

Balakumaran *et al.* (2015) evaluated the cytotoxic potential of silver nanoparticles, synthesized using the fungus *Guignardia mangiferae*, against HeLa (human cervical carcinoma) and MCF-7 tumor cells, as well as normal Vero cells (African monkey kidney). Higher cytotoxicity was observed against the tumor cells, which showed signs of apoptosis, with condensed nuclei, membrane damage, and the presence of apoptotic bodies.

El-Sonbaty (2013) evaluated silver nanoparticles synthesized using the fungus *Agaricus bisporus* for their antitumor potential *in vitro* against MCF-7 tumor cells and *in vivo* against Ehrlich carcinoma in mice. The nanoparticles presented concentration-dependent activity in reducing the viability of the breast carcinoma cells. In the case of Ehrlich carcinoma, there was a decrease of blood vessels and an increase of apoptotic cells, with these effects being intensified when the application of nanoparticles was combined with exposure to gamma radiation. The cytotoxic effects of silver nanoparticles occur due to the interactions of the silver atoms with the groups of intracellular proteins and with the nitrogenous bases and phosphate groups of DNA (Sriram *et al.*, 2010). Although the application of nanoparticles for the control of cancer is of considerable interest and has shown promising results in several studies, this technique still requires further investigation and the use of clinical trials (Balakumaran *et al.*, 2015).

Biogenic silver nanoparticles have also shown effects against viruses. Gaikwad *et al.* (2013) synthesized silver nanoparticles using the fungi *Alternaria* sp., *Fusarium oxysporum*, *Curvularia* sp., *Chaetomium indicum*, and *Phoma* sp., which showed potential for reducing the replication of HSV-1, HSV-2, and HPIV-3 in cell cultures. The nanoparticles produced using *F. oxysporum*, *Curvularia* sp., and *C. indicum* were the most effective and presented low cytotoxicity, while the other two types were not used, due to their cytotoxicity.

Agriculture and pest control applications

There have been few studies to evaluate the potential of silver nanoparticles synthesized using biogenic methods for the control of phytopathogenic fungi in agriculture and pests. Table 3 shows some studies in which silver nanoparticles synthesized from different fungal species were employed in agriculture and pests control.

Table 3 – Applications of silver nanoparticles synthesized by fungi in agriculture and pests control.

Synthesis source	Bioactivity	Target organism	Effective concentration	Reference
<i>Trichoderma harzianum</i>	Antifungal	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	0.15×10^{12} and 0.31×10^{12} NPs/mL	(Guilger, <i>et al.</i> 2017)
<i>Beauveria bassiana</i>	Insecticide	<i>Lipaphis erysimi</i>	(concentration-dependent)	(Kamil <i>et al.</i> , 2017)
<i>Trichoderma harzianum</i> SYA.F4	Antifungal	<i>Helminthosporium</i> sp., <i>Alternaria alternata</i> , <i>Phytophthora arenaria</i> and <i>Botrytis</i> sp.	100 µg/mL	(El-Moslamy <i>et al.</i> , 2017)
<i>Arthroderra fulvum</i>	Antifungal	<i>Fusarium</i> sp.	0.125–4.00 µg/mL	(Xue <i>et al.</i> , 2016)
<i>Aspergillus versicolor</i>	Antifungal	<i>S. sclerotiorum</i> and <i>Botrytis cinerea</i>	150 ppm	(Elgorban <i>et al.</i> , 2016)
<i>Epicoccum nigrum</i>	Antifungal	<i>Fusarium solani</i> , <i>Sporothrix schenckii</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Aspergillus flavus</i> and <i>Aspergillus fumigatus</i>	0.125-1.00 µg/mL	(Qian <i>et al.</i> , 2013)
<i>Guignardia mangiferae</i>	Antifungal	<i>Colletotrichum</i> sp., <i>Rhizoctonia solani</i> and <i>Curvularia lunata</i>	1 mg/mL	(Balakumaran <i>et al.</i> , 2015)
<i>Fusarium solani</i>	Antifungal	Fungal species isolated from wheat, barley and corn	1, 2 and 4%	(ABD El-Aziz <i>et al.</i> , 2015)
<i>Alternaria alternata</i>	Antifungal combined with Fluconazol	<i>Phoma glomerata</i> , <i>Phoma herbarum</i> and <i>Fusarium semitectum</i>	20 µL/disk	(Gajbhiye <i>et al.</i> , 2009)
<i>Trichoderma harzianum</i>	Antiparasitic combined with Triclabendazol	<i>Fasciola hepatica</i>	50 µg/mL	(Gherbawy <i>et al.</i> , 2013)
<i>Trichoderma harzianum</i>	Insecticide	<i>Aedes aegypti</i>	0.2-1.0%	(Sundaravadivelan and Padmanabahn, 2014)

<i>Isaria fumosorosea</i>	Insecticide	<i>Culex quinquefasciatus</i> and <i>Aedes aegypti</i>	0.3-1.0 ppm	(Banu and Balasubramanian, 2014b)
<i>Beauveria bassiana</i>	Insecticide	<i>Aedes aegypti</i>	0.06-1.0 ppm	(Banu and Balasubramanian, 2014a)

Elgorban *et al.* (2016) synthesized silver nanoparticles using the fungus *Aspergillus versicolor* and observed their effects against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea* in strawberry plants. The nanoparticles showed concentration-dependent activity towards both pests, with the greatest effect against *B. cinerea*. Qian *et al.* (2013) synthesized silver nanoparticles using the fungus *Epicoccum nigrum* and observed their activity against isolates of the pathogenic fungi *C. albicans*, *Fusarium solani*, *Sporothrix schenckii*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus flavus*, and *Aspergillus fumigatus*. Balakumaran *et al.* (2015) synthesized silver nanoparticles using the fungus *Guignardia mangiferae* and reported their potential to control the phytopathogenic fungi *Colletotrichum* sp., *Rhizoctonia solani*, and *Curvularia lunata*. In other work, silver nanoparticles synthesized using the phytopathogenic fungus *Fusarium solani* isolated from wheat were shown to be effective for the treatment of wheat, barley, and maize seeds contaminated by different species of phytopathogenic fungi (Abd El-Aziz *et al.*, 2015).

Several studies have investigated the combination of biogenic nanoparticles and conventional biocides. Gajbhiye *et al.* (2009) synthesized silver nanoparticles using the fungus *Alternaria alternata* and evaluated their potential, in combination with the antifungal compound fluconazole, against the phytopathogenic fungi *Phoma glomerata*, *Phoma herbarum*, and *Fusarium semitectum*, as well as the biological control agent *Trichoderma* sp. and the human pathogenic fungus *Candida albicans*. The combination of the nanoparticles and fluconazole was effective, with *C. albicans* showing the highest sensitivity after exposure, followed by *Trichoderma* sp. and *P. glomerata*. Potentiation of antifungal activity was not observed for *F. semitectum* or *P. herbarum*. Gherbawy *et al.* (2013) synthesized silver nanoparticles using *Trichoderma harzianum* and applied them in combination with triclabendazole for controlling the parasite *Fasciola* sp., which affects sheep and cattle. The nanoparticles combined with triclabendazole inhibited egg hatching by 90.6%, while use of the drug alone caused 70.6% inhibition. It was suggested that use of the nanoparticles together with

the drug could be a way to overcome the resistance that the parasite has developed towards the drug.

Other studies have investigated the use of biogenic nanoparticles to control insect vectors. Sundaravadivelan and Padmanabahn (2014) synthesized silver nanoparticles using the filtrate from *Trichoderma harzianum* and observed concentration-dependent mortality when they were tested against the larvae and pupae of the dengue vector mosquito *Aedes aegypti*. In other work by Banu and Balasubramanian (2014b), silver nanoparticles synthesized using the entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea* were tested for control of the mosquito species *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti*, when applied between instars 1 and 4. Potential concentration-dependent control was observed for both species, with the greatest effectiveness against *Aedes aegypti*, for which the mortality of 1st instar larvae reached 100% within 24 h. The 4th instar larvae of both species showed lower susceptibility to the nanoparticles. Based on these results, these nanoparticles were considered as potential larvicides for mosquito control. The same authors synthesized silver nanoparticles using the mycelial extract of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* and obtained 100% mortality of the 1st and 2nd instar larvae of *Aedes aegypti* within 21 h of exposure to the nanoparticles. The authors concluded that use of the nanoparticles could be an environmentally safe strategy for vector control, following scale-up of production and field applications (Banu and Balasubramanian, 2014a).

CONCLUSION

Recent studies show that the biogenic synthesis of silver nanoparticles using fungi offers several advantages and that these materials have promising potential for a range of applications in the areas of health and agriculture. The nanoparticles possess cappings derived from the fungi, which confer stability. Depending on the fungus used, this capping may also exhibit biological activity, acting in synergy with the effect of the nanoparticle core. The ability to use different species of fungi and to perform the synthesis under different conditions of temperature, pH, quantity of biomass, and concentration of the metal precursor, among others, enables the production of nanoparticles that have different physicochemical characteristics. However, in order to successfully use fungi for biogenic synthesis, there are a number of disadvantages that must be overcome. These include the need to know which fungus to use, its growth parameters, the need for sterile conditions, and the time required for fungal growth and for the synthesis to be completed. There can also be difficulties associated with scale-up, including the need for

further investigation concerning the mechanisms of formation of capping layers and the molecules present in them.

Although progress is required on some issues, the studies published to date show that the use of fungi for biogenic synthesis of silver nanoparticles can lead to a wide range of possible applications. These nanoparticles offer considerable potential for exploitation in the control of pathogenic microorganisms.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MG-C and RL wrote the manuscript and prepared the figures. All authors read and approved the final manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to University of Sorocaba/UNISO for supporting the publication charges.

REFERENCES

- Abd El-Aziz, A.R.M., Al-Othman, M.R., Mahmoud, M.A., Metwaly, H.A., (2015). Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using *Fusarium Solani* and its Impact on Grain Borne Fungi. *Dig J Nanomater Bios.* 10, 655-662.
- AbdelRahim, K., Mahmoud, S.Y., Ali, A.M., Almaary, K.S., Mustafa, A.E.Z.M.A., Husseiny, S.M., (2017). Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using *Rhizopus stolonifer*. *Saudi J Biol Sci.* 24, 208-216.
- Adeeyo, A.O., Odiyo, J.O., (2018). Biogenic Synthesis of Silver Nanoparticle from Mushroom Exopolysaccharides and its Potentials in Water Purification. *OPEN CHEM.* 5, 64-75.
- Ahluwalia, V., Kumar, J., Sisodia, R., Shakil, N.A., Walia, S., (2014). Green synthesis of silver nanoparticles by *Trichoderma harzianum* and their bio-efficacy evaluation against *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumonia*. *Ind Crops Prod.* 55, 202-206.
- Ahmad, A., Mukherjee, P., Senapati, S., Mandal, D., Kahn, M.I., Kumar, R., et al., (2003). Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium oxysporum*. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 28, 313-318.
- Ahmed, S., Ahmad, M., Swami, B.L., Ikram, S., (2016). A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: A green expertise. *J Adv Res.* 7, 17–28.
- Alghuthaymi, M.A., Almoammar, H., Rai, M., Said-Galiev, E., Abd-Elsalam, K.A., (2015). Myconanoparticles: synthesis and their role in phytopathogens management. *Biotechnol Biotechnol Equip.* 29, 221-236.

- Ashajyothi, C., Praburajeshwar, C., Harish, K.H., Chandrakanth, K.R., (2016). Investigation of antifungal and anti-mycelium activities using biogenic nanoparticles: An eco-friendly approach. *Environ. Nanotechnol. Monit. Manage.* 5, 81-87.
- Ashrafi, S.J., Rastegar, M.F., Ashrafi, M., Yazdian, F., Pourrahim, R., Suresh, A.K., (2013). Influence of external factors on the production and morphology of biogenic silver nanocrystallites. *J Nanosci Nanotechnol.* 13, 2295-2301.
- Azmath, P., Baker, S., Rakshith, D., Satish, S., (2016). Mycosynthesis of silver nanoparticles bearing antibacterial activity. *Saudi Pharm J.* 24, 140-146.
- Baker, S., Satish, S., (2012). Endophytes: Toward a Vision in Synthesis of Nanoparticle for Future Therapeutic Agents. *Int. J. Bio-Inorg. Hybd. Nanomat.* 1, 67-77.
- Balaji, D.S., Basavaraja, S., Deshpande, R., Mahesh, D.B., Prabhakar, B.K., Venkataraman, A., (2009). Extracellular biosynthesis of functionalized silver nanoparticles by strains of *Cladosporium cladosporioides* fungus. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 68, 88-92.
- Balakumaran, M.D., Ramachandran, R., Kalaichelvan, P.T., (2015). Exploitation of endophytic fungus, *Guignardia mangiferae* for extracellular synthesis of silver nanoparticles and their *in vitro* biological activities. *Microbiol Res.* 178, 9-17.
- Ballotin, D., Fulaz, S., Souza, M.L., Corio, P., Rodrigues, A.G., Souza, A.O., et al., (2016). Elucidating Protein Involvement in the Stabilization of the Biogenic Silver Nanoparticles. *Nanoscale Res Lett.* 11, 1-9.
- Bhangale, H.G., Bachhav, S.G., Nerkar, D.M., Sarode, K.M., Patil, D.R., (2019). Study on Optical Properties of Green Synthesized Silver Nanoparticles for Surface Plasmon Resonance. *J Nanosci Tech.* 5, 658-661.
- Banu, N., Balasubramanian, C., (2014a). Mycosynthesis of silver nanoparticles using *Beauveria bassiana* against dengue vector, *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae). *Parasitol Res.* 113, 1-9.
- Banu, A.N., Balasubramanian, C., (2014b). Optimization and synthesis of silver nanoparticles using *Isaria fumosorosea* against human vector mosquitoes. *Parasitol Res.* 113, 3843-3851.
- Basavaraja, S., Balaji, S.D., Lagashetty, A., Rajasab, A.H., Venkataraman, A., (2008). Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium semitectum*. *Mater Res Bull.* 43, 1164-1170.
- Baymiller, M., Huang, F., Rogelj, S., (2017). Rapid one-step synthesis of gold nanoparticles using the ubiquitous coenzyme NADH. *Matters.* <http://dx.doi.org/10.19185/matters.201705000007>.
- Bérdy J., (2005). Bioactive microbial metabolites. *J Antibiot (Tokyo).* 58, 1-26.
- Bhat, M.A., Nayak, B.K., Nanda, A., (2015). Evaluation of bactericidal activity of biologically synthesized silver nanoparticles from *Candida albicans* in combination with Ciprofloxacin. *Mater Today: Proc.* 2, 4395-4401.
- Birla, S.S., Gaikwad, S.C., Gade, A.K., Rai, M.K., (2013). Rapid Synthesis of Silver Nanoparticles from *Fusarium oxysporum* by Optimizing Physicocultural Conditions. *Sci World J.* 2013, 1-12.
- Burduşel, A.C., Gherasim, O., Grumezescu, A.M., Mogoantă, L., Ficai, A., Andronescu, E., (2018). Biomedical Applications of Silver Nanoparticles: An Up-to-Date Overview. *Nanomaterials (Basel).* 8, 1-25.

- Castro-Longoria, E., Vilchis-Nestor, A.R., Avalos-Borja, M., (2011). Biosynthesis of silver, gold and bimetallic nanoparticles using the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 83, 42-48.
- Chowdhury, S., Basu, A., Kundu, S., (2014). Green synthesis of protein capped silver nanoparticles from phytopathogenic fungus *Macrophomina paseolina*. *Nanoscale Res Lett*. 9, 1-11.
- Costa Silva, L.P., Oliveira, J.P., Keijok, W.J., Silva, A.R., Aguiar, A.R., Guimarães, M.C.C., et al., (2017). Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the cell-free filtrate of nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans*. *Int J Nanomed*. 12, 6373-6381.
- Dakal, T.C., Kumar, A., Majumdar, R.S., Yadav, V., (2016). Mechanistic Basis of Antimicrobial Actions of Silver Nanoparticles. *Front. Microbiol*. 16, 1-17.
- Devi, L.S., Joshi, S.R., (2015). Ultrastructures of silver nanoparticles biosynthesized using endophytic fungi. *Journal of Microscopy and Ultrastructure*. 3, 29-37.
- Du, L., Xu, Q., Huang, M., Xian, L., Feng, J-X., (2015). Synthesis of small silver nanoparticles under light radiation by fungus *Penicillium oxalicum* and its application for the catalytic reduction of methylene blue. *Mater Chem Phys*. 160, 40-47.
- Durán, N., Marcato, P.D., Alves, O.L., De Souza, G.I.H., Esposito, E., (2005). Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains. *J Nanobiotechnol*. 3, 1-7.
- Durán, N., Marcato, P.D., Durán, M., Yadav, A., Gade, A., Rai, M., (2011). Mechanistic aspects in the biogenic synthesis of extracellular metal nanoparticles by peptides, bacteria, fungi and plants. *Appl Microbiol Biotechnol*. 90, 1609-1624.
- Elamawi, R.M., Al-Harbi, R.E., Hendi, A.A., (2018). Biosynthesis and characterization of silver nanoparticles using *Trichoderma longibrachiatum* and their effect on phytopathogenic fungi. *Egypt J Biol Pest Co*. 28, 1-11.
- Elgorban, A.M., Aref, S. M., Seham, S.M., Elhindi, K.M., Bahkali, A.H., Sayed, S.R., et al., (2016). Extracellular synthesis of silver nanoparticles using *Aspergillus versicolor* and evaluation of their activity on plant pathogenic fungi. *Mycosphere*. 7, 844-852.
- El-Moslamy, S.H., Elkady, M.F., Rezk, A.H., Abdel-Fattah, Y.R., (2017). Applying Taguchi design and large-scale strategy for mycosynthesis of nano-silver from endophytic *Trichoderma harzianum* SYA.F4 and its application against phytopathogens. *Sci Rep*. <https://doi.org/10.1038/srep45297>.
- El-Sonbaty, S.M., (2013). Fungus-mediated synthesis of silver nanoparticles and evaluation of antitumor activity. *Cancer Nanotechnol*. 4, 73-79.
- Fátima, F., Verma, S.R., Pathak, N., Bajpai, P., (2016). Extracellular mycosynthesis of silver nanoparticles and their microbicidal activity. *J Glob Antimicrob Resist*. 7, 88-92.
- Fayaz, A.M., Balaji, K., Kalaichelvan, P.T., Venkatesan, R., (2009). Fungal based synthesis of silver nanoparticles—An effect of temperature on the size of particles. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 74, 123-126.
- Gade, A.K., Bonde, P., Ingle, A.P., Marcato, P.D., Durán, N., Rai, M.K., (2008). Exploitation of *Aspergillus niger* for Synthesis of Silver Nanoparticles. *J Biobased Mater Bioenergy*. 2, 1-5.

- Gaikwad, S., Ingle, A., Gade, A., Rai, M., Falanga, A., Incoronato, N., *et al.*, (2013). Antiviral activity of mycosynthesized silver nanoparticles against herpes simplex virus and human parainfluenza virus type 3. *Int J Nanomed.* 8, 4303–4314.
- Gajbhiye, M., Kesharwani, J., Ingle, A., Gade, A., Rai, M., (2009). Fungus-mediated synthesis of silver nanoparticles and their activity against pathogenic fungi in combination with fluconazole. *Nanomedicine.* 5, 382-386.
- Gherbawy, Y.A., Shalaby, I.M., El-Sadek, M.S.A., Elhairy, H.M., Banaja, A.A., (2013). The Anti-Fasciolasis Properties of Silver Nanoparticles Produced by *Trichoderma harzianum* and Their Improvement of the Anti-Fasciolasis Drug Triclabendazole. *Int J Mol Sci.* 14, 21887-21898.
- Gholami-Shabani, M., Akbarzadeh, A., Norouzian, D., Amini, A., Gholami-Shabani, Z., Imani, A., *et al.*, (2014). Antimicrobial Activity and Physical Characterization of Silver Nanoparticles Green Synthesized Using Nitrate Reductase from *Fusarium oxysporum*. *Appl Biochem Biotechnol.* 172, 4084-4098.
- Gole, A., Dash, C., Ramakrishnan, V., Sainkar, S.R., Mandale, A. B., Rao, M., Sastry, M., (2001). Pepsin–Gold Colloid Conjugates: Preparation, Characterization, and Enzymatic Activity. *Langmuir.* 17, 1674-1679.
- Gopinath, V., Mubarakali, D., Priyadarshini, S., Priyadarshini, M., Thajuddin, N., Velusamy, P., (2012). Biosynthesis of silver nanoparticles from *Tribulus terrestris* and its antimicrobial activity: A novel biological approach. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 96, 69-74.
- Gudikandula, K., Vadapally, P., Charya, M.A.S., (2017). Biogenic synthesis of silver nanoparticles from white rot fungi: their characterization and antibacterial studies. *OpenNano.* 2, 64-78.
- Guilger, M., Pasquoto-Stigliani, T., Bilesky-Jose, N., Grillo, R., Abhilash, P.C., Fraceto, L.F., *et al.*, (2017). Biogenic silver nanoparticles based on *Trichoderma harzianum*: synthesis, characterization, toxicity evaluation and biological activity. *Sci Rep.* <https://dx.doi.org/10.1038%2Fsrep44421>.
- Gurunathan, S., Kalishwaralal, K., Vaidyanathan, R., Deepak, V., Pandian, S.R.K., Muniyand, J., *et al.*, (2009). Biosynthesis, purification and characterization of silver nanoparticles using *Escherichia coli*. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 74, 328-35.
- Gupta, R.K., Kumar, V., Gundampati, R.K., Malviya, M., Hasan, S.H., Jagannadham, M.V., *et al.*, (2017). Biosynthesis of silver nanoparticles from the novel strain of Streptomyces Sp. BHUMB-80 with highly efficient electroanalytical detection of hydrogen peroxide and antibacterial activity. *J. Environ. Chem. Eng.* 5, 5624-5635.
- Hamedi, S., Ghaseminezhad, M., Shokrollahzadeh, S., Shojaosadati, S.A., (2017). Controlled biosynthesis of silver nanoparticles using nitrate reductase enzyme induction of filamentous fungus and their antibacterial evaluation. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 45, 1588–1596.
- Hietzschild, S., Walter, A., Davis, C., Taylor, A.A., Sepunaru, L., (2019). Does Nitrate Reductase Play a Role in Silver Nanoparticle Synthesis? Evidence for NADPH as the Sole Reducing Agent. *ACS Sustainable Chem. Eng.* 7, 8070-8076.
- Hu, C.J., Zhang, L., Aryal, S., Cheung, C.; Fang, R.H., Zhang, L., (2011). Erythrocyte membrane-camouflaged polymeric nanoparticles as a biomimetic delivery platform. *PNAS.* 108, 10980-10985.
- Husseiny, S.M., Salah, T.A., Anter, H.A., (2015). Biosynthesis of size controlled silver nanoparticles by *Fusarium oxysporum*, their antibacterial and antitumoral activities. *Beni-Suef*

University Journal of Basic and Applied Sciences.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bjbas.2015.07.004>.

- Ibrahim, H.M.M., Hassan, M.S., (2016). Characterization and antimicrobial properties of cotton fabric loaded with green synthesized silver nanoparticles. *Carbohydr Polym.* 151, 841-850.
- Iravani, S., Korbekandi, H., Mirmohammadi, S.V., Zolfaghari, B., (2014). Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods. *RPS.* 9, 385-406.
- Ishida, K., Cipriano, T.F., Rocha, G.M., Weissmüller, G., Gomes, F., Miranda, K., et al., (2014). Silver nanoparticle production by the fungus *Fusarium oxysporum*: nanoparticle characterisation and analysis of antifungal activity against pathogenic yeasts. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 109, 1-9.
- Kamil, D., Prameeladevi, T., Ganesh, S., Prabakharan, N., Nareshkumar, R., Thomas, S.P., (2017). Green synthesis of silver nanoparticles by entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* and their bioefficacy against mustard aphid (*Lipaphis erysimi* Kalt.). *Indian J Exp Biol.* 55, 555-561.
- Kaviya, S., Santhanalakshmi, J., Viswanathan, B., (2011). Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using *Polyalthia longifolia* Leaf Extract along with D-Sorbitol: Study of Antibacterial Activity. *J Nanotechnol.* 2011, 1-5.
- Khan, N.T., Khan, M.J., Jameel, J., Jameel, N., Rheman, S.U.A., (2017). An Overview: Biological Organisms That Serves as Nanofactories for Metallic Nanoparticles Synthesis and Fungi Being the Most Appropriate. *Bioceram Dev Appl.* 7, 1-4.
- Khandel, P., Shahi, S.K., (2018). Mycogenic nanoparticles and their bio-prospective applications: current status and future challenges. *JNSC.* 8, 369–391.
- Kim, S.H., Lee, H.S., Ryu, D.S., Choi, S.J., Lee, D.S. (2011). Antibacterial Activity of Silver-nanoparticles Against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* 39, 77–85.
- Kim, S.W., Jung, J.H., Lamsal, K., Kim, Y.S., Min, J.S., Lee, Y.S., (2012). Antifungal Effects of Silver Nanoparticles (AgNPs) against Various Plant Pathogenic Fungi. *Mycobiology.* 40, 53–58.
- Korbekandi, H., Ashari, Z., Iravani, S., Abbasi, S., (2013). Optimization of Biological Synthesis of Silver Nanoparticles using *Fusarium oxysporum*. *IJPR.* 12, 289-298.
- Kumar, S.A., Abyaneh, M.K., Gosavi, S.W., Kulkarni, S.K., Pasricha, N., Ahmad, A., et al., (2007). Nitrate reductase-mediated synthesis of silver nanoparticles from AgNO₃. *Biotechnol Lett.* 29, 439-445.
- Lee, S.H., Jun, B.H., (2019). Silver Nanoparticles: Synthesis and Application for Nanomedicine. *Int J Mol Sci.* <https://doi.org/10.3390/ijms20040865>
- Li, W., Xie, X., Shi, Q., Zeng, H., Ou-Yang, Y., Chen, Y., (2010). Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 85, 1115-1122.
- Liang, M., Wei, S., Jian-Xin, L., Xiao-Xi, Z., Zhi, H., Wen, L., et al., (2017). Optimization for extracellular biosynthesis of silver nanoparticles by *Penicillium aculeatum* Su1 and their antimicrobial activity and cytotoxic effect compared with silver ions. *Mater Sci Eng, C.* 77, 963-971.

- Loo, Y.Y., Rukayadil, Y., Nor-Khaizura, M.A.R., Kuan, C.H., Chieng, B.W., Nishibuchi, M., *et al.*, (2018). *In Vitro* Antimicrobial Activity of Green Synthesized Silver Nanoparticles Against Selected Gram-negative Foodborne Pathogens. *Front. Microbiol.* 9, 1-7.
- Lu, Z., Rong, K., Li, J., Yang, H., Chen, R., (2013). Size-dependent antibacterial activities of silver nanoparticles against oral anaerobic pathogenic bacteria. *J Mater Sci: Mater Med.* 24, 1465-1471.
- Mekkawy, A.I., El-Mokhtar, M.A., Nafady, N.A., Yousef, N., Hamad, M.A., El-Shanawany, S.M., *et al.*, (2017). *In vitro* and *in vivo* evaluation of biologically synthesized silver nanoparticles for topical applications: effect of surface coating and loading into hydrogels. *Int J Nanomed.* 12, 759-777.
- Metuku, R.P., Pabba, S., Burra, S., *et al.*, (2014). Biosynthesis of silver nanoparticles from *Schizophyllum radiatum* HE 863742.1: their characterization and antimicrobial activity. *3 Biotech.* 4, 227–234.
- Mishra, S., Singh, H.B., (2015). Biosynthesized silver nanoparticles as a nanoweapon against phytopathogens: exploring their scope and potential in agriculture. *Appl Microbiol Biotechnol.* 99, 1097–1107.
- Moazeni, M., Rashidi, N., Shahverdi, A.R., Noorbakhsh, F., Rezaie, S., (2012). Extracellular Production of Silver Nanoparticles by Using Three Common Species of Dermatophytes: *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* and *Microsporum canis*. *Iran Biomed J.* 16, 52-58.
- Mohanta, Y.K., Nayak, D., Biswas, K., Singdevsachan, S.K., Abd_Allah, E.F., Hashem, A., *et al.*, (2018). Silver Nanoparticles Synthesized Using Wild Mushroom Show Potential Antimicrobial Activities against Food Borne Pathogens. *Molecules.* 23, 1-18.
- Molnár, Z., Bódai, V., Szakacs, G., Erdélyi, B., Fogarassy, Z., Sáfrán, G., *et al.*, (2018). Green synthesis of gold nanoparticles by thermophilic filamentous fungi. *Sci Rep.* <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22112-3>
- Morones, J.R., Elichiguerra, J.L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J.B., Ramírez, J.T., *et al.*, (2005). The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology.* 16, 2346-2353.
- Mout, R., Moyano, D.F., Rana, S., Rotello, V.M., (2012). Surface functionalization of nanoparticles for nanomedicine. *Chem Soc Rev.* 41, 2539–2544.
- Nagajyothi, P.C., Sreekanth, T.V.M., Lee, J., Lee, K.D., (2014). Mycosynthesis: Antibacterial, antioxidant and antiproliferative activities of silver nanoparticles synthesized from *Inonotus obliquus* (Chaga mushroom) extract. *J Photochem Photobiol, B.* 130, 299-304.
- Naqvi, S.Z.H., Kiran, U., Ali, M.I., Jamal, A., Hameed, A., Ahmed, S., *et al.*, (2013). Combined efficacy of biologically synthesized silver nanoparticles and different antibiotics against multidrug-resistant bacteria. *Int J Nanomed.* 8, 3187–3195.
- Nayak, R.R., Pradhan, N., Behera, D., Pradhan, K.M., Mishra, S., Sukla, L.B., *et al.*, (2011). Green synthesis of silver nanoparticle by *Penicillium purpurogenum* NPMF: the process and optimization. *J Nanopart Res.* 13, 3129–3137.
- Nayak, B.K., Nanda, A., Prabhakar, V., (2018). Biogenic synthesis of silver nanoparticle from wasp nest soil fungus, *Penicillium italicum* and its analysis against multi drug resistance pathogens. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology.* 16, 412-418.
- Netala, V.R., Bethu, M.S., Pushpalatah, B., Baki, V.B., Aishwarya, S., Rao, J.V., *et al.*, (2016). Biogenesis of silver nanoparticles using endophytic fungus *Pestalotiopsis microspora*

- and evaluation of their antioxidant and anticancer activities. *Int J Nanomedicine.* 11, 5683-5696.
- Otoni, C.A., Simões, M.F., Fernandes, S., Santos, J.G., Silva, E.S., Souza, R.F.B., *et al.*, (2017). Screening of filamentous fungi for antimicrobial silver nanoparticles synthesis. *AMB Express.* 7, 1-10.
- Owaid, M.N., Raman, J., Lakshmanan, H., Al-Saeedi, S.S.S., Sabaratnam, V., Abed, I.A., (2015). Mycosynthesis of silver nanoparticles by *Pleurotus cornucopiae* var. *citrinopileatus* and its inhibitory effects against *Candida* sp. *Mater Lett.* 153, 186-190.
- Pereira, L., Dias, N., Carvalho, J., Fernandes, S., Santos, C., Lima, N., (2014). Synthesis, characterization and antifungal activity of chemically and fungal-produced silver nanoparticles against *Trichophyton rubrum*. *J Appl Microbiol.* 117, 1601-1613.
- Phanjom, P., Ahmed, G., (2017). Effect of different physicochemical conditions on the synthesis of silver nanoparticles using fungal cell filtrate of *Aspergillus oryzae* (MTCC No. 1846) and their antibacterial effects. *Adv Nat Sci: Nanosci Nanotechnol.* 8, 1-13.
- Prabhu, S., Poulose, E.K., (2012). Silver Nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. *Int Nano Lett.* 2, 1-10.
- Qian, Y., Yu, H., He, D., Yang, H., Wang, W., Wan, X., Wang, L., (2013). Biosynthesis of silver nanoparticles by the endophytic fungus *Epicoccum nigrum* and their activity against pathogenic fungi. *Bioprocess Biosyst Eng.* 36, 1613–1619.
- Qidwai, A., Pandey, A., Kumar, R., Shukla, S.K., Dikshit, A., (2018). Advances in Biogenic Nanoparticles and the Mechanisms of antimicrobial Effects. *Indian J. Pharm. Sci.* 80, 592-603.
- Rai, M., Yadav, A., Gade, A., (2009). Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnol Adv.* 27, 76-83.
- Rai, M., Kon, K., Ingle, A., Duran, N., Galdiero, S., Galdiero, M., (2014). Broad-spectrum bioactivities of silver nanoparticles: the emerging trends and future prospects. *Appl Microbiol Biotechnol.* 98, 1951-1961.
- Rajput, S., Werezuk, R., Lange, R.M., Mcdermott, M.T., (2016). Fungal Isolate Optimized for Biogenesis of Silver Nanoparticles with Enhanced Colloidal Stability. *Langmuir.* 32, 8688-8697.
- Raman, J., Reddy, G.R., Lakshmanan, H., Selvaraj, V., Gajendran, B., Nanjian, R., *et al.*, (2015). Mycosynthesis and characterization of silver nanoparticles from *Pleurotus djamor* var. *roseus* and their *in vitro* cytotoxicity effect on PC3 cells. *Process Biochem.* 50, 140-147.
- Rani, R., Sharma, D., Chaturvedi, M., Yadav, J.P., (2017). Green Synthesis, Characterization and Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles of Endophytic Fungi *Aspergillus terreus*. *J Nanomed Nanotechnol.* 8, 1-8.
- Reidy, B., Haase, A., Luch, A., Dawson, K., (2013). Mechanisms of silver nanoparticle release, transformation and toxicity: a critical review of current knowledge and recommendations for future studies and applications. *Materials.* 6, 2295-2350.
- Rheder, D.T., Guilger, M., Bilesky-José, N., Germano-Costa, T., Pasquoto-Stigliani, T., Gallep, T.B.B., *et al.*, (2018). Synthesis of biogenic silver nanoparticles using *Althaea officinalis* as reducing agent: evaluation of toxicity and ecotoxicity

- Rodrigues, A.G., Ping, L.Y., Marcato, P.D., Alves, O.L., Silva, M.C.P., Ruiz, R.C., *et al.*, (2013). Biogenic antimicrobial silver nanoparticles produced by fungi. *Appl Microbiol Biotechnol.* 97, 1-8.
- Rose, G.K., Soni, R., Rishi, P., Soni, S.K., (2019). Optimization of the biological synthesis of silver nanoparticles using *Penicillium oxalicum* GRS-1 and their antimicrobial effects against common food-borne pathogens. *Green Process Synth.* 8, 144-156.
- Sabri, M.A., Umer, A., Awan, G.H., Hassan, M.F., Hasnain, A., (2016). Selection of Suitable Biological Method for the Synthesis of Silver Nanoparticles. *Nanomater Nanotechnol.* 6, 1-20.
- Saxena, J., Sharma, P.K., Sharma, M.M., Singh, A., (2016). Process optimization for green synthesis of silver nanoparticles by *Sclerotinia sclerotiorum* MTCC 8785 and evaluation of its antibacterial properties. *SpringerPlus.* 5, 1-10.
- Shahzad, A., Saeed, H., Iqtedar, M., Hussain, S.Z., Kaleem, A., Abdullah, R., (2019). Size-Controlled Production of Silver Nanoparticles by *Aspergillus fumigatus* BTCB10: Likely Antibacterial and Cytotoxic Effects. *Journal of Nanomaterials.* 2019, 1-14.
- Sharma, D., Kanchi, S., Bisetty, K., (2015). Biogenic synthesis of nanoparticles: A review. *Arabian J Chem.* <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2015.11.002>.
- Shrivastava, S., Bera, T., Roy, A., Singh, G., Ramachandrara, P., Dash, D., (2007). Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. *Nanotechnology.* 18, 1-9.
- Singh, D., Rathod, V., Ninganagouda, S., Hiremath, J., Singh, A.K., Mathew, J., (2014). Optimization and Characterization of Silver Nanoparticle by Endophytic Fungi *Penicillium* sp. Isolated from *Curcuma longa* (Turmeric) and Application Studies against MDR *E. coli* and *S. aureus*. *Bioinorg Chem Appl.* 2014, 1-8.
- Singh, R., Shedbalkar, U.U., Wadhwani, S.A., Chopade, B.A., (2015) Bacteriagenic silver nanoparticles: synthesis, mechanism, and applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 99, 4579-4593.
- Singh, T., Jyoti, K., Patnaik, A., Singh, A., Chauhan, R., Chandel, S.S., (2017). Biosynthesis, characterization and antibacterial activity of silver nanoparticles using an endophytic fungal supernatant of *Raphanus sativus*. *J Genet Eng Biotechnol.* 15, 31-39.
- Sintubin, L., Windt, W.D., Dick, J., Mast, J., Ha, D.V.D., Verstraete, W., *et al.*, (2009). Lactic acid bacteria as reducing and capping agent for the fast and efficient production of silver nanoparticles. *Appl Microbiol Biotechnol.* 84, 741-749.
- Sriram, M.I., Kanth, S.B.M., Kalishwaralal, K., Gurunathan, S., (2010). Antitumor activity of silver nanoparticles in Dalton's lymphoma ascites tumor model. *Int J Nanomed.* 5, 753-762.
- Sundaravadivelan, C., Padmanabhan, M.N., (2014). Effect of mycosynthesized silver nanoparticles from filtrate of *Trichoderma harzianum* against larvae and pupa of dengue vector *Aedes aegypti* L. *Environ Sci Pollut Res.* 21, 4624-4633.
- Thakkar, K.N., Mhatre, S.S., Parikh, R.Y., (2010). Biological synthesis of metallic nanoparticles. *Nanomedicine.* 6, 257-262.
- Vahabi, K., Mansoori, G.A., Karimi, S., (2011). Biosynthesis of Silver Nanoparticles by Fungus *Trichoderma reesei*. *Insci J.* 1, 65-79.

