

UNIVERSIDADE DE SOROCABA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA, EXTENSÃO E
INOVAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROCESSOS TECNOLÓGICOS E
AMBIENTAIS

Bianca Bertolini Migliorini

NANOBIOHÍBRIDOS PARA TRATAMENTO DE SEMENTES

Sorocaba/SP

2025

Bianca Bertolini Migliorini

NANOBIOHIBRIDOS PARA TRATAMENTO DE SEMENTES

Dissertação final apresentada à Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Processos Tecnológicos e Ambientais da Universidade de Sorocaba, como exigência parcial para obtenção do título de Mestre em Processos Tecnológicos e Ambientais.

Orientadora: Prof(a). Dr(a). Renata Lima

Sorocaba/SP

2025

Ficha Catalográfica

M576n Migliorini, Bianca Bertolini
Nanobiohíbridos para tratamento de sementes / Bianca Bertolini
Migliorini. -- 2025.
50 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Renata Lima.
Dissertação (Mestrado em Processos Tecnológicos e Ambientais) -
Universidade de Sorocaba, Sorocaba, SP, 2025.

1. Nanotecnologia. 2. Sementes – Controle biológico. 3.
Nanopartículas. I. Lima, Renata, orient. II. Universidade de Sorocaba. III.
Título.

Bianca Bertolini Migliorini

NANOBIOHIBRIDOS PARA TRATAMENTO DE SEMENTES

Dissertação apresentada à Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Processos Tecnológicos e Ambientais da Universidade de Sorocaba, como exigência parcial para obtenção do título de Mestre em Processos Tecnológicos e Ambientais.

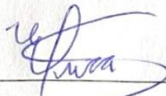
Aprovado: 26 de setembro de 2025

BANCA EXAMINADORA




Prof. Dr. Renata Lima

UNISO



Prof. Dr. Érica Cristina Santos Silva

UNISO



Prof. Dr. Eduardo Roberto de Almeida Bernardo

UNESP

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me guiado até aqui e ter me dado forças quando eu precisei.

Gostaria de agradecer a Prof^a Dra. Renata Lima que desde o primeiro ano da faculdade abriu as portas do LABITON para mim, me dando inúmeras oportunidades e por seguir sendo minha orientadora, me guiando e aconselhando.

A minha mãe por todo amor e carinho, por ter me apoiado e incentivado nessa caminhada, por sempre ter sido meu suporte, por sempre me ouvir e me aconselhar, e por ter me inspirado como profissional e ser humano. E a minha família por todo amor e apoio ao longo do caminho.

A todo pessoal do laboratório, por me acolherem, por sempre estarem dispostos a me ajudar, por tudo que me ensinaram e por me acompanharem sempre que eu precisei.

Muito obrigada a todos que participaram dessa minha trajetória.

Agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro concedido pelo Processo nº 2023/06380-1.

As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade do(s) autor(es) e não necessariamente refletem a visão da FAPESP.

RESUMO

A nanotecnologia ganhou destaque na agricultura devido a diferentes possibilidades de aplicação, seja no controle de pragas, doenças, fitonematóides e fertilização. Entre os diferentes tipos de nanomateriais, as nanopartículas metálicas e semimetálicas biogênicas, apresentam a característica da sinergia entre os metabólitos dos organismos e o metal/semimetal, além de apresentarem versatilidade, baixo custo e baixa toxicidade. O presente trabalho sintetizou nanopartículas metálicas de sílica, de ferro e bimetálicas sílica/ferro utilizando bactérias (*Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense*) e o fungo (*Trichoderma harzianum*), visando a melhora do crescimento e manutenção de plantas. O material desenvolvido foi avaliado quanto à caracterização físico-química, utilizando teste realizado utilizando *Dynamic Light Scattering* (DLS) e *Nanoparticles Tracking Analysis* (NTA). Foram avaliados a atividade e os efeitos da exposição na germinação das sementes de tomateiro e feijoeiro, e crescimento de plantas, a viabilidade e toxicidade em exposição a linhagens celulares, assim como produção enzimática de quitinase, celulase e sideróforos. A citotoxicidade foi verificada utilizando a técnica de redução do Tetrazolium (MTT) e linhagens celulares HaCat, V79 e 3T3. Após *screening* realizado uma nanopartícula foi escolhida para dar seguimento nas análises, esta apresentou ao longo de sua preparação um diâmetro de 95,8 nm (nanopartículas de ferro), 215nm (nano ferromagnética) e 227 nm quando encapada com sílica (nanopartícula de ferro/sílica), foram também sintetizadas nanopartículas de sílica para serem utilizadas como controle, estas apresentaram 203 nm de diâmetro. As concentrações de síntese variaram entre 1,39 e 2,26 x 10⁹ NPs/mL. Em relação ao teste de germinação com sementes de tomateiro e feijoeiro expostos às nanopartículas, foi possível verificar que estas não apresentaram grandes alterações quando comparadas com o controle. Em relação à toxicidade, nenhuma das nanopartículas apresentou IC₅₀ na concentração testada. Os resultados da atividade da quitinase mostraram que é possível detectar a presença da enzima nas nanopartículas, porém não foi possível detectar a atividade da celulase. Os resultados iniciais demonstraram que as nanopartículas ferro/sílica, não levam a alteração de parâmetros de germinação e desenvolvimento.

Palavras-chave: Síntese biogênica de nanopartículas; Sílica; Biofertilizantes; Microrganismos agrícolas; Germinação de sementes; Controle biológico; Tratamento de sementes.

ABSTRACT

Nanotechnology has gained prominence in agriculture due to its various applications, including pest control, disease control, phytonematode control, and fertilization. Among the different types of nanomaterials, biogenic metallic and semimetallic nanoparticles exhibit synergy between the metabolites of organisms and the metal/semimetal, in addition to being versatile, low cost, and low toxicity. This study synthesized metallic silica, iron, and bimetallic silica/iron nanoparticles using bacteria (*Bradyrhizobium japonicum* and *Azospirillum brasilense*) and the fungus (*Trichoderma harzianum*), aiming to improve plant growth and maintenance. The developed material was evaluated for physical-chemical characterization using Dynamic Light Scattering (DLS) and Nanoparticles Tracking Analysis (NTA) tests. The activity and effects of exposure on the germination of tomato and bean seeds, plant growth, viability, and toxicity in exposure to cell lines were evaluated, as well as the enzymatic production of chitinase, cellulase, and siderophores. Cytotoxicity was verified using the Tetrazolium reduction (MTT) technique and HaCat, V79, and 3T3 cell lines. After screening, one nanoparticle was chosen for further analysis. During preparation, it presented a diameter of 95.8 nm (iron nanoparticles), 215 nm (ferromagnetic nanoparticles) and 227 nm when coated with silica (iron/silica nanoparticles). Silica nanoparticles were also synthesized for use as controls, with a diameter of 203 nm. The synthesis concentrations varied between 1.39 and 2.26 x 10⁹ NPs/mL. Regarding the germination test with tomato and bean seeds exposed to nanoparticles, it was possible to verify that they did not show major changes when compared to the control. Regarding toxicity, none of the nanoparticles presented IC₅₀ at the tested concentration. The results of chitinase activity showed that it is possible to detect the presence of the enzyme in nanoparticles, but it was not possible to detect cellulase activity. The initial results demonstrated that iron/silica nanoparticles do not lead to changes in germination and development parameters.