- Velusamy, P., Kumar, G.V., Jeyanthi, V., Das, J., Pachaiappan, R., (2016). Bio-Inspired Green Nanoparticles: Synthesis, Mechanism, and Antibacterial Application. *Toxicol Res.* 32, 95-102.
- Xue, B., He, D., Gao, S., Wang, D., Yokoyama, K., Wang, L., (2016). Biosynthesis of silver nanoparticles by the fungus *Arthroderma fulvum* and its antifungal activity against genera of *Candida*, *Aspergillus* and *Fusarium*. *Int J Nanomed.* 11, 1899-1906.
- Yahyaei, B., Pourali, P., (2019). One step conjugation of some chemotherapeutic drugs to the biologically produced gold nanoparticles and assessment of their anticancer effects. *Sci Rep.* <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46602-0>
- Zhang, X.F., Liu, Z.G., Shen, W., Gurunathan, S., (2016). Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. *Int J Mol Sci.* 17, 1-34.
- Zielonka, A., Klimek-Ochab, M., (2017). Fungal synthesis of size-defined nanoparticles. *Adv. Nat. Sci.: Nanosci. Nanotechnol.* 8, 1-9.
- Zomorodian, K., Pourshahid, S., Sadatsharifi, A., Mehryar, P., Pakshir, K., Rahimi, M.J., et al., (2016). Biosynthesis and Characterization of Silver Nanoparticles by *Aspergillus* Species. *BioMed Research International.* <http://dx.doi.org/10.1155/2016/5435397>.

3.2 CAPÍTULO II – BIOSSÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA EMPREGANDO *Trichoderma harzianum* COM ESTIMULAÇÃO ENZIMÁTICA PARA O CONTROLE DE *Sclerotinia sclerotiorum*

O segundo capítulo apresenta um artigo que descreve a síntese de duas diferentes nanopartículas de prata utilizando o filtrado do fungo agente de controle biológico *Trichoderma harzianum*. Uma das nanopartículas foi sintetizada a partir do filtrado do fungo cultivado na presença da parede celular do fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum* e a outra na ausência dessa fonte de carboidratos. A suplementação do meio de cultura foi realizada visando induzir a atividade de algumas enzimas hidrolíticas de *Trichoderma harzianum*, obtendo-se um filtrado com características diferenciadas para a síntese das nanopartículas. As nanopartículas foram avaliadas quanto ao potencial para o controle do crescimento micelial e do desenvolvimento de escleródios de *S. sclerotiorum* *in vitro*, visando aplicações agrícolas. Também foram realizadas análises de caracterização físico-química, ensaios para determinação da atividade das enzimas β-1,3-glucanase, N-acetylglucosaminidase (NAGase), quitinase e protease ácida, e ensaios para a avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade das nanopartículas.

GUILGER-CASAGRANDE, M.; GERMANO-COSTA, T.; BILESKY-JOSE, N.; PASQUOTO-STIGLIANI, T.; FRACETO, L. F.; LIMA, R. Biosynthesis of silver nanoparticles employing *Trichoderma harzianum* with enzymatic stimulation for the control of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Scientific Reports*, v. 9, p. 1-9, 2019.

Biosynthesis of silver nanoparticles employing *Trichoderma harzianum* with enzymatic stimulation for the control of *Sclerotinia sclerotiorum*

Mariana Guilger-Casagrande¹, Tais Germano-Costa¹, Tatiane Pasquoto-Stigliani¹, Leonardo Fernande Fraceto², Renata de Lima^{1*}

¹Laboratory for Evaluation of the Bioactivity and Toxicology of Nanomaterials, University of Sorocaba (UNISO), Sorocaba, São Paulo, Brazil

²Laboratory of Environmental Nanotechnology, State University of São Paulo (UNESP), Sorocaba, São Paulo, Brazil

Abstract

Biogenic synthesis of silver nanoparticles employing fungi offers advantages, including the formation of a capping from fungal biomolecules, which provides stability and can contribute to biological activity. In this work, silver nanoparticles were synthesized using *Trichoderma harzianum* cultivated with (AgNP-TS) and without enzymatic stimulation (AgNP-T) by the cell wall of *Sclerotinia sclerotiorum*. The nanoparticles were evaluated for the control of *S. sclerotiorum*. The specific activity of the *T. harzianum* hydrolytic enzymes were determined in the filtrates and nanoparticles. Cytotoxicity and genotoxicity were also evaluated. Both the nanoparticles exhibited inhibitory activity towards *S. sclerotiorum*, with no new sclerotia development, however AgNP-TS was more effective against mycelial growth. Both the filtrates and the nanoparticles showed specific enzymatic activity. Low levels of cytotoxicity and genotoxicity were observed. This study opens perspectives for further exploration of fungal biogenic nanoparticles, indicating their use for the control of *S. sclerotiorum* and other agricultural pests.

Keywords: Directed green synthesis. *Trichoderma harzianum*. Metallic nanoparticles. Cytotoxicity. Genotoxicity. *In vitro* assays. Biological activity. White mold.

INTRODUCTION

The biogenic synthesis of silver nanoparticles is an attractive nanotechnological alternative to other chemical and physical methods, offering simplicity, relatively low cost, lower generation of toxic waste, lower energy consumption, and higher yields. Bacteria, yeasts, fungi, plant extracts, and algae can be used in this type of synthesis, acting as reducing agents and stabilizers.¹ The ability of such organisms to alter the chemical nature of metals is due to their development of mechanisms of defense against toxic agents, with the products being nanoparticles with lower toxicity.² The process of extracellular biogenic synthesis is probably

mediated by the nitrate reductase enzyme, which acts in the reduction of metals, leading to the formation of nanoparticles.³

Fungi have been extensively used in the synthesis of metallic nanoparticles due to their ease of handling and cultivation, high biomass production, and the secretion of large quantities of metabolites, enzymes, and extracellular proteins. These biomolecules not only act in the reduction process of the metal precursor, but also form a capping on the nanoparticles, hence providing better control of size and stability.⁴⁻⁶ The biogenic synthesis of silver nanoparticles can be achieved using a wide range of filamentous fungi and yeasts, including *Fusarium oxysporum*⁷, *Aspergillus* sp.⁸, *Trichoderma harzianum*^{9,10}, *Trichoderma asperellum*¹¹, *Beauveria bassiana*^{12,13}, *Penicillium* sp.¹⁴, and *Candida albicans*.¹⁵ Depending on the species of fungus used in the synthesis (due to the different extracellular enzyme profiles), the nanoparticles produced can have different physicochemical characteristics and biological activities¹⁶, making them promising materials for use in the areas of health, agriculture, and the environment.

In addition to the different characteristics of nanoparticles according to the fungal species used, differences can also occur using the same species under different culture conditions. Variations of culture medium composition, pH, temperature, growth time, and agitation can alter the metabolism of the microorganisms, consequently influencing the physicochemical characteristics of the nanoparticles and the composition of the capping, which can either enhance the synthesis or make it unviable.^{17,18}

Trichoderma harzianum is a mycoparasitic filamentous fungus used as a biological control agent against phytopathogens that affect the production of several agriculturally important plant species. Its main mechanism of action is by the growth of hyphae and the release of hydrolytic enzymes that degrade the cell wall of the target fungus. These enzymes include chitinases, N-acetyl-β-D-glucosaminidases, and proteases, which are fundamental in the mycoparasitism process.¹⁹⁻²¹ The secretion of these enzymes is enhanced in the presence of phytopathogenic fungi, so it is possible to induce enzyme production by mimicking mycoparasitism, cultivating *Trichoderma* spp. in culture media supplemented with cell wall material from the phytopathogen.^{22,23} Due to the favorable characteristics of *T. harzianum* for the control of phytopathogens, together with its easy handling, this fungus has been extensively explored in the fields of biotechnology and nanotechnology, opening avenues for the development of new products and applications.²⁴ Fungi of the genus *Trichoderma* spp. present the NADH co-enzyme and NADH-dependent enzymes such as nitrate reductase, which is

important in the synthesis of both the nanoparticles and the cappings that confer greater stability.^{25,3}

In previous work, silver nanoparticles synthesized using the filtrate of *T. harzianum* presented inhibitory activity against the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*, which causes white mold disease.¹⁰ In the present work, two types of silver nanoparticles were synthesized, considering that the characteristics of biogenic nanoparticles can differ according to the composition of the culture medium in which the reducing and stabilization agent is cultivated. The first type was obtained using the filtrate of *T. harzianum* with enzyme production stimulated by the cell wall of *S. sclerotiorum*, while the other type was obtained using the filtrate from *T. harzianum* grown in the absence of the cell wall.

S. sclerotiorum affects the production of crops including soybean, tomato, lettuce, beans, and sunflower, among others, causing agriculture economical losses in several countries around the world, including all the continents.^{26,27} Resistant structures (sclerotia) can remain viable in the soil for decades and can be widely distributed, leading to plant diseases that cause annual economic losses of around 1.47 billion dollars in Brazil.²⁸ In the United States, the disease caused losses of about 2.8 million tons of soybean between 2010 and 2014, the equivalent to 1.2 billion dollars, with a devastating epidemic in 2009.^{29,30} Yield losses in different crops are also observed in Canada, India and several European countries.²⁷ Considering the severity of the impacts of *S. sclerotiorum*, evaluation was made of the *in vitro* activities of the AgNP-TS and AgNP-T nanoparticles against this phytopathogen, as well as their possible effects on *T. harzianum*. Determinations were also made of the physicochemical characteristics of the formulations, the specific activities of the *T. harzianum* hydrolytic enzymes, and possible toxic effects of the nanoparticles.

MATERIALS AND METHODS

Biogenic synthesis of the nanoparticles using *Trichoderma harzianum*

The cultivation of *T. harzianum* was performed using commercial Ecotrich® wettable powder (1×10^{10} CFU/g, Ballagro) in potato-dextrose agar medium, in the absence of light, at ambient temperature. Disks of the mycelium were transferred to potato-dextrose broth and potato-dextrose broth supplemented with 0.5% cell wall of the *S. sclerotiorum* phytopathogen as a source of carbon and nitrogen.^{21,23} The cultures were kept under agitation at 150 rpm for 12 days, after which the biomasses were weighed, transferred to ultrapure water, and kept under the conditions described above for 72 h. The samples were then vacuum-filtered and AgNO_3

was added to a final concentration of 1 mM.¹⁰ Two different types of nanoparticle were obtained, with one synthesized using the filtrate from *T. harzianum* stimulated with *S. sclerotiorum* (AgNP-TS) and the other synthesized using the filtrate from *T. harzianum* without stimulation (AgNP-T). Employing this methodology it is possible to obtain dispersions of 2,000 mL of nanoparticles.

Physicochemical characterization of the nanoparticles

After the synthesis, the nanoparticles and the corresponding *T. harzianum* filtrates were analyzed by UV-Visible spectroscopy in the wavelength range between 200 and 800 nm, with resolution of 1 nm, using a Shimadzu Multispec 1501 spectrophotometer. The pH values of the nanoparticles and the filtrates were measured using a pH meter (HMMPB-210).

The hydrodynamic diameters and polydispersities of the nanoparticles were measured by dynamic light scattering (DLS) and the zeta potentials were determined by microelectrophoresis, using a ZS90 particle analyzer (Malvern Instruments). The analyses were performed in triplicate, at 25 °C, with a fixed angle of 90°. The sizes and concentrations (NPs.mL⁻¹) of the nanoparticles were also determined by nanoparticle tracking analysis (NTA), using a NanoSight LM10 cell (Malvern Analytical) coupled to a camera and controlled with NanoSight v. 2.3 software. The nanoparticles were diluted 50-fold in ultrapure water and 5 measurements were performed for each sample.

Hydrolytic enzyme specific activity assays

The specific activities of the *T. harzianum* hydrolytic enzymes β-1,3-glucanase, N-acetylglucosaminidase (NAGase), chitinase, and acid protease were determined using microplate assays in which the enzyme sources were the *T. harzianum* filtrates obtained with and without stimulation, as well as the corresponding nanoparticles (AgNP-TS and AgNP-T). The protein concentrations were first determined using the method of Bradford³¹, with bovine serum albumin (0.125, 0.250, 0.500, and 1.000 mg.mL⁻¹) as standard. The assays of the four enzymes employed the methodology described by Qualhato *et al.*²¹

Biological activities of the nanoparticles towards *Sclerotinia sclerotiorum* and effects on *Trichoderma harzianum*

For evaluation of the ability of the nanoparticles to control the mycelial growth and sclerotia development of *S. sclerotiorum*, Petri dishes were prepared with potato-dextrose agar

culture medium containing AgNP-TS and AgNP-T at final concentration of 3×10^9 NPs.mL⁻¹, in triplicate. Controls were prepared using potato-dextrose agar alone and inoculated with *T. harzianum* (127 µg.mL⁻¹). After solidification of the agar, a viable sclerotium was placed in the center of each plate, followed by keeping at room temperature for 15 days, with a photoperiod of 12 h. At the end of the period, the mycelium growth halo was measured and the number of new sclerotia was counted.

Evaluation was also made of possible effects of the nanoparticles on *T. harzianum*, given the importance of ensuring the viability of this biological control agent for both the control of phytopathogens and the induction of plant growth and development. For this, plates were prepared with culture media containing the nanoparticles, as described above, which were inoculated with *T. harzianum* at 127 µg.mL⁻¹, in duplicate. The cultures were kept at ambient temperature for 15 days, in the dark, followed by growth analysis.

Viability/cytotoxicity and genotoxicity assays using the nanoparticles

The cytotoxic effects of the nanoparticles were evaluated using the V79 (chinese hamster lung fibroblast), 3T3 (albino Swiss mouse embryo fibroblast), and HaCat (human keratinocyte) cell lines. The techniques employed were the tetrazolium reduction assay (MTT test for mitochondrial activity), image cytometry (cell viability, apoptosis, and necrosis), and the trypan blue exclusion test (cell viability). For the MTT assay, the cells were previously cultured in Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), plated in 96-well plates (5×10^4 cells per well), and exposed for 24 h to the nanoparticles at concentrations from 0.1×10^9 to 3.5×10^9 NPs.mL⁻¹. The wells were than washed with phosphate buffer saline (PBS), MTT solution (5 mg.mL⁻¹) was added, and the plates were left for 3 h. Finally, the samples were fixed with dimethylsulphoxide (DMSO) and were read using a microplate reader at 540 nm. Image cytometry analyses of cell viability, apoptosis, and necrosis were performed using an apoptosis kit with Annexin V Alexa Fluor® 488 and propidium iodide (Invitrogen). The cells were exposed for 1 h to the nanoparticles at a concentration of 3×10^9 NPs.mL⁻¹ and were then prepared as specified by the manufacturer. The readings were obtained using a Tali® image cytometer (Invitrogen). For the trypan blue exclusion assay, the cells were exposed for 1 h to the nanoparticles at 3×10^9 NPs.mL⁻¹, followed by staining with trypan blue and counting the cells using an optical microscope, considering cells stained blue to be dead. The positive controls were cells exposed to 0.5 M hydrogen peroxide, while the negative controls were cells kept in culture medium without any exposure.

The genotoxic potentials of the nanoparticles were determined using the *Allium cepa* assay, as described by Lima *et al.*³² The roots were exposed for 24 h to AgNP-TS and AgNP-T at concentrations of 1×10^{10} and 3×10^9 NPs.mL⁻¹, followed by fixing in ethanol:acetic acid (3:1). For preparation of the slides (in triplicate), the roots were hydrolyzed in 1 M HCl, at 60 °C, and stained with Schiff's reagent. The meristematic regions were cut, stained with acetic carmine, and crushed under cover slips. The cells were observed under an optical microscope, with counting of the cells in division and those that presented chromosomal alterations, hence obtaining the mitotic index (MI) and chromosomal alteration index (AI) values.

The comet assays to evaluate the effects of AgNP-TS and AgNP-T were performed using an adaptation of the methodology described by Singh *et al.*³³ The previously cultured cells were exposed for 1 h to the nanoparticles at concentrations of 3×10^9 NP.mL⁻¹, followed by mixing with agarose, application to pre-gelatinized slides, and keeping for 1 h in lysis solution. Following neutralization, the slides were kept for 20 min in electrophoresis buffer and were subsequently submitted to electrophoresis for 20 min at 22 V and 300 mA. The slides were then fixed, stained with silver, and visual scoring was performed under an optical microscope.

Statistical analyses

Statistical treatment of the data employed one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test, with a significance level of $p < 0.05$. These analyses were performed with GraphPad Prism 7.0 software.

RESULTS AND DISCUSSION

Physicochemical characterization of the nanoparticles

Silver nanoparticles were successfully synthesized using the filtrates from *T. harzianum* cultivated in the presence and absence of the cell wall of *S. sclerotiorum*, which resulted in the nanoparticles AgNP-TS and AgNP-T. The filtrates showed color change from light yellow to reddish-brown 72 h after addition of AgNO₃, due to the surface plasmon resonance of the silver.³⁴ The synthesis was confirmed by UV-Visible spectroscopy, with peaks obtained at 409 and 413 nm for AgNP-TS and AgNP-T, respectively (Fig. 1a), indicating the presence of elemental silver.^{35,36} Analysis of the filtrates used in the synthesis revealed peaks at 221 and 215 nm for the samples obtained with and without stimulation by the cell wall of *S. sclerotiorum*, respectively. These absorbance peaks observed for the filtrates were also present

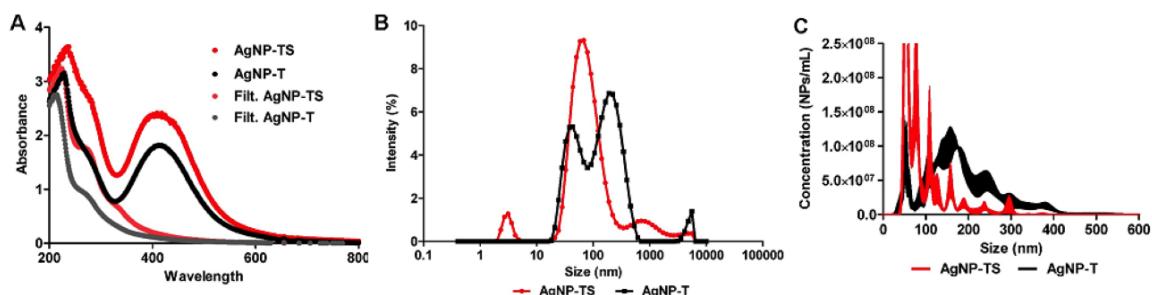
in the spectra for the nanoparticles, reflecting the presence of filtrate proteins in their compositions. In previous studies, Phanjom and Ahmed³⁷ reported peaks at 210 and 260 nm for filtrate of the fungus *Aspergillus oryzae* used for the synthesis of silver nanoparticles, which were attributed to amides and amino acid residues, respectively. Durán *et al.*³⁸ used *Fusarium oxysporum* to synthesize silver nanoparticles, with peaks at 265 nm attributed to aromatic amino acids of proteins released into the filtrate, which contributed to silver nitrate reduction and stabilization of the nanoparticles. Ballotin *et al.*³⁹ found two main UV-Vis bands for silver nanoparticles synthesized using *Aspergillus tubingensis*, with one at 440 nm, confirming formation of the silver nanoparticles, and another at 280 nm, attributed to aromatic amino acids such as tryptophan, tyrosine, and phenylalanine residues, which composed the protein capping of the nanoparticles. Phanjom and Ahmed³⁷ observed a band at 260 nm for silver nanoparticles synthesized using *Aspergillus oryzae*, which was attributed to the same amino acid residues. The presence of peaks corresponding to proteins and amino acid residues in both the filtrates and the capped nanoparticles confirmed the release of these compounds from the fungal biomass dispersed in water, indicating that they were involved in the process of reduction of the metal ions, leading to the formation and stabilization of the nanoparticles.

The hydrodynamic diameters, polydispersity indices, and zeta potentials of the nanoparticles were determined by the DLS and microelectrophoresis techniques. The AgNP-TS and AgNP-T nanoparticles presented mean hydrodynamic diameters of 57.02 ± 1.75 and 81.84 ± 0.67 nm, respectively (Fig. 1b). The polydispersity and zeta potential values were 0.49 ± 0.01 and -18.70 ± 3.01 mV for AgNP-TS and 0.52 ± 0.00 and -18.30 ± 1.73 mV for AgNP-T, respectively. The difference in size between the nanoparticles synthesized using the filtrates of *T. harzianum* with and without stimulation by the *S. sclerotiorum* cell wall could have been due to the different culture medium compositions. Various factors have been reported to influence nanoparticle physicochemical characteristics, including the composition of the medium in which the reducing agent is cultivated.⁴⁰

The NTA technique was also used to determine the sizes and concentrations of the nanoparticles (Fig. 1c), resulting in different concentrations for AgNP-TS and AgNP-T, with particle sizes of 88.0 ± 7.3 and 182.5 ± 6.9 nm, respectively. After characterization, the stock concentration of the nanoparticles was standardized at 1×10^{10} NPs.mL⁻¹, in order to facilitate the activity and toxicity evaluations. Durán *et al.*³⁸ reported the presence of a capping around biogenic nanoparticles synthesized using the fungus *Fusarium oxysporum*, which avoided aggregation. In agreement with the previous report, the nanoparticles synthesized in the present work by the biogenic method presented a capping of proteins and other biomolecules derived

from the organism used as the reducing agent (*T. harzianum*). This capping provided stability to the nanoparticles, so that they maintained their original size and did not aggregate.³⁵

Fig. 1. Physicochemical characterization of the AgNP-TS and AgNP-T nanoparticles. A: UV-Vis spectra of the nanoparticles and the corresponding filtrates, B: Hydrodynamic diameters obtained by the DLS technique, C: Nanoparticle sizes and concentrations obtained by the NTA method.

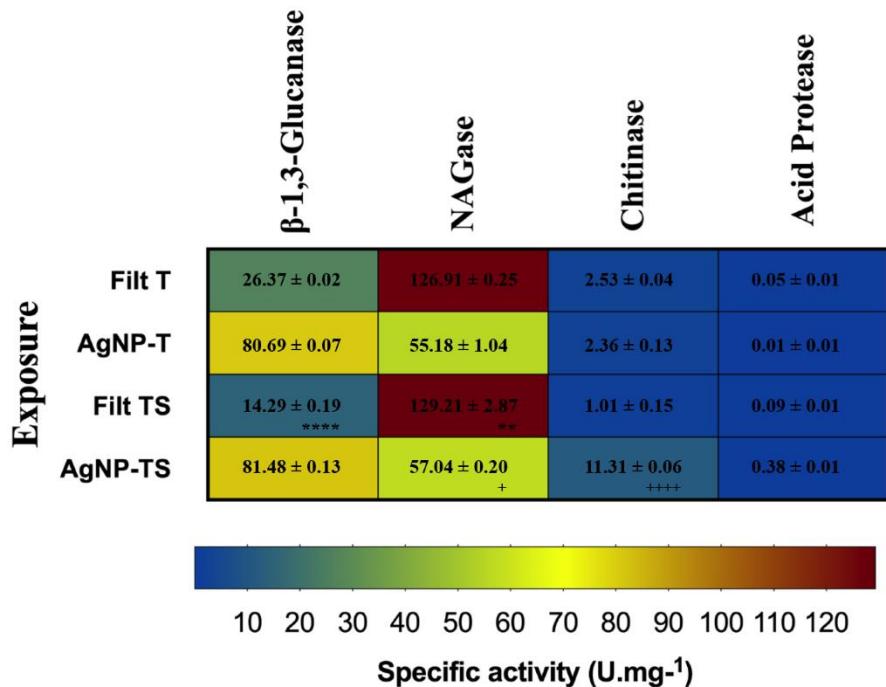


The pH of the medium in which the synthesis occurs (in this case, the filtrates) can affect the size and morphology of the nanoparticles. A higher pH leads to smaller nanoparticles with spherical morphology, while a lower pH results in larger nanoparticles in the forms of rods and prisms.⁴¹ In the present case, both filtrates presented pH of 7.2, while no significant changes were observed after the synthesis, with near-neutral values of 7.2 and 7.3 for AgNP-TS and AgNP-T, respectively. It has been reported that for non-biogenic nanoparticles, the pH and size of newly synthesized nanoparticles influence their reactivity, with lower values of these parameters indicating greater possibility of dissolution and ionization, which could lead to increased toxic effects.⁴²

Determination of hydrolytic enzyme specific activity

The assays used to determine the specific activities of the *T. harzianum* hydrolytic enzymes β -1,3-glucanase, NAGase, chitinase, and acid protease detected the activities of these enzymes in both the filtrates, as well as in the AgNP-TS and AgNP-T nanoparticles (Fig. 2). It was not possible to compare the activity levels of the filtrates and the corresponding nanoparticles, due to the concentration changes in the synthesis processes. However, it could be seen that the highest specific activity was obtained for NAGase, followed by β -1,3-glucanase for both the filtrates and the nanoparticles. The specific activity of chitinase and acid protease were also observed with lower values, especially for acid protease.

Fig. 2. Specific activities (U/mg) of the hydrolytic enzymes of *Trichoderma harzianum* present in the nanoparticles and the corresponding filtrates. Statistically significant difference ($p<0.05$) is indicated by * for comparison of Filt T (filtrate without stimulation) and Filt TS (filtrate with stimulation) and + for comparison of AgNP-T and AgNP-TS. More symbols indicate a higher statistical significance.



Small differences were observed between the enzymatic activities for the filtrates obtained with and without stimulation by the cell wall of *S. sclerotiorum*, and between the activities for different nanoparticles. Higher specific activity of the NAGase and chitinase was observed for AgNP-TS in comparison with AgNP-T. Regarding to the filtrates, the exposure of *T. harzianum* to the cell wall of *S. sclerotiorum* stimulated the specific activity of the enzyme NAGase.

The effectivity of the biogenic nanoparticles for the control of *S. sclerotiorum* can be attributed to the specific activity of the hydrolytic enzymes present in the capping of the nanoparticles. In a previous study, Guilger *et al.*¹⁰ evaluated the effects of commercial AgNPs, non-biogenic and uncapped, and these nanoparticles were not able to control fungal development.

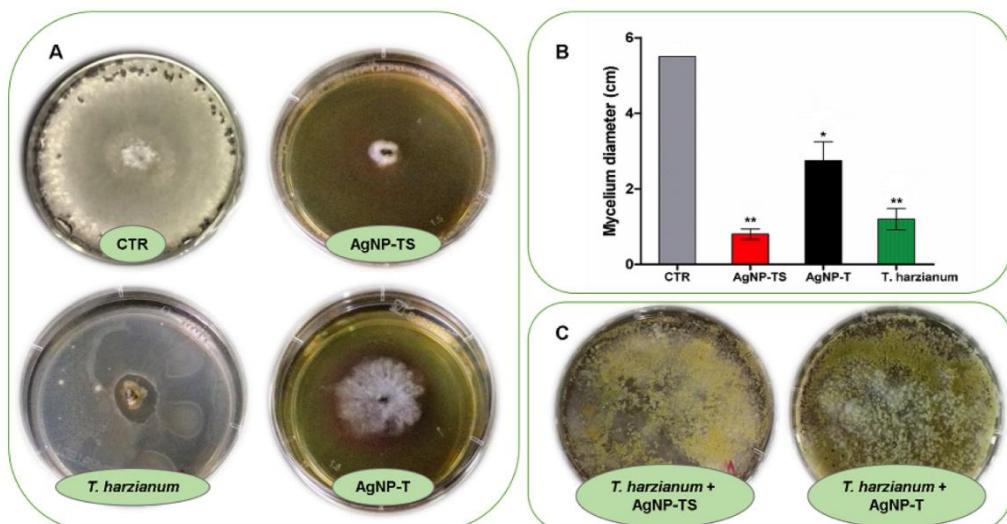
Geraldine *et al.*²³ evaluated the specific activity of the hydrolytic enzymes NAGase, acid phosphatase, β-glucosidase, lipase, β-1,3-glucanase and proteases in the filtrates of different *Trichoderma* species and strains after exposure to *S. sclerotiorum* cell wall. All the species and strains showed enzymatic activity in different proportions and in a varied way, with the highest activities for NAGase, acid phosphatase, and protease.

Qualhato *et al.*²¹ also reported the production and secretion of β -1,3-glucanase, NAGAse, chitinase, acid phosphatase, acid proteases and alginate lyase in the filtrates of *Trichoderma* spp grown in the presence of the cell wall of the pathogenic fungi *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani* and *S. sclerotiorum*. To our knowledge, no prior studies have examined the specific activity of fungal hydrolytic enzymes in samples of biogenic silver nanoparticles.

Biological activity of the nanoparticles against *Sclerotinia sclerotiorum* and effects on *Trichoderma harzianum*

The biological activity results showed that the AgNP-TS and AgNP-T nanoparticles presented potential for the control of *S. sclerotiorum*, since mycelial growth was reduced and there was no formation of new sclerotia. Treatment using *T. harzianum* also resulted in inhibition of *S. sclerotiorum*. As shown in Fig. 3a, many new sclerotia were formed from the precursor sclerotium at the edges of the control plate (CTR), with a mean of 116.5 ± 7.7 sclerotia, while the AgNP-TS and AgNP-T plates showed no new sclerotia and reduced mycelial growth. The greatest mycelial inhibition was provided by AgNP-TS, for which the nanoparticle capping was derived from the filtrate obtained using stimulation to enhance the production of *T. harzianum* hydrolytic enzymes (Fig. 3b), indicating the greater potential of this type of nanoparticle.

Figure 3. Biological activities of the AgNP-TS and AgNP-T nanoparticles (3×10^9 NPs.mL⁻¹) towards *S. sclerotiorum* and *T. harzianum*. A: Control of mycelium growth and sclerotia, B: Mycelium diameter, C: Effect on *T. harzianum*. Statistically significant difference ($p < 0.05$) is indicated by * for comparison of the exposures to the control (CTR), with ** indicating a higher statistical significance.



The superior control of mycelial growth achieved using AgNP-TS could have been related to the smaller nanoparticle size, given that previous work has found that a smaller nanoparticle size is associated with higher activity.⁴³ An additional consideration is that these nanoparticles were synthesized using filtrate from a culture in which there had been stimulation of the production of hydrolytic enzymes that could act in degradation of the cell walls of the phytopathogen. The better control of mycelial growth by AgNP-TS can be attributed to the higher activity of the enzymes NAGase and chitinase from these nanoparticles.

The inhibition of microorganisms by silver nanoparticles is due to the strong surface oxidative activity of the particles and the release of ions.⁴⁴ However, in the case of biogenic nanoparticles, there may also be a contribution of the stabilizing capping derived from the reducing organism, which deserves further investigation.

Previous studies have investigated the use of silver nanoparticles for controlling agricultural phytopathogens including *S. sclerotiorum*, with effective inhibitory activity observed *in vitro*.⁴⁵⁻⁴⁸ However, the mechanism of action of nanoparticles is not yet understood.⁴⁹ Krishnaraj *et al.*⁴⁶ tested different concentrations of silver nanoparticles against the phytopathogenic fungi *Alternaria alternata*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, and *Curvularia lunata*, with inhibitory effects observed against all these species. Despite such promising results, there have been no previous studies concerning the biogenic synthesis of nanoparticles with stimulation of the metabolism of the biological agent employed for the reduction and stabilization. This is important, since enzyme production by fungi is directly influenced by the conditions under which the organisms are cultivated.⁵⁰

The nanoparticles caused no alteration of *T. harzianum* growth (Fig. 3c), which was an important finding, considering the widespread use of this fungus as a biological control agent, indicating the possibility of its use in combination with the nanoparticles.

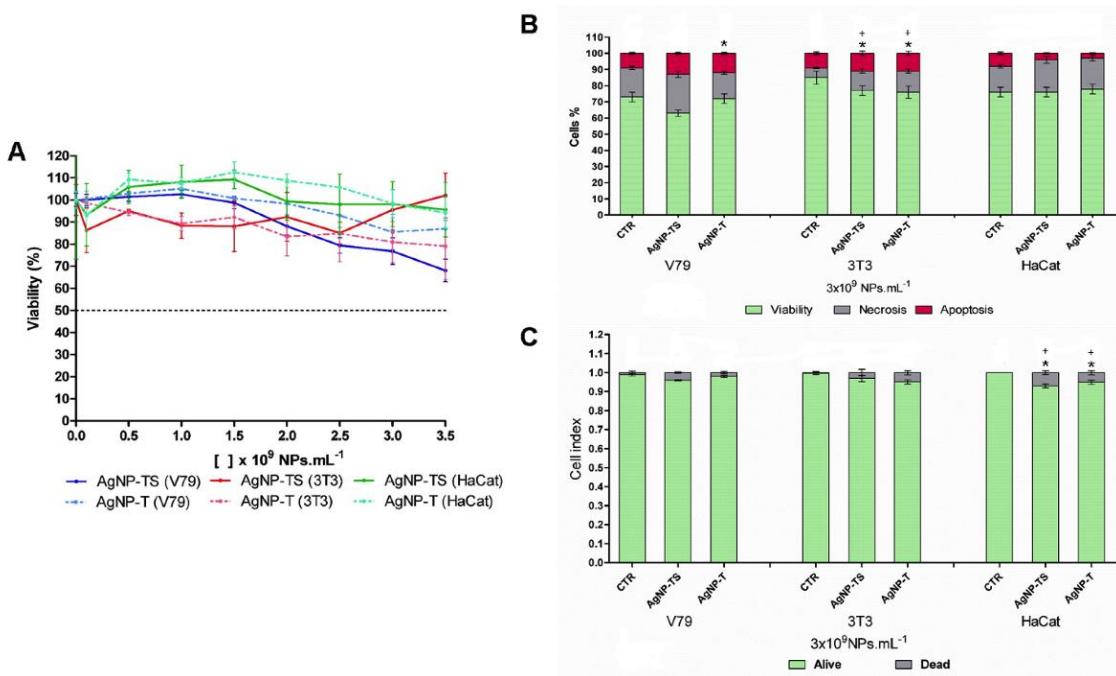
The use of nanotechnological products for the control of pests in agriculture is considered to be safer than employing traditional agrochemicals, since it helps to avoid excessive accumulation in the environment of chemicals that can cause residual toxicity.⁴⁹ An additional consideration is that the use of chemical fungicides can lead to the development of resistance by phytopathogens.^{52, 53} Nonetheless, it is possible that the release of new nanomaterials into the environment could become a problem for humans and other organisms.⁵⁴ For this reason, it is vital that their potential toxicities towards biological systems should be thoroughly investigated, in order to ensure the safe development of effective new

nanomaterials.⁵⁵ The nanometric size of nanoparticles enables their internalization within the cells of living organisms, which might lead to serious consequences.⁵⁶

Viability/cytotoxicity and genotoxicity evaluation of the nanoparticles

Evaluation of the cytotoxic effects of the nanoparticles using the MTT test, which indicates the mitochondrial activity of the cells, revealed differences in the viability percentages for the different cell lines. However, despite presenting different sensitivities, no IC₅₀ values were observed for any of the samples, indicating low cytotoxicity of the nanoparticles in the range of exposure concentrations employed (Fig. 4a), including the concentration of interest for the control of *S. sclerotiorum* (3×10^9 NPs.mL⁻¹). These results were consistent with the direct analyses of cytotoxicity using the image cytometry (Fig. 4b) and trypan blue (Fig. 4c) methods, although it is important to take the different exposure periods into consideration (24 h for the MTT test and 1 h for the image cytometry and trypan blue methods). In the image cytometry tests, the two types of nanoparticle caused similar levels of apoptosis and necrosis, with the HaCat cell line presenting viability equivalent to that of the control. The results of the trypan blue exclusion assays indicated that exposure to both types of nanoparticle led to significant decreases of the viabilities of the 3T3 and HaCat cells, while the V79 cells only showed decreased viability when exposed to AgNP-TS. In comparison of the two types of nanoparticle, AgNP-TS caused the lowest viabilities of the V79 and HaCat cells.

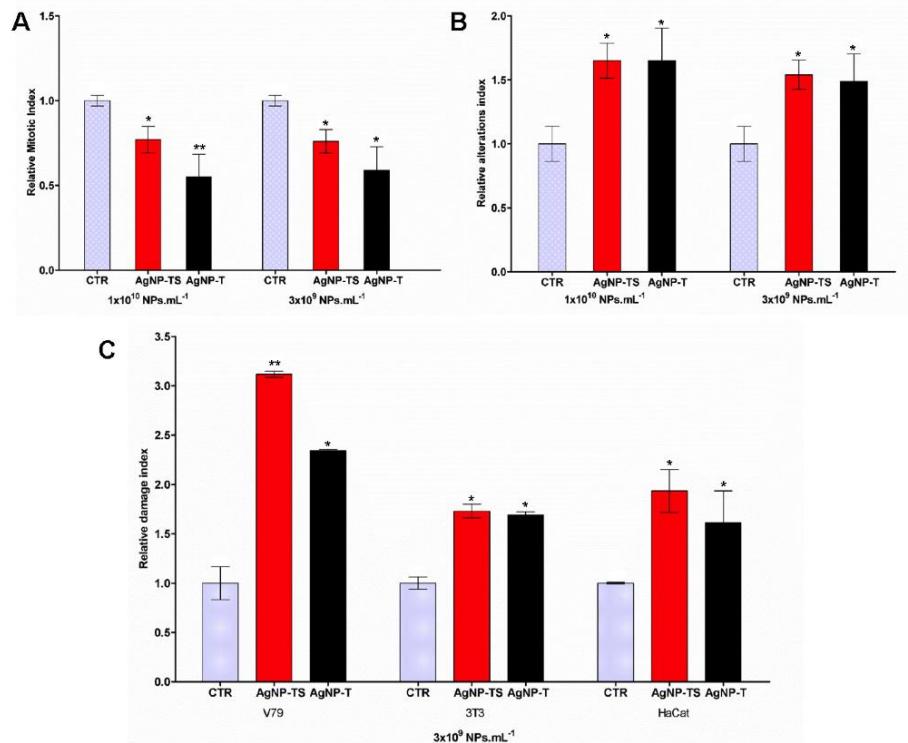
Figure 4. Cytotoxicity evaluation of the AgNP-TS and AgNP-T nanoparticles. A: Tetrazolium reduction test (MTT), B: Image cytometry determination of cell viability, necrosis, and apoptosis with statistically significant difference ($p<0.05$) indicated by * for comparison of viability to the control (CTR) and + for comparison of apoptosis to the control (CTR), C: Trypan blue exclusion test with statistically significant difference ($p<0.05$) indicated by * for comparison of alive cells to the control (CTR) and + for comparison of dead cells to the control (CTR).



Silver nanoparticles can alter normal cellular functions, affect membrane integrity, and initiate programmed death processes.⁵⁷ This cytotoxicity may arise from physicochemical interactions between silver atoms and the functional groups of cellular proteins.⁵⁸ However, although these effects apply to silver nanoparticles in general, the nanoparticles obtained using biogenic synthesis present specific characteristics related to the organism used in the reduction process, with the cytotoxicity generally being lower than observed for commercial nanoparticles and solutions containing silver ions.⁵⁹ Skladanowski *et al.*⁶⁰, using the MTT test, reported an absence of cytotoxicity in L929 mouse fibroblasts exposed to silver nanoparticles synthesized using *Streptomyces* sp. NH28.

The *Allium cepa* assay was used to investigate possible genotoxicity of the nanoparticles and mitotic index alteration. At the two exposure concentrations tested, both types of nanoparticle caused the mitotic index values to decrease, compared to the control (Fig. 5a). The alteration indices indicated that both AgNP-TS and AgNP-T caused increased chromosomal alterations, at the exposure concentrations, with no difference between the effects of the two nanoparticle types (Fig. 5b).

Figure 5. Evaluation of the cytotoxicity and genotoxicity of AgNP-TS and AgNP-T. A: Relative mitotic index using the *Allium cepa* assay, B: Relative chromosomal alteration index using the *Allium cepa* assay, C: Relative DNA damage index using the comet assay. Statistically significant difference ($p<0.05$) is indicated by * for comparison of the exposures to the control (CTR), with ** indicating a higher statistical significance.



The results of the *Allium cepa* assay were consistent with those obtained in a similar trial using the plant species *Drimia polyantha*, where decreases of the mitotic index and the presence of chromosomal alterations were found following exposure to the highest concentrations of biogenic silver nanoparticles synthesized using the plant *Getonia floribunda*.⁶¹ Similar results were obtained using the *Allium cepa* assay to evaluate the effects of low concentrations of silver nanoparticles synthesized using the plant *Swertia chirata*.⁶² The toxic effects caused by silver nanoparticles may be due to the generation of reactive oxygen species and DNA damage, leading to apoptosis, as well as the release of Ag^+ ions, which depends on the rate of dissolution of the nanoparticles within the cells.⁶³⁻⁶⁵

Further evaluation of the genotoxicity of the nanoparticles was performed using comet assays to determine the extent of DNA damage in the V79, 3T3, and HaCat cell lines. Both types of nanoparticle caused increases of the damage indices for the three cell lines, compared to the control, with the V79 cells showing the greatest sensitivity to AgNP-TS (Fig. 5c).

4 Conclusions

Silver nanoparticles were successfully synthesized using the filtrates from *T. harzianum* cultivated in the presence and absence of the cell wall of *S. sclerotiorum*, which resulted in nanoparticles with different physicochemical characteristics. Both AgNP-TS and AgNP-T were able to control the growth of *S. sclerotiorum*, with inhibition of mycelial growth and prevention of the formation of new sclerotia. The most effective control of mycelial growth was achieved using AgNP-TS, which could be attributed to the smaller hydrodynamic diameter of the nanoparticles, as well as a possible effect of the biomolecules from the capping of the nanoparticles, which were derived from the filtrate obtained using stimulation of the enzymatic production of *T. harzianum*. The effect of the capping could have acted in synergy with the effect of the nanoparticles themselves. Both types of nanoparticle presented low levels of cytotoxicity and genotoxicity towards V79, 3T3, and HaCat cell lines.

This study provides new perspectives for the development of techniques involving the biogenic synthesis of metallic nanoparticles, considering the biological activity potentials of not only the metal (in this case, silver), but also the biomolecules and organic compounds derived from the organisms used in the synthesis, which compose the capping on the nanoparticles. The promising results obtained for the control of *S. sclerotiorum* highlight this system among the emerging applications of nanotechnology in the agricultural sector.

Acknowledgments

The authors are grateful for the support provided by FAPESP (grants #2016/13692-6, #2017/13328-5, and #2017/21004-5), the Environmental Nanotechnology Laboratory of UNESP (Sorocaba), and the University of Sorocaba (UNISO) for supporting the publication charges.

Authors' contributions

MG-C performed the synthesis, the physico-chemical characterization of the nanoparticles, the enzymatic activity assays and the evaluation of biological activity of the nanoparticles. MG-C, TG-C and TP-S performed the cytotoxicity and genotoxicity evaluations. MG-C and RL wrote the manuscript and prepared the figures. RL and LFF supervised the study, gave inputs on the data and revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

REFERENCES

1. Siddiqi, Q.S., Husen, A. & Rao, R.A.K. A review on biosynthesis of silver nanoparticles and their biocidal properties. *J Nanobiotechnol.* **16**, 1-28 (2018).
2. Pantidos, N. & Horsfall, L.E. Biological Synthesis of Metallic Nanoparticles by Bacteria, Fungi and Plants. *J Nanomed Nanotechnol.* **5**, 1-10 (2014).
3. Kumar, S.A., Abyaneh, M.K., Gosavi, S.W., Kulkarni, S.K., Pasricha, N., Ahmad, A. *et al.* Nitrate reductase-mediated synthesis of silver nanoparticles from AgNO₃. *Biotechnol Lett.* **29**, 439-445 (2007).
4. Zhao, X., Zhou, L., Rajoka, M.S.R., Yan, L., Jiang, C., Shao, D. *et al.* Fungal silver nanoparticles: synthesis, application and challenges. *Crit Rev Biotechnol.* **38**, 1-19 (2017).
5. Chowdhury, S., Basu, A. & Kundu, S. Green synthesis of protein capped silver nanoparticles from phytopathogenic fungus *Macrophomina paseolina*. *Nanoscale Res Lett.* **9**, 1-11 (2014).
6. Azmath, P., Baker, S., Rakshith, D. & Satish, S. Mycosynthesis of silver nanoparticles bearing antibacterial activity. *Saudi Pharm J.* **24**, 140-146 (2016).
7. Vijayan, S., Divya, K., George, T.K. & Jisha, M.S. Biogenic Synthesis of Silver Nanoparticles Using Endophytic Fungi *Fusarium oxysporum* Isolated from *Withania Somnifera*, Its Antibacterial and Cytotoxic Activity. *J Bionanosci.* **10**, 1-8 (2016).
8. Zomorodian, K., Pourshahid, S., Sadatsharifi, A., Mehryar, P., Pakshir, K., Rahimi, M.J. *et al.* Biosynthesis and Characterization of Silver Nanoparticles by *Aspergillus* Species. *BioMed Res Int.* **2016**, 1-6 (2016).
9. Ahluwalia, V., Kumar, J., Sisodia, R., Shakil, N.A. & Walia, S. Green synthesis of silver nanoparticles by *Trichoderma harzianum* and their bio-efficacy evaluation against *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumonia*. *Ind Crops Prod.* **55**, 202-206 (2014).
10. Guilger, M., Pasquito-Stigliani, T., Bilesky-Jose, N., Grillo, R., Abhilash, P.C., Fraceto, L.F. *et al.* Biogenic silver nanoparticles based on *Trichoderma harzianum*: synthesis, characterization, toxicity evaluation and biological activity. *Sci Rep.* (2017) <https://dx.doi.org/10.1038%2Fsrep44421>.
11. Mukherjee, P., Roy, M., Mandal, B.P., Dey, G.K., Mukherjee, P.K., Ghatak, J. *et al.* Green synthesis of highly stabilized nanocrystalline silver particles by a non-pathogenic and agriculturally important fungus *T. asperellum*. *Nanotechnology.* **19**, 1-7 (2008)
12. Banu, N. & Balasubramanian, C. Mycosynthesis of silver nanoparticles using *Beauveria bassiana* against dengue vector, *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae). *Parasitol Res.* **113**, 1-9 (2014).
13. Kamil, D., Prameeladevi, T., Ganesh, S., Prabakharan, N., Nareshkumar, R. & Thomas, S.P. Green synthesis of silver nanoparticles by entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* and their bioefficacy against mustard aphid (*Lipaphis erysimi* Kalt.). *IJEB.* **55**, 555-561 (2017).
14. Singh, D., Rathod, V., Ninganagouda, S., Hiremath, J., Singh, A.K. & Mathew, J. Optimization and Characterization of Silver Nanoparticle by Endophytic Fungi *Penicillium* sp. Isolated from *Curcuma longa* (Turmeric) and Application Studies against MDR *E. coli* and *S. aureus*. *Bioinorg Chem App.* **2014**, 1-8 (2014).

15. Bhat, M.A., Nayak, B.K. & Nanda, A. Evaluation of bactericidal activity of biologically synthesized silver nanoparticles from *Candida albicans* in combination with Ciprofloxacin. *Mater Today: Proc.* **2**, 4395-4401 (2015).
16. Vigneshwaran, N., Kathe, A.A., Varadarajan, P.V., Nachane, R.P. & Balasubramanya, R.H. Biomimetics of silver nanoparticles by white rot fungus, *Phaenerochaete chrysosporium*. *Colloids Surf. B*. **53**, 55-59 (2006).
17. Liang, M., Wei, S., Jian-Xin, L., Xiao-Xi, Z., Zhi, H., Wen, L. et al. Optimization for extracellular biosynthesis of silver nanoparticles by *Penicillium aculeatum* Su1 and their antimicrobial activity and cytotoxic effect compared with silver ions. *Mater Sci Eng.* **77**, 963-971 (2017).
18. Rajput, S., Werezuk, R., Lange, R.M. & Mcdermott, M.T. Fungal Isolate Optimized for Biogenesis of Silver Nanoparticles with Enhanced Colloidal Stability. *Langmuir*. **32**, 8688-8697 (2016).
19. Kubicek, C., Mach, R., Peterbauer, C.K. & Lorito, M. *Trichoderma*: From genes to biocontrol. *J Plant Pathol.* **83**, 11-23 (2001).
20. Almeida, F.B.R., Cerqueira, F.M., Silva, R.N., Ulhoa, C.J. & Lima, A.L. Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* strains against *Rhizoctonia solani*: evaluation of coiling and hydrolytic enzyme production. *Biotechnol Lett.* **29**, 1189-1193 (2007).
21. Qualhato, T.F., Lopes, F.A.C., Steindorf, A.S., Brandão, R.S., Jesuino, R.S.A. & Ulhoa, C.J. Mycoparasitism studies of *Trichoderma* species against three phytopathogenic fungi: evaluation of antagonism and hydrolytic enzyme production. *Biotechnol Lett.* **35**, 1461–1468 (2013).
22. Gruber, S. & Seidl-Seiboth, V. Self versus non-self: fungal cell wall degradation in *Trichoderma*. *Microbiology*. **158**, 26-34 (2011).
23. Geraldine, A.M., Lopes, F.A.C., Carvalho, D.D.C., Barbosa, E.T., Rodrigues, A.R., Brandão, R.S. et al. Cell wall-degrading enzymes and parasitism of sclerotia are key factors on field biocontrol of white mold by *Trichoderma* spp. *Biol Control*. **67**, 308-316 (2013).
24. Fraceto, L.F., Maruyama, C.R., Guilger, M., Mishra, S., Kesvani, C., Singh, H.B. et al. *Trichoderma harzianum*-based novel formulations: potential applications for management of Next-Gen agricultural challenges. *J Chem Technol Biotechnol.* **93**, 2056-2063 (2018).
25. Vahabi, K., Mansoori, G.A. & Karimi, S. Biosynthesis of Silver Nanoparticles by Fungus *Trichoderma reesei*. *Insciences J.* **1**, 65-79 (2011).
26. Fall, M.L., Boyse, J.F., Wang, D., Willbur, J.F., Smith, D.L. & Chilvers, M.I. Case Study of an Epidemiological Approach Dissecting Historical Soybean Sclerotinia Stem Rot Observations and Identifying Environmental Predictors of Epidemics and Yield Loss. *Phytopathology*. **108**, 469-478 (2018).
27. Willbur, J., McCaghey, M., Kabbage, M. & Smith, D. L. An overview of the *Sclerotinia sclerotiorum* pathosystem in soybean: impact, fungal biology, and current management strategies. *Trop Plant Pathol.* **44**, 3-11 (2019).
28. Lehner, M.S., Pethybridge, S.J., Meyer, M.C. & Del Ponte, E.M. Metaanalytic modeling of the incidence-yield and incidence-sclerotial production relationships in soybean white mold epidemics. *J Plant Pathol.* **66**, 460-468 (2016).

29. Allen, T.W., Bradley, C.A., Sisson, A.J., Byamukama, E., Chilvers, M.I., Coker, C.M., *et al.* Soybean yield loss estimates due to diseases in the United States and Ontario, Canada from 2010 to 2014. *Plant Health Progress*. **18**, 19-27 (2017).
30. Peltier, A. J., Bradley, C. A., Chielvers, M.I., Malwick, D.K., Mueller, D.S., Wise, K.A. *et al.* Biology, Yield loss and Control of Sclerotinia Stem Rot of Soybean. *J. Integ. Pest. Mngmt*, **3**, 1-7 (2012).
31. 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*. **7**, 248-254 (1976).
32. Lima, R., Feitosa, L.O., Pereira, A.E., Moura, M.G., Aouada, F.A., Mattoso, L.H.C. *et al.* Evaluation of the Genotoxicity of Chitosan Nanoparticles for Use in Food Packaging Films. *J Food Sci*. **75**, 89-96 (2010).
33. Singh, N.P., Mccoy, M.T., Tice, R.R. & Schneider, E.L. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*. **175**, 175-184 (1988).
34. Elamawi, R.M., Al-Harbi, R.E. & Hendi, A.A. Biosynthesis and characterization of silver nanoparticles using *Trichoderma longibrachiatum* and their effect on phytopathogenic fungi. *EJBPC*. **28**, 1-11 (2018).
35. Abdelrahim, K., Mahmoud, S.Y., Ali, A.M., Almaary, K.S., Mustafa, A.E.M.A. & Husseiny, S.M. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using *Rhizopus stolonifer*. *Saudi J Biol Sci*. **24**, 208-216 (2017).
36. Campoy, A.H.G., Gutierrez, R.M.P., Manriquez-Alvirde, G. & Ramirez, A.M. Protection of silver nanoparticles using *Eysenhardtia polystachya* in peroxide-induced pancreatic β -Cell damage and their antidiabetic properties in zebrafish. *Int J Nanomed*. **13**, 2601-2612 (2018).
37. Phanjom, P. & Ahmed, G. Effect of different physicochemical conditions on the synthesis of silver nanoparticles using fungal cell filtrate of *Aspergillus oryzae* (MTCC No. 1846) and their antibacterial effects. *Adv Nat Sci: Nanosci Nanotech*. **8**, 1-13 (2017).
38. Durán, N., Marcato, P.D., Alves, O.L., De Souza, G.I.H. & Esposito, E. Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains. *J Nanobiotechnol*. **3**, 1-7 (2005).
39. Ballotin, D., Fulaz, S., Souza, M.L., Corio, P., Rodrigues, A.G., Souza, A.O. *et al.* Elucidating Protein Involvement in the Stabilization of the Biogenic Silver Nanoparticles. *Nanoscale Res Lett*. **11**, 1-9 (2016).
40. Luo, K., Jung, S., Park, K.H. & Kim, Y.R. Microbial Biosynthesis of Silver Nanoparticles in Different Culture Media. *J Agric Food Chem*. **66**, 957-962 (2018).
41. Alqadi, M.K., Noqtah, O.A.A., Alzoubi, F.Y. & Aljarrah, K. pH effect on the aggregation of silver nanoparticles synthesized by chemical reduction. *Mater Sci*. **32**, 107-111 (2014).
42. Zhang, H., Chen, B. & Banfield, J.F. Particle Size and pH Effects on Nanoparticle Dissolution. *J Phys Chem C*. **114**, 14876-14884 (2010).
43. Jadhav, K., Dhamecha, D., Bhattacharya, D. & Patil, M. Green and ecofriendly synthesis of silver nanoparticles: Characterization, biocompatibility studies and gel formulation for treatment of infections in burns. *J Photochem Photobiol B*. **155**, 109-115 (2016).

44. He, D., Dorantes-Aranda, J.J. & Waite, T.D. Silver nanoparticle-algae interactions: oxidative dissolution, reactive oxygen species generation and synergistic toxic effects. *Environ Sci Technol.* **46**, 8731–8738 (2012).
45. Elgorban, A.M., Aref, S.M., Seham, S.M., Elhindi, K.M., Bahkali, A.H., Sayed, S.R. *et al.* Extracellular synthesis of silver nanoparticles using *Aspergillus versicolor* and evaluation of their activity on plant pathogenic fungi. *Mycosphere.* **7**, 844-852 (2016).
46. Krishnaraj, C., Ramachandran, R., Mohan, K. & Kalaichelvan, P.T. Optimization for rapid synthesis of silver nanoparticles and its effect on phytopathogenic fungi. *Spectrochim Acta Part A.* **93**, 95-99 (2012).
47. Mahdizadeh, V., Safaie, N. & Khelghatibana, F. Evaluation of antifungal activity of silver nanoparticles against some phytopathogenic fungi and *Trichoderma harzianum*. *J Crop Prot.* **4**, 291-300 (2015).
48. Min, J.S., Kim, K.S., Kim, S.W., Jung, J.H., Lamsal, K., Kim, S.B. *et al.* Effects of Colloidal Silver Nanoparticles on Sclerotium-Forming Phytopathogenic Fungi. *Plant Pathol J.* **25**, 376-380 (2009).
49. Alghuthaymi, M.A., Almoammar, H., Rai, M., Said-Galiev, E. & Abd-Elsalam, K.A. Myconanoparticles: synthesis and their role in phytopathogens management. *Biotechnol Biotechnol Equip.* **29**, 221-236 (2015).
50. Singh, D., Rathod, V., Ninganagouda, S., Herimath, J. & Kulkarni, P. Biosynthesis of silver nanoparticles by endophytic fungi *Penicillium* sp isolated from *Curcuma longa* (turmeric) and its antibacterial activity against pathogenic gram negative bacteria. *J Pharm Res.* **7**, 448-453 (2013).
51. Devi, T.P., Kulanthaivel, S., Kamil, D., Borah, J.L., Prabhakaran, N. & Srinivasa, N. Biosynthesis of silver nanoparticles from Trichoderma species. *Ind J Exp Biol.* **51**, 543-547 (2013).
52. Hobbelen, P.H.F., Paveley, N.D. & van den Bosch, F. The emergence of resistance to fungicides. *Plos One.* **9**, 1-14 (2014).
53. Hahn, M. The rising threat of fungicide resistance in plant pathogenic fungi: Botrytis as a case study. *J Chem Biol.* **7**, 133-141 (2014).
54. Banik, S. & Sharma, P. Plant pathology in the era of nanotechnology. *Indian Phytopathol.* **64**, 120-127 (2011).
55. Zhang, T., Wang, L., Chen, Q. & Chen, C. Cytotoxic Potential of Silver Nanoparticles. *Yonsei Med J.* **55**, 283-291 (2014).
56. Greulich, C., Diendorf, J., Simon, T., Eggeler, G., Epple, M. & Köller, M. Uptake and intracellular distribution of silver nanoparticles in human mesenchymal stem cells. *Acta Biomater.* **7**, 347-357 (2011).
57. Sanpui, P., Chattopadhyay, A. & Ghosh, S.S. Induction of Apoptosis in Cancer Cells at Low Silver Nanoparticle Concentrations using Chitosan Nanocarrier. *ACS Appl Mater Interfaces.* **3**, 218-228 (2011).
58. Shahbazzadeh, D., Ahari, H., Motalebi, A.A., Anvar, A.A., Moaddab, S., Asadi, T. *et al.* *In vitro* effect of Nanosilver toxicity on fibroblast and mesenchymal stem cell lines. *IJFS.* **10**, 487-496 (2011).

59. Lima, R., Seabra, A.B. & Durán, N. Silver nanoparticles: a brief review of cytotoxicity and genotoxicity of chemically and biogenically synthesized nanoparticles. *J Appl Toxicol.* **32**, 867-879 (2012).
60. Skladanowski, M., Golinska, P., Rudnicka, K., Dahm, H. & Rai, M. Evaluation of cytotoxicity, immune compatibility and antibacterial activity of biogenic silver nanoparticles. *Med Microbiol Immunol.* **205**, 603-613 (2016).
61. Daphedar, A. & Taranath, T.C. Characterization and cytotoxic effect of biogenic silver nanoparticles on mitotic chromosomes of *Drimia polyantha* (Blatt. & McCann) Stearn. *Toxicol Rep.* **5**, 910-918 (2018).
62. Saha, N. & Gupta, S.D. Low-dose toxicity of biogenic silver nanoparticles fabricated by Swertia chirata on root tips and flower buds of *Allium cepa*. *J Hazard Mater.* **330**, 18-28 (2017).
63. Asharani, P.V., Hande, M.P. & Valiyaveettil, S. Anti-proliferative activity of silver nanoparticles. *BMC Cell Biol.* **10**, 1-14 (2009).
64. Fu, P.P., Xia, Q., Hwang, H.M., Ray, P.C. & Yu, H. Mechanisms of nanotoxicity: generation of reactive oxygen species. *J Food Drug Anal.* **22**, 64-75 (2014).
65. Fageria, L., Pareek, V., Dilip, R.V., Bhargava, A., Pasha, S.S., Laskar, I.R. *et al.* Biosynthesized Protein-Capped Silver Nanoparticles Induce ROS-Dependent Proapoptotic Signals and Prosurvival Autophagy in Cancer Cells. *ACS Omega.* **2**, 1489-1504 (2017).

3.3 CAPÍTULO III - INFLUÊNCIA DO RECOBRIMENTO DE NANOPARTÍCULAS BIOGÊNICAS DE PRATA NA TOXICIDADE E NO MECANISMO DE AÇÃO SOBRE *Sclerotinia sclerotiorum*

O terceiro capítulo traz um artigo que dá continuidade às análises das nanopartículas do capítulo anterior, com foco no estudo do recobrimento de biomoléculas provenientes de *Trichoderma harzianum* que envolve as nanopartículas, conferindo melhor estabilidade, com possível contribuição para a atividade biológica. Desta forma, foi realizada a remoção do recobrimento de parte das amostras de nanopartículas previamente sintetizadas, com o objetivo de comparar nanopartículas recobertas e não-recobertas. Como o enfoque principal foi investigar a importância do recobrimento das nanopartículas foram realizadas análises para a detecção de proteínas e grupamentos funcionais, e a atividade de enzimas hidrolíticas de *Trichoderma harzianum*. Foi então investigado o potencial das nanopartículas para o controle do crescimento micelial e germinação de novos escleródios do fungo fitopatogênico *Sclerotinia sclerotiorum*. Também foi realizada a avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade das nanopartículas recobertas e não-recobertas sobre linhagens celulares e dos efeitos sobre organismos não-alvo.

Influência do recobrimento de nanopartículas biogênicas de prata na toxicidade e no mecanismo de ação sobre *Sclerotinia sclerotiorum*

Mariana Guilger-Casagrande¹, Taís Germano-Costa¹, Natália Bilesky-José¹, Tatiane Pasquoto-Stigliani¹, Lucas Bragança de Carvalho², Leonardo Fernandes Fraceto² e Renata de Lima^{1*}

¹Laboratório de Avaliação de Bioatividade e Toxicologia de Nanomateriais, Universidade de Sorocaba, Sorocaba, São Paulo, Brasil

²Laboratório de Nanotecnologia Ambiental, Universidade Estadual Paulista, Sorocaba, São Paulo, Brasil

E-mail do autor correspondente: renata.lima@prof.uniso.br

Resumo

Nanopartículas biogênicas apresentam um recobrimento de biomoléculas e metabólitos secundários provenientes do organismo utilizado na síntese, este confere estabilidade à nanopartícula e pode contribuir para sua atividade biológica. Essas nanopartículas têm apresentado destaque devido à possível aplicação no controle de fitopatógenos, fato que desperta interesse em sua composição, mecanismos de ação e toxicidade. O objetivo deste trabalho foi estudar a influência do recobrimento de duas diferentes nanopartículas de prata sintetizadas a partir do fungo *Trichoderma harzianum*, e avaliar a toxicidade e o potencial das mesmas contra o fitopatógeno *S. sclerotiorum*. O recobrimento das nanopartículas foi removido para obtenção de amostras recobertas e não-recobertas, a caracterização físico-química foi realizada por espectrofotometria, espalhamento dinâmico de luz, microeletroforese, rastreamento de nanopartículas e microscopia de força atômica. Para estudar o recobrimento foram realizados SDS-PAGE, ensaios enzimáticos e infravermelho. Também foram avaliados os efeitos das nanopartículas sobre *S. sclerotiorum* *in vitro* e realizados ensaios para avaliar a citotoxicidade e genotoxicidade sobre linhagens celulares e organismos não-alvo. Todas as amostras apresentaram morfologia esférica, sendo observado aumento no diâmetro das nanopartículas não-recobertas. A ausência de picos característicos de proteínas observada por espectrofotometria e a alteração nos grupamentos funcionais determinados por infravermelho confirmaram a ausência de recobrimento. Foram observadas bandas de proteína em comum nos filtrados e nos recobrimentos por SDS-PAGE, e foi detectada a atividade específica das enzimas hidrolíticas β-1,3-glucanase, NAGase, quitinase e protease ácida nos filtrados, recobrimentos e nanopartículas recobertas pelos ensaios enzimáticos. Em relação aos efeitos sobre *S. sclerotiorum*, as nanopartículas recobertas inibiram o fungo, enquanto as não-recobertas não apresentaram efetividade. Foram observados efeitos tóxicos sobre linhagens celulares e organismos não-alvo, porém as nanopartículas não-recobertas, em geral, apresentaram efeitos mais intensos. Os resultados sugerem que o recobrimento tem um papel importante no controle de tamanho e estabilidade, e possivelmente contribui para a atividade biológica das nanopartículas. Este estudo abre perspectivas para investigações quanto à aplicação dessas nanopartículas para o controle de fitopatógenos.