Keywords: Biogenic synthesis of nanoparticles; Silica; Biofertilizers; Agricultural microorganisms; Seed germination; Biological control; Seed treatment.

SUMÁRIO

<u>1</u>	<u>INTRODUÇÃO</u>	<u>9</u>
<u>2</u>	<u>REVISÃO DE LITERATURA.....</u>	<u>12</u>
2.1	NANOTECNOLOGIA	12
2.2	NANOTECNOLOGIA APLICADA A AGRICULTURA	12
2.3	NANOPARTÍCULAS BIOGÊNICAS.....	13
2.4	MICRORGANISMOS NA AGRICULTURA.....	15
<u>3</u>	<u>OBJETIVO.....</u>	<u>18</u>
3.1	OBJETIVO GERAL.....	18
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
<u>4</u>	<u>MÉTODOS.....</u>	<u>19</u>
4.1	PREPARO DOS FILTRADOS PARA SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS	19
4.2	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA	20
4.3	EXPOSIÇÃO DE SEMENTES E ANÁLISE DE GERMINAÇÃO	21
4.4	DETECÇÃO DE QUITINASE NAS NANOPARTÍCULAS	22
4.5	DETECÇÃO DE PRESENÇA DE CELULASE NAS NANOPARTÍCULAS.....	22
4.6	DETECÇÃO DE PRESENÇA DE SIDERÓFOROS.....	23
4.7	AVALIAÇÕES DE CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE	23
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS.....	24
<u>5</u>	<u>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</u>	<u>25</u>
5.1	AJUSTE DE PROTOCOLOS DE SÍNTESES	25
5.2	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA	29
5.3	EXPOSIÇÃO DE SEMENTES E ANÁLISE DE GERMINAÇÃO	31
5.4	DETECÇÃO DE QUITINASE NAS NANOPARTÍCULAS	35
5.5	DETECÇÃO DE PRESENÇA DE CELULASE NAS NANOPARTÍCULAS.....	37
5.6	DETECÇÃO DE SIDERÓFOROS.....	39
5.7	AVALIAÇÃO DE CITOXICIDADE E GENOTOXICIDADE	40
<u>6</u>	<u>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</u>	<u>44</u>
	<u>REFERÊNCIAS.....</u>	<u>45</u>

1 INTRODUÇÃO

Dentro da nanotecnologia, as nanopartículas (NPs) são por definição partículas de uma dimensão e estão dentro da escala nanométrica, e apresentam suas características físico-químicas modificadas quando em escala nanométrica, e ganham outras características de bastante interesse, como magnetismo, baixa toxicidade, propriedades óticas e termodinâmicas (Hendricks *et al.*, 2023).

De uma forma geral, as NPs podem ser orgânicas, como micélios ou lipossomos, ou serem sintetizadas a partir de materiais inorgânicos, tornando-se nanopartículas inorgânicas, como as nanopartículas metálicas (Verma *et al.*, 2022).

Em relação às nanopartículas inorgânicas, estas podem ser sintetizadas a partir de metais e semimetais. Embora existam sínteses química e física, as NPs inorgânicas biogênicas, acabaram tendo destaque, devido a sua síntese que envolve organismos ou materiais biológicos, que funcionam como agentes redutores e estabilizantes (Rodrigues *et al.*, 2020; Suman *et al.*, 2024)

A utilização de organismos como fungos e bactérias leva à formação de um recobrimento que estabiliza as nanopartículas e é denominado *capping*, o qual muitas vezes contém grupos funcionais e enzimas que contribuem para a atividade das nanopartículas (Guilger-Casagrande *et al.*, 2021; Kumar *et al.*, 2023).

Além da estabilidade e menor toxicidade, a síntese biogênica também é explorada por apresentar menor custo e ser menos tóxica em relação às sínteses físicas e químicas, além dos materiais naturais usados na síntese serem de mais fácil acesso e mais disponíveis (Ebrahiminezhad *et al.*, 2018).

Na agricultura, a utilização de NPs biogênicas visas colaborar para uma agricultura sustentável e com menor toxicidade para o campo, uma vez que existe nos últimos anos uma preocupação constante em aumentar a produção sem que haja danos ao ambiente (Mahawar *et al.*, 2023; Khan *et al.*, 2025).

A utilização do material biológico em sinergia aos metais pode levar a resultados interessantes, onde é possível realizar a escolha baseado na função a qual a nanopartícula será destinada (Juárez- Maldonado *et al.*, 2019; Madhogaria *et al.*, 2024). No presente estudo foram escolhidos três microrganismos já conhecidos na área agrícola por promoverem o crescimento

das plantas, sendo eles o fungo *Trichoderma harzianum*, e as bactérias *Azospirillum brasilense* e *Bradyrhizobium japonicum*.

O *Trichoderma harzianum* é um fungo bastante conhecido na agricultura, é utilizado no controle de patógenos e no estímulo de crescimento de plantas, é encontrado no solo e possibilita a modificação do ecossistema, levando ao aumento dos microrganismos benéficos e dessa forma promovendo o crescimento das plantas (Liu *et al.*, 2022; Kajic, *et al.*, 2025).

A *Azospirillum brasilense* é uma bactéria que coloniza a rizosfera e promove o crescimento das plantas através da fixação de nitrogênio, estimula a síntese de fitormônios e a proteção de estresse biótico e abiótico (Degon *et al.*, 2023). *A. brasilense* promove a germinação das sementes e estimula o crescimento de raízes secundárias, além de promover o crescimento de outros microrganismos benéficos para o solo e para a planta (Silva *et al.*, 2022).

Bradyrhizobium japonicum está associado aos nódulos nas raízes das plantas, é usado como inoculante na agricultura para promover a produção no campo, é uma bactéria fixadora de nitrogênio. Forma relações simbióticas com as plantas, e estimula o crescimento das plantas de várias formas (Dutta; Shityakov; Maruyama, 2023; Padukkage *et al.*, 2020). Essa bactéria, além da fixação do nitrogênio, produz fitormônios e precursores de fitormônios e ajuda na resistência ao estresse biótico e abiótico (Schroeder *et al.*, 2022).

O Brasil consolida sua posição como um dos maiores exportadores de produtos agrícolas do mundo, com o agronegócio registrando valores recordes de exportação nos últimos anos. Em 2023, as exportações do setor atingiram a marca de US\$ 166,55 bilhões, um recorde histórico que evidencia a força e a capacidade de expansão da produção nacional (Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil, 2024).