Palavras chave: nanopartículas de prata, síntese biogênica, recobrimento, *Trichoderma harzianum*, enzimas hidrolíticas, sds-page, ftir

A nanotecnologia desponta no setor agrícola contribuindo de forma significativa para diversos problemas, entre eles o controle de pragas. Dentre os novos nanomateriais destacam-se as nanopartículas de prata, as quais apresentam potencial para o controle de microrganismos fitopatogênicos.¹ A síntese dessas nanopartículas pode ser realizada por agentes redutores e estabilizantes biológicos, como fungos, bactérias, plantas e algas,² pela ação da enzima nitrato-redutase e outros metabólitos.³ Os fungos podem ser empregados na síntese de nanopartículas de prata de uma forma limpa e relativamente rápida, sendo considerados nanobiofábricas.¹ As nanopartículas são formadas pela interação entre enzimas, coenzimas e demais ativos provenientes desses organismos com um precursor metálico e recebem um recobrimento de grupamentos bioativos.^{4,5}

Nanopartículas metálicas produzidas por síntese biogênica de um modo geral apresentam esse recobrimento, o qual confere estabilidade, podendo ainda agregar substâncias com propriedades para atividade específica, potencializando seus efeitos.^{6,7} O recobrimento das nanopartículas biogênicas é formado por biomoléculas e compostos provenientes do metabolismo do fungo ou de outro agente biológico, tais como proteínas extracelulares, enzimas, aminoácidos e metabólitos.^{8,9} No caso de nanopartículas produzidas por síntese química é necessária a adição de agentes de recobrimento, como surfactantes, proteínas e outras biomoléculas, visando a obtenção de estabilidade eletrostérica. Esses agentes se ligam à superfície das nanopartículas por ligações covalentes ou interações químicas, porém não são facilmente degradados.¹⁰⁻¹²

O recobrimento, dependendo de sua composição, também pode contribuir para a biocompatibilidade das nanopartículas, possibilitando a presença de uma superfície ativa para interação com compostos biológicos e conjugação com substâncias de interesse como medicamentos, antimicrobianos, material genético e aminoácidos.⁹ Bhunia *et al.* (2015) verificaram uma maior biocompatibilidade de nanopartículas de prata recobertas com proteína, como hemoglobina humana, em comparação com nanopartículas não-recobertas.¹³ Devido a estas características, as nanopartículas biogênicas são consideradas mais adequadas para aplicações nas áreas de saúde, agricultura e ambiente.^{14,15} Entretanto, é importante considerar que o recobrimento superficial pode influenciar em parâmetros como morfologia, agregação e taxa de dissolução, bem como ter efeitos sobre a citotoxicidade.¹⁵ Desta forma, com a perspectiva de aplicação dessas nanopartículas nas áreas da saúde e agrícola, e sua consequente liberação para o ambiente, se faz necessária a avaliação das características físico-químicas e da toxicidade.¹⁶

O mofo branco é uma doença que atinge mais de 450 espécies de culturas agrícolas, causada pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum*. Esse fungo é considerado um dos fitopatógenos mais severos do mundo devido as suas estruturas de resistência (escleródios) de alta virulência, que podem permanecer viáveis no solo por anos.¹⁷ O controle dessa doença é realizado pela aplicação de fungicidas químicos e agentes de controle biológico, porém existem alguns estudos que relatam os efeitos inibitórios de nanopartículas de prata sobre fungos fitopatogênicos.¹⁸⁻²³ Em um estudo anterior do nosso grupo, foram sintetizadas nanopartículas de prata a partir do fungo *Trichoderma harzianum* com e sem estímulo da produção enzimática e as mesmas inibiram o crescimento micelial e a germinação de escleródios de *S. sclerotiorum in vitro*.²³

Considerando a importância do recobrimento das nanopartículas, o presente estudo visou comparar as características físico-químicas de nanopartículas recobertas e não-recobertas, investigar os recobrimentos por meio de espectroscopia infravermelho, análises de proteína e ensaios enzimáticos, assim como, verificar a atividade biológica sobre o fitopatógeno *S. sclerotiorum* e a toxicidade para linhagens celulares e organismos não-alvo.

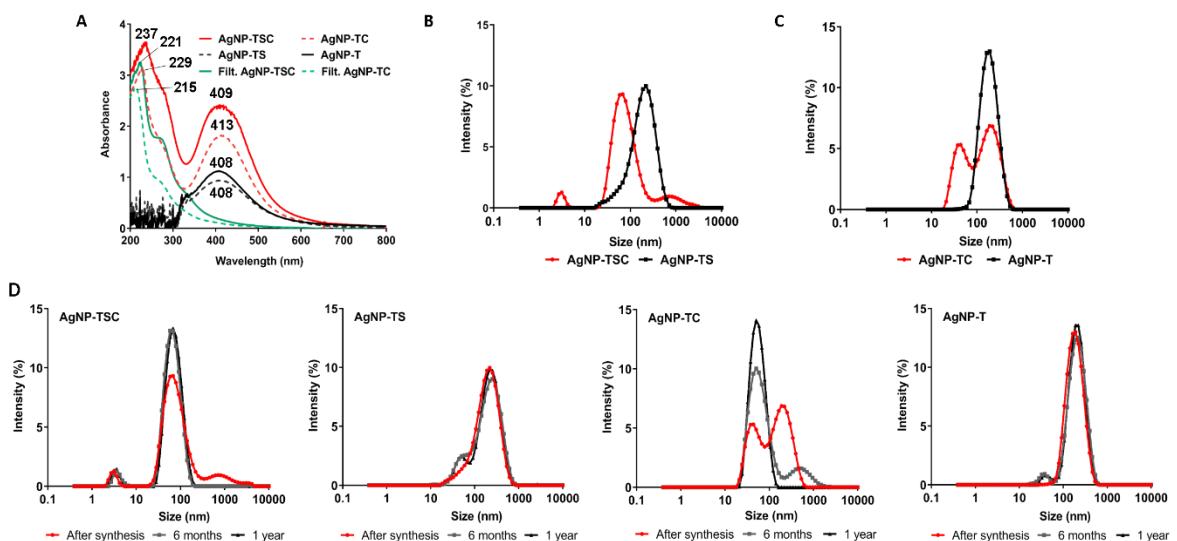
Resultados e Discussão

O procedimento de remoção do recobrimento das nanopartículas deu origem a duas novas amostras não-recobertas, desta maneira ao final da remoção foram obtidas quatro amostras no total, duas recobertas e duas não-recobertas. As amostras foram denominadas e apresentadas ao longo deste estudo da seguinte forma: AgNP-TSC (recobertas, com estímulo); AgNP-TC (recobertas, sem estímulo), AgNP-TS (não-recobertas, com estímulo) e AgNP-T (não-recobertas, sem estímulo).

Caracterização e estabilidade das nanopartículas biogênicas

Através de análises UV-Vis foram observados, para todas as amostras, picos de absorbância característicos da prata elementar (Ag^0), entre 400 e 420 nm. Nas amostras de nanopartículas recobertas AgNP-TSC e AgNP-TC foram visualizados picos entre 200 e 300 nm, semelhantes a seus respectivos filtrados, os quais indicam a presença de compostos orgânicos como resíduos de aminoácidos, metabólitos secundários e proteínas. Na mesma região, foram observados ruídos para as amostras AgNP-TS e AgNP-T, o que pode ser decorrente do processo de remoção do recobrimento e eliminação das biomoléculas (Figura 1A).

Figura 1 – Caracterização físico-química das nanopartículas. A: Espectroscopia UV-Visível das nanopartículas e seus respectivos filtrados. B e C: Diâmetro hidrodinâmico por DLS. D: Acompanhamento da estabilidade por DLS. AgNP-TSC (recobertas, com estímulo); AgNP-TC (recobertas, sem estímulo), AgNP-TS (não-recobertas, com estímulo) e AgNP-T (não-recobertas, sem estímulo).



As nanopartículas apresentaram diferentes distribuições de diâmetro hidrodinâmico, as quais podem estar relacionadas às condições de síntese e principalmente à presença e ausência de recobrimento. AgNP-TSC apresentou populações de 3 nm (6,0%), 59 nm (88,3%) e 825 nm (5,6%) (Figura 1B) e AgNP-TC apresentou populações de 32 nm (39,3%) e 190 nm (60,7%) (Figura 1C). A formação de populações de diferentes tamanhos em nanopartículas sintetizadas por via biogênica tem sido observada em alguns estudos.^{24,25} Após a remoção do recobrimento estas nanopartículas apresentaram populações de 220 nm (100%) para AgNP-TS (Figura 1B) e uma população de 190 nm (100%) para AgNP-T (Figura 1C), observando-se um aumento dos diâmetros. Esse aumento pode ser devido a provável agregação das nanopartículas quando ocorreu a remoção do recobrimento.²⁶

Em relação à polidispersão, as amostras AgNP-TSC, AgNP-TC, AgNP-TS e AgNP-T apresentaram índices de 0,49, 0,52, 0,42 e 0,25, respectivamente. A AgNP-T apresentou o menor índice, o qual indica menor variação de tamanho entre as nanopartículas, porém é importante considerar que estas apresentaram maior diâmetro, sendo um indicativo de que sofreram agregação e em seguida estabilizaram. Quanto ao potencial zeta, carga formada na interface entre as nanopartículas e o meio de dispersão, todas as amostras apresentaram valores negativos, sendo estes -16,7 mV; -16,3 mV; -33,3 mV e -15,2 mV para AgNP-TSC, AgNP-TC, AgNP-TS e AgNP-T, respectivamente, sendo que AgNP-TS apresentou maior eletronegatividade. De acordo com a literatura, quanto maior o potencial zeta maior a

estabilidade das nanopartículas, entretanto, ao se tratar de nanopartículas biogênicas, a estabilidade está principalmente vinculada ao recobrimento de biomoléculas.¹² Diferentes recobrimentos resultam em diferentes cargas de superfície, o que pode influenciar na atividade das nanopartículas e em sua citotoxicidade.^{27,28}

A estabilidade das nanopartículas foi avaliada seis meses e um ano após a síntese por meio da análise DLS (Figura 1D). Não foram observadas alterações no diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas durante o período, com exceção da amostra AgNP-TC, que inicialmente apresentava distribuição bimodal, porém após seis meses foi possível observar um deslocamento da curva, a qual mostrou um aumento das nanopartículas de menor diâmetro e após um ano passou a apresentar distribuição monomodal, com redução do diâmetro das nanopartículas em relação ao início do experimento. Mesmo apresentando alterações em relação ao diâmetro, as nanopartículas recobertas, após um ano, continuaram apresentando atividade biológica para o controle de *S. sclerotiorum* e não apresentam evidências de alteração de cor, floculação e sedimentação. A continuidade do efeito com o passar do tempo pode estar relacionada ao envoltório de biomoléculas do fungo que confere às nanopartículas estabilidade estérica.²⁹ A estabilidade das nanopartículas é muito importante para garantir sua atividade biológica.³⁰

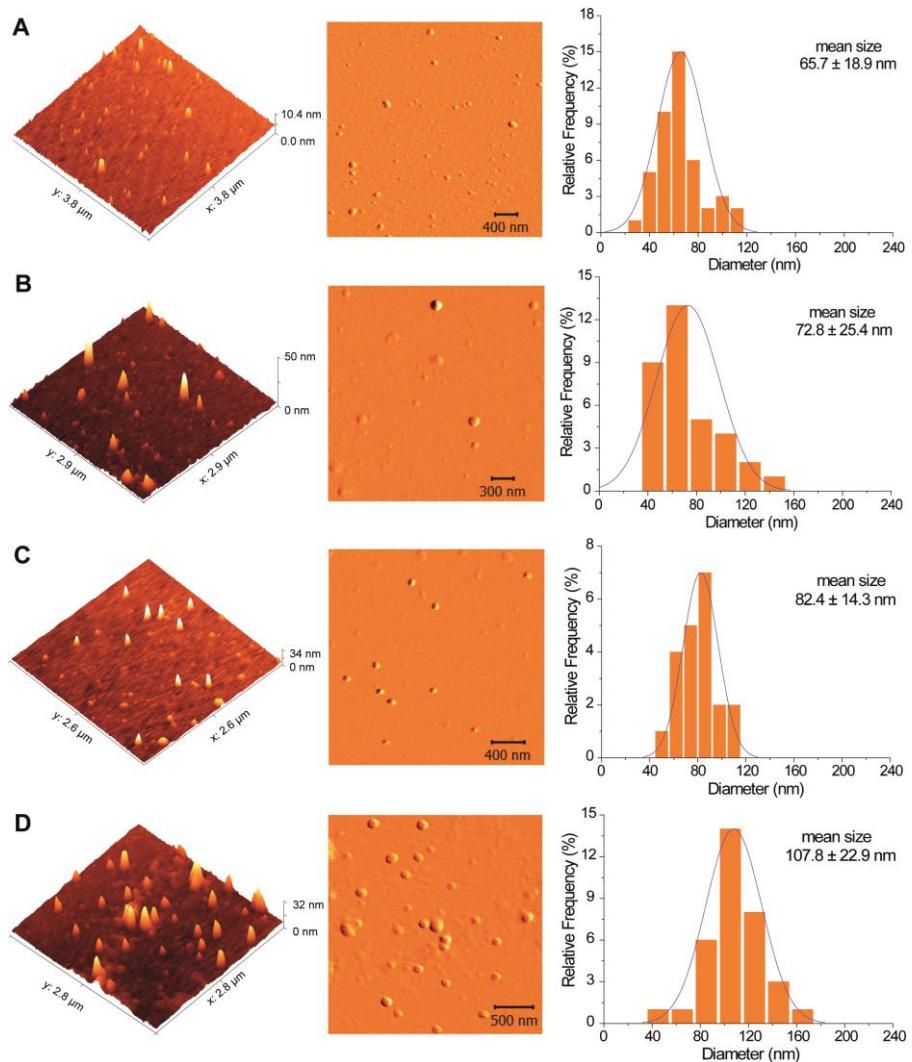
Quanto aos valores de pH das dispersões foi observado que ambas as nanopartículas recobertas apresentaram valores próximos ou idênticos a seus respectivos filtrados (7,2-7,3), enquanto as nanopartículas não-recobertas apresentaram uma redução nos valores de pH (4,9-5,0). Esse efeito sobre o pH se deve, provavelmente, à ausência dos compostos provenientes do filtrado envolvendo as nanopartículas. Durante a síntese, íons OH⁻ fornecem elétrons para a redução dos íons de prata e adsorvem na superfície das nanopartículas garantindo sua estabilidade e manutenção de tamanho, resultando em uma dispersão mais alcalina.¹⁴ Na remoção do recobrimento esses íons OH⁻ são perdidos, ocasionando a alteração do pH da dispersão e, desta forma, a nanopartícula de Ag⁰ fica exposta à solução aquosa, iniciando um processo de ionização e consequentemente perdendo sua estabilidade.³¹ Nanopartículas não-recobertas são mais facilmente ionizáveis quando dispersas em sistemas aquosos e quanto menor o pH da dispersão maior a possibilidade da dissolução das mesmas.^{32,33}

Análise da morfologia das nanopartículas

Por meio da microscopia de força atômica foi observado que as quatro amostras de nanopartículas apresentam morfologia esférica, porém as nanopartículas não-recobertas

apresentaram maior diâmetro médio (Figura 2), o que é condizente com as distribuições de diâmetro obtidas pela análise DLS. A morfologia e o tamanho das nanopartículas estão diretamente relacionados com as condições de síntese.³⁴

Figura 2 – Microscopia de força atômica (AFM) com distribuição de tamanho das nanopartículas recobertas AgNP-TSC (A) e AgNP-TC (B) e não-recobertas AgNP-TS (C) e AgNP-T (D), respectivamente.



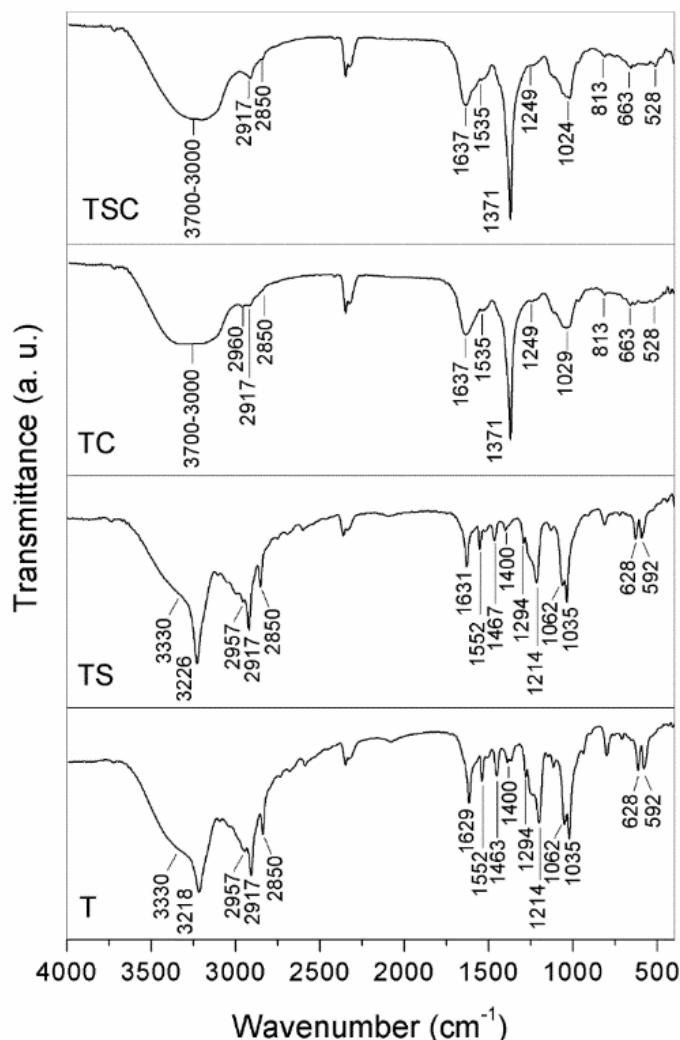
Análise das características do recobrimento das nanopartículas

As análises por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) constituem uma ferramenta importante para caracterizar sistemas como aos que se refere este estudo, pela identificação de características específicas inerentes das nanopartículas e de seus precursores. A detecção de proteínas responsáveis pela síntese biogênica e estabilidade de nanopartículas de prata, por exemplo, foi relatada por outros estudos.³⁵⁻³⁷ As interações dessas proteínas e resíduos de aminoácidos com as nanopartículas pode ocorrer por ligações covalentes

aos grupamentos amino, resíduos de cisteína, e ligações eletrostáticas via grupamentos carboxila.^{29,37} Daphedar e Taranath (2018) observaram bandas de grupamentos de proteína por FTIR em nanopartículas produzidas por síntese biogênica e confirmaram que os componentes fitoquímicos do extrato utilizado na síntese (proteínas, ácidos carboxílicos, flavonóides, álcoois e fenóis) atuaram nos processos de redução, formação do recobrimento e estabilização.³⁸

Assim, pela análise por espectroscopia de infravermelho das nanopartículas de prata deste estudo, foi possível observar que as nanopartículas recobertas (AgNP-TSC e AgNP-TC) apresentaram bandas características de grupos funcionais que podem ser correlacionadas à biomoléculas ativas provenientes dos fungos (Figura 3).

Figura 3 – Espectros infravermelho por FTIR das nanopartículas recobertas AgNP-TSC, AgNP-TC e não-recobertas AgNP-TS e AgNP-T.



A banda larga em 3700-3000 cm^{-1} é atribuída às vibrações de estiramentos O-H dos grupamentos hidroxilas.³⁹⁻⁴² Em 2960 ocorrem os estiramentos do grupo NH associado,³⁹ em

amidas provenientes de estruturas protéicas e de enzimas hidrolíticas como as glicanases e quitinases. As bandas em 2917 e 2850 cm⁻¹ são características de estiramentos C-H,^{41,8} e em 1637 e 1535 cm⁻¹ são atribuídas às amidas associadas I e II respectivamente.^{29,42} A banda intensa em 1371 cm⁻¹ é atribuída a absorção de dobramento C-H de grupos metila^{39,43} e/ou à banda de absorção dos estiramentos C-N de aminas aromáticas.^{8,29,42} A banda de baixa intensidade em 1249 cm⁻¹ refere-se ao estiramento C-N de amina.^{41,42} A absorção em torno de 1024 cm⁻¹ é atribuída aos estiramentos C-O de grupo funcional éter.^{39,40,42} A presença desses grupos funcionais nas nanopartículas recobertas indica que o recobrimento é formado por estruturas provenientes do fungo, como proteínas, enzimas hidrolíticas, e também resíduos de aminoácidos decorrentes de proteólise via ação enzimática.

As características apresentadas nos espectros de absorção descritas corroboram com outros estudos presentes na literatura. Gurunathan *et al.* (2015) sintetizaram nanopartículas de prata a partir do filtrado da bactéria *Bacillus tequilensis* e do fungo *Calocybe indica*, e em ambas as nanopartículas foram observadas bandas espectrais bastante próximas das encontradas para as amostras de nanopartículas recobertas no presente estudo.²⁷ Jain *et al.* (2011) também encontraram resultados similares para as nanopartículas de prata sintetizadas a partir do filtrado do fungo *Aspergillus flavus* NJP08. Ambos os estudos atribuem a formação de um recobrimento ao redor das nanopartículas ao alto potencial de ligação de grupamentos C-O dos resíduos de aminoácidos com metais, em que a estabilidade das nanopartículas está relacionada à presença e interação de proteínas.³⁷

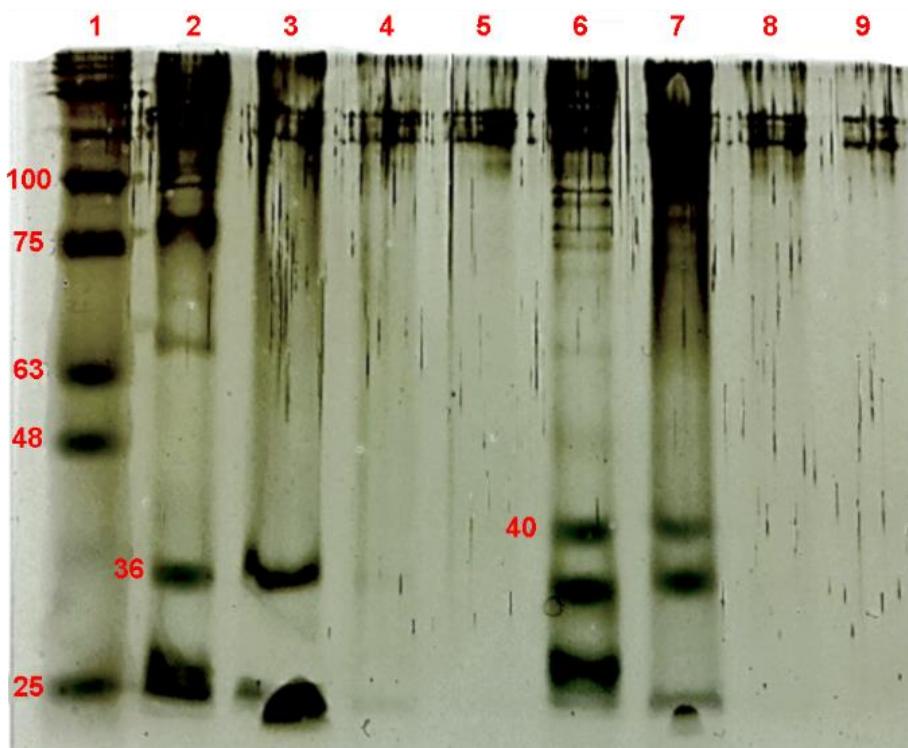
Por outro lado, não foram observadas as bandas características das nanopartículas recobertas para as nanopartículas que passaram pelo processo de remoção do recobrimento. Essas nanopartículas apresentaram agora bandas que são características do composto tampão Tris-HCl, no qual as nanopartículas foram resuspensas.^{44,45} A banda larga em 3300 cm⁻¹ refere-se aos estiramentos O-H e em torno de 3226 cm⁻¹ aos estiramentos simétricos N-H. As bandas na região compreendida entre 2957 e 2850 cm⁻¹ são atribuídas às vibrações dos estiramentos simétricos e assimétricos de CH₂. Em 1629 e 1552 cm⁻¹ ocorrem as bandas características da deformação angular simétrica no plano e fora do plano de NH₂. A banda em 1463 cm⁻¹ refere-se à deformação de CH₂ e em 1400 cm⁻¹ à vibração C-C. Em 1294 e 1214 cm⁻¹ são bandas atribuídas às deformações de OH e em 1062 e 1035 às deformações de C-O. Por fim, a deformação C-C-C aparece como um duplete em 628 e 592 cm⁻¹. Esses resultados corroboram com o estudo de Jain *et al.* (2015) em que também foi realizada a remoção do recobrimento de nanopartículas de prata sintetizadas a partir do filtrado de *Aspergillus* sp. NJP02.³² O perfil do

espectro de FTIR mudou e as bandas vibracionais referentes a amida I, amida II e estiramentos C-N de amina alifática desapareceram, confirmando assim a remoção do recobrimento.

Análise de proteínas presentes no recobrimento das nanopartículas

O ensaio SDS-PAGE foi realizado com o objetivo de comprovar a permanência das proteínas existentes no filtrado utilizado para a síntese das nanopartículas no recobrimento das mesmas. Os perfis de proteína de ambos os filtrados apresentaram bandas que coincidiram com seus respectivos recobrimentos, sendo um indício de que as proteínas do filtrado podem permanecer envolvendo as nanopartículas (Figura 4).

Figura 4 – Análise SDS-PAGE das nanopartículas e seus respectivos filtrados e recobrimentos, sendo **1**. Marcador de peso molecular Blueye Prestained ladder (Invitrogen) 11-245 kDa, **2**. Filtrado de *T. harzianum* sem estímulo. **3**. Recobrimento sem estímulo. **4**. AgNP-TC. **5**. AgNP-T. **6**. Filtrado de *T. harzianum* com estímulo. **7**. Recobrimento com estímulo. **8**. AgNP-TSC. **9**. AgNP-TS.



Foram observadas bandas de 36 kDa e 40 kDa nas amostras de filtrado e recobrimento, pesos moleculares correspondentes aos das enzimas de *T. harzianum* β -1,3-glucanase e quitinase, respectivamente, indicando a possível presença dessas enzimas, a qual foi confirmada pela análise de atividade enzimática específica.^{46,47} Não foram obtidas bandas nítidas para as amostras de nanopartículas recobertas e não-recobertas. No caso das nanopartículas recobertas, as fortes interações entre as proteínas e as nanopartículas previnem a migração das proteínas no

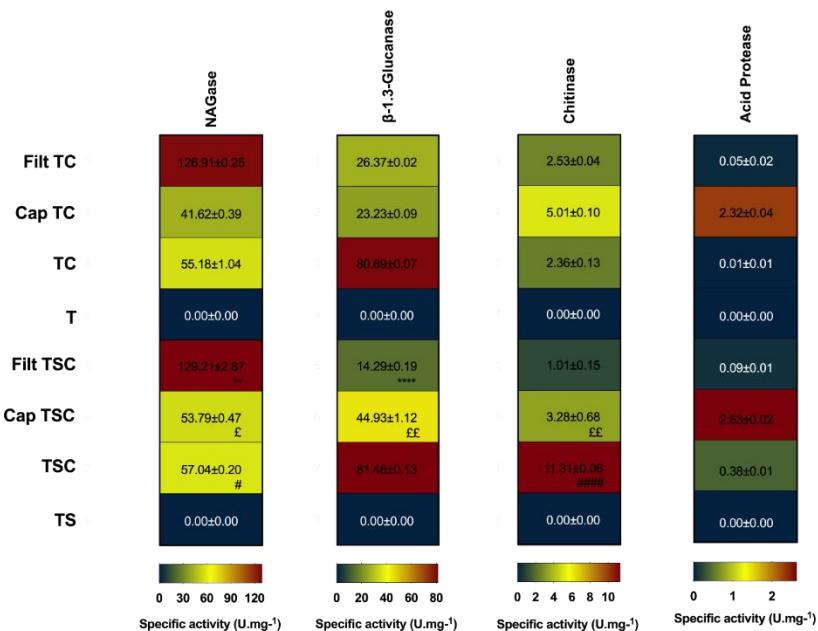
gel³⁷ e em relação às nanopartículas não-recobertas, as proteínas foram eliminadas das amostras nos processos de remoção do recobrimento e diálise.

A obtenção de bandas com o mesmo peso molecular nos filtrados e recobrimentos é uma confirmação da permanência das proteínas do filtrado envolvendo as nanopartículas.³⁷ Alguns estudos apresentaram resultados semelhantes aos aqui apresentados. Rodrigues *et al.* (2013) obtiveram as mesmas bandas de proteína (75, 122, 191 e 328 kDa) para o filtrado e para o recobrimento de nanopartículas sintetizadas a partir de *Aspergillus tubingensis*, o que confirma a participação das proteínas do filtrado na síntese e sua permanência envolvendo as nanopartículas.³⁵ Jain *et al.* (2011) realizaram a análise SDS-PAGE com o filtrado do fungo *Aspergillus flavus*, com as nanopartículas sintetizadas a partir do fungo e o recobrimento das nanopartículas, o qual foi removido por fervura em SDS 1%, e verificaram a presença de duas bandas intensas de 35 e 32 kDa no filtrado do fungo, sendo que a banda de 35 kDa também foi observada no recobrimento das nanopartículas. De acordo com os autores a síntese ocorre em duas etapas, na primeira a proteína de 32 kDa teria reduzido os íons de prata em nanopartículas e na segunda a proteína de 35 kDa teria se ligado às nanopartículas conferindo a elas estabilidade.³⁷ Chowdhury, Basu e Kundu (2014) também constataram a presença da mesma banda de 85 kDa no filtrado e no recobrimento de nanopartículas de prata sintetizadas a partir de *Macrophomina phaseolina*, indicando a permanência de compostos do fungo envolvendo as nanopartículas. Os autores consideram que essa banda seja formada por um componente do recobrimento, que confere estabilidade às nanopartículas.³⁶

Avaliação da atividade específica das enzimas hidrolíticas de *Trichoderma harzianum*

A avaliação da atividade específica de algumas enzimas hidrolíticas de *T. harzianum* que atuam no controle biológico de fitopatógenos permitiu constatar a presença e atividade dessas enzimas nos filtrados, recobrimentos e nanopartículas recobertas, não sendo verificada atividade nas amostras de nanopartículas não-recobertas. Dentre as enzimas estudadas, de uma forma geral, foi observada uma maior atividade de NAGase, seguida de β-1,3-glucanase, enquanto quitinase e protease ácida apresentaram baixos níveis de atividade. Os perfis de atividade enzimática específica das quatro enzimas estão apresentados na Figura 5.

Figura 5 – Atividade específica das enzimas hidrolíticas de *Trichoderma harzianum* (U/mg): N-Acetylglucosaminidase (NAGase), β -1,3-glucanase, Quitinase e Protease ácida. Filt TSC= filtrado com estímulo; Cap TSC= recobrimento com estímulo; TSC=nanopartículas com estímulo recobertas; TS=nanopartículas com estímulo não-recobertas; Filt TC= filtrado sem estímulo; Cap TC= recobrimento sem estímulo; TC= nanopartículas sem estímulo recobertas; T= nanopartículas sem estímulo não-recobertas. Diferença estatística significativa ($p < 0,05$) é indicada por * para comparação entre Filt TC e Filt TSC, £ para Cap TC e Cap TSC, # para TC e TSC, e -- para T e TS. Maior quantidade de símbolos indica maior significância estatística.



Comparando as amostras entre si, no caso de β -1,3-glucanase foi observada maior atividade em ambas as nanopartículas recobertas AgNP-TSC e AgNP-TC, enquanto a NAGase apresentou maior atividade em ambos os filtrados. Já a quitinase apresentou maior atividade em AgNP-TSC, seguida do recobrimento de AgNP-TC, e a protease apresentou maior atividade no recobrimento de AgNP-TSC. Essas variações podem ser decorrentes dos processos aos quais as amostras foram submetidas, como por exemplo a remoção do recobrimento, com etapas de aquecimento e centrifugação, considerando diferentes comportamentos das diferentes enzimas. Especificamente em relação ao estímulo da atividade enzimática utilizando a parede celular de *S. sclerotiorum*, tanto as nanopartículas recobertas sintetizadas com estímulo como as sintetizadas na ausência de estímulo apresentaram atividade específica, sendo observado um aumento significativo na atividade de quitinase para as nanopartículas recobertas sintetizadas com estímulo.

Como principal achado dessas análises, corroborando com os resultados do ensaio SDS-PAGE e da análise FTIR, foi possível confirmar a permanência e atividade das enzimas do filtrado nos recobrimentos, assim como nas nanopartículas recobertas. Tal resultado pode justificar a melhor atividade inibitória de ambas as nanopartículas recobertas em relação às não-

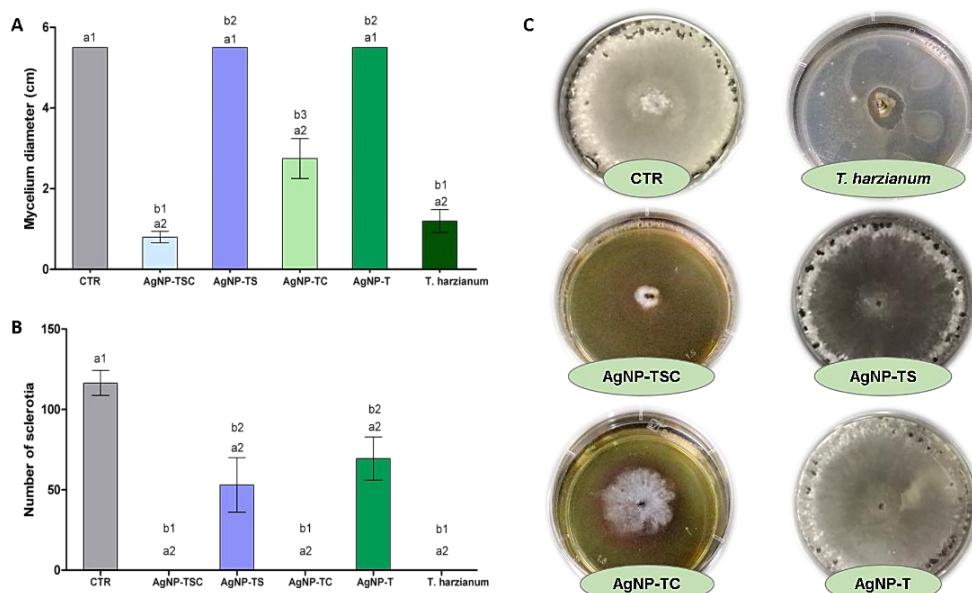
recobertas sobre o crescimento micelial e a germinação de *S. sclerotiorum*. As enzimas ativas presentes no recobrimento das nanopartículas podem estar agindo em sinergia com as nanopartículas potencializando o efeito das mesmas. Entretanto, ainda são necessárias maiores investigações.