A expansão das fronteiras agrícolas, impulsionada por novas tecnologias, intensifica os desafios fitossanitários, como a incidência de pragas e doenças. Nesse contexto, o desenvolvimento de soluções sustentáveis torna-se fundamental. O Manejo Integrado de pragas (MIP), que combina diferentes táticas de controle, e o crescente mercado de bioinsumos, que registrou um aumento de 15% na safra 2023/2024, são exemplos de estratégias que buscam aliar produtividade e menor impacto ambiental (CropLife Brasil, 2024).

Para este estudo, foram selecionados o tomateiro e o feijoeiro como culturas modelo. O tomate se destaca como uma das hortaliças de maior relevância econômica no Brasil, com uma produção que alcançou 3,8 milhões de toneladas em 2023 (IBGE, 2024). O feijão, por sua vez, representa um pilar da segurança alimentar e da economia, sendo um dos grãos mais

consumidos em países da América Latina e África. Sua importância global é crescente, com a demanda por fontes de proteína vegetal impulsionando o interesse mundial em sua cadeia produtiva (FAO, 2023).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Nanotecnologia

A nanotecnologia pode atender a uma ampla gama de aplicações, existindo muitos estudos desta tecnologia em diferentes áreas, como farmácia, saúde e agricultura, sendo a vantagem principal a alteração das características do material quando em escala manométrica (Najahi-Missaoui; Arnold; Cummings, 2020; Alzate-correa *et al.*, 2022). Os materiais apresentam redução de tamanho bruto para um tamanho de até 1000 nm (Singh *et al.*, 2022; Abaszadeh *et al.*, 2023; Bayda *et al.*, 2019).

O aumento da área superficial leva a um aumento da reatividade, alteração de cor do material, aumento da solubilidade, alteração das características termodinâmicas e óticas, (Verma *et al.*, 2022; Jiang *et al.*, 2022; Singh *et al.*, 2022). Os nanomateriais também oferecem a possibilidade de liberação controlada e alvo específico (Jiang *et al.*, 2022). Eles podem ser sintetizados em diversas formas e tamanhos, além de ser possível ter sua superfície funcionalizada o que permite um aumento na estabilidade (Shah *et al.*, 2024)

Os nanomateriais podem possuir uma dimensão, duas dimensões ou mais; os nanomateriais que possuem apenas uma dimensão são conhecidos como nanopartículas (Najahu-Missaoui; Arnold; Cummings, 2020). Também é possível que as NPs tenham diferentes formatos, como esféricas ou triangulares (Singh *et al.*, 2021).

2.2 Nanotecnologia aplicada a agricultura

Calcula-se que a população mundial ultrapasse 9 bilhões de pessoas até 2050, sendo necessário o aumento da produção de alimentos (Zhao *et al.*, 2020; Jiang *et al.*, 2022). Mediante a esta expectativa existem problemas que devem ser solucionados para que a produção supere os números atuais e forneça alimento suficiente, alguns fatores que devem ser superados são disponibilidade de terras disponíveis para plantio e questões ambientais (Guha *et al.*, 2020).

A forma mais utilizada para promover o aumento da produtividade é o uso de agroquímicos, como fertilizantes, pesticidas e herbicidas; entretanto, o uso desses atingiu um limite que deve ser considerado, entre eles a resistência dos patógenos e os problemas ambientais (Singh; Handa; Manchanda, 2021).

Entre as novas tecnologias que são utilizadas para auxiliar a uma agricultura mais sustentável temos a nanotecnologia que ganha cada vez mais destaque, sendo um dos pontos considerados para o seu uso na agricultura, a presença natural de nanomateriais, como os microrganismos que são capazes de formar nanopartículas (Wu; Li, 2022). Logo o uso da nanotecnologia na agricultura é apontado como uma estratégia promissora para aumentar a produtividade no campo (Bhatia; Gulati; Sethi, 2021; Mahawar *et al.*, 2023).

Entre os estudos existentes em nanotecnologia estão os focados em produção de *priming* de sementes para estimular a germinação e um crescimento mais acelerado das plantas e nanossensores, nanopesticidas e nanofertilizantes (Hong *et al.*, 2021; Nile *et al.*, 2022; Santás-Miguel *et al.*, 2023; Balusamy *et al.*, 2023). Algumas nanopartículas são utilizadas para a liberação controlada em alvo específico, isto torna possível que o princípio ativo permaneça no local específico por um maior período, dessa forma seria necessárias dosagens menores e mais espaçadas (Karnwal; Dohoroo; Malik, 2023).

2.3 Nanopartículas biogênicas

As nanopartículas de síntese biogênica têm atraído a atenção dos pesquisadores pelo aumento da preocupação com a sustentabilidade e o cenário ambiental atual (Shah *et al.*, 2024). A síntese biogênica apresenta menor custo e menor toxicidade quando comparada com os métodos físicos e químicos, isto ocorre por consumir menos energia no processo de síntese e não ser necessário o uso de reagentes químicos tóxicos (El-kahky *et al.*, 2021; Kah, Chandran, Abrahamse, 2023).

Para esta forma de síntese utiliza organismos ou seus metabolitos, como bactérias, fungos, vírus, plantas ou algas, podendo ser utilizados proteínas, enzimas e aminoácidos destes (Rozhin *et al.*, 2021). Estes funcionam como agentes redutores e estabilizantes, ou seja, durante a síntese esses produtos biológicos reduzem o material em escala nanométrica e formam uma película, chamada capping, que estabiliza o tamanho das nanopartículas e evita que haja a aglomeração. (Bekele; Gonfa; Sabir, 2021; Priya, *et al.*, 2023).

Há estudos que destacam o uso de fungos para serem usados na síntese biogênica devido à facilidade de cultivo, uma grande produção de biomassa e a quantidade de metabólitos que estes secretam (Zhang *et al.*, 2016; Gomaa *et al.*, 2022). Outros estudos destacam as bactérias, por sua facilidade de cultivo, a rapidez de crescimento e por sua facilidade em modificação genética (Singh *et al.*, 2018).

2.3.1 Nanopartículas de ferro

As nanopartículas de ferro e óxido de ferro (NPFe) são estudadas por suas capacidades de condutividade elétrica e térmica (Batoool *et al.*, 2021), sendo estudadas como carreadores de medicamentos na área médica e como herbicidas e nutrientes para o campo na agricultura (Siddiqi *et al.*, 2016).

Essas NPFe quando expostas ao ar ou a água são oxidadas e liberam íons, apresentadas em diferentes formas como magnetitas (Fe_3O_4), maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$), oxi-hidróxido de ferro (FeOOH) e ferro metálico zero- valente (Prema *et al.*, 2022). Elas possuem potencial antibacteriano e antifúngico, por isso são uma alternativa no combate a bactérias resistentes (Alam *et al.*, 2019; Minhas *et al.*, 2023).

Na agricultura a deficiência de ferro pode trazer diversos problemas para as plantas, o ferro é um importante mineral responsável por várias funções nas plantas que resultam no crescimento e desenvolvimento das plantas (Ahmad *et al.*, 2024). Dessa forma, as NPFe possuem potencial em serem usadas como fertilizantes por suas características benéficas para o campo, como biossíntese de clorofila, na síntese de enzimas e proteínas (Irum *et al.*, 2020).

2.3.2 Nanopartículas magnéticas de ferro

As nanopartículas magnéticas de ferro, são denominadas como superparamagnéticas, devido a sensibilidade à campos magnéticos (Frantellizi *et al.*, 2020). São cristais de óxido de ferro, chamados magnetita (Fe_3O_4) ou maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) (Yang *et al.*, 2023).

As superfícies destas nanopartículas podem ser modificadas para diversas aplicações (Matar; Andac, 2024). Existindo a possibilidade de manter o core metálico da nanopartícula e formar um capping externo, como polímeros hidrofílicos ou mesocamadas de silicato (Wu *et al.*, 2019; Lassenberger *et al.*, 2017).

Como as nanopartículas magnéticas de ferro são mais suscetíveis a precipitação e a agregação, a modificação na superfície viria a ser uma alternativa para impedir tanta a precipitação quanto a agregação (Awada *et al.*, 2019). Uma característica positiva dessas nanopartículas é que não há magnetização restante na inexistência de um campo magnético externo, permitindo um controle mais preciso (Dulinska- Litewka *et al.*, 2019).

2.3.3 Nanopartículas de sílica (NPSi)

A sílica é um dos materiais mais abundantes na Terra, sendo encontrado também em plantas, mesmo sendo um material inorgânico (Huang *et al.*, 2022). As NPSi possuem tamanho de partículas controláveis, e facilidade na modificação da superfície (Huang *et al.*, 2022). Podem ser sintetizadas a partir de diferentes precursores, como silicato de sódio, ortossilicato de tetraetila (TEOS), ortossilicato de tetrametila, e compostos de alcoxissilano, há estudos também que sintetizam as nanopartículas a partir de resíduos agrícolas (Seghir *et al.*, 2023).

As NPSi mesoporosas possuem poros uniformes em sua superfície, tem baixa toxicidade e alta estabilidade físico-química (Kudaibergen *et al.*, 2023). Apresentam características positivas, como biocompatibilidade e biodegradabilidade (Ding *et al.*, 20223).

Devido às suas características positivas, essas NPs recebem grande atenção para uma diversa gama de aplicações, podendo ser usadas carregando medicamentos, proteínas e pequenas moléculas, além de catalisar e usos na agricultura (Xu *et al.*, 2023). Em relação à agricultura, a sílica está envolvida na adaptabilidade das plantas em diversas situações de estresse biótico e abiótico, e as NPSi podem ser úteis nessas situações, dessa forma aumentando a produtividade no campo (Sankareswaran *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2022).

2.3.4 Nanopartículas de ferro com sílica

As nanopartículas magnéticas de ferro possuem a facilidade de agregação, dessa forma, a modificação na superfície com sílica seria uma possibilidade para solucionar esse problema, mantendo o magnetismo das nanopartículas de ferro (Reczynska *et al.*, 2020).

Além da agregação, outra preocupação é a degradação rápida e, conseqüentemente, a perda de magnetismo com o passar do tempo; dessa forma, o revestimento com sílica atrasaria a degradação e manteria o magnetismo por mais tempo (Li *et al.*, 2013). Conseqüentemente, o revestimento de sílica é amplamente estudado. As propriedades da sílica, como baixa toxicidade e possibilidade de funcionalização, e o fato de manter as características térmicas e magnéticas das nanopartículas de ferro, podem prolongar a vida útil das nanopartículas, sendo uma boa opção para utilização na agricultura (Donadelli *et al.*, 2018).

2.4 Microrganismos na agricultura

O desejo de uma agricultura mais sustentável impulsiona a busca por soluções que sejam capazes de promover uma diminuição no uso de agroquímicos; isto estimula o uso de

microrganismos como uma alternativa ecológica que oferece várias vantagens no setor agrônômico (Cortivo *et al.*, 2020; Afridi *et al.*, 2024).

A aplicação de microrganismos na agricultura se aproveita das relações já existentes nos ecossistemas, priorizando benefícios ecológicos, assim promove uma agricultura equilibrada (Kumar; Dubey, 2020). Espera-se que o menor uso de agroquímicos e o aumento do uso de microrganismos nas plantações diminuam os danos colaterais nos organismos não alvo, resultando em diminuição dos danos em humanos e no ambiente (Ansari *et al.*, 2021).

Hoje é conhecida e utilizada uma extensa gama de microrganismos, como fungos e bactérias, capazes de promover o crescimento das plantas e promover o controle biológico contra doenças e pragas nas plantas (Fusco *et al.*, 2022). Estes estudos mostram que alguns microrganismos são capazes de promover o crescimento das plantas por facilitar que a planta adquira os nutrientes necessários, pois por muitas vezes estes colonizam as raízes das plantas e solubilizam os nutrientes, além de melhorar a absorção de nitrogênio nas plantas, os microrganismos usados nesse estudo (Kumar; Dubey, 2020; Cortivo *et al.*, 2020).

2.4.1 *Trichoderma harzianum*

O *Trichoderma harzianum* é um fungo, verde filamentosos, naturalmente encontrado no solo, pode sobreviver e se adaptar a condições desfavoráveis, é usado na agricultura como biofertilizantes e biopesticidas (Mironenka *et al.*, 2021; Bjork *et al.*, 2023).

Como biopesticida, este interage com os patógenos, sejam eles patógenos de folhagem ou de raiz de diversas formas, podendo parasitar os patógenos, ou através da competição por espaço e nutrientes (Mukhopadyay; Kumar, 2020). Outros estudos mostram que o *T. harzianum* é capaz de promover o crescimento das plantas, melhorando a germinação das sementes (Bjork *et al.*, 2023). Ainda existem evidências de que, quando utilizado como biofertilizante, o *T. harzianum* consegue combater estresse abiótico e estresse biótico (Bashyal *et al.*, 2021), além de apresentar a capacidade de aumentar a absorção de nutrientes e a capacidade de retenção de água (Marra *et al.*, 2021).

2.4.2 *Azospirillum brasilense*

A *Azospirillum brasilense* é uma bactéria Gram-negativa móvel com forma de vibrião (Martínez *et al.*, 2023). É uma bactéria prolífica colonizadora, biofertilizante presente na agricultura (Zhao *et al.*, 2023). Pode estar associada à rizosfera da planta, colonizando tanto a região externa quanto associar-se endofiticamente se houver uma colonização interna nos

espaços intracelulares das raízes (Zeffa *et al.*, 2019). Possui a capacidade de promover o crescimento das raízes e o aumento das raízes secundárias, facilitando a aquisição de fósforo pela planta (Zhao *et al.*, 2023).

Outra forma que essa bactéria consegue promover o crescimento das plantas é através da fixação do nitrogênio e através da proteção das plantas de estresse biótico e estresse abiótico (Méndez-Gómez *et al.*, 2021; Degom *et al.*, 2023).