A presença de proteínas e enzimas em nanopartículas biogênicas recobertas é uma questão interessante a ser investigada devido à importância desse recobrimento para a estabilidade, biocompatibilidade e possível intensificação da atividade biológica dessas nanopartículas.

Atividade biológica das nanopartículas sobre o fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum*

A atividade biológica das nanopartículas foi avaliada sobre o crescimento micelial e a formação de novos escleródios de *S. sclerotiorum* em meio de cultura suplementado com as amostras visando comparar os efeitos das nanopartículas recobertas e não-recobertas. Foi observada uma redução no crescimento micelial do fungo exposto as nanopartículas recobertas, com melhores resultados para AgNP-TSC, e ausência de formação de novos escleródios, enquanto ambas as nanopartículas não-recobertas apresentaram crescimento micelial por todo o diâmetro das placas, equivalente as placas controle, e formação de novos escleródios (Figuras 6A e 6B). O aspecto visual das culturas pode ser observado na figura 6C.

Figura 6 – Atividade biológica das nanopartículas AgNP-TSC, AgNP-TS, AgNP-TC e AgNP-T (3×10^9 NPs.mL $^{-1}$) sobre *S. sclerotiorum* A: Diâmetro micelial. B: Número de novos escleródios. C: Aspecto visual das culturas. Análise estatística: a. controle x AgNP; b. AgNP x AgNP. Diferentes números indicam diferença estatística significativa, $p < 0,05$.



A ausência de efeito das nanopartículas não-recobertas pode ser decorrente do maior tamanho, visto que nanopartículas maiores apresentam menor potencial citotóxico.^{48,49} Além disso, é importante considerar a permanência de compostos ativos provenientes de *T. harzianum* nas nanopartículas recobertas, os quais podem estar contribuindo para a inibição do fitopatógeno. Alguns estudos relatam que no processo de redução do nitrato de prata e ao se ligarem à superfície das nanopartículas as proteínas não sofrem deformações das estruturas secundárias, terciárias e das ligações covalentes.^{29,37} Dessa forma, podemos considerar a possibilidade das mesmas não perderem suas funções, contribuindo assim para a atividade biológica das nanopartículas.

Conforme as características e a composição do recobrimento das nanopartículas biogênicas podem ser estabelecidas ligações com algumas moléculas importantes, conferindo a elas novas funções e melhorando sua estabilidade coloidal,⁵⁰ além disso podem ser definidas as vias de internalização das nanopartículas nas células.⁵¹ De acordo com Zewde *et al.* (2016), a presença ou ausência de recobrimento, o tipo de recobrimento e a densidade do recobrimento têm grande influência sobre os efeitos antimicrobianos e o potencial citotóxico das nanopartículas.¹² Diante de tais resultados é possível sugerir que o recobrimento das nanopartículas pode exercer atividade antifúngica para o controle de *S. sclerotiorum* e contribuir para a manutenção das propriedades antifúngicas próprias das nanopartículas, conferindo a elas maior estabilidade.

Vários estudos verificaram o potencial de nanopartículas biogênicas aplicadas no controle de fungos fitopatogênicos. Elamawi, Al-Harbi e Hendi (2018) sintetizaram nanopartículas de prata utilizando o filtrado do fungo *Trichoderma longibrachiatum* e avaliaram o potencial destas para o controle dos fungos fitopatogênicos *Fusarium verticillioides*, *Fusarium moniliforme*, *Penicillium brevicompactum*, *Helminthosporium oryzae* e *Pyricularia grisea* *in vitro*, obtendo efeito inibitório sobre todas as espécies. Pela técnica FTIR os autores observaram bandas de proteína, indicando a presença de proteínas ligadas à superfície das nanopartículas, as quais sugerem estar contribuindo para a estabilização e prevenindo a aglomeração.³⁰ Abboud (2018) sintetizou nanopartículas de prata a partir de *Trichoderma harzianum* e avaliou os efeitos sobre *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata* e *Trichoderma harzianum*. Foi observada inibição da formação de colônias pelos fungos de forma concentração-dependente.⁵² Mishra *et al.* (2017) aplicaram nanopartículas de prata sintetizadas a partir da bactéria *Stenotrophomonas* sp. como nanofungicida para o controle de fitopatógenos foliares como *Alternaria alternata*, *Curvularia lunata* e *Bipolares sorokiniana* e

do solo, *Sclerotium rolfsii*. Foi observada inibição completa dos conídios e escleródios dos três fitopatógenos foliares expostos as nanopartículas em baixas concentrações.⁵³

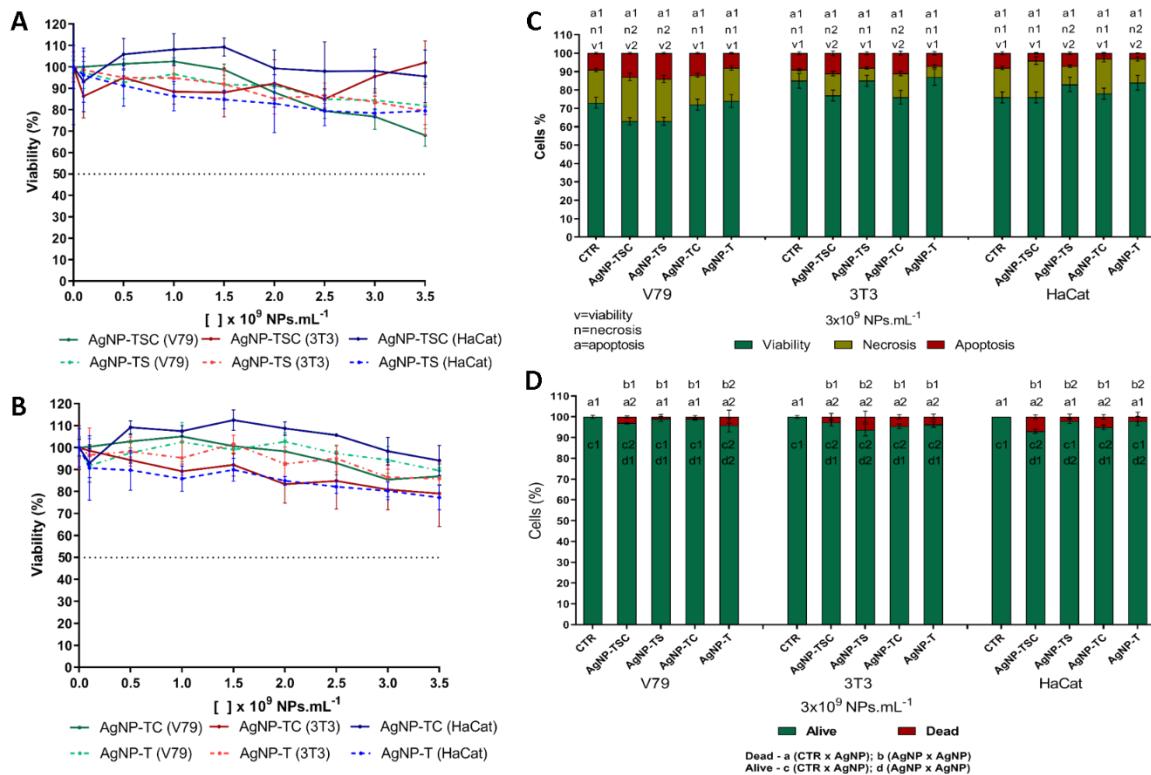
Apesar dos vários estudos investigando o potencial de nanopartículas de prata biogênicas para o controle de fitopatógenos da agricultura apresentarem resultados interessantes, o presente estudo tem o diferencial de considerar a importância do recobrimento para a qualidade e atividade biológica das nanopartículas, abrindo perspectivas para um estudo mais aprofundado, explorando essa especificidade das nanopartículas biogênicas.

Potencial efeito cito e genotóxico das nanopartículas sobre linhagens celulares e *Allium cepa*

Avaliação da citotoxicidade

Foram observadas diferenças na citotoxicidade das nanopartículas recobertas e não-recobertas pelo ensaio MTT, principalmente sobre a linhagem HaCat, na qual ambas as nanopartículas não-recobertas apresentaram maiores efeitos citotóxicos, entretanto não foram atingidos valores de IC₅₀ para nenhuma das amostras, o que indica baixa citotoxicidade nas concentrações de exposição (Figuras 7A e 7B). Os resultados dos ensaios de viabilidade por citometria de imagem e azul de tripan foram condizentes com os resultados dos ensaios de MTT, sendo observados baixos índices de morte celular (Figura 7C e 7D). Pela análise por citometria de imagem a linhagem celular V79 apresentou maior sensibilidade para todas as amostras. Diferentes linhagens celulares apresentam diferentes comportamentos quando expostas a nanopartículas de prata devido à diferença metabólica apresentada entre elas.¹⁵

Figura 7 – Avaliação da citotoxicidade das nanopartículas AgNP-TSC, AgNP-TS, AgNP-TC e AgNP-T. A: Ensaio de redução do tetrazólio (MTT) comparando AgNP-TSC e AgNP-TS; B: Ensaio de redução do tetrazólio (MTT) comparando AgNP-TC e AgNP-T; C: Viabilidade celular, necrose e apoptose por citometria de imagem; D: Ensaio de exclusão do azul de tripan. Análise estatística: Diferentes números indicam diferença estatística significativa, $p < 0,05$.



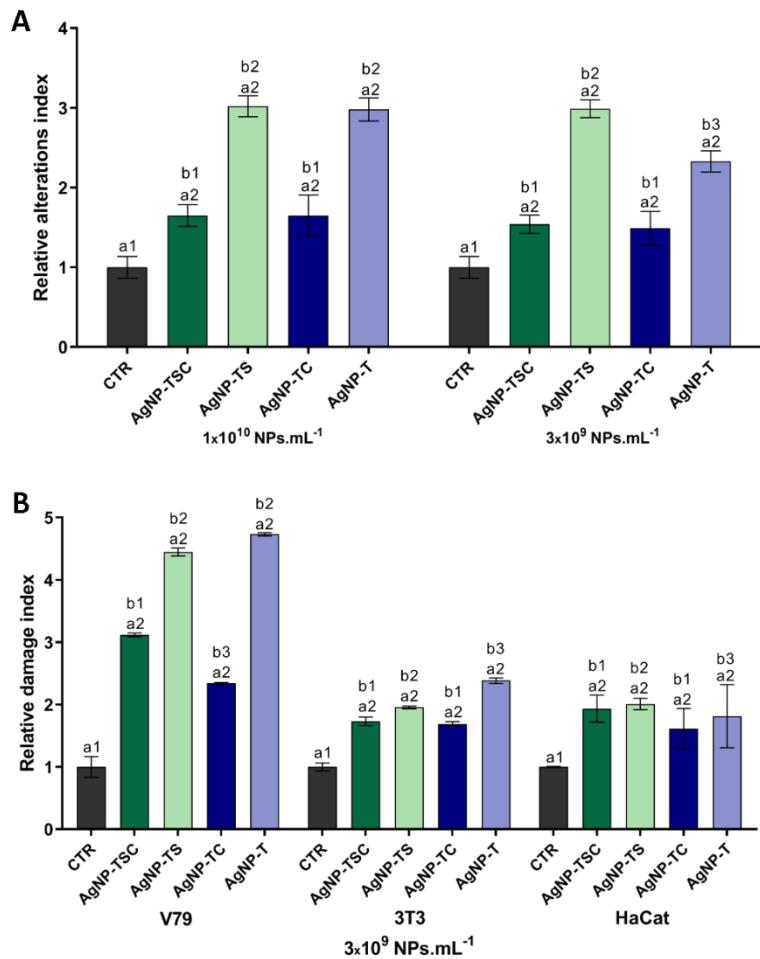
A citotoxicidade das nanopartículas de prata pode variar muito conforme o tipo de partícula e o processo de síntese, pois está relacionada com fatores como tempo de exposição, concentração, temperatura, tamanho, recobrimento e linhagem celular.^{15,30} Também é importante considerar que nanopartículas de prata biogênicas geralmente apresentam menor citotoxicidade que nanopartículas comerciais não-recobertas e íons de prata.¹⁰ Składanowski *et al.* (2016) sintetizaram nanopartículas de prata a partir de *Streptomyces* sp. NH28 e avaliaram sua citotoxicidade sobre a linhagem celular de fibroblastos de camundongo L929 pelo ensaio MTT. Foi observado que nas menores concentrações de exposição não houve citotoxicidade, e a viabilidade celular foi equivalente ao controle, sendo obtido IC₅₀ apenas em altas concentrações.⁵⁶ Apesar da ausência ou baixa citotoxicidade, também é importante avaliar os efeitos genotóxicos das novas nanopartículas.

Avaliação da genotoxicidade

Em relação à genotoxicidade, no ensaio *Allium cepa*, em ambas as concentrações de exposição, as nanopartículas não-recobertas apresentaram índices de alterações maiores que as

nanopartículas recobertas (Figura 8A). No ensaio cometa foram observados resultados semelhantes, sendo que as nanopartículas não-recobertas apresentaram maiores índices de danos quando comparadas às nanopartículas recobertas (Figura 8B). A linhagem V79 apresentou maior sensibilidade a todas as amostras em comparação com as demais linhagens celulares.

Figura 8 – Avaliação da genotoxicidade de AgNP-TSC, AgNP-TS, AgNP-TC e AgNP-T. A: Índice de alterações cromossômicas pelo ensaio *Allium cepa*. B: Índice de danos no DNA pelo ensaio cometa. Análise estatística: Diferentes números indicam diferença estatística significativa, $p<0,05$.



Os maiores efeitos genotóxicos ocasionados pelas nanopartículas não-recobertas podem estar relacionados ao fato do recobrimento, além de conferir estabilidade às nanopartículas impedindo que agreguem e percam suas propriedades, retarda a liberação de íons Ag^+ , os quais apresentam maior toxicidade em comparação com as nanopartículas compostas por $\text{Ag}^{0,57}$. Em doses não citotóxicas, algumas nanopartículas de prata podem induzir danos no DNA, aberrações cromossômicas e possível mutagenicidade.¹⁵ Daphedar e Taranath (2018) observaram aberrações cromossômicas dependentes da concentração e do tempo de exposição

em raízes meristemáticas da planta *Drimia polyantha* expostas a nanopartículas de prata biogênicas. Segundo os autores, quando as nanopartículas são internalizadas nas raízes podem causar vários tipos de alterações cromossômicas como pontes, anáfase multipolar, atrasos na divisão, falhas no fuso, c-metáfase, entre outras.³⁸

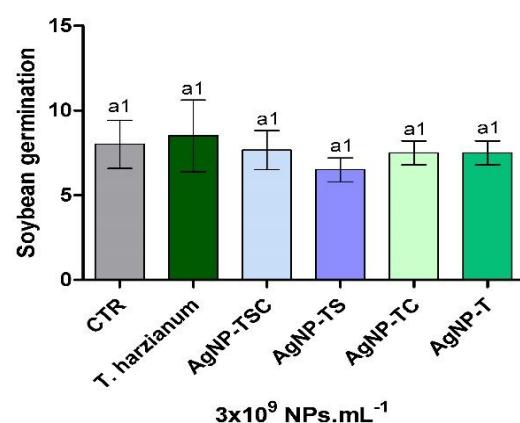
Os estudos de toxicidade de nanopartículas de prata biogênicas, de uma forma geral, apresentam resultados bastante variados devido aos diferentes tipos de agentes redutores e estabilizantes biológicos, diferentes composições de recobrimento e diferentes condições de síntese, os quais dão origem à nanopartículas com diferentes características e níveis de toxicidade.³⁰ Além disso, é difícil estabelecer comparações devido às diferentes concentrações de exposição e organismos expostos. Entretanto, é importante considerar a possibilidade de efeitos tóxicos, visando a síntese e aplicação desses nanomateriais de forma responsável e ambientalmente segura. Os efeitos citotóxicos e genotóxicos ocasionados pelas nanopartículas de prata podem ocorrer por meio da internalização das mesmas nas células, causando estresse oxidativo, danos na membrana, alterações no ciclo celular, respostas inflamatórias, danos no DNA e aberrações cromossômicas,⁵¹ bem como alterações na morfologia celular, redução da viabilidade e morte celular por apoptose e necrose.⁵⁸

Avaliação da toxicidade das nanopartículas sobre organismos não-alvo

Influência das nanopartículas sobre a germinação de sementes de soja

O resultado do teste de germinação de sementes de soja expostas as nanopartículas não mostrou alterações significativas para nenhuma das amostras, sendo todas equivalentes à germinação das sementes do controle e das sementes expostas a *T. harzianum* (Figura 9).

Figura 9 – Avaliação dos efeitos das nanopartículas AgNP-TSC, AgNP-TS, AgNP-TC e AgNP-T sobre a germinação de sementes de soja. Análise estatística: a. controle x AgNP. Diferentes números indicam diferença estatística significativa, p<0,05.



Mustafa *et al.* (2015) realizaram um estudo no qual constataram que a exposição à nanopartículas de prata potencializou o crescimento de plântulas de soja em condições de estresse por inundação, tendo contribuído para a redução do estresse por privação de oxigênio.⁵⁴ Pittol *et al.* (2017) avaliaram os efeitos de nanopartículas de prata sobre a germinação e o desenvolvimento de cebola (*Allium cepa*) e rabanete (*Raphanus sativus*) e observaram uma redução de 50% do crescimento das raízes de cebola expostas às nanopartículas em comparação com o controle negativo, enquanto que no caso dos rabanetes ocorreu um aumento na taxa de germinação de 80% no controle para 100% para as sementes expostas às nanopartículas. Segundo os autores, cada espécie de planta apresenta respostas específicas à exposição às nanopartículas.⁵⁵ No presente estudo, a ausência de efeitos das nanopartículas sobre a germinação das sementes de soja é um fator positivo, caso esse nanomaterial venha a ser utilizado para o controle de fitopatógenos que atingem essa cultura.

Avaliação da concentração inibitória mínima (MIC) sobre microrganismos de importância agrícola

Os valores de MIC variaram conforme as nanopartículas e as espécies de microrganismos de importância agrícola. De uma forma geral, os microrganismos apresentaram susceptibilidade às nanopartículas recobertas, com maior efeito antimicrobiano de AgNP-TSC, não sendo obtidos valores de MIC para os microrganismos expostos às nanopartículas não-recobertas nas concentrações de exposição (Tabela 1).

Tabela 1 – Valores de MIC para os microrganismos de importância agrícola expostos às nanopartículas AgNP-TSC, AgNP-TC, AgNP-TS e AgNP-T.

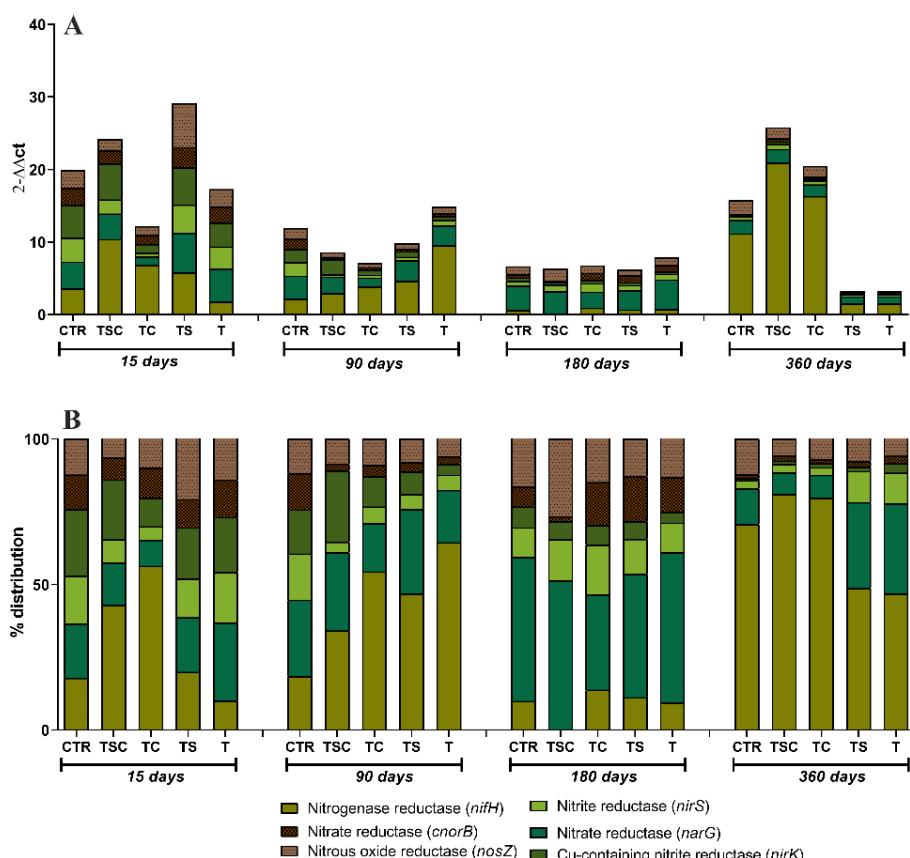
Microrganismo	AgNP-TSC	AgNP-TC	AgNP-TS	AgNP-T
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	$3,0 \times 10^9$ NPs.mL ⁻¹	$3,5 \times 10^9$ NPs.mL ⁻¹	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$2,5 \times 10^9$ NPs.mL ⁻¹	$3,5 \times 10^9$ NPs.mL ⁻¹	-	-
<i>Beauveria bassiana</i>	$1,5 \times 10^9$ NPs.mL ⁻¹	$3,0 \times 10^9$ NPs.mL ⁻¹	-	-
<i>Bacillus thuringiensis</i> 1	$4,0 \times 10^9$ NPs.mL ⁻¹	-	-	-
<i>Bacillus thuringiensis</i> 2	$2,0 \times 10^9$ NPs.mL ⁻¹	$3,5 \times 10^9$ NPs.mL ⁻¹	-	-
<i>Bacillus thuringiensis</i> 3	$3,5 \times 10^9$ NPs.mL ⁻¹	-	-	-

A ausência de efeitos das nanopartículas não-recobertas sobre os microrganismos de importância agrícola pode ser decorrente do maior diâmetro hidrodinâmico das mesmas e consequente redução do potencial antimicrobiano, visto que nanopartículas de prata de menor diâmetro apresentam maiores efeitos para o controle de microrganismos.^{59,60}

Análises moleculares dos efeitos das nanopartículas sobre a microbiota do solo por qPCR

De uma forma geral, as amostras de solo expostas as nanopartículas recobertas AgNP-TSC e AgNP-TC, apresentaram resultados mais próximos ao controle, tanto em relação à quantidade como em relação as proporções dos genes, o que pode ser observado com maior clareza nos resultados referentes ao dia 360 após a exposição. Os solos expostos as nanopartículas não-recobertas AgNP-TS e AgNP-T apresentaram a quantificação dos genes inferior aos 360 dias após a exposição (Figura 10).

Figura 10 – Análise molecular quantitativa de solos expostos as nanopartículas AgNP-TSC, AgNP-TC, AgNP-TS e AgNP-T após 15, 90, 180 e 360 dias. Em A) resultados da quantificação calculada por $2^{-\Delta\Delta ct}$. Em B) resultados das proporções de cada gene analisado.



Aos 15 dias após a exposição a alteração mais evidente em relação ao controle foi um aumento na proporção de nifH nas amostras de solo expostas as nanopartículas AgNP-TSC e AgNP-TC, o que indica aumento no processo de fixação do nitrogênio. Aos 90 dias o aumento da fixação ocorreu também em AgNP-TS e AgNP-T, sendo observada uma redução da primeira fase da denitrificação pelo gene nirS nas quatro amostras. Nesse período também foi observado aumento de cnorB, envolvido na segunda fase da denitrificação, em AgNP-TSC e redução desse gene em AgNP-T. Aos 180 dias AgNP-TSC apresentou as maiores alterações, com o desaparecimento de nifH e redução de cnorB, não sendo observadas alterações nas demais amostras em relação ao controle. Aos 360 dias as amostras de solo expostas as nanopartículas AgNP-TSC e AgNP-TC apresentaram maior semelhança com o controle em comparação com AgNP-TS e AgNP-T, o que indica que com o tempo a distribuição das bactérias expostas as nanopartículas recobertas tende a se recuperar. É importante considerar, como pode ser observado, que o solo controle, livre de exposição as nanopartículas, passou por alterações próprias do ciclo ao longo do período de análise.

Grün *et al.* (2019) avaliaram os efeitos de nanopartículas de prata não funcionalizadas e funcionalizadas com grupamentos amina ou grupamentos carboxila sobre bactérias do solo por meio da quantificação dos genes 16s rRNA, nifH e amoA. Foram observadas menores alterações na distribuição dos genes na amostra de solo exposta as nanopartículas funcionalizadas com grupamentos carboxila, com carga negativa. Os autores atribuíram esse resultado ao efeito do recobrimento, que reduziu a liberação de íons e o contato direto da prata com os microrganismos, além de ter permitido a ligação com cátions do solo, aumentando ainda mais essa barreira de contato.⁶¹ Em outro estudo, VandeVoort e Arai (2012) observaram que nanopartículas recobertas com polivinilpirrolidona (PVP) apresentaram maior afinidade com o solo e baixa toxicidade para bactérias envolvidas no processo de denitrificação quando comparadas a nanopartículas não-recobertas.⁶²

Em nosso estudo também podemos atribuir as menores alterações das nanopartículas recobertas, especialmente em relação à quantidade de bactérias, à presença do recobrimento. Também podemos relacionar esse resultado aos menores efeitos citotóxicos e genotóxicos das nanopartículas recobertas nos ensaios com exposição de culturas de células *in vitro* e *Allium cepa*, os quais podem estar vinculados à uma possível inibição da liberação de íons.

Conclusão

O presente estudo mostrou que nanopartículas biogênicas recobertas sintetizadas a partir de diferentes filtrados do fungo *Trichoderma harzianum* apresentam atividade biológica no controle do fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum* *in vitro* e que tais efeitos podem ser decorrentes da presença do recobrimento. As nanopartículas não-recobertas apresentaram aumento no diâmetro hidrodinâmico e não inibiram o desenvolvimento de *S. sclerotiorum*. Além disso, por meio da avaliação dos recobrimentos foi constatada a permanência de proteínas do filtrado envolvendo as nanopartículas, sendo detectada atividade específica de enzimas hidrolíticas de *T. harzianum*. Em relação à toxicidade, de uma forma geral, as nanopartículas recobertas apresentaram menores efeitos quando comparadas às não-recobertas. Essas descobertas abrem perspectivas para futuros estudos e uma maior investigação da composição e da importância do recobrimento de nanopartículas biogênicas direcionadas para aplicações no controle de fitopatógenos da agricultura.

Materiais e Método

Materiais

Neste estudo foram utilizadas nanopartículas de prata previamente sintetizadas a partir de *Trichoderma harzianum* com estímulo de produção enzimática pela presença da parede celular de *Sclerotinia sclerotiorum*, aqui denominadas AgNP-TSC ($57,02 \pm 1,75$ nm; $-18,70 \pm 3,01$ mV e polidispersão $0,49 \pm 0,01$), e na ausência deste estímulo, aqui denominadas AgNP-TC ($81,84 \pm 0,67$ nm; $-18,30 \pm 1,73$ mV e polidispersão $0,52 \pm 0,00$).²³ Em alguns ensaios também foram utilizados os filtrados de *T. harzianum* empregados na síntese e os recobrimentos removidos das nanopartículas.

As linhagens celulares V79 (fibroblasto pulmonar de hamster chinês), 3T3 (fibroblasto embrionário de swiss albino) e HaCat (queratinócito humano) foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (Rio de Janeiro, Brasil). Os microrganismos de importância agrícola *Bradyrhizobium japonicum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus thuringiensis* e *Beauveria bassiana* e o fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum* foram obtidos por doação. Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT) e Resazurin foram adquiridos da Sigma-AldrichTM. Ágar batata dextrose foi adquirido da KasviTM. O marcador de peso molecular de proteínas Blueye Prestained, o kit Apoptose Annexin V AlexaFluorTM 488 e Iodeto de Propídio, o kit de quantificação de DNA Qubit dsDNA HS e o SYBR Green foram adquiridos da InvitrogenTM.

As membranas de diálise Visking MWCO 12.000-14.000 foram adquiridas de ServaTM. O kit de extração de DNA do solo Power Soil foi obtido da QIAGENTM.

Métodos

Remoção do recobrimento das nanopartículas

Para analisar possíveis diferenças entre nanopartículas recobertas e não-recobertas foi realizada a remoção do recobrimento de metade do volume das amostras, conforme metodologia descrita por Jain *et al.* (2015).³² As dispersões de nanopartículas foram centrifugadas, e os *pellets* foram resuspensos e fervidos em Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) 1%, seguido de nova centrifugação. Os sobrenadantes contendo os recobrimentos foram armazenados a -20°C para posteriores análises de proteínas e enzimas. Para a obtenção das nanopartículas sem recobrimento os *pellets* foram fervidos em Tris-HCl, seguido por diálise utilizando membrana Visking MWCO 12.000-14.000 (Serva). As nanopartículas não-recobertas foram denominadas AgNP-TS (não-recobertas, com estímulo) e AgNP-T (não-recobertas, sem estímulo).

Caracterização e estabilidade das nanopartículas biogênicas

Após a remoção do recobrimento das nanopartículas foram realizadas as análises das quatro amostras e dos respectivos filtrados de *T. harzianum* por espectroscopia UV-Visível na faixa de comprimento de onda entre 200 e 800 nm, com resolução de 1 nm, utilizando o espectrofotômetro Multispec 1501 - Shimadzu. Também foi realizada a medição do pH das nanopartículas e de seus respectivos filtrados utilizando o medidor de pH HMMPB-210.

As técnicas de espalhamento dinâmico de luz (DLS) e microeletroforese foram empregadas para investigar o diâmetro hidrodinâmico, a polidispersão e o potencial zeta das amostras (ZetaSizer Nano ZS90 - Malvern Instruments). As leituras foram realizadas em triplicata, a 25°C, com um ângulo fixo de 90°. Para verificar a estabilidade das nanopartículas, essas análises foram repetidas nos períodos de seis meses e um ano após a síntese. As concentrações das amostras foram obtidas pela técnica de rastreamento de nanopartículas (NTA) (NanoSight LM 10 cell/NanoSight v. 2.3) e padronizadas para uma concentração de trabalho dispersando-se em água.

Análise da morfologia das nanopartículas

A morfologia das nanopartículas recobertas e não-recobertas foi avaliada por microscopia de força atômica (AFM). Alíquotas das nanopartículas foram diluídas em água ultrapura e 10 µL dessas amostras foram gotejadas em placas de silício para AFM e mantidas em dessecador até secagem completa. As amostras foram analisadas em um Microscópio de Força Atômica Easy Scan 2 Basic BT002217 (Nanosurf, Switzerland) operado em modo não contato. O instrumento foi equipado com cantilevers TapAl-G (BudgetSensors, Bulgaria) e operado a uma taxa de scan de 90 Hz. As micrografias adquiridas foram analisadas utilizando o software Gwyddion.

Análise das características do recobrimento das nanopartículas

Para as análises por espectroscopia de infravermelho das nanopartículas recobertas e não-recobertas foi utilizado um espetrômetro Jasco (FT/IR – 410). Foram confeccionadas pastilhas de brometo de potássio (KBr) com uma proporção de 1,5% de amostras de nanopartículas, cujo sólido foi obtido por liofilização de dispersões aquosas. Os espectros foram obtidos em uma faixa de 4000 a 400 cm⁻¹, 32 varreduras e resolução de 8 cm⁻¹.

Análise de proteínas presentes no recobrimento das nanopartículas

A técnica de eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE foi realizada para verificar a presença de proteínas provenientes de *T. harzianum* nos filtrados utilizados para a síntese e nos recobrimentos resultantes do processo de remoção, assim como nas próprias amostras de nanopartículas recobertas e não-recobertas. O ensaio foi realizado com base na metodologia de Chowdhury *et al.* (2014) com algumas adaptações³⁶. As amostras foram misturadas com tampão de amostra na proporção 1:1, aquecidas a 95°C por 10 minutos, centrifugadas a 14.000 rpm por 1 minuto e carregadas no gel na seguinte ordem: 1. Marcador de peso molecular Blueye Prestained ladder (Invitrogen) 11-245 kDa, 2. Filtrado de *T. harzianum* sem estímulo. 3. Recobrimento sem estímulo. 4. AgNP-TC. 5. AgNP-T. 6. Filtrado de *T. harzianum* com estímulo. 7. Recobrimento com estímulo. 8. AgNP-TSC. 9. AgNP-TS. A eletroforese foi conduzida com voltagem constante de 200V, 20 kV até o corante atingir a região inferior do gel. O gel foi corado utilizando solução de prata amoniacial e a análise dos perfis proteicos foi realizada visualmente com base no marcador de peso molecular.