2.4.3 *Bradyrhizobium japonicum*

A *Bradyrhizobium japonicum* é uma bactéria Gram-negativa, que faz parte do grupo de fixadoras de nitrogênio, essa bactéria coloniza as raízes das plantas criando nódulos (Ong; O'Brian, 2024). Apresentam relação de simbiose com as plantas; a planta hospedeira entrega fontes de carbono para atender às demandas energéticas da bactéria e, por sua vez, a bactéria sintetiza nitrogênio (Bender *et al.*, 2022; Bitire *et al.*, 2023).

Elas são encontradas naturalmente na microbiota do solo, possuem a capacidade de alterar a morfologia das raízes e o metabolismo de alguns fitormônios, podendo produzir fitohormônios ou precursores desses hormônios (Schroeder *et al.*, 2022). A sua utilização na agricultura tem a função de promover o crescimento das plantas e, conseqüentemente, aumentar a produtividade (Gomez *et al.*, 2023). A *B. japonicum* é capaz de diminuir os estresses bióticos e estresses abióticos das plantas, como expressar enzimas antioxidantes nas plantas sob estresse salino, e a produção de sideróforos (Gomez *et al.*, 2023; Torres *et al.*, 2018).

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo sintetizar de forma biogênica nanopartículas metálicas de sílica, de ferro e combinação sílica/ferro (bimetálicas) utilizando o fungo *Trichoderma harzianum* (IBLF 006) e as bactérias *Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA 5079 e SEMIA 5080) e *Azospirillum brasilense* (AbV5 e AbV6) como agentes redutores e estabilizantes, avaliar seu efeito na germinação de sementes e crescimento das plantas de tomateiro e feijoeiro.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar de nanopartículas biogênicas utilizando como o agente redutor ou estabilizante um mix de metabólitos de *Trichoderma harzianum*, *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* utilizando cloreto de ferro III (FeCl₃) e cloreto de ferro II (FeCl₂) para as nanopartículas de ferro e *Tetraethyl orthosilicate* (TEOS) para a síntese de nanopartículas de sílica;
- Caracterizar as nanopartículas para a definição de parâmetros como distribuição de tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta através de análises por rastreamento de nanopartículas e microeletroforese;
- Caracterizar as nanopartículas utilizando microscopia de varredura (MEV);
- Avaliar dos efeitos das nanopartículas biogênicas em sementes, através do ensaio de germinação;
- Detectar a presença de quitinase nas nanopartículas;
- Detectar a presença de celulase nas nanopartículas;
- Detectar a presença de sideróforos nas nanopartículas;
- Avaliar o comportamento das plantas provenientes de sementes de tomateiro e feijoeiro expostas as nanopartículas;
- Avaliar a viabilidade celular em exposição as nanopartículas linhagens celulares em culturas 2D, por meio do ensaio de viabilidade indireta por MTT (redução de tetrazolium), viabilidade direta por Azul de Tripan;
- Analisar a genotoxicidade utilizando ensaio cometa.

4 MÉTODOS

4.1 Preparo dos filtrados para síntese de nanopartículas

Para a síntese das nanopartículas, os filtrados de *Trichoderma harzianum* (IBLF 006), *Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA 5079 e SEMIA 5080) e *Azospirillum brasilense* (AbV5 e AbV6) e respeitando as exigências individuais para o melhor crescimento e desenvolvimento dos microrganismos eles foram preparados separadamente.

Para obtenção dos metabólitos de *T. harzianum*, inicialmente, foi crescido uma cultura em meio composto por ágar batata dextrose (BDA), mantido em estufa a 25 C° por 168 horas. Após esse período discos de micélio foram transferidos para caldo batata dextrose (BD), sendo a cultura fermentada por 288 horas, em agitação constante de 150 rpm a 25C°. A biomassa obtida foi pesada e transferida para um volume dez vezes maior de água que a massa obtida e mantida nas condições anteriores por 72 horas (Deshmukh; Gupta; Kim (2019).

Para a obtenção dos metabólitos das bactérias (*Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense*), cada cepa foi inoculada com 1mL de bactéria para cada 100mL de caldo nutriente e estas foram mantidas sob agitação constante de 150 rpm a 35C° por 24 horas. Após as 24 horas de fermentação, a cultura foi centrifugada, o sobrenadante foi descartado e a biomassa foi colocada em água, seguida de centrifugação para retirada de quaisquer resquícios de meio. Na sequência, o pallet formado foi colocado em 100mL de água ultrapura e mantida em agitação nas condições anteriores por mais 72 horas.

Após 72 horas de fermentação em água ultrapura, os metabólitos obtidos foram misturados na proporção (1:1:1), e após mistura foram separados em dois grupos, para que fossem processados de diferentes maneiras. O grupo 1 foi filtrado anteriormente a 0,45 µm seguido de filtração em filtros 0,2 µm. O grupo 2 foi utilizado para a síntese sem que tenha ocorrido a filtração (NAYAK *et al.*, 2016).

4.1.1 Síntese das nanopartículas biogênicas de ferro

Para a síntese de nanopartículas de ferro (NPFe) foram utilizados os precursores cloreto de ferro III (FeCl₃) e cloreto de ferro II (FeCl₂), sendo as nanopartículas de ferro mantidas em agitação por 72 horas (Li *et al.*, 2011 e Kim *et al.*, 2008), em temperatura de 25°C.

4.1.2 Síntese das nanopartículas de sílica

As nanopartículas de sílica (NPSi) foram sintetizadas a partir do precursor TEOS (*Tetraethyl orthosilicate*/Sigma). As sínteses foram seguindo Sankareswaran *et al.*, 2022 e Periakaruppan *et al.*, 2022. Para a síntese de sílica (NPSi) o material utilizado foi o mix de metabólitos que não foi filtrado, onde 20 mL do material de cultura não filtrado foi acrescido de 12 mL de TEOS, sendo mantido em agitação a 50 °C e por 15 min. Após os 15 min, foram acrescentados 12 mL de solução de HCl a 1M e o material foi mantido em agitação por mais 15 min, em temperatura ambiente. Após os 15 min, sendo necessário realizar a secagem a solução foi colocada em forno a 100°C durante a noite.

4.1.3 Síntese das nanopartículas biogênicas de ferro com sílica

A síntese de ferro com sílica (NPFesi) foi baseada em Li *et al.* (2011), Kim *et al.* (2008). Para a síntese de ferro com sílica, as nanopartículas de ferro foram utilizadas 21,6mL das nanopartícula de ferro magnética, 3,32mL de etanol e 0,78g de CTAB, a mistura foi mantida em agitação magnética, seguida do acréscimo de 2,19mL de TEOS, foi mantida em agitação a 80 C° por 2 horas. Após este período, a solução foi transferida para um tubo tipo Falcon e centrifugada por 10 min a 10.000 rpm. Sendo necessário a secagem o pallet obtido foi transferido para o forno a 60 °C onde permaneceu durante a noite.

4.2 Caracterização físico-química

As diferentes atividades de caracterização que foram realizadas foram baseadas em Gomes *et al.*, 2019. O potencial zeta foi verificado pela técnica de microeletroforese utilizando o equipamento ZetaSizer Nano ZS 90 (Malvern). Foram realizadas três leituras a um ângulo fixo de 90°, a 25°C, e os resultados foram expressos pela média das leituras. A técnica de rastreamento de nanopartículas foi realizada para determinar a distribuição de tamanho, concentração e índice de polidispersão, utilizando o equipamento *NanoSight* LM14 e uma câmera ligada ao software *NanoSight* v.2.3.

A observação das nanopartículas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foi realizada com um microscópio eletrônico de varredura (SEM; FEI-Inspect-F50) operado com voltagem de aceleração de 2 kV. As amostras foram gotejadas em substrato de silício previamente tratado (*glow discharge*). Depois de seco, o substrato de silício foi colocado na porta amostra com fita de carbono, o qual foi submetido a deposição de filme de carbono com 10 nm de espessura sob atmosfera de argônio.

Para determinação da estrutura das nanopartículas foi realizada a Difração de Raios X (DRX). Os difratogramas foram obtidos através de medidas realizadas no difratômetro Shimadzu modelo XRD-6000, utilizando como fonte de radiação a linha de emissão do cobre (λ Cu $K\alpha = 1,5418\text{\AA}$).

4.3 Exposição de sementes e análise de germinação

4.3.1 Tratamento de sementes (priming)

Para o teste de germinação foram utilizadas sementes de feijoeiro e tomateiro. Para as sementes de feijoeiro foram separadas 100 g de sementes e para as sementes de tomateiro foram separadas 1,5 g de sementes. As sementes foram colocadas em sacos grandes e tratadas com 1mL para as sementes de tomateiro e 2mL para as sementes de feijoeiro da substância de exposição. A princípio foi realizado um *screening* com as sementes de tomateiro em diferentes concentrações das nanopartículas ($41,7e+06$, $13,9e+06$, $6,95e+06$ e $1,39e+06$), após o *screening* foi escolhida a concentração $1,39e+06$ para seguir com os testes de germinação, sendo possível observar que foi a concentração que as plantas se desenvolveram melhor, e como controle foram utilizados água e o mix de metabólitos. As nanopartículas foram despejadas nos sacos junto das sementes, e estes foram agitados vigorosamente por 2 min para uma aplicação uniforme, em seguida as sementes foram deixadas para secar overnight, em temperatura de 25°C .

4.3.2 Germinação de sementes e acompanhamento de viabilidade

Os índices de germinação das sementes foram avaliados após o tratamento com as nanopartículas e a secagem das sementes.

Para acompanhamento da viabilidade das sementes, estas foram estocadas logo após o tratamento com as nanopartículas e secagem, sendo realizada uma análise após secagem, mês a mês, nos três primeiros meses e após seis meses.

Para avaliação da germinação, após a exposição, as sementes foram colocadas em papel de germinação 28/76 cm, com um espaço de 3 cm entre as sementes. Cada folha de germinação foi umedecida com 10 mL de água ultrapura, sendo em seguida dobrada, inserida em pacotes plásticos e incubada no escuro e temperatura ambiente. Foram determinados o tempo de germinação de 7 dias para ambas as sementes, tanto de feijão como de tomate, e em seguida determinado o índice de germinação (Equação 1) e analisado o desenvolvimento de raízes (comprimento da raiz principal, número de raízes laterais e área da raiz).

$$\% \text{ de Germinação} = \frac{N \times 100}{TS} \quad \text{Equação 1}$$

Onde N, é o número de sementes germinadas e TS, é igual ao número total de sementes usadas no ensaio.

Para avaliação do desenvolvimento das raízes, fotos das sementes germinadas foram analisadas pelo software Image J. A partir das análises foram obtidos o comprimento das raízes (cm).

4.4 Detecção de quitinase nas nanopartículas

Para a detecção de quitinase foi preparado 1 L do meio, foi utilizado 0,3 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 g de KH_2PO_4 , 1 g de ácido cítrico monoidratado, 15 g de ágar, 200 μL de Tween- 80, 4,5 g de quitina coloidal e 0,15 g de roxo bromocresol, foi realizado o ajuste do pH para 4,7 e o meio foi autoclavado. Após autoclavado, o meio foi colocado em placas de *petri*, após solidificação, discos de papel filtro embebidos nas nanopartículas foram colocados no centro da placa. As placas foram incubadas a 25 °C e foi aguardada a alteração de coloração do meio indicando a presença de quitinase (AGRAWAL e KOTASTHANE, 2012).

O teste foi repetido em caldo para observar como seria o comportamento das nanopartículas em meio líquido, então todos os reagentes foram utilizados menos o ágar, dessa forma o meio não se solidificou. Foram acrescentados 5 mL do caldo de quitinase e 10 μL das amostras. Em ambos os testes foram usadas as bactérias *A. brasilense* e a *B. japonicum* e o fungo *T. harzianum*, e os metabólitos na mesma proporção usada nas sínteses (1:1:1) como controle.

4.5 Detecção de presença de celulase nas nanopartículas

As placas foram preparadas usando meio de composição CMC (NaNO_3 - 0,5 g; K_2HPO_4 - 1 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,5 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,01 g; Extrato de Levedura- 1 g; CMC- 10 g; ágar- 15 g; q.s.p. H_2O 1 L e suplementação de 1 mL de Triton 100X. Após solidificação do meio, no centro das placas foram colocados discos de papel filtro embebidos com as nanopartículas. Após 168 horas a 30 °C, as placas foram lavadas com solução de vermelho Congo (0,1% v/v). Depois de 15 min, as placas foram lavadas com solução de NaCl a 1 M, revelando os halos formados de degradação de celulose (Pansa, 2017).

4.6 Detecção de presença de sideróforos

Foi dissolvido 60,5 mg de CAS em 50 mL de água destilada. Em separado, foi misturado 10 mL de uma solução de cloreto férrico (1 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ em 10 mM HCl) com 72,9 mg de hexadeciltrimetilamônio (HDTMA) dissolvido em 40 mL de água. A solução de CAS foi então lentamente adicionada à solução de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ /HDTMA sob agitação constante. A solução resultante, de cor azul, foi autoclavada. Foi autoclavado de forma separada o ágar. Após a autoclavagem e resfriamento de ambos os componentes a aproximadamente 50-60°C, foi misturado asépticamente 100 mL da solução CAS com 900 mL do ágar. Foi homogeneizado suavemente para evitar bolhas e vertido em placas de Petri estéreis. Após solidificação do meio, no centro das placas foram colocados discos de papel filtro embebidos com as nanopartículas por 168 horas.

4.7 Avaliações de Citotoxicidade e Genotoxicidade

Para os testes utilizando culturas 2D, foram preparadas placas de cultura com suspensão celular a 1×10^5 células/mL, a partir das linhagens: HaCat (queratinócitos humanos), 3T3 (fibroblastos embrionários de camundongo) e V79 (fibroblastos pulmonares de hamster chinês), as quais foram mantidas em incubação a 37 °C por 24 horas, para a aderência total das células. A seguir, as células foram expostas às nanopartículas pelo período que varia conforme o teste utilizado.