Avaliação da atividade específica das enzimas hidrolíticas de *Trichoderma harzianum*

Inicialmente, foi determinada a concentração de proteínas nas amostras de filtrado, recobrimento e nanopartículas utilizando o reagente de Bradford (1976) e albumina sérica bovina (1 mg.mL^{-1} , $0,500 \text{ mg.mL}^{-1}$, $0,250 \text{ mg.mL}^{-1}$ e $0,125 \text{ mgmL}^{-1}$) como padrão.⁶³ A avaliação da atividade específica das enzimas hidrolíticas N-acetylglucosaminidase (NAGase), β -1,3-glucanase, quitinase e protease ácida de *T. harzianum* nos filtrados, recobrimentos e nanopartículas foi realizada com base na metodologia descrita por Qualhato *et al.* (2013).⁶⁴ Foram realizados ensaios em microplacas de 96 poços utilizando as amostras: filtrado de *T. harzianum* sem estímulo, recobrimento sem estímulo, AgNP-TC, AgNP-T, filtrado de *T. harzianum* com estímulo, recobrimento com estímulo, AgNP-TSC e AgNP-TS.

Atividade biológica das nanopartículas sobre o fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum*

Com o objetivo de comparar a atividade das nanopartículas recobertas e não-recobertas no controle de *S. sclerotiorum* foi realizado o ensaio de crescimento do fitopatógeno em ágar batata-dextrose suplementado com as amostras na concentração de $3 \times 10^9 \text{ NPs.mL}^{-1}$.^{19,23} Após 15 dias de cultura foi realizada a medição dos halos de crescimento micelial e a contagem de novos escleródios.

Potencial efeito cito e genotóxico das nanopartículas sobre linhagens celulares e *Allium cepa*

As análises de citotoxicidade e genotoxicidade foram realizadas visando comparar os efeitos das nanopartículas recobertas AgNP-TSC e AgNP-TC com suas respectivas amostras não-recobertas AgNP-TS e AgNP-T.

Avaliação da citotoxicidade

A citotoxicidade foi avaliada sobre as linhagens celulares V79, 3T3 e HaCat pelos ensaios de atividade mitocondrial por redução do tetrazólio (MTT), viabilidade celular, apoptose e necrose por citometria de imagem e viabilidade celular por exclusão do corante azul de tripan. Para o ensaio MTT as células foram plaqueadas (5×10^4 células/poço) e expostas às

n nanopartículas nas concentrações entre 0,1 e $3,5 \times 10^9$ NPs.mL⁻¹ por 24 horas. Em seguida foi adicionada solução de MTT (5 mg.mL⁻¹), incubado por 3 horas, com posterior fixação com DMSO e leitura a 540 nm. Para as análises de citometria de imagem e exclusão de azul de tripan a exposição das células foi realizada por 1 hora na concentração 3×10^9 NPs.mL⁻¹. As análises de viabilidade celular, apoptose e necrose por citometria de imagem foram realizadas utilizando o kit Apoptose Annexin V AlexaFluor® 488 e Iodeto de Propídio (Invitrogen) conforme especificação do fabricante e as leituras foram realizadas utilizando citômetro de imagem (Tali™ image cytometer). Para o ensaio de exclusão do azul de tripan, logo após o final da exposição às nanopartículas na concentração 3×10^9 NPs.mL⁻¹, as células foram coradas com azul de tripan, sendo então realizada contagem em microscópio ótico, em triplicata, considerando mortas as células coradas de azul.

Avaliação da genotoxicidade

Para avaliar a genotoxicidade das nanopartículas foram realizados os ensaios *Allium cepa* e cometa. O ensaio *Allium cepa* foi realizado com base em Lima *et al.* (2010).⁶⁵ A exposição às amostras de nanopartículas foi realizada nas concentrações 1×10^{10} NPs.mL⁻¹ e 3×10^9 NPs.mL⁻¹ por 24 horas, seguida de fixação e hidrólise das raízes, preparo das lâminas em triplicata e análise por microscopia ótica. Do total de células foram contabilizadas as que se apresentavam em divisão celular (Índice mitótico – IM) e destas, as que apresentavam alterações cromossômicas (Índice de alterações – IA).

O ensaio cometa foi realizado conforme metodologia adaptada de Singh *et al.* (1988).⁶⁶ As mesmas linhagens celulares utilizadas nos ensaios de citotoxicidade foram expostas às amostras a 3×10^9 NPs.mL⁻¹ por 1 hora e em seguida foram preparadas as lâminas, as quais foram mantidas em solução de lise por 1 hora, neutralizadas, mantidas em tampão de eletroforese por 20 minutos e submetidas à eletroforese a 22 V, 300 mA por 20 minutos. Foi então realizada fixação, coloração e análise microscópica por scoring visual.⁶⁷

Avaliação da toxicidade das nanopartículas sobre organismos não-alvo

Avaliação dos efeitos das nanopartículas sobre a germinação da soja

As sementes de soja foram previamente descontaminadas em hipoclorito 2%, lavadas em água ultrapura e colocadas para germinar sobre filtro de papel embebido com as nanopartículas na concentração de 3×10^9 NPs.mL⁻¹ em placas de petri. Foram colocadas 13

sementes por placa, com 3 placas por tratamento, utilizando como controle replicatas com filtro de papel embebido com água ultrapura e replicatas contendo *T. harzianum* ($127 \mu\text{g. mL}^{-1}$). As placas foram mantidas em estufa a 25°C , no escuro, pelo período de 5 dias e em seguida foi realizada contagem das sementes que germinaram.

Avaliação da concentração inibitória mínima (MIC) sobre microrganismos de importância agrícola

O teste MIC foi realizado utilizando os microrganismos de importância agrícola *Bradyrhizobium japonicum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Beauveria bassiana* e três diferentes cepas de *Bacillus thuringiensis* (BT1, BT2 e BT3). Os microrganismos foram cultivados por 24 horas, transferidos para placas de 96 poços em uma concentração de 5×10^5 UFC/mL e expostos às nanopartículas em concentrações decrescentes, entre $4,0 \times 10^9 \text{ NPs.mL}^{-1}$ e $1,0 \times 10^8 \text{ NPs.mL}^{-1}$. Após incubação a 37°C por 24 horas foi adicionada solução de Resazurina ($6,75 \text{ mg.mL}^{-1}$) e as placas foram incubadas por mais 24 horas, sendo então realizada análise visual da coloração.

Análises moleculares dos efeitos das nanopartículas sobre a microbiota do solo por qPCR

Para verificar os possíveis efeitos das nanopartículas sobre as bactérias do solo que atuam no ciclo do nitrogênio, nos processos de fixação, nitrificação e denitrificação, foi realizada exposição do solo às nanopartículas na concentração de $3 \times 10^9 \text{ NPs.mL}^{-1}$, em microcosmos contendo 10 g de solo.⁶⁸ Também foi preparado um controle com água ultrapura. Os microcosmos foram mantidos em temperatura ambiente, na ausência de luz. No dia da exposição foi realizada extração do DNA de uma amostra de solo sem tratamento (denominada solo zero), indicando as condições iniciais. As extrações de DNA de todas as amostras foram então realizadas nos intervalos de 15, 90, 180 e 360 dias após a exposição, utilizando o kit Power Soil DNA Isolation (QIAGENTM) e o DNA foi quantificado utilizando o kit de quantificação de DNA Qubit dsDNA HS (Qubit 3.0 FluorometerTM) e diluído para a concentração final de 100 ng/mL. A quantificação de genes de bactérias do ciclo do nitrogênio foi realizada com primers específicos através de reação em cadeia de polimerase em tempo real (qPCR), utilizando Syber Green.⁶⁹ Para a quantificação relativa do DNA foi utilizado como gene referência 16srRNA, sendo todas as amostras avaliadas em triplicata.

Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas pela análise de variância one way (ANOVA) seguida do teste de Tukey, com nível de significância de $p<0,05$, utilizando o programa GraphPad Prism 7.0.

Agradecimentos

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (#2016/13692-6; #2017/13328-5; #2017/20932-6, #2017/21004-5), Laboratório de Nanotecnologia Ambiental (UNESP – Sorocaba), Universidade de Sorocaba (UNISO).

Referências

- (1) Alghuthaymi, M. A.; Almoammar, H.; Rai, M.; Said-Galiev, E.; Abd-Elsalam, K. A. Myconanoparticles: Synthesis and Their Role in Phytopathogens Management. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* **2015**, 29, 221-236.
- (2) Pantidos, N.; Horsfall, L. E. Biological Synthesis of Metallic Nanoparticles by Bacteria, Fungi and Plants. *J. Nanomed. Nanotechnol.* **2014**, 5, 1-10.
- (3) Kumar, S. A.; Abyaneh, M. K.; Gosavi, S. W.; Kulkarni, S. K.; Pasricha, N.; Ahmad, A.; Khan, M. I. Nitrate Reductase-Mediated Synthesis of Silver Nanoparticles from AgNO_3 . *Biotechnol. Lett.* **2007**, 29, 439-445.
- (4) Li, G.; He, D.; Qian, Y.; Guan, B.; Gao, S.; Cui, Y.; Yokoyama, K.; Wang, L. Fungus-Mediated Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using *Aspergillus terreus*. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, 13, 466-476.
- (5) Singh, P.; Kim, Y.; Zhang, D.; Yang, D. Biological Synthesis of Nanoparticles from Plants and Microorganisms. *Trends Biotechnol.* **2016**, 34, 588-599.
- (6) Tripathi, R. M., Gupta, R. K., Shrivastav, A., Singh, M. P., Shrivastav, B. R., Singh, P. *Trichoderma koningii* Assisted Biogenic Synthesis of Silver Nanoparticles and Evaluation of Their Antimicrobial Activity. *Adv. Nat. Sci.: Nanosci. Nanotechnol.* **2013**, 4, 1-5.
- (7) Khan, S. A., Ahmad, A. Enzyme Mediated Synthesis of Water-Dispersible Nanoparticles, Naturally Protein Capped, Monodispersed Gold Nanoparticles; Their Characterization and Mechanistic Aspect. *RSC Adv.* **2014**, 4, 7729-7734.
- (8) Sanghi, R.; Verma, P. Biomimetic Synthesis and Characterization of Protein Capped Silver Nanoparticles. *Bioresour. Technol.* **2009**, 100, 500-504.
- (9) Singh, P.; Garg, A.; Pandit, S.; Mokkapati, S. S. S.; Mijakovic, I. Antimicrobial Effects of Biogenic Nanoparticles. *Nanomaterials* **2018**, 8, 1-19.
- (10) Lima, R.; Seabra, A. B.; Durán, N. Silver Nanoparticles: A Brief Review of Cytotoxicity and Genotoxicity of Chemically and Biogenically Synthesized Nanoparticles. *J. Appl. Toxicol.* **2012**, 32, 867-879.
- (11) Sharma, D.; Kanchi, S.; Bisetty, K. Biogenic Synthesis of Nanoparticles: A Review. *Arabian J. Chem.* **2019**, 12, 3576-3600.
- (12) Zewde, B.; Ambaye, A.; Stubbs, J.; Raghavan, D. A. Review of Stabilized Silver Nanoparticles – Synthesis, Biological Properties, Characterization, and Potential Areas of Applications. *JSM Nanotechnol. Nanomed.* **2016**, 4, 1-14.

- (13) Bhunia, A. K.; Samanta, P. K.; Aich, D.; Saha, S.; Kamilya, T. Biocompatibility Study of Protein Capped and Uncapped Silver Nanoparticles on Human Hemoglobin. *J. Phys. D: Appl. Phys.* **2015**, 48, 1-10.
- (14) Gurunathan, S.; Kalishwaralal, K.; Vaidyanathan, R.; Deepak, V.; Pandian, S. R. K.; Muniyand, J.; Hariharan, N.; Eom, S. H. Biosynthesis, Purification and Characterization of Silver Nanoparticles Using *Escherichia coli*. *Colloids Surf., B* **2009**, 74, 328–335.
- (15) Zhang, T.; Wang, L.; Chen, Q.; Chen, C. Cytotoxic Potential of Silver Nanoparticles. *Yonsei Med J.* **2014**, 55, 283-291.
- (16) Banik, S.; Sharma, P. Plant Pathology in the Era of Nanotechnology. *Indian Phytopath.* **2011**, 64, 120-127.
- (17) Bolton, M. D.; Thomma, B. P. H. J.; Nelson, B. D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary: Biology and Molecular Traits of a Cosmopolitan Pathogen. *Mol. Plant Pathol.* **2006**, 7, 1-16.
- (18) Krishnaraj, C.; Ramachandran, R.; Mohan, K.; Kalaichelvan, P. T. Optimization for Rapid Synthesis of Silver Nanoparticles and Its Effect on Phytopathogenic Fungi. *Spectrochim. Acta, Part A* **2012**, 93, 95-99.
- (19) Guilger, M.; Pasquoto-Stigliani, T.; Bilesky-Jose, N.; Grillo, R.; Abhilash, P. C.; Fraceto, L. F.; Lima, R. Biogenic Silver Nanoparticles Based on *Trichoderma harzianum*: Synthesis, Characterization, Toxicity Evaluation and Biological Activity. *Sci. Rep.* **2017**, 7, 1-13.
- (20) Min, J. S.; Kim, K. S.; Kim, S. W.; Jung, J. H.; Lamsal, K.; Kim, S. B.; Jung, M.; Lee, Y. S. Effects of Colloidal Silver Nanoparticles on Sclerotium-Forming Phytopathogenic Fungi. *Plant Pathol. J.* **2009**, 25, 376-380.
- (21) Elgorban, A. M.; Aref, S. M.; Seham, S. M.; Elhindi, K. M.; Bahkali, A. H.; Sayed, S. R.; Manal, M. A. Extracellular Synthesis of Silver Nanoparticles Using *Aspergillus versicolor* and Evaluation of Their Activity on Plant Pathogenic Fungi. *Mycosphere* **2016**, 7, 844-852.
- (22) Mahdizadeh, V.; Safaei, N.; Khelghatibana, F. Evaluation of Antifungal Activity of Silver Nanoparticles Against Some Phytopathogenic Fungi and *Trichoderma harzianum*. *J. Crop Prot.* **2015**, 4, 291-300.
- (23) Guilger-Casagrande, M.; Germano-Costa, T.; Pasquoto-Stigliani, T.; Fraceto, L. F.; Lima, R. Biosynthesis of Silver Nanoparticles Employing *Trichoderma harzianum* with Enzymatic Stimulation for the Control of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Sci. Rep.* **2019**, 9, 1-9.
- (24) Singh, D.; Rathod, V.; Ninganagouda, S.; Hiremath, J.; Singh, A. K.; Mathew, J. Optimization and Characterization of Silver Nanoparticle by Endophytic Fungi *Penicillium* sp. Isolated from *Curcuma longa* (Turmeric) and Application Studies against MDR *E. coli* and *S. aureus*. *Bioinorg. Chem. Appl.* **2014**, 2014, 1-8.
- (25) Mohanta, T. K.; Panda, S. K.; Jayabalan, R.; Sharma, N.; Bastia, A. K.; Mohanta, T. K. Antimicrobial, Antioxidant and Cytotoxic Activity of Silver Nanoparticles Synthesized by Leaf Extract of *Erythrina suberosa* (Roxb.). *Front. Mol. Biosci.* **2017**, 4, 1-9.
- (26) Abdelrahim, K.; Mahmoud, S. Y.; Ali, A. M.; Almaary, K. S.; Mustafa, A. E . M. A.; Husseiny, S. M. Extracellular Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using *Rhizopus Stolonifer*. *Saudi J. Biol. Sci.* **2017**, 24, 208-216.
- (27) Gurunathan, S.; Park, J. H.; Han, J. W.; Kim, J. H. Comparative Assessment of the Apoptotic Potential of Silver Nanoparticles Synthesized by *Bacillus tequilensis* and *Calocybe indica* in MDA-MB-231 Human Breast Cancer Cells: Targeting P53 for Anticancer Therapy. *Int J Nanomed.* **2015**, 10, 4203–4223.
- (28) Suresh, A. K.; Pelletier, D. A.; Wang, W.; Morrell-Falvey, J. L.; Gu, B.; Dokttcz, M. J. Cytotoxicity Induced by Engineered Silver Nanocrystallites is Dependent on Surface Coatings and Cell Types. *Langmuir* **2012**, 28, 2727-2735.

- (29) Ballotin, D.; Fulaz, S.; Souza, M. L.; Corio, P.; Rodrigues, A. G.; Souza, A. O.; Gaspari, P. M.; Gomes, A. F.; Gozzo, F.; Tasic, L. Elucidating Protein Involvement in the Stabilization of the Biogenic Silver Nanoparticles. *Nanoscale Res. Lett.* **2016**, 11, 1-9.
- (30) Elamawi, R. M.; Al-Harbi, R. E.; Hendi, A. A. Biosynthesis and Characterization of Silver Nanoparticles Using *Trichoderma longibrachiatum* and Their Effect on Phytopathogenic Fungi. *Egyptian Journal of Biological Pest Control* **2018**, 28, 1-11.
- (31) Behra, R.; Sigg, L.; Clift, M. J. D.; Herzog, F.; Minghetti, M.; Johnston, B.; Petri-Fink, A.; Rothen-Rutishauser, B. Bioavailability of Silver Nanoparticles and Ions: from a Chemical and Biochemical Perspective. *J. R. Soc. Interface* **2013**, 10, 1-15.
- (32) Jain, N.; Bhargava, A.; Rathi, M.; Dilip, V.; Panwar, J. Removal of Protein Capping Enhanced the Antibacterial Efficiency of Biosynthesized Silver Nanoparticles. *PloS One* **2015**, 10, 1-19.
- (33) Zhang, H.; Chen, B.; Banfield, J. F. Particle Size and pH Effects on Nanoparticle Dissolution. *J. Phys. Chem. C* **2010**, 114, 14876-14884.
- (34) Sumithra, M.; Aparna, Y.; Rao, P. R.; Reddy, K. S.; Reddy, P. R. Morphological Change of Silver Nanoparticles by the Effect of Synthesis Parameters. *Mater. Today: Proc.* **2016**, 3, 2278-2283.
- (35) Rodrigues, A. G.; Ping, L. Y.; Marcato, P. D.; Alves, O. L.; Silva, M. C. P.; Ruiz, R. C.; Melo, I. S.; Tasic, L.; De Souza, A. O. Biogenic Antimicrobial Silver Nanoparticles Produced By Fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, 97, 1-8.
- (36) Chowdhury, S.; Basu, A.; Kundu, S. Green Synthesis of Protein Capped Silver Nanoparticles from Phytopathogenic Fungus *Macrophomina Paseolina*. *Nanoscale Res. Lett.* **2014**, 9, 1-11.
- (37) Jain, N.; Bhargava, A.; Majumdar, S.; Tarafdar, J. C.; Panwar, J. Extracellular Biosynthesis and Characterization of Silver Nanoparticles Using *Aspergillus flavus* NJP08: A Mechanism Perspective. *Nanoscale* **2011**, 3, 635-641.
- (38) Daphedar, A.; Taranath, T. C. Characterization and Cytotoxic Effect of Biogenic Silver Nanoparticles on Mitotic Chromosomes of *Drimia polyantha* (Blatt. & Mccann) Stearn. *Toxicol Rep.* **2018**, 5, 910-918.
- (39) Priya, K.; Vijayakumar, M.; Janani, B. Chitosan-Mediated Synthesis of Biogenic Silver Nanoparticles (AgNPs), Nanoparticle Characterisation and *in Vitro* Assessment of Anticancer Activity in Human Hepatocellular Carcinoma HePG2 Cells. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, 149, 844-852.
- (40) Ahluwalia, V.; Kumar, J.; Sisodia, R.; Shakil, N. A.; Walia, S. Green Synthesis of Silver Nanoparticles by *Trichoderma harzianum* and Their Bio-Efficacy Evaluation Against *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumonia*. *Ind. Crops Prod.* **2014**, 55, 202-206.
- (41) Jyoti, K.; Baunthiyal, M.; Singh, A. Characterization of Silver Nanoparticles Synthesized Using *Urtica dioica* Linn. Leaves and Their Synergistic Effects with Antibiotics. *J. Radiat. Res. Appl. Sci.* **2016**, 9, 217-227.
- (42) Parmar, A.; Kaur, G.; Kapil, S.; Sharma, V.; Choudhary, M. K.; Sharma, S. Novel Biogenic Silver Nanoparticles as Invigorated Catalytic and Antibacterial Tool: A Cleaner Approach Towards Environmental Remediation and Combating Bacterial Invasion. *Mater. Chem. Phys.* **2019**, 238, 1-10.
- (43) Li, X.; Odoom-Wubah, T.; Huang, J. (2018). Biosynthesis of Ag–Pd Bimetallic Alloy Nanoparticles Through Hydrolysis of Cellulose Triggered by Silver Sulfate. *RSC Adv.* **2018**, 8, 30340-30345.
- (44) Emmons, E. D.; Fallas, J. C.; Kamisetty, V. K.; Chien, W. M.; Covington, A. M.; Chellappa, R. S.; Gramsch, S. A.; Hemley, R. J.; Chandra, D. High-Pressure Raman Spectroscopy of Tris (Hydroxymethyl) Aminomethane. *J Phys Chem B.* **2010**, 114, 5649-5656.

- (45) Wu, R.; Yao, Y. Tris (Hydroxymethyl) Aminomethane, a Pure Organic Thermal Stabilizer for Poly (Vinyl Chloride). In: *International Conference on Materials for Renewable Energy and Environment* **2013**, 2, 613-616.
- (46) Marco, J. L.; Felix, C. R. Purification and Characterization of a β -Glucanase Produced by *Trichoderma harzianum* Showing Biocontrol Potential. *Braz. Arch. Biol. Technol.* **2007**, 50, 21-29.
- (47) Ulhoa, C. J.; Peberdy, J. F. Purification and Some Properties of the Extracellular Chitinase Produced by *Trichoderma harzianum*. *Enzyme Microb. Technol.* **1992**, 14, 236-240.
- (48) Carlson, C.; Hussain, S. M.; Schrand, A. M.; Braydich-Stolle, L. K.; Hess, K. L.; Jones, R. L.; Schlager, J. J. Unique Cellular Interaction of Silver Nanoparticles: Size-Dependent Generation of Reactive Oxygen Species. *J. Phys. Chem. B.* **2008**, 112, 13608-13619.
- (49) Zhao, W.; Lu, X.; Yuan, Y.; Liu, C.; Yang, B.; Hong, H.; Wang, G.; Zeng, F. Effect of Size and Processing Method on the Cytotoxicity of Realgar Nanoparticles in Cancer Cell Lines. *Int J Nanomed.* **2011**, v. 6, p. 1569–1577.
- (50) Seabra, A. B.; Durán, N. Nitric Oxide-Releasing Vehicles for Biomedical Applications. *J. Mater. Chem.* **2010**, 20, 1624-1637.
- (51) Asharani, P. V.; Hande, M. P.; Valiyaveettil, S. Anti-Proliferative Activity of Silver Nanoparticles. *BMC Cell Biol.* **2009**, 10, 1-14.
- (52) Abboud, M. A. A. Fungal Biosynthesis of Silver Nanoparticles and Their Role in Control of Fusarium Wilt of Sweet Pepper and Soil-borne Fungi in Vitro. *Int. J. Pharmacol.* **2018**, 14, 773-780.
- (53) Mishra, S.; Singh, B. R.; Naqvi, A. H.; Singh, H. B. Potential of Biosynthesized Silver Nanoparticles Using *Stenotrophomonas* sp. BHU-S7 (MTCC 5978) for Management of Soil-Borne and Foliar Phytopathogens. *Sci Rep.* **2017**, 7, 1-15.
- (54) Mustafa, G.; Sakata, K.; Hossain, Z.; Komatsu, S. Proteomic Study on the Effects of Silver Nanoparticles on Soybean Under Flooding Stress. *J Proteomics* **2015**, 122, 100-118.
- (55) Pittol, M.; Tomacheski, D.; Simões, D. N.; Ribeiro, V. F.; Santana, R. M. C. Macroscopic Effects of Silver Nanoparticles and Titanium Dioxide on Edible Plant Growth. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, **2017**, 8, 127-133.
- (56) Skladanowski, M.; Golinska, P.; Rudnicka, K.; Dahm, H.; Rai, M. Evaluation of Cytotoxicity, Immune Compatibility and Antibacterial Activity of Biogenic Silver Nanoparticles. *Med. Microbiol. Immunol.* **2016**, 205, 603-613.
- (57) Misra, S. K.; Dybowska, A.; Berhanu, D.; Luoma, S. N.; Valsami-Jones, E. The Complexity of Nanoparticles Dissolution and Its Importance in Nanotoxicological Studies. *Sci. Total Environ.* **2012**, 438, 225-232.
- (58) Jiang, X.; Foldbjerg, R.; Miclaus, T.; Wang, L.; Singh, R.; Hayashi, Y.; Sutherland, D.; Chen, C.; Autrup, H.; Beer, C. Multi-Platform Genotoxicity Analysis Of Silver Nanoparticles In The Model Cell Line CHO-K1. *Toxicol Lett.* **2013**, 222, 55-63.
- (59) Kim, D.H.; Park, J.C.; Jeon, G.E.; Kim, C. S.; Seo, J. H. Effect of the Size and Shape of Silver Nanoparticles on Bacterial Growth and Metabolism by Monitoring Optical Density and Fluorescence Intensity. *Biotechnol. Bioprocess.* **2017**, 22, 210–217.
- (60) Ivask, A.; Kurvet, I.; Kasemets, K.; Blinova, I.; Aruoja, V.; Suppi, S.; Vija, H.; Käkinen, A.; Titma, T.; Heinlaan, M.; et al. Size-Dependent Toxicity of Silver Nanoparticles to Bacteria, Yeast, Algae, Crustaceans and Mammalian Cells in Vitro. *PLoS One* **2014**, 9, 1-14.
- (61) Grün, A. L.; Manz, V.; Kohl, Y. L.; Meier, F.; Straskraba, S.; Jost, C.; Drexel, R.; Emmerling, C. Impact of Silver Nanoparticles (AgNP) on Soil Microbial Community Depending on Functionalization, Concentration, Exposure Time, and Soil Texture. *Environ. Sci. Eur.* **2019**, 31, 1-22.

- (62) VandeVoort, A. R.; Arai, Y. Effect of Silver Nanoparticles on Soil Denitrification Kinetics. *Ind. Biotechnol.* **2012**, 8, 358-364.
- (63) 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.* **1976**, 7, 248-254.
- (64) Qualhato, T. F.; Lopes, F. A. C.; Steindorf, A. S.; Brandão, R. S.; Jesuino, R. S. A.; Ulhoa, C. J. Mycoparasitism Studies of Trichoderma Species Against Three Phytopathogenic Fungi: Evaluation of Antagonism and Hydrolytic Enzyme Production. *Biotechnol. Lett.* **2013**, 35, 1461–1468.
- (65) Lima, R.; Feitosa, L. O.; Pereira, A. E.; Moura, M. G.; Aouada, F. A.; Mattoso, L. H. C.; Fraceto, L. F. Evaluation of the Genotoxicity of Chitosan Nanoparticles for Use in Food Packaging Films. *J. Food Sci.* **2010**, 75, 89-96.
- (66) Singh, N. P.; Mccoy, M. T.; Tice, R. R.; Schneider, E. L. A Simple Technique for Quantification of Low Levels of DNA Damage in Individual Cells. *Exp. Cell. Res.* **1988**, 175, 175-184.
- (67) Collins, A. R., Fleming, I. M., Gedik, C. M. *In Vitro* Repair of Oxidative and Ultraviolet-Induced DNA Damage in Supercoiled Nucleoid DNA by Human Cell Extract. *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, 1219, 724–727.
- (68) Hjelmso, M. H.; Hansen, L. H.; Baelum, J.; Feld, L.; Holben, W. E.; Jacobsen, C. S. High-Resolution Melt Analysis for Rapid Comparison of Bacterial Community Compositions. *Appl. Environ. Microbiol.* **2014**, 80, 3568–3575.
- (69) Maruyama, C. R.; Guilger, M.; Pascoli, M.; Bilesky-Jose, N.; Abhilash, P. C.; Fraceto, L. F.; Lima, R. Nanoparticles Based on Chitosan as Carriers for the Combined Herbicides Imazapic and Imazapyr. *Sci. Rep.* **2016**, 6, 1-13.

3.4 CAPITULO IV - SÍNTESE BIOGÊNICA DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA EM MAIOR ESCALA, CONTROLE DE *Sclerotinia sclerotiorum* E AVALIAÇÃO DOS EFEITOS SOBRE PLANTAS DE SOJA

O quarto capítulo traz um artigo no qual uma das nanopartículas apresentadas nos capítulos anteriores foi selecionada para síntese em maior escala. A nanopartícula recoberta, sem estímulo, foi selecionada devido à conhecida eficiência para o controle do fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum* e ao processo de síntese com menos etapas. Após a síntese foi realizada caracterização físico-química e avaliação do potencial inibitório das nanopartículas sobre o fungo fitopatogênico *Sclerotinia sclerotiorum*. Considerando a importância de se conhecer os possíveis efeitos das nanopartículas sobre organismos não-alvo e que a soja é uma das culturas mais atingidas pelo fitopatógeno, foram analisados parâmetros morfológicos e fisiológicos de plantas de soja cultivadas em solo exposto às nanopartículas.

Síntese biogênica de nanopartículas de prata em maior escala, controle de *Sclerotinia sclerotiorum* e avaliação dos efeitos sobre plantas de soja

Mariana Guilger-Casagrande^f, Tatiane Pasquoto-Stigliani^f, Natália Bilesky-Jose^f, Bruno T. Sousa[§],
Halley C. Oliveira[§], Leonardo F. Fraceto[#], e Renata de Lima^{f*}

^fLaboratório de Avaliação de Bioatividade e Toxicologia de Nanomateriais, Universidade de Sorocaba (UNISO), Rod. Raposo Tavares km 92,5, Sorocaba, São Paulo, 18023-000, Brasil

[§] Departamento de Biologia Animal e Vegetal, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Rod. Celso Garcia Cid km 380, Londrina, Paraná, 86057-970, Brasil

[#] Laboratório de Nanotecnologia Ambiental, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Av. Três de Março 511, Sorocaba, São Paulo, 18087-180, Brasil

Resumo

Nanopartículas biogênicas de prata apresentam potencial fungicida e vêm se destacando como alternativa para o controle de fitopatógenos. Entretanto, aumentar o volume da síntese é um desafio. Neste estudo sintetizamos nanopartículas de prata em maior escala utilizando o filtrado do fungo *Trichoderma harzianum*. Avaliamos o potencial dessas nanopartículas para o controle do fungo fitopatogênico *Sclerotinia sclerotiorum* *in vitro* e investigamos os possíveis efeitos sobre o desenvolvimento e morfologia, a fotossíntese, o estresse oxidativo e a expressão de genes envolvidos na lignificação, em plantas de soja cultivadas em vasos em casa de vegetação. A síntese resultou em 3,13 litros de nanopartículas, as quais apresentaram um maior rendimento e características físico-químicas muito próximas das nanopartículas sintetizadas em menor escala. Em relação aos efeitos sobre *S. sclerotiorum*, as nanopartículas inibiram o crescimento micelial e a formação de novos escleródios *in vitro*. As plantas de soja expostas às nanopartículas apresentaram maior área foliar e menor matéria seca das raízes em comparação com as plantas controle. Nos parâmetros relacionados às trocas gasosas ocorreu redução da condutância estomática e aumento da eficiência intrínseca do uso da água, não sendo observadas alterações nas taxas fotossintética e de pigmentos. Foi observado aumento dos níveis de peróxido de hidrogênio nas folhas e raízes, porém não ocorreu aumento de peroxidação lipídica, nem aumento da expressão de genes da lignificação. Portanto, é possível ampliar a síntese de nanopartículas de prata a partir de *T. harzianum*, obtendo nanopartículas com atividade antifúngica. Além disso, é destacada a importância de se investigar os efeitos desses nanomateriais sobre culturas vegetais, visando explorar seu potencial com maior segurança.

Palavras-chave: nanopartículas de prata, biossíntese, maior escala, *Trichoderma harzianum*, soja, *Sclerotinia sclerotiorum*

Introdução

A população mundial vem crescendo e despertando preocupação em relação aos recursos alimentares. De acordo com a FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2017), estima-se que a população atinja 10 bilhões até o ano de 2050, aumentando a demanda da produção agrícola.¹ Junto à essa preocupação surge a necessidade de práticas para o controle de pragas que causam grandes perdas na produção de alimentos, tais como fungos e bactérias fitopatogênicos. O controle desses fitopatógenos é realizado, mais comumente, por meio da aplicação de agrotóxicos, porém estes nem sempre apresentam a efetividade desejada, podem desenvolver a resistência dos microrganismos e oferecem grandes prejuízos à saúde e ao ambiente.²

A nanotecnologia se destaca como uma ferramenta promissora para a agricultura, com diferentes alternativas para o controle de pragas e a promoção do desenvolvimento das plantas, buscando maior segurança em relação à saúde e ao ambiente.³⁻⁵ Dentre os nanomateriais direcionados para esse propósito estão as nanopartículas de prata, as quais apresentam potencial antimicrobiano bastante explorado.^{6,7}

Na pesquisa voltada para a área agrícola, diversos estudos apresentam resultados favoráveis de nanopartículas de prata para o controle de fitopatógenos.⁸⁻¹³ Nanopartículas de prata sintetizadas por via biogênica a partir da bactéria *Serratia* sp. BHU-S4 apresentaram atividade no controle do fungo *Bipolaris sorokiniana*, causador de uma doença foliar no trigo, inibindo completamente a formação de conídios.¹⁰ No estudo de Shyla *et al.* (2014) foi observada alta atividade antifúngica de nanopartículas de prata em baixas concentrações sobre o fitopatógeno *Macrophomina phaseolina*.¹¹ Utilizando este mesmo fungo fitopatogênico Spagnoletti *et al.* (2019) sintetizaram nanopartículas de prata as quais inibiram bactérias gram-positivas e gram-negativas.⁸

Em comparação com os agroquímicos convencionais, as nanopartículas são consideradas menos impactantes para o ambiente, visto que são necessárias baixas concentrações para se obter efetividade e além disso, não requerem aplicações sucessivas.¹³ Porém, apesar do menor impacto em comparação com agroquímicos, essas nanopartículas geralmente são sintetizadas por métodos químicos, os quais requerem o uso de substâncias tóxicas, podendo ocasionar impactos ambientais.¹⁴ Uma alternativa a esse tipo de síntese é a síntese biogênica, na qual são empregados organismos como bactérias, fungos e plantas, e/ou o produto de seu metabolismo, para a redução do precursor do metal e a estabilização das nanopartículas.^{15,16} As nanopartículas biogênicas apresentam um recobrimento de biomoléculas

provenientes do organismo utilizado na síntese, e esse recobrimento, além de conferir melhor estabilidade, contribui para a redução da toxicidade, tornando o processo de ionização do metal mais lento.^{17,18}

Um dos desafios da síntese biogênica é a transposição das reações em pequena escala para a produção em maior escala visando uma melhor exploração das aplicações das nanopartículas. Nanopartículas de prata foram sintetizadas em maior escala (7 litros) utilizando o filtrado do fungo endofítico *Trichoderma harzianum* SYA.F4 isolado de tomate e as mesmas apresentaram potencial contra os fitopatógenos *Helminthosporium* sp., *Alternaria alternata*, *Phytophthora arenaria* e *Botrytis* sp *in vitro*.¹⁹

Considerando a aplicação dessas nanopartículas para o controle de pragas agrícolas faz-se necessária a investigação dos possíveis efeitos sobre as plantas. Existem relatos de efeitos negativos causados pela exposição de plantas a nanopartículas de prata,^{20,21} porém é necessário considerar que no caso de nanopartículas biogênicas as mesmas podem apresentar diferentes características e propriedades. Devido a uma maior biocompatibilidade e toxicidade reduzida, as nanopartículas biogênicas podem ser uma melhor opção para aplicações em culturas vegetais.^{22,23}

A maioria dos estudos apresentados na literatura avaliou os efeitos de nanopartículas comerciais produzidas por síntese química sobre as plantas, sendo que poucos trazem efeitos de nanopartículas biogênicas. Diante dessas considerações, os objetivos do presente estudo foram sintetizar nanopartículas de prata por via biogênica em maior escala a partir do filtrado do fungo *Trichoderma harzianum*, avaliar o potencial das mesmas para o controle do fungo fitopatogênico *Sclerotinia sclerotiorum* *in vitro* e investigar os possíveis efeitos sobre o crescimento e fisiologia de plantas de soja.