4.7.1 Avaliação da atividade mitocondrial por redução do Tetrazolium (MTT)

O ensaio de redução do Tetrazolium (MTT) foi conduzido com base em Sieuwerts *et al.* (1995). Este ensaio possui boa aceitação, sendo um dos ensaios sugeridos pela Anvisa e FDA para a avaliação da citotoxicidade de algumas substâncias.

As células aderentes foram colocadas em placas de 96 poços (10^6 células/poço) por 24h para aderência, após estarem aderidas, foram expostas às nanopartículas em concentrações decrescentes (48,65e+06, 41,7e+06, 34,75e+06, 27,8e+06, 20,85e+06, 13,9e+06, 6,95e+06, 1,39e+06) por 24h. Após exposição, as nanopartículas foram retiradas e foi adicionada solução de MTT (3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) por 3 horas. Após este período o dimetilsulfoxido (DMSO) foi solubilizado nos poços. A análise da viabilidade celular por meio da atividade mitocondrial foi realizada com equipamento GloMax Explorer à 560 nm.

4.7.2 Viabilidade celular direta com azul de Tripán

O ensaio de exclusão por azul de Tripán foi utilizado para avaliar a citotoxicidade mensurando a viabilidade celular direta pela integridade da membrana celular. Nesse ensaio, as células não viáveis (mortas) apresentam o rompimento da membrana plasmática, absorvendo o azul de Tripán para o citoplasma, enquanto as células vivas permanecem intactas e incolores.

Inicialmente, as células foram expostas às nanopartículas por 1h, na concentração de $48,65 \times 10^6$. Em seguida, foram homogeneizadas e misturadas a uma solução de azul de Tripán a 0,4% na proporção final de 1:1 e transferidas para a câmara hemocitométrica de Neubauer. A contagem de células viáveis (não coradas) e não viáveis (coradas) foi realizada por microscopia. O cálculo foi determinado pela: $\text{viabilidade celular (\%)} = \frac{\text{n. de células viáveis} \times 100}{\text{total de células (coradas e não coradas)}}$.

4.7.3 Avaliação da genotoxicidade das nanopartículas pelo ensaio cometa

O ensaio cometa foi realizado de acordo com a metodologia adaptada de Singh *et al.* (1988). As células foram expostas às nanopartículas na concentração de $41,7 \times 10^6$ pelo período de 1 h, seguidas de homogeneização em agarose de baixo ponto de fusão e aplicadas em lâminas pré-gelificadas com agarose. Após solidificação, as lâminas passaram por solução de lise por 1 h e corrida de eletroforese por 20 min (22 V, 10 W e 300 mA), seguidas de coloração. As análises foram realizadas por “*scoring visual*” em microscópio óptico, classificando os danos ao DNA em diferentes categorias.

4.8 Análise Estatística dos Resultados

As análises estatísticas dos resultados dos ensaios foram realizadas utilizando ANOVA, seguidas do Tukey's HSD post hoc test (variâncias iguais), programa *GraphPad Prism*. A significância estatística foi definida como $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Ajuste de protocolos de sínteses

5.1.1 *Nanopartículas de ferro*

Quadro 1 - Quadro indicando todos os protocolos utilizados para as sínteses das nanopartículas de ferro.

Protocolo	Concentração	Modo de preparo	Filtragem
1	0,03M de FeCl ₂ e FeCl ₃	uso direto do pó	om e sem filtragem
2	0,03M FeCl ₂ e FeCl ₃	solução previa	com e sem filtragem
3	0,003M FeCl ₂ e FeCl ₃	uso direto do pó	com e sem filtragem
4	0,003M FeCl ₂ e FeCl ₃	solução previa	com e sem filtragem
5	0,00315 M de FeCl ₂ e 0,00631M e FeCl ₃	uso direto do pó	com e sem filtragem
6	0,00315 M de FeCl ₂ e 0,00631M e FeCl ₃	solução previa	com e sem filtragem
7*	0,01M de FeCl ₂ e 0,02M FeCl ₃	solução previa	sem filtragem
7m	0,01M de FeCl ₂ e 0,02M FeCl ₃ (magnetizada)	solução previa	sem filtragem

Inicialmente foram realizados 2 protocolos de síntese, um deles utilizando o sal diretamente no material obtido do mix de metabólitos, e na outra foi realizada uma solução concentrada dos sais e estes foram pingados lentamente no material obtido da síntese (Quadro 1).

Logo, para o protocolo 1 foram utilizadas quantidades de sais suficientes para uma concentração final de 0,03M, e os sais foram acrescentados diretamente no material obtido da cultura (metabólitos) (HOAG *et al.*, 2009, modificado). Após o uso deste protocolo, foi observada alteração da coloração da solução para marrom, porém o material mostrou-se turvo, sendo observado excesso de sal, sendo este decantado, isto ocorreu em ambas as sínteses, tanto do grupo 1 como do grupo 2.

O protocolo 2 foi realizado para a obtenção de uma concentração final de 0,03M de ambos os sais, porém inicialmente foi preparada uma solução de cloreto de ferro III (FeCl₃) e uma solução de cloreto de ferro II (FeCl₂) em maior concentração (BILESKY- JOSÉ *et al.*, 2021). Ambas as nanopartículas ficaram com uma coloração marrom escura e turvas.

Devido à alta turbidez, decidiu-se realizar um terceiro e quarto protocolos onde a concentração de sais no final da solução foi 0,003M. O protocolo 3 seguiu os passos do protocolo 1 utilizado onde os sais foram acrescentados diretamente nos filtrados (HOAG *et al.*, 2009, com alterações). Os resultados ainda apresentaram soluções turvas e amareladas e foram observados decantação de sal excedente da síntese.

O protocolo 4 foi realizado seguindo a concentração do protocolo 3, mas o FeCl₃ e FeCl₂ foram preparados em soluções mais concentradas e adicionados lentamente para obtenção de concentração final de 0,003M. Aqui também foram observadas e decantação de sais.

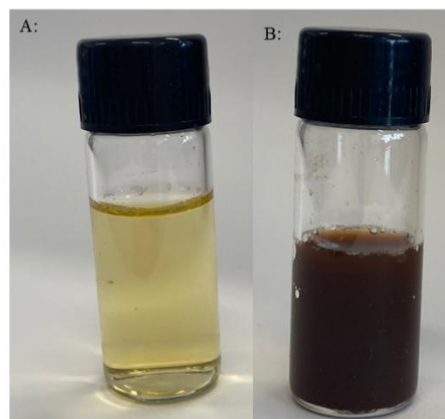
Novos protocolos se seguiram, com a síntese utilizando protocolos 5 e 6, utilizando como base Talone *et al.* (2020), onde as concentrações finais utilizadas foram de 0,00315 M de FeCl_2 e 0,00631 M de FeCl_3 , sendo a síntese 5 com o sal adicionado diretamente nos filtrados e a síntese 6 com solução de FeCl_3 e FeCl_2 . As nanopartículas apresentaram uma coloração marrom clara, porém muito turvas, e apresentaram decantação de sal.

Um novo protocolo foi utilizado, protocolo 7, este foi baseado em Khandanlou *et al.* (2013) com algumas modificações, as concentrações finais de cada sal foram 0,01 M de FeCl_2 e 0,02 M de FeCl_3 a partir de soluções concentradas de FeCl_3 e FeCl_2 . Na última síntese foi utilizado apenas o mix de metabólitos que não foi filtrado, pois não foram observadas diferenças nas sínteses anteriores quando era realizada a filtração. Para a síntese das nanopartículas de ferro com sílica houve a necessidade de magnetizar as nanopartículas de ferro (NPFemg), porque não houve síntese quando não estavam magnetizadas, sendo escolhidas nanopartículas sintetizadas utilizando o protocolo 7 por não apresentarem sal excedido e mais translúcidas.

Para a magnetização das nanopartículas (Protocolo 7m), estas, após serem sintetizadas, foram acrescidas de 2 mL de solução de amônia a 25% para cada 100 mL de síntese, e foram mantidas por 2h sob agitação. Após as duas horas, pode ser observada a alteração de cor das nanopartículas, adquirindo uma tonalidade preta. As nanopartículas agora magnéticas foram transferidas para um tubo tipo Falcon e lavadas com água ultrapura por três vezes. O magnetismo final foi comprovado utilizando-se um ímã.

Após a síntese utilizando o protocolo 7, o material final contendo nanopartículas apresentou transparência e coloração marrom-clara (Figura 1A). Já as nanopartículas magnéticas apresentaram coloração mais escura (Figura 1B).

Figura 1- Imagem das nanopartículas após a síntese. Em A NPF_e e em B NPF_em_g. Na imagem é possível observar a alteração na coloração após o processo de magnetização.



5.1.2 Nanopartículas de sílica

O primeiro protocolo (Protocolo 1S) utilizado para a síntese utilizou 20 mL do mix de metabólitos e 12 mL de TEOS, esta mistura foi mantida em agitação magnética por 10 min a 60 °C. Após os 10 min, o material foi retirado da agitação e foram acrescentados 8,4 mL de solução de HCl a 1 M, sendo esta mistura mantida parada por 10 min, porém foi observado que a síntese não aconteceu.

Um segundo protocolo foi utilizado (Protocolo 2S), onde 20 mL do material de cultura não filtrado foi acrescido de 12 mL de TEOS, sendo mantido em agitação a 50 °C e por 15 min. Após os 15 min, foram acrescentados 12 mL de solução de HCl a 1M e o material foi mantido parado por mais 15 min. Após os 15 min, a solução foi colocada em forno a 100°C durante a noite. No dia seguinte foi obtido um produto em grânulos, o qual a coloração variava entre amarelo claro e um amarelo mais escuro. Esses grânulos foram triturados para se obter um pó de coloração amarela clara.

Um novo protocolo foi testado (Protocolo 3S), neste seguiu-se o protocolo 2S, porém ao invés de deixar em 15min o material parado após adição de HCL, este foi deixado em agitação seguido de forno 100°C por 24 horas. Após a retirada do material do forno, foi possível observar que os grânulos obtidos estavam transparentes, e após este ser triturado, foi possível obter um pó branco (Figura 2).

5.1.3 Nanopartículas de ferro e sílica

O primeiro protocolo montado (Protocolo 1FS) foi realizado utilizando as nanopartículas do Protocolo 7, neste foram utilizados 21,6 mL das nanopartículas de ferro, onde foram misturados 3,32 mL de etanol e 0,78 g de CTAB (Brometo de Cetiltrimetilamônio). Esta mistura foi mantida em agitação magnética até o CTAB dissolver completamente, depois de dissolvido, foram acrescentados 2,19 mL do precursor TEOS e mantida em agitação magnética por duas horas a 80 °C. Após duas horas a solução foi transferida para um tubo tipo falcon de 50 mL e centrifugada por 10 min a 10.000 rpm, a princípio o pallet obtido seria transferido para água ultrapura para lavar a solução, entretanto na primeira centrifugação foi observado que não houve um pallet formado levando a conclusão de que a síntese da nanopartícula de ferro com sílica não resultou em nanopartículas.

Uma observação que deve ser considerada é que na literatura os artigos sempre utilizam síntese de ferro magnético (Li *et al.* 2011; Kim *et al.*, 2008; Talone *et al.*, 2020) com

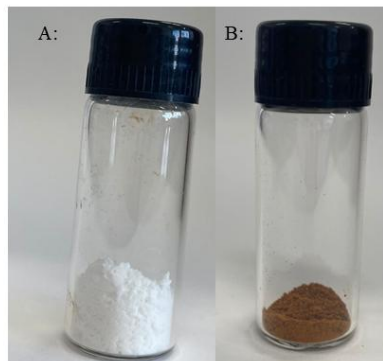
sílica. Este primeiro protocolo (Protocolo 1FS) foi realizado utilizando nanopartículas não magnéticas provenientes do Protocolo 7.

Um segundo protocolo foi realizado (Protocolo 2FS), onde a nanopartícula de ferro magnética (NPFemg), proveniente do Protocolo 7m, foi seca em forno a 80 °C por três horas, e então foi obtido um pó preto como produto. Para esta síntese foram utilizadas 1 g das NPFemg, 21,6 mL de água ultrapura, 3,32 mL de etanol e 0,78 g de CTAB, a mistura foi mantida em agitação até a completa dissolução do CTAB, em seguida foi acrescentado 2,19 mL do precursor TEOS e a mistura foi mantida em agitação por 2 horas a 80 °C. Passadas essas 2 horas, a solução foi centrifugada por 10 min a 10.000 rpm. Na primeira centrifugação, pode ser observado que a nanopartícula de ferro e o TEOS ficaram em fases diferentes, não havendo formação de nanopartícula de ferro com sílica.

Um terceiro protocolo foi utilizado (Protocolo 3FS) onde as nanopartículas de ferro não passaram por secagem. Foram utilizados 21,6 mL das nanopartículas de ferro magnético, 3,32 mL de etanol e 0,78 g de CTAB, a mistura foi mantida em agitação magnética, seguida do acréscimo de 2,19 mL de TEOS, a mistura foi novamente agitada a 80 °C por 2 horas. Após este período, a solução foi transferida para um tubo tipo Falcon e centrifugada por 10 min a 10.000 rpm, sendo observada a formação de um pellet homogêneo, o sobrenadante foi descartado e foram realizadas três lavagens com água ultrapura. O pallet obtido foi transferido para o forno a 60 °C onde permaneceu durante a noite. O produto obtido foi um pó de coloração acobreada, a nanopartícula de ferro com sílica foi então obtida e seu magnetismo foi testado.

Logo ao final do *screening* de sínteses, os protocolos escolhidos para a realização do trabalho foram Protocolo 7m, Protocolo 3S e Protocolo 3FS.

Figura 2- Imagem das nanopartículas após a síntese. Em A: NPSi e em B: NPFeSi.



5.2 Caracterização físico-química

As nanopartículas NPFemg, NPSi e NPFeSi foram caracterizadas a partir da técnica de NTA, microeletroforese e MEV, sendo possível determinar o tamanho