Seção Experimental

Síntese biogênica de nanopartículas de prata em maior escala

A síntese biogênica das nanopartículas foi realizada utilizando o filtrado do fungo *Trichoderma harzianum*, conforme metodologia de Guilger *et al.* (2017).²⁴ O volume inicial de caldo batata-dextrose para a cultura do fungo foi adaptado para 4.000 mL, sendo adicionados discos de micélio na proporção de 1 disco para cada 75 mL de caldo, totalizando 106,6 discos. Paralelamente, para fins comparativos, foi realizada a síntese em menor escala iniciando a cultura do fungo em 150 mL de caldo. Para a síntese das nanopartículas foi adicionado nitrato

de prata ao filtrado de *T. harzianum* resultante do processo para a concentração final de 1 mM. A mistura foi mantida sob agitação em agitador magnético por 72 horas.

Caracterização físico-química das nanopartículas

Logo após o processo de síntese foi realizada leitura das nanopartículas em espectrofotômetro UV-Visível (Shimadzu Multispec 1501) para confirmar a formação das nanopartículas. Foi realizada leitura da amostra pura na faixa de comprimento de onda entre 200 e 800 nm, com resolução de 1 nm. As análises de diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e potencial zeta foram realizadas pelas técnicas de espalhamento dinâmico de luz e microeletroforese, utilizando o equipamento analisador de partículas ZS90 (Malvern). As leituras foram realizadas em triplicata a um ângulo fixo de 90° e temperatura de 25°C. Também foi realizada a análise de rastreamento de nanopartículas para a obtenção da distribuição de tamanho e concentração das nanopartículas utilizando o equipamento NanoSight LM10 cell (Malvern Analytical) acoplado a uma câmara com o software NanoSight v. 2.3.

Avaliação dos efeitos das nanopartículas sobre *Sclerotinia sclerotiorum* in vitro

Os efeitos das nanopartículas para o controle de *Sclerotinia sclerotiorum* foram avaliados em placas contendo ágar batata-dextrose suplementado com as nanopartículas na concentração de 3×10^9 NPs.mL⁻¹. Após a solidificação do ágar foi inoculado um escleródio no centro de cada placa, sendo as placas preparadas em triplicata, com controles negativos. As culturas de *S. sclerotiorum* foram mantidas em temperatura ambiente, com fotoperíodo de 12 horas, durante 15 dias. Após esse período foi analisado o crescimento micelial e realizada a contagem de novos escleródios.

Avaliação dos efeitos das nanopartículas em plantas de soja

Plantio e manutenção das plantas

As avaliações dos efeitos das nanopartículas sobre a soja (*Glycine max* L. Merr. cv. BRS 257) foram realizadas na Universidade Estadual de Londrina. A soja foi cultivada em vasos plásticos com 14 cm de diâmetro superior, 9,5 cm de diâmetro inferior e 10,5 cm de altura, em solo de baixa fertilidade previamente tratado com as nanopartículas ($1,53 \times 10^{13}$ NPs/m²). A quantidade de nanopartículas foi definida de acordo com a concentração de nanopartículas utilizada no teste realizado com *Sclerotinia sclerotiorum* in vitro para a área do vaso. Foram preparados cinco vasos, com cinco plantas por vaso, sendo que cada vaso correspondeu a uma

repetição. Como controle foi cultivada a mesma quantidade de plantas, com as mesmas repetições, em solo livre da exposição às nanopartículas.

As características do solo utilizado no experimento foram as seguintes: pH 5,8, matéria orgânica 4 g/dm³, fósforo 7 mg/dm³, potássio 0,04 cmolc/dm³, cálcio 0,8 cmolc/dm³, magnésio 0,7 cmolc/dm³, H+Al₂ cmolc/dm³, SB (soma de bases) 1,5 cmolc/dm³, CTC 3,5 cmolc/dm³, V% 44, enxofre 9 mg/dm³, boro 0,08 mg/dm³, cobre 0,1 mg/dm³, ferro 1 mg/dm³, manganês 0,2 mg/dm³ e zinco 0,2 mg/dm³.

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, com aplicação de 50 mL de solução nutritiva (1 mM KH₂PO₄, 4 mM Ca(NO₃)₂.4H₂O, 2 mM K₂SO₄, 4 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgSO₄.7H₂O, 92,5 µM H₃BO₃, 18 µM MnCl₂.4H₂O, 1,5 µM ZnCl₂, 0,56 µM Na₂MoO₄.2H₂O, 0,66 µM CuCl₂.2H₂O, 100 uM FeSO₄) na metade desse período.

Análises morfológicas

As análises de morfologia foram realizadas em duas plantas de cada vaso. Além das medições de comprimento de parte aérea e de raiz com o auxílio de uma régua, a área foliar total foi determinada com um medidor de área foliar LI3000C (LI-COR® Biosciences, Lincoln, EUA). Para obtenção de massa seca de parte aérea e raiz, o material foi mantido em estufa a 60°C por 72 horas.

Análises de trocas gasosas e pigmentos fotossintéticos

As análises de trocas gasosas foram realizadas entre 9:00 h e 11:00 h da manhã em um dia ensolarado, anteriormente à coleta das plantas. Utilizou-se um analisador portátil de gases por infravermelho (Irga) modelo LI-6400 XT (LI-COR® Biosciences, Lincoln, EUA) acoplado a uma câmara com 6 cm², ajustada a uma PAR saturante de 1500 µmol m² s⁻¹. Para as medidas, foi escolhido o folíolo central da folha mais jovem completamente expandida de duas plantas de cada vaso. Foram obtidas as taxas de fotossíntese líquida e a condutância estomática, e a razão entre elas foi calculada para obtenção da eficiência intrínseca no uso da água.

Para a análise de pigmentos fotossintéticos, foram pulverizados 0,05 g de folhas em nitrogênio líquido e adicionados 5 mL de uma solução de acetona (80%) em tampão fosfato de sódio (2,5 mM; pH 7,8), mantendo as amostras em gelo. Foi então realizada agitação em vortex seguida de centrifugação a 1800 xg por 10 minutos. A leitura das absorbâncias dos sobrenadantes foi realizada nos seguintes comprimentos de onda: 663,2 nm, 646,8 nm e 470

nm, e os teores de clorofilas *a* e *b* e de carotenoides foram calculados utilizando as equações propostas por Wellburn (1994).²⁵

Marcadores de estresse oxidativo

Peróxido de hidrogênio, malondialdeído (MDA) e dienos conjugados foram dosados em folhas e raízes como marcadores de estresse oxidativo.

Para extração de peróxido de hidrogênio e MDA, os tecidos vegetais (0,1 g) foram pulverizados em nitrogênio líquido e homogeneizados com 1 mL de ácido tricloroacético (0,2 %) diluído em metanol gelado. Após centrifugação a 13700 xg, a 4°C por 5 minutos, o sobrenadante foi utilizado para a dosagem de peróxido de hidrogênio através da reação com iodeto de potássio (KI) 1M em tampão fosfato²⁶ e de MDA através da determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).²⁷

Para extração de dienos conjugados, os tecidos vegetais (0,1 g) foram pulverizados em nitrogênio líquido e homogeneizados com 1 mL de etanol 96% gelado. Após centrifugação a 13700 xg, a 4°C por 5 minutos, a absorbância a 234 e 500 nm do sobrenadante foi determinada e o conteúdo de dienos conjugados estimado conforme descrito por Boveris *et al.* (1980).²⁸

Expressão de genes da lignificação

Para a análise da expressão de genes envolvidos no processo de lignificação das raízes das plantas de soja, foi realizada extração do RNA total conforme metodologia de Bittencourt *et al.* (2011)²⁹ e quantificação utilizando o Qubit™ RNA HS Assay Kit. Em seguida foi realizada transcrição reversa para síntese do cDNA utilizando SUPERSCRIPT™ III RT e PCR em tempo real utilizando os primers para análise da expressão dos genes de Phenylalanine ammonia-lyase, Cinnamate 4-hydroxylase, Cinnamyl alcohol dehydrogenase, Peroxidase 2, Peroxidase 4 e Peroxidase 7, com base no estudo de Nair e Chung (2014).³⁰ Como controle foi utilizada amostra de raízes de soja cultivada em solo livre da exposição às AgNPs.

Análise estatística

Os dados obtidos para as variáveis morfológicas, fotossíntese, pigmentos e marcadores de estresse oxidativo foram comparados por teste t ($p<0,05$) para avaliar a diferença significativa entre as médias das plantas controle e das plantas expostas às nanopartículas.

Resultados e Discussão

Rendimento da síntese e caracterização físico-química das nanopartículas

A tabela 1 apresenta o rendimento da síntese de nanopartículas de prata sintetizadas a partir de *Trichoderma harzianum* em maior escala em comparação com as nanopartículas sintetizadas em menor escala.

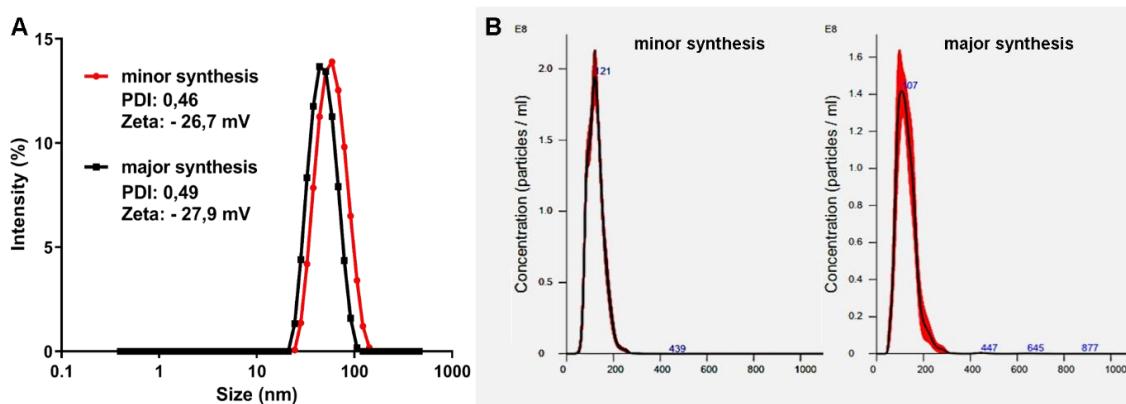
Tabela 1 – Rendimento da síntese de nanopartículas em menor e maior escala.

Síntese	Discos de micélio	Volume de caldo (mL)	Biomassa (g)	Volume de filtrado (mL)	Nitrato de prata (g)	Volume final de síntese (mL)	Concentração (NPs.mL ⁻¹)
Menor escala	4	150	10	100	0,017	100	$1,52 \times 10^{10}$
Maior escala	106,6	4.000	313	3.130	0,532	3.130	$1,32 \times 10^{10}$
Rendimento (Índice relativo)	26,7 x	-	31,3 x	31,3 x	-	31,3 x	-

Observamos que as nanopartículas sintetizadas em menor escala apresentaram um rendimento de 66,66 % em relação ao volume de caldo inicial utilizado para o crescimento de *T. harzianum*, enquanto as nanopartículas sintetizadas em maior escala apresentaram rendimento de 78,25%, indicando um aumento no rendimento com a ampliação da síntese.

Ambas as sínteses foram concluídas em 72 horas, sendo observada ao final desse período uma coloração marrom avermelhada. Pela análise UV-Vis ambas as nanopartículas apresentaram pico de 413 nm indicativo da presença de prata elementar. Pelas análises de espalhamento dinâmico de luz e microeletroforese as nanopartículas sintetizadas em menor escala e maior escala apresentaram diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e potencial zeta similares (Figura 1A). Pela análise de rastreamento de nanopartículas foi observado tamanho de 125,5 nm e concentração de $1,52 \times 10^{10}$ NPs.mL⁻¹ para as nanopartículas sintetizadas em menor escala e tamanho de 130 nm e concentração de $1,32 \times 10^{10}$ NPs.mL⁻¹ para as nanopartículas sintetizadas em maior escala (Figura 1B).

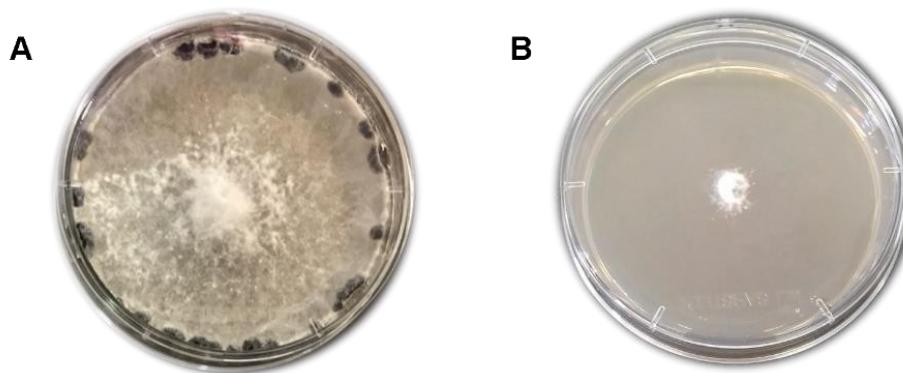
Figura 1 – Caracterização físico-química das nanopartículas sintetizadas em menor e maior escala. A: Diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e potencial zeta. B: Tamanho e concentração em NPs.mL⁻¹.



Efeitos das nanopartículas sobre *Sclerotinia sclerotiorum*

As nanopartículas de prata biogênicas apresentaram potencial para o controle do crescimento micelial e da formação de novos escleródios de *S. sclerotiorum*. As culturas em meio ágar suplementado com as nanopartículas não apresentaram expansão micelial pelas placas nem formação de novos escleródios a partir dos escleródios precursores (Figura 2). Foi observada redução total da formação de novos escleródios nas culturas expostas as nanopartículas em comparação com as culturas controle.

Figura 2 – Efeitos inibitórios das nanopartículas sobre o crescimento micelial e a formação de novos escleródios de *S. sclerotiorum* *in vitro*. A: controle; B: AgNP.



As nanopartículas de prata são reconhecidas como eficientes agentes antifúngicos com aplicações na área agrícola. Elas apresentam mecanismos variados para o controle dos fungos e devido a isso a probabilidade de desenvolvimento de resistência por esses microrganismos é bastante reduzida em comparação com fungicidas químicos convencionais.³¹ Diversos estudos apresentam resultados promissores dessas nanopartículas para o controle de fungos

fitopatogênicos, sendo que as produzidas por meio da síntese biogênica se destacam devido à melhor estabilidade, biocompatibilidade, toxicidade reduzida e baixo custo.^{32,33}

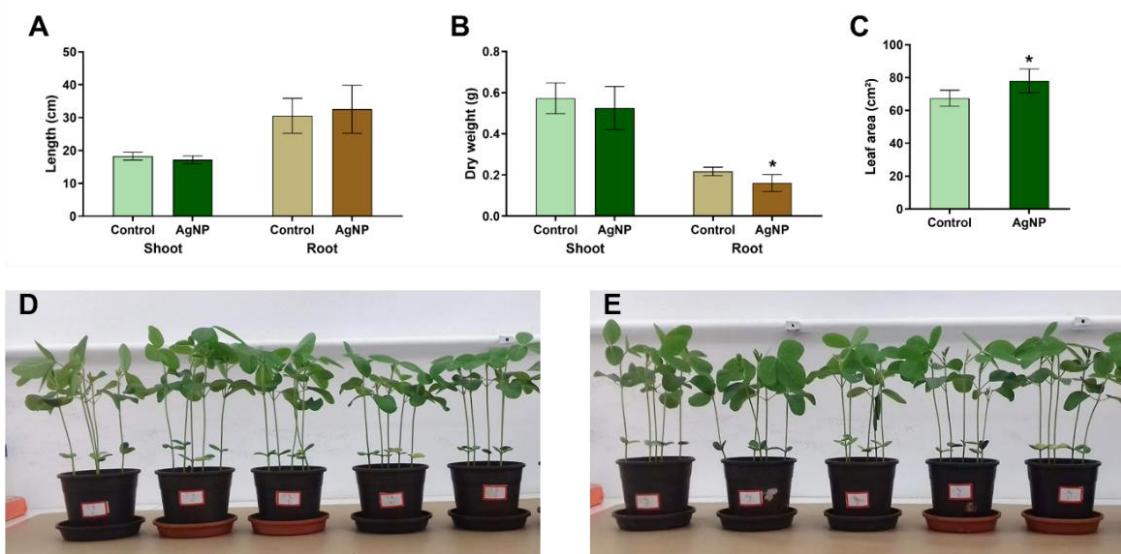
Nanopartículas de prata sintetizadas a partir de *Trichoderma harzianum* inibiram a formação de colônias pelos fungos fitopatogênicos *Fusarium oxysporum* e *Alternaria alternata* de forma concentração dependente.³⁴ Mishra *et al.* (2017) obtiveram efeitos inibitórios de nanopartículas de prata sintetizadas utilizando a bactéria *Stenotrophomonas* sp. sobre os fitopatógenos foliares *Alternaria alternata*, *Curvularia lunata* e *Bipolaris sorokiniana*, e sobre o fitopatógeno do solo *Sclerotium rolfsii*.³⁵ No estudo de Ali *et al.* (2015) nanopartículas de prata sintetizadas a partir do filtrado da planta *Artemisia absinthium* inibiram o desenvolvimento de *Phytophthora* spp., impedindo o crescimento micelial, a germinação e produção de zoosporos, e o alongamento do tubo germinativo. Também foram observados efeitos *in vivo*, prevenindo a infecção em plantas de *Nicotiana benthamiana* e promovendo a sobrevivência das plantas.³¹ No estudo de Mendes *et al.* (2014) foram observados efeitos inibitórios de nanopartículas de prata sobre o fungo *Phomopsis* sp. em sementes de soja, com 100% de inibição nas maiores concentrações.³⁶

Avaliação dos efeitos das nanopartículas em plantas de soja

Morfologia

Em relação aos efeitos das nanopartículas biogênicas sobre as características morfológicas das plantas de soja, não foram observadas alterações no comprimento de parte aérea e raiz, porém ocorreu um aumento de 16% da área foliar e uma redução de 35% da massa seca das raízes em comparação às plantas controle (Figura 3). O menor investimento em biomassa nas raízes indica um efeito fitotóxico das nanopartículas.

Figura 3 – Parâmetros morfológicos das plantas de soja expostas as AgNPs. A: comprimento de parte aérea e raiz; B: massa seca de parte aérea e raiz; C: área foliar; D: aspecto das plantas controle; E: aspecto das plantas expostas às AgNPs. * indica diferença significativa entre plantas expostas às AgNPs e plantas controle, de acordo com teste t de Student ($p < 0,05$). As barras são médias ± desvio padrão ($n = 10$).



Diversos estudos relatam os efeitos de nanopartículas de prata sobre o crescimento de plantas, sendo que a maioria deles apresenta resultados negativos.³⁷ A intensidade desses efeitos pode variar dependendo da espécie de planta, estágio de desenvolvimento, nutrição, via de aplicação, tipo de síntese e concentração de nanopartícula.^{3,38-40}

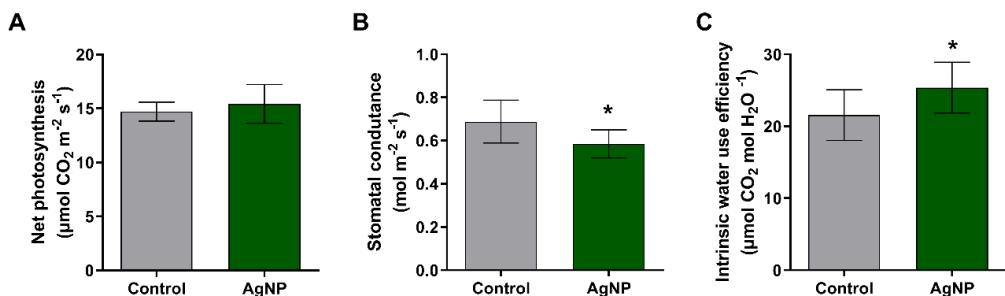
Nanopartículas de prata comerciais ocasionaram a redução dose-dependente do comprimento da parte aérea e raízes de plântulas de trigo e consequentemente a redução da massa seca.²⁰ Em plantas de arroz expostas a esse tipo de nanopartículas foi observada redução do comprimento das raízes, e da massa fresca de parte aérea e raízes.³⁰ Também foi observada redução da biomassa de plantas de soja transgênicas e não transgênicas cultivadas em exposição à nanopartículas de prata.⁴¹ Nanopartículas de prata biogênicas sintetizadas a partir de *Aloe vera* reduziram o comprimento das raízes e parte aérea, e massa fresca de plantas de *Brassica* sp.⁴² Efeitos semelhantes foram observados em plantas de *Lupinus termis* expostas a nanopartículas de prata sintetizadas utilizando extrato de folhas de *Coriandrum sativum*.⁴³

Trocas gasosas e pigmentos fotossintéticos

Em relação aos efeitos das nanopartículas sobre os parâmetros de trocas gasosas, não foram observadas alterações na taxa de fotossíntese líquida. Todavia, houve uma redução de 16% na condutância estomática e um aumento de 18% na eficiência intrínseca do uso da água (Figura 4). Essas alterações nas trocas gasosas podem ser um mecanismo adaptativo para ajustar

a perda de água ao menor investimento em raízes (estruturas de absorção de água do solo) e maior área foliar (mais superfície de transpiração), evitando-se assim o déficit hídrico. Todavia, é importante frisar a manutenção da taxa fotossintética mesmo com a redução da condutância estomática, resultando no uso mais eficiente da água.

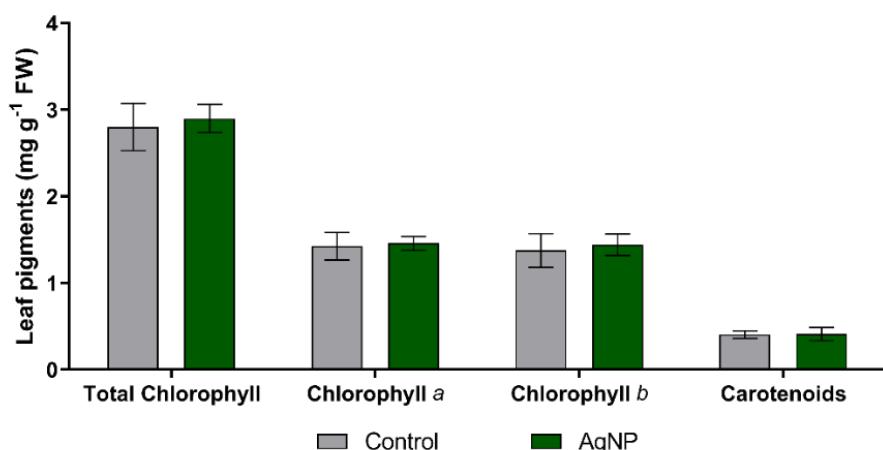
Figura 4 – Efeitos das nanopartículas sobre os parâmetros de trocas gasosas das plantas de soja. A: taxa fotossintética líquida; B: condutância estomática; C: eficiência intrínseca do uso da água. * indica diferença significativa entre plantas expostas às AgNPs e plantas controle, de acordo com teste t de Student ($p < 0,05$). As barras são médias ± desvio padrão ($n = 10$).



Em plantas de abóbora (*Cucurbita pepo*) em cultivo hidropônico, a exposição a diferentes concentrações de nanopartículas de prata ocasionou reduções da transpiração de 84 a 91%, resultando em plantas com menor biomassa.^{44,45} Também foi observada redução da eficiência fotossintética em plantas de *Arabidopsis thaliana* expostas à nanopartículas de prata.⁴⁶

Em relação aos pigmentos, não foram encontradas alterações significativas nos níveis de clorofila total, clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides das plantas de soja expostas às nanopartículas (Figura 5), o que foi relevante para a manutenção da taxa fotossintética.

Figura 5 – Pigmentos fotossintéticos das plantas de soja cultivadas em solo exposto às nanopartículas. As barras são médias ± desvio padrão ($n = 5$).



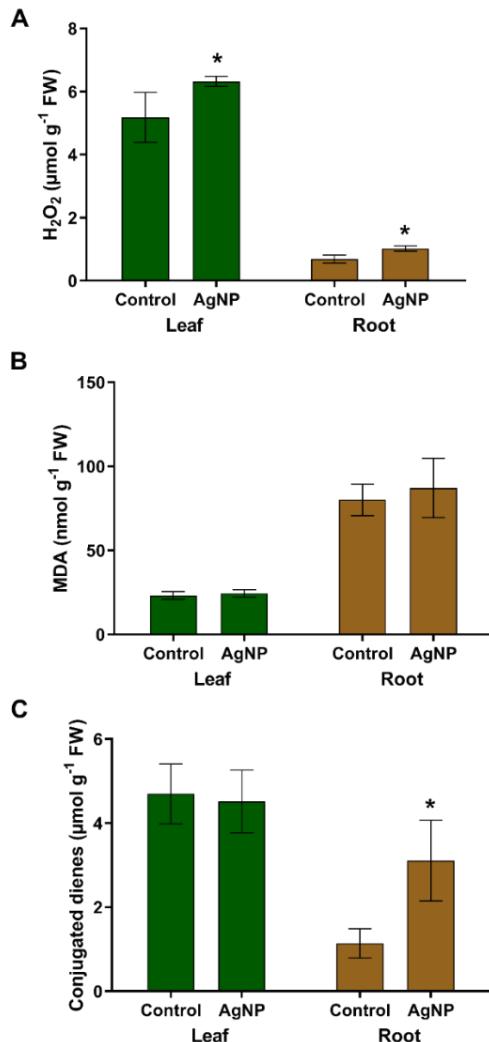
Ao contrário dos resultados aqui expostos, a maioria dos estudos que avaliam os efeitos de nanopartículas de prata sobre pigmentos foliares apresenta reduções nos níveis desses pigmentos. Em um estudo no qual plantas de *Brassica* sp foram expostas a nanopartículas de prata sintetizadas a partir de *Aloe vera* foi observada redução nos níveis totais dos pigmentos clorofila e carotenoides.⁴² A fitotoxicidade de nanopartículas de prata também foi observada em plantas de *Lycopersicon esculentum* (tomate) levando à redução dos teores de clorofilas⁴⁷ e plantas de *Oryza sativa* (arroz), levando à redução dos níveis de clorofila total e carotenoides.³⁰ Outro estudo relata o aumento dos níveis de clorofila a, clorofila b e carotenoides em plantas de *Phaseolus vulgaris* (feijão) e *Zea mays* (milho) expostas a baixa concentração de nanopartículas de prata comerciais, e a redução desses níveis com o aumento da concentração de exposição.⁴⁸

Marcadores de estresse oxidativo

Nanopartículas de prata podem ocasionar alterações bioquímicas, fisiológicas e moleculares nas plantas, levando à formação de espécies reativas de oxigênio que ocasionam o estresse oxidativo e a efeitos genotóxicos.^{49,50}

As análises dos dados mostraram que as nanopartículas de prata biogênicas não ocasionaram aumento nos níveis de MDA nas folhas e raízes. Já em relação aos níveis de peróxido de hidrogênio, foi observado aumento de 22% nas folhas e de 58% nas raízes das plantas expostas às nanopartículas em relação a seu respectivo controle. Os níveis de dienos conjugados nas raízes também apresentaram um aumento de 37% em relação ao controle (Figura 6). Esses resultados indicam que as nanopartículas induziram estresse oxidativo apenas nas raízes das plantas de soja. Nas folhas foi observado um pequeno aumento de peróxido de hidrogênio, não acompanhado de maior peroxidação lipídica. Esse efeito foi mais acentuado nas raízes devido a se tratar de estruturas que entram mais em contato com as nanopartículas presentes no solo. A menor massa seca apresentada nas raízes expostas às nanopartículas também pode estar relacionada ao maior estresse oxidativo nessa parte da planta.

Figura 6 – Efeitos das nanopartículas sobre marcadores de estresse oxidativo em raízes e folhas de plantas de soja. A: Peróxido de hidrogênio (H_2O_2); B: malondialdeído (MDA); C: dienos conjugados. * indica diferença significativa entre plantas expostas às AgNPs plantas controle, de acordo com teste t de Student ($p < 0,05$). As barras são médias ± desvio padrão ($n = 10$).



A maioria dos estudos que avaliam os efeitos de nanopartículas de prata em plantas apresenta indução do estresse oxidativo.³⁷ Foi observado aumento da expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo em *Arabidopsis thaliana* exposta a nanopartículas de prata.⁵¹ Em plantas de *Oryza sativa* (arroz) foi observado aumento dos níveis de H_2O_2 e peroxidação lipídica.³⁰ Também foi relatada a indução de estresse oxidativo por nanopartículas de prata em plantas de *Brassica* sp.,⁴² *Solanum tuberosum* L. (batata),⁵² *Wolffia globosa* (lentilha-d'água)⁵³ e soja.⁵⁴

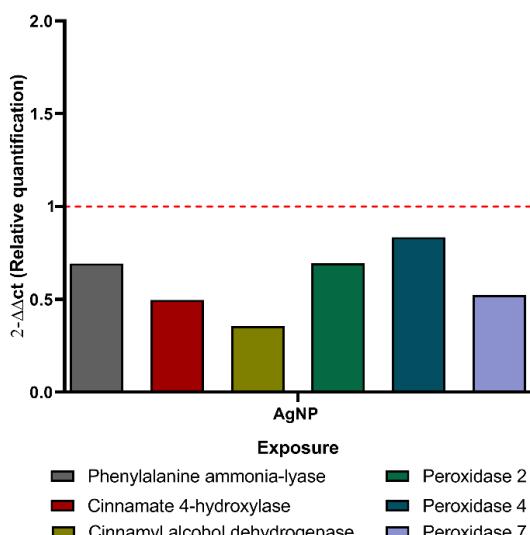
As vias e concentrações de exposição das plantas, bem como as características das nanopartículas, são importantes fatores a serem considerados em relação à fitotoxicidade. Li *et al.* (2017) avaliaram os efeitos de nanopartículas de prata sobre a soja e observaram maiores níveis de MDA e H_2O_2 nas folhas das plantas após exposição via raízes em comparação com a

exposição foliar.³⁸ No estudo de Panda *et al.* (2011), ao comparar os efeitos de nanopartículas de prata biogênicas e comerciais sobre *Allium cepa*, foi observado que ambas as nanopartículas aumentaram a geração de superóxido e H₂O₂, e induziram a morte celular e danos no DNA, porém a nanopartícula comercial apresentou efeitos mais intensos.⁵⁵ Segundo Taran *et al.* (2016), baixas doses de nanomateriais com aplicações periódicas podem resultar em baixos níveis de estresse e respostas adaptativas pelas plantas.⁵⁶ Em nosso estudo a exposição foi realizada pelo preparo do solo com as nanopartículas anteriormente ao plantio, com base na concentração efetiva para o controle do fitopatógeno *S. sclerotiorum* *in vitro*. Essa exposição está mais próxima do que seria realizado em campo, trazendo resultados mais realistas em comparação com a maioria dos estudos que avaliam os efeitos de nanopartículas sobre plantas, nos quais são utilizados sistemas de hidroponia ou testes *in vitro* em meio de cultura.^{51,53,54}

Expressão de genes da lignificação

A lignina é um dos principais componentes da parede celular e está envolvida no crescimento e desenvolvimento das plantas.⁵⁷ O aumento no processo de lignificação é uma das respostas de defesa das plantas à condições de estresse. Quando a planta é exposta a substâncias com altos níveis de toxicidade ocorre um aumento nos níveis de H₂O₂, que pode desencadear um aumento da expressão dos genes envolvidos na síntese de lignina.^{58,30} Em nosso estudo, apesar do aumento de níveis de H₂O₂, não foi observado aumento na expressão de nenhum desses genes nas raízes de soja, contrariamente, houve uma redução em comparação com o controle (Figura 7).

Figura 7 – Efeitos das nanopartículas sobre a expressão de genes envolvidos no processo de lignificação e peroxidação das raízes de soja.



A redução na expressão dos genes de lignificação em comparação com o controle pode estar relacionada ao fato de que as plantas mostraram alguns indícios de adaptação ao estresse, como por exemplo a redução da condutância estomática, aumento da área foliar e aumento da eficiência intrínseca do uso da água. Porém, mais estudos são necessários para investigar esse comportamento frente à exposição às nanopartículas.

Conclusão

O presente estudo mostrou que é possível ampliar a proporção da síntese biogênica de nanopartículas de prata utilizando o fungo *Trichoderma harzianum*. As nanopartículas obtidas apresentaram características físico-químicas desejáveis, indicando boa distribuição de tamanho e estabilidade. Foi observado efeito inibitório sobre *Sclerotinia sclerotiorum* *in vitro*, o que abre perspectivas para a aplicação desse nanomaterial no combate a fitopatógenos que atingem culturas agrícolas. A contaminação do solo com as nanopartículas induziu estresse oxidativo e reduziu a massa seca das raízes das plantas de soja, indicando sua fitotoxicidade. Todavia as plantas apresentaram respostas adaptativas, como aumento de área foliar, redução da condutância estomática e aumento da eficiência no uso da água. Também foi observada uma redução da expressão de genes envolvidos no processo de lignificação das raízes em comparação com o controle, cujo aumento seria um indicativo de estresse. Maiores avaliações em relação aos efeitos de nanopartículas biogênicas sobre plantas devem ser realizadas, principalmente a longo prazo, acompanhando todo o período de desenvolvimento da cultura. Além disso, é necessário investigar possíveis respostas adaptativas, compreender os mecanismos de tolerância das plantas às nanopartículas e explorar o potencial antipatogênico das mesmas com maior confiança, dada sua alta efetividade contra o fitopatógeno *S. sclerotiorum*.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (#2016/13692-6, #2017/13328-5, e #2017/21004-5), a Universidade de Sorocaba (UNISO), a Universidade Estadual Paulista (UNESP), e a Universidade Estadual de Londrina (UEL).

Referências

- (1) FAO. The future of food and agriculture – Trends and challenges. **2017**. Rome.
- (2) Mahmood, I.; Imadi, S. R.; Shazadi, K.; Gul, A.; Hakeen, K. R. Effects of pesticides on environment. In: Hakeen, K. R.; Akhtar, M. S.; Abdullah, S. N. A. (Eds.), Plant, Soil and Microbes. *Springer International Publishing*, Switzerland, **2016**, 1, 253-269.
- (3) Rizwan, M.; Ali, S.; Qayyum, M.F.; Ok, Y. S.; Adrees, M.; Ibrahim, M.; Zia-Ur-Rehman, M.; Farid, M.; Abbas, F. Effect of metal and metal oxide nanoparticles on growth and physiology of globally important food crops: A critical review. *J. Hazard. Mater.* **2017**, 322, 2-16.
- (4) Duhan, J. S.; Kumar, R.; Kumar, N.; Kaur, P.; Nehra, K.; Duhan, S. Nanotechnology: The new perspective in precision agriculture. *Biotechnol. Rep.* **2017**, 15, 11-23.
- (5) Prasad, R.; Bhattacharrya, A.; Nguyen, Q. D. Nanotechnology in Sustainable Agriculture: Recent Developments, Challenges, and Perspectives. *Front. Microbiol.* **2017**, 8, 1-13.
- (6) Rai, M. K.; Deshmukh, S. D.; Ingle, A. P.; Gade, A. K. Silver nanoparticles: the powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria. *J. Appl. Microbiol.* **2012**, 112, 841-852.
- (7) Kim, S. W.; Jung, J. H.; Lamasall, K.; Kim, Y. S.; Min, J. S.; Leel, Y. S. Antifungal effects of silver nanoparticles (AgNPs) against various plant pathogenic fungi. *Mycobiology* **2012**, 40, 53–58.
- (8) Spagnoletti, F. N.; Spedalieri, C.; Kronberg, F.; Giacometti, R. Extracellular biosynthesis of bactericidal Ag/AgCl nanoparticles for crop protection using the fungus *Macrophomina phaseolina*. *J. Environ. Manage.* **2019**, 231, 457-466.
- (9) Jo, Y. K., Kim, B. H.; Jung, G. Antifungal activity of silver ions and nanoparticles on phytopathogenic fungi. *Plant Dis.* **2009**, 93, 1037–1043.
- (10) Mishra, S.; Singh, B. R.; Singh, A.; Keswani, C.; Naqvi, A. H.; Singh, H. B. Biofabricated silver nanoparticles act as a strong fungicide against *Bipolaris sorokiniana* causing spot blotch disease in wheat. *Plos One* **2014**, 9, 1-11.
- (11) Shyla, K. K.; Natarajan, N.; Nakkeeran, S. Antifungal activity of zinc oxide, silver and titanium dioxide nanoparticles against *Macrophomina phaseolina*. *J. Mycol. Plant Pathol.* **2014**, 44, 268–273.
- (12) Karimi, N.; Minaei, S.; Almassi, M.; Shahverdi, A. R. Application of silver nanoparticles for protection of seeds in different soils. *Afr. J. Agric. Res.* **2012**, 7, 863–1869.
- (13) Abdelmalek, G. M. A.; Salaheldin, T. A. Silver nanoparticles as a potent fungicide for Citrus phytopathogenic fungi. *J. Nanomed. Res.* **2016**, 3, 1-8.
- (14) Gudikandula, K.; Maringanti, S. C. Synthesis of silver nanoparticles by chemical and biological methods and their antimicrobial properties. *J. Exp. Nanosci.* **2016**, 11, 714-721.
- (15) Guilger-Casagrande, M.; Lima, R. Synthesis of Silver Nanoparticles Mediated by Fungi: A Review. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2019**, 7, 1-16.
- (16) Rheder, D. T.; Guilger, M.; Bilesky-Jose, N.; Germano-Costa, T.; Pasquito-Stigliani, T.; Gallep, T. B. B.; Grillo, R.; Carvalho, C. D. S.; Fraceto, L. F.; Lima, R. Synthesis of biogenic silver nanoparticles using *Althaea officinalis* as reducing agent: evaluation of toxicity and ecotoxicity. *Sci. Rep.* **2018**, 8, 1-11.
- (17) Ballotin, D.; Fulaz, S.; Souza, M. L.; Corio, P.; Rodrigues, A. G.; Souza, A. O.; Gaspari, P. M.; Gomes, A. F.; Gozzo, F.; Tasic, L. Elucidating Protein Involvement in the Stabilization of the Biogenic Silver Nanoparticles. *Nanoscale Res. Lett.* **2016**, 11, 1-9.
- (18) Chowdhury, S.; Basu, A.; Kundu, S. Green synthesis of protein capped silver nanoparticles from phytopathogenic fungus *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid with

- antimicrobial properties against multidrug-resistant bacteria. *Nanoscale Res. Lett.* **2014**, *9*, 1-11.
- (19) El-Moslamy, S. H.; Elkady, M. F.; Rezk, A. H.; Abdel-Fattah, Y. R. Applying Taguchi design and large-scale strategy for mycosynthesis of nano-silver from endophytic *Trichoderma harzianum* SYA.F4 and its application against phytopathogens. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1-22.
- (20) Dimkpa, C. O.; McLean, J. E.; Martineau, N.; Britt, D. W.; Haverkamp, R.; Anderson, A. J. Silver nanoparticles disrupt wheat (*Triticum aestivum* L.) growth in a sand matrix. *Environ. Sci. Technol.* **2013**, *47*, 1082-1090.
- (21) Kumari, M.; Mukherjee, A.; Chadrasekaran, N. Genotoxicity of silver nanoparticle in *Allium cepa*. *Sci. Total. Environ.* **2009**, *407*, 5243-5246.
- (22) Jasim, B.; Thomas, R.; Mathew, J.; Radhakrishnan, E. K. Plant growth and diosgenin enhancement effect of silver nanoparticles in Fenugreek (*Trigonella foenumgraecum* L.). *Saudi Pharm. J.* **2017**, *25*, 443-447.
- (23) Shende, S.; Rathod, D.; Gade, A.; Rai, M. Biogenic copper nanoparticles promote the growth of pigeon pea (*Cajanus cajan* L.). *IET Nanobiotechnology* **2017**, *11*, 773-781.
- (24) Guilger M.; Pasquoto-Stigliani T.; Bilesky-Jose N.; Grillo R.; Abhilash P. C.; Fraceto L. F.; Lima, R. Biogenic silver nanoparticles based on *Trichoderma harzianum*: synthesis, characterization, toxicity evaluation and biological activity. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1-13.
- (25) Wellburn, A. R. The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. *J. Plant Physiol.* **1994**, *144*, 307-313.
- (26) Alexieva, V; Sergiev, I; Mapelli, S; Karanov, E. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant, Cell Environ.* **2011**, *24*, 1337-1344.
- (27) Camejo, G.; Wallin, B.; Enojärvi, M. Analyses of oxidation and antioxidants using microtiter plates. In: Armstrong, D. (Ed.), *Free Radical and Antioxidants Protocols*. Humana Press, Molndal, **1998**, 377-387.
- (28) Boveris, A.; Cadenas, E.; Chance, B. Low-level chemi-luminescence of the lipoxygenase reaction. *Photobiochem. Photobiophys.* **1980**, *1*, 175-182.
- (29) Bitencourt, G. A.; Chiari, L.; Valle, C. B.; Laura, V. A.; Moro, J. R. Avaliação de diferentes métodos para extração de RNA total de folhas e raízes de braquiária. *Embrapa - Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento* **2011**, *29*, 1-23.
- (30) Nair, P. M. G.; Chung, I. M. A Mechanistic Study on the Toxic Effect of Copper Oxide Nanoparticles in Soybean (*Glycine max* L.) Root Development and Lignification of Root Cells. *Biol. Trace Element Res.* **2014**, *162*, 342-352.
- (31) Ali, M.; Kim, B.; Belfield, K. D.; Norman, D.; Brennan, M.; Ali, G. S. A Mechanistic Study on the Toxic Effect of Copper Oxide Nanoparticles in Soybean (*Glycine max* L.) Root Development and Lignification of Root Cells. *Phytopathology* **2015**, *105*, 1183-1190.
- (32) Gholami-Shabani, M.; Akbarzadeh, A.; Norouzian, D.; Amini, A.; Gholami Shabani, Z.; Imani, A.; Chiani, M.; Riazi, G.; Shams-Ghahfarokhi, M.; Razzaghi Abyaneh, M. Antimicrobial activity and physical characterization of silver nanoparticles green synthesized using nitrate reductase from *Fusarium oxysporum*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2014**, *172*, 4084-4098.
- (33) Mishra, S.; Singh, H. B. Biosynthesized silver nanoparticles as a nanoweapon against phytopathogens: exploring their scope and potential in agriculture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *99*, 1097-1107.
- (34) Abboud, M. A. A. Fungal biosynthesis of silver nanoparticles and their role in control of fusarium wilt of sweet pepper and soil-borne fungi *in vitro*. *Int. J. Pharmacol.* **2018**, *14*, 773-780.

- (35) Mishra, S.; Keswani, C.; Abhilash, P. C.; Fraceto, L. F.; Singh, H. B. Integrated Approach of Agri-nanotechnology: Challenges and Future Trends. *Front. Plant Sci.* **2017**, 8, 1-12.
- (36) Mendes, J. E.; Abrunhosa, L.; Teixeira, J. A.; Camargo, E. R.; Souza, C. P.; Pessoa, J. D. C. Antifungal activity of silver colloidal nanoparticles against phytopathogenic fungus (*Phomopsis* sp.) in soybean seeds. *International Journal of Biological, Veterinary, Agricultural and Food Engineering* **2014**, 8, 928-933.
- (37) Yan, A.; Chen, Z. Impacts of Silver Nanoparticles on Plants: A Focus on the Phytotoxicity and Underlying Mechanism. *Int J Mol Sci.* **2019**, 20, 1-21.
- (38) Li, J.; Sang, H.; Guo, H.; Popko, J. T.; He, L.; White, J. C.; Dhakher, O. P.; Jung, G.; Xing, B. Antifungal mechanisms of ZnO and Ag nanoparticles to *Sclerotinia homoeocarpa*. *Nanotechnology* **2017**, 28, 1-11.
- (39) Kataria, S.; Jain, M., Role of nanoparticles on photosynthesis: avenues and applications, In: Tripathi, D. K.; Ahmad, P.; Sharma, S.: Chauhan, D. K.; Dubey, N. K. (Eds.), Nanomaterials in Plants, Algae and Microorganisms: Concepts and Controversies, Elsevier, India, **2018**, 2, 103-127.
- (40) Sanzari, I.; Leone, A.; Ambrosone, A. Nanotechnology in plant science: to make a long story short. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2019**, 7, 1-12.
- (41) Galazzi, R. M.; Lopez Júnior, C. A.; Lima, T. B.; Gozzo, F. C.; Arruda, M. A. Z. Evaluation of some effects on plant metabolism through proteins and enzymes in transgenic and non-transgenic soybeans after cultivation with silver nanoparticles. *J. Proteomics* **2019**, 191, 88-106.
- (42) Vishwakarma, K.; Schweta; Upadhyay, N.; Singh, J.; Liu, S.; Singh, V. P.; Prasad, S. M.; Chauhan, D. K.; Tripathi, D. K.; Sharma, S. Differential Phytotoxic Impact of Plant Mediated Silver Nanoparticles (AgNPs) and Silver Nitrate (AgNO₃) on *Brassica* sp. *Front. Plant Sci.* **2017**, 8, 1-12.
- (43) Al-Huqail, A. A.; Hatata, M. M.; Al-Huqail, A. A.; Ibrahim, M. M. Preparation, characterization of silver phyto nanoparticles and their impact on growth potential of *Lupinus termis* L. seedlings. *Saudi J. Biol. Sci.* **2018**, 25, 313-319.
- (44) Hawthorne, J.; Musante, C.; Sinha, S. K.; White, J. C. Accumulation and Phytotoxicity of Engineered Nanoparticles to *Cucurbita Pepo*. *Int. J. Phytorem.* **2012**, 14, 429-442.
- (45) Mussante, C.; White, J. C. Toxicity of silver and copper to *Cucurbita pepo*: Differential effects of nano and bulk-size particles. *Environ. Toxicol.* **2012**, 27, 510-517.
- (46) Sosan, A.; Svistunenko, D.; Straltsova, D.; Tsirkina, J.; Smolich, I.; Lawson, T.; Subramaniam, S.; Golovko, V.; Anderson, D.; Sokolik, A.; Colbeck, I.; Demidchik, V. Engineered silver nanoparticles are sensed at the plasma membrane and dramatically modify the physiology of *Arabidopsis thaliana* plants. *The Plant Journal* **2016**, 85, 245-257.
- (47) Song, U.; Jun, H.; Waldman, B.; Roh, J.; Kim, Y.; Yi, J.; Lee, E. J. Functional analyses of nanoparticle toxicity: A comparative study of the effects of TiO₂ and Ag on tomatoes (*Lycopersicon esculentum*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2013**, 93, 60-67.
- (48) Salama, H. M. H. Effects of silver nanoparticles in some crop plants, common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and corn (*Zea mays* L.). *Int. Res. J. Biotechnol.* **2012**, 3, 190-197.
- (49) Belava, V. N.; Panyuta, O. O.; Yakovleva, G. M.; Pysmenna, Y. M.; Volkogon, M. V. The effect of silver and copper nanoparticles on the wheat - *Pseudocercosporella herpotrichoides* pathosystem. *Nanoscale Res. Lett.* **2017**, 12, 1-10.
- (50) Tripathi, D. K.; Tripathi, A.; Shweta; Singh, S.; Singh, Y.; Vishwakarma, K.; Yadav, G.; Sharma, S.; Singh, V. K.; Mishra, R. K.; Upadhyay, R. G.; Dubey, N. K.; Lee, Y.; Chauhan, D. K. Uptake, Accumulation and Toxicity of Silver Nanoparticle in Autotrophic Plants, and Heterotrophic Microbes: A Concentric Review. *Front. Microbiol.* **2017**, 8, 1-16.

- (51) Kaveh, R.; Li, Y. S.; Ranjbar, S.; Tehrani, R.; Brueck, C. L.; Van Aken, B. Changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression in response to silver nanoparticles and silver ions. *Environ. Sci. Technol.* **2013**, *47*, 10637-10644.
- (52) Homae, M. B.; Ehsanpour, A. A. Silver nanoparticles and silver ions: Oxidative stress responses and toxicity in potato (*Solanum tuberosum* L) grown *in vitro*. *Hortic., Environ. Biotechnol.* **2016**, *57*, 544-553.
- (53) Zou, X.; Li, P.; Huang, Q.; Zhang, H. The different response mechanisms of *Wolffia globosa*: Light-induced silver nanoparticle toxicity. *Aquat. Toxicol.* **2016**, *176*, 97-105.
- (54) De La Torre-Roche, R.; Hawthorne, J.; Musante, C.; Xing, B.; Newman, L. A.; Ma, X.; White, J. C. Impact of Ag Nanoparticle Exposure on p,p'-DDE bioaccumulation by *Cucurbita pepo* (Zucchini) and *Glycine max* (Soybean). *J. Environ. Sci. Technol.* **2013**, *47*, 718-725.
- (55) Panda K. K.; Achary V. M. M.; Krishnaveni R.; Padhi B. K.; Sarangi S. N.; Sahu S. N.; Panda, B. B. *In vitro* biosynthesis and genotoxicity bioassay of silver nanoparticles using plants. *Toxicol. in Vitro* **2011**, *25*, 1097–1105.
- (56) Taran, N.; Batsanova, L.; Kovalenko, M.; Okanenko, A. Impact of Metal Nanoform Colloidal Solution on the Adaptive Potential of Plants. *Nanoscale Res. Lett.* **2016**, *11*, 1-6. DOI 10.1186/s11671-016-1294-z
- (57) Liu, Q.; Luo, L.; Zheng, L. Lignins: Biosynthesis and biological functions in plants. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 1-16. doi:10.3390/ijms19020335
- (58) Passardi, F.; Cosio, C.; Penel, C.; Dunand, C. Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Rep.* **2005**, *24*, 255-265.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diversos estudos sobre a síntese de nanopartículas de prata por fungos vêm sendo publicados, porém poucos investigam a composição e a importância do recobrimento das nanopartículas. Além disso, a maioria apresenta o processo de síntese, a caracterização físico-química e a aplicação, sem maiores investigações em relação ao potencial tóxico desses novos nanomateriais. Outro fator bastante evidente é que são poucas as publicações que direcionam essas nanopartículas para o controle de pragas agrícolas e investigam possíveis efeitos sobre organismos não-alvo.

Diante deste contexto, nesta tese foi exposto que é possível realizar a síntese de nanopartículas por via biogênica de forma direcionada para a aplicação de interesse, bem como ampliar a produção para uma maior escala. Além disso, foi observado que o recobrimento das nanopartículas composto por biomoléculas provenientes do fungo *Trichoderma harzianum* contribui para o controle do fungo fitopatogênico *S. sclerotiorum*, ocasionando a inibição do crescimento micelial e da germinação de novos escleródios. Foi observado, ainda, que as nanopartículas recobertas apresentam menor toxicidade para linhagens celulares e organismos não-alvo quando comparadas às não-recobertas. Também foi constatado que as nanopartículas causam algumas alterações na morfologia e fisiologia de plantas de soja, porém com indícios de uma resposta adaptativa.

Com base no levantamento de publicações que realizamos para a elaboração da revisão da literatura apresentada no capítulo I, esse é o primeiro trabalho que investiga a influência do recobrimento no potencial de nanopartículas biogênicas para o controle de um fitopatógeno. Além disso, a realização de ensaios para a avaliação dos possíveis efeitos tóxicos das nanopartículas evidencia a importância de se desenvolver nanomateriais ambientalmente seguros. Apesar dos resultados satisfatórios, ainda se fazem necessários muitos outros estudos para o aprimoramento da síntese e para um melhor conhecimento dos mecanismos de ação contra o fitopatógeno. A nanotecnologia é uma ciência nova que vem se expandindo e poderá contribuir fortemente para melhorias no setor agrícola.

REFERÊNCIAS

- AHLUWALIA, Vivek. et al. Green synthesis of silver nanoparticles by *Trichoderma harzianum* and their bio-efficacy evaluation against *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumonia*. **Industrial Crops and Products**, v. 55, p. 202-206, 2014.
- BURDUŞEL, Alexandra-Cristina et al. Biomedical Applications of Silver Nanoparticles: An Up-to-Date Overview. **Nanomaterials (Basel)**, v. 8, 1-25, 2018.
- DUHAN, Joginder Singh et al. Nanotechnology: The new perspective in precision agriculture. **Biotechnology Reports.**, v. 15, p. 11-23, 2017.
- FRACETO, Leonardo Fernandes et al. Nanotechnology in Agriculture: Which Innovation Potential Does it Have? **Frontiers in Environmental Sciences**, v. 4, p. 1-5, 2016.
- GHERBAWY, Youssuf A. et al. The Anti-Fasciolasis Properties of Silver Nanoparticles Produced by *Trichoderma harzianum* and Their Improvement of the Anti-Fasciolasis Drug Triclabendazole. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, p. 21887-21898, 2013.
- GUILGER, Mariana et al. Biogenic silver nanoparticles based on *Trichoderma harzianum*: synthesis, characterization, toxicity evaluation and biological activity. **Scientific Reports**, v. 7, 2017.
- LOO, Yuet Ying et al.. *In Vitro* Antimicrobial Activity of Green Synthesized Silver Nanoparticles Against Selected Gram-negative Foodborne Pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 1-7, 2018.
- MAJED, Abdul. Application of Agrochemicals in Agriculture: Benefits, Risks and Responsibility of Stakeholders. **Journal of Food Science and Toxicology**, v. 2, p. 1-2, 2018.
- PRASAD, Ram; BHATTACHARYYA, Atanu; NGUYEN, Quang D. Nanotechnology in Sustainable Agriculture: Recent Developments, Challenges, and Perspectives. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1-13, 2017.
- SABA, Hasan. et al. Trichoderma – a promising plant growth stimulator and biocontrol agent. **Mycosphere**, p. 524-531, 2012.
- SMOLINSKA, Urszula.; KOWALSKA, Beata. Biological control of soil-borne fungal pathogen *Sclerotinia sclerotiorum* – a review. **Jounal of Plant Pathology**, v. 100, p. 1-12, 2018.
- ZUBROD, Jochen. P. et al. Fungicides: An overlooked Pesticide Class? **Environmental Science and Technology**, v. 53, p. 3347-3365, 2019.

ANEXO A – Revisão da literatura publicada na revista científica internacional *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, apresentada no capítulo I desta tese.



Synthesis of Silver Nanoparticles Mediated by Fungi: A Review

Mariana Guilger-Casagrande and Renata de Lima*

Laboratory for Evaluation of the Bioactivity and Toxicology of Nanomaterials, University of Sorocaba, Sorocaba, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Jinmyoung Joo,
Ulsan National Institute of Science and
Technology, South Korea

Reviewed by:

Pradipta Ranjan Rauta,
University of Texas MD Anderson
Cancer Center, United States
Palanivel Velmurugan,
Sri Sankara Arts and Science
College, India

***Correspondence:**

Renata de Lima
renata.lima@prof.uniso.br

Specialty section:

This article was submitted to
Nanobiotechnology,
a section of the journal
*Frontiers in Bioengineering and
Biotechnology*

Received: 19 July 2019

Accepted: 07 October 2019

Published: 22 October 2019

Citation:

Guilger-Casagrande M and Lima R
(2019) Synthesis of Silver
Nanoparticles Mediated by Fungi: A
Review.
Front. Bioeng. Biotechnol. 7:287.
doi: 10.3389/fbioe.2019.00287

The use of fungi as reducing and stabilizing agents in the biogenic synthesis of silver nanoparticles is attractive due to the production of large quantities of proteins, high yields, easy handling, and low toxicity of the residues. Furthermore, this synthesis process coats the nanoparticles with biomolecules derived from the fungus, which can improve stability and may confer biological activity. The aim of this review is to describe studies in which silver nanoparticles were synthesized using fungi as reducing agents, discussing the mechanisms and optimization of the synthesis, as well as the applications. The literature shows that various species of fungus have potential for use in biogenic synthesis, enabling the production of nanoparticles with different characteristics, considering aspects such as their size, surface charge, and morphology. The synthesis mechanisms have not yet been fully elucidated, although it is believed that fungal biomolecules are mainly responsible for the process. The synthesis can be optimized by adjusting parameters such as temperature, pH, silver precursor concentration, biomass amount, and fungus cultivation time. Silver nanoparticles synthesized using fungi enable the control of pathogens, with low toxicity and good biocompatibility. These findings open perspectives for future investigations concerning the use of these nanoparticles as antimicrobials in the areas of health and agriculture.

Keywords: biogenic synthesis, silver nanoparticles, fungi, biological activity, biomolecules

INTRODUCTION

Among the different types of metallic nanoparticles, silver nanoparticles can be highlighted for their broad-spectrum antimicrobial potential (Prabhu and Poulose, 2012; Rai et al., 2014; Gupta et al., 2017; Loo et al., 2018). These nanoparticles adhere to the cell walls and membranes of microorganisms and may reach the cell interior. They damage the cellular structures, induce the production of reactive oxygen species, and alter the mechanisms of signal transduction (Kim et al., 2011; Dakal et al., 2016). Several studies report applications in which good results have been obtained using silver nanoparticles for the control of pathogenic microorganisms in the areas of health and agriculture (Kim et al., 2012; Mishra and Singh, 2015; Burduşel et al., 2018).

The commonest method used to produce silver nanoparticles is chemical synthesis, employing reagents whose function is to reduce the silver ions and stabilize the nanoparticles. These reagents are toxic and can present risks to health and the environment (Ahmed et al., 2016; Zhang et al., 2016), which has led to increasing interest in biogenic synthesis methods. Such processes enable nanoparticles to be obtained that present lower toxicity, better physicochemical characteristics, and higher stability (Iravani et al., 2014).

Biogenic synthesis of nanoparticles can be performed using organisms such as bacteria, fungi, and plants, or the byproducts of their metabolism, which act as reducing and stabilizing agents

ANEXO B – Artigo publicado na revista científica internacional *Scientific Reports*, apresentado no capítulo II desta tese.

www.nature.com/scientificreports/



OPEN

Biosynthesis of silver nanoparticles employing *Trichoderma harzianum* with enzymatic stimulation for the control of *Sclerotinia sclerotiorum*

Received: 9 July 2019

Accepted: 9 September 2019

Published online: 04 October 2019

Mariana Guilger-Casagrande¹, Tais Germano-Costa¹, Tatiane Pasquoto-Stigliani¹, Leonardo Fernandes Fraceto² & Renata de Lima¹

Biogenic synthesis of silver nanoparticles employing fungi offers advantages, including the formation of a capping from fungal biomolecules, which provides stability and can contribute to biological activity. In this work, silver nanoparticles were synthesized using *Trichoderma harzianum* cultivated with (AgNP-TS) and without enzymatic stimulation (AgNP-T) by the cell wall of *Sclerotinia sclerotiorum*. The nanoparticles were evaluated for the control of *S. sclerotiorum*. The specific activity of the *T. harzianum* hydrolytic enzymes were determined in the filtrates and nanoparticles. Cytotoxicity and genotoxicity were also evaluated. Both the nanoparticles exhibited inhibitory activity towards *S. sclerotiorum*, with no new sclerotia development, however AgNP-TS was more effective against mycelial growth. Both the filtrates and the nanoparticles showed specific enzymatic activity. Low levels of cytotoxicity and genotoxicity were observed. This study opens perspectives for further exploration of fungal biogenic nanoparticles, indicating their use for the control of *S. sclerotiorum* and other agricultural pests.

The biogenic synthesis of silver nanoparticles is an attractive nanotechnological alternative to other chemical and physical methods, offering simplicity, relatively low cost, lower generation of toxic waste, lower energy consumption, and higher yields. Bacteria, yeasts, fungi, plant extracts, and algae can be used in this type of synthesis, acting as reducing agents and stabilizers¹. The ability of such organisms to alter the chemical nature of metals is due to their development of mechanisms of defense against toxic agents, with the products being nanoparticles with lower toxicity². The process of extracellular biogenic synthesis is probably mediated by the nitrate reductase enzyme, which acts in the reduction of metals, leading to the formation of nanoparticles³.

Fungi have been extensively used in the synthesis of metallic nanoparticles due to their ease of handling and cultivation, high biomass production, and the secretion of large quantities of metabolites, enzymes, and extracellular proteins. These biomolecules not only act in the reduction process of the metal precursor, but also form a capping on the nanoparticles, hence providing better control of size and stability⁴⁻⁶. The biogenic synthesis of silver nanoparticles can be achieved using a wide range of filamentous fungi and yeasts, including *Fusarium oxysporum*⁷, *Aspergillus* sp⁸, *Trichoderma harzianum*^{9,10}, *Trichoderma asperellum*¹¹, *Beauveria bassiana*^{12,13}, *Penicillium* sp¹⁴, and *Candida albicans*¹⁵. Depending on the species of fungus used in the synthesis (due to the different extracellular enzyme profiles), the nanoparticles produced can have different physicochemical characteristics and biological activities¹⁶, making them promising materials for use in the areas of health, agriculture, and the environment.

In addition to the different characteristics of nanoparticles according to the fungal species used, differences can also occur using the same species under different culture conditions. Variations of culture medium composition, pH, temperature, growth time, and agitation can alter the metabolism of the microorganisms, consequently influencing the physicochemical characteristics of the nanoparticles and the composition of the capping, which can either enhance the synthesis or make it unviable^{17,18}.

¹Laboratory for Evaluation of the Bioactivity and Toxicology of Nanomaterials, University of Sorocaba (UNISO), Sorocaba, São Paulo, Brazil. ²Laboratory of Environmental Nanotechnology, State University of São Paulo (UNESP), Sorocaba, São Paulo, Brazil. Correspondence and requests for materials should be addressed to R.d.L. (email: renata.lima@prof.uniso.br)

ANEXO C – Orientações do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba

Orientações para apresentação de dissertações/teses do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba

As dissertações/teses do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba (PPGCF-Uniso) poderão ser apresentadas em dois formatos: o tradicional ou em formato de artigo(s) científico(s).

Os trabalhos de investigação que possam resultar em patentes poderão ser apresentados na forma convencional, a critério do grupo de pesquisadores envolvidos, reservadas as particularidades exigidas em relação ao sigilo.

O formato tradicional segue o padrão descrito nas normas do “Manual para normalização de trabalhos acadêmicos” da Universidade de Sorocaba.

As dissertações entregues no formato de artigo científico têm como exigência a publicação ou, no mínimo, a submissão prévia de **pelo menos um** artigo em revista científica com classificação mínima Qualis/Capes B2 (de acordo com a categorização da WebQualis mais recente, na data do envio/publicação) e podem ser inseridos no idioma e na formatação estabelecida pelo(s) respectivo(s) periódico(s). Os demais artigos podem não ter sido submetidos ainda.

As teses entregues no formato de artigo científico têm como exigência a publicação ou, no mínimo, a submissão prévia de **pelo menos dois artigos** em revista científica com classificação mínima Qualis/Capes B2 (de acordo com a categorização da WebQualis mais recente, na data do envio/publicação) e podem ser inseridos no idioma e na formatação estabelecida pelo(s) respectivo(s) periódico(s). Os demais artigos podem não ter sido submetidos ainda.

Para aclarar membros da banca que desconhecem esta versão alternativa da dissertação/tese recomenda-se anexar este documento no final das versões encaminhadas aos membros da banca.

A dissertação/tese no formato de artigo(s) científico(s) deverá possuir os elementos apresentados no Quadro 1.

Quadro 1 - Elementos para a construção da dissertação no formato de artigo(s) científico(s).

<i>Elementos pré-textuais</i>	<i>1. Folha de rosto</i>
	<i>2. Errata (Opcional)</i>
	<i>3. Folha de aprovação</i>
	<i>4. Dedicatória (Opcional)</i>
	<i>5. Agradecimentos (Opcional)</i>
	<i>6. Epígrafe (Opcional)</i>
	<i>7. Resumo na língua vernácula</i>

	<p><i>8. Resumo em inglês (Abstract)</i></p> <p><i>9. Lista de abreviaturas e siglas; lista de tabelas e lista de símbolos (opcionais). Estas listas não devem conter as informações apresentadas nos artigos científicos.</i></p> <p><i>10. Sumário</i></p>
<i>Elementos textuais</i>	<p><i>11. Introdução ou apresentação:</i> trata-se da parte inicial do texto com formulação clara e simples do tema investigado, constando a delimitação do assunto tratado, sua relevância e justificativa.</p> <p><i>12. Revisão de literatura:</i> quando a revisão de literatura for concebida como artigo de revisão, este item deverá ser incluído no item resultado(s).</p> <p><i>13. Objetivos:</i> geral e específico</p> <p><i>14. Material e Métodos (opcional). Quando parte dos resultados não for apresentada no formato de artigo, este item deverá ser incluído após os objetivos específicos. Quando o autor quiser apresentar o(s) método(s) de forma mais detalhada do que no artigo, este item pode também ser apresentado em separado.</i></p> <p><i>15. Resultados (pode ser apresentado no formato de artigos):</i> deve(m) ser inserida(s) a(s) cópia(s) de artigo(s) derivado(s) da dissertação, previamente publicados, submetidos ou não para publicação em revistas científicas. Sugere-se que cada artigo seja antecedido de uma breve apresentação seguida dos elementos de identificação do artigo (autores, título, revista de publicação, volume, páginas). Os artigos anexados poderão ser apresentados nos formatos exigidos pelas revistas, as quais os artigos foram publicados e/ou submetidos. Parte dos resultados pode ser apresentada em separado dos artigos, quando conveniente.</p> <p><i>16. Discussão (opcional):</i> O autor pode ampliar a discussão dos resultados, quando conveniente.</p> <p><i>17. Conclusão ou Considerações finais:</i> esta parte deverá conter a conclusão do trabalho ou as considerações do autor sobre os resultados alcançados frente aos objetivos propostos.</p>
<i>Elementos pós-textuais</i>	<p><i>18. Referências:</i> Devem seguir as normas do “Manual para normalização de trabalhos acadêmicos” da Universidade de Sorocaba.</p> <p>Não devem ser inseridas as referências apresentadas nos artigos.</p> <p><i>19. Apêndices (Opcional)</i></p> <p><i>20. Anexos (Opcional)</i></p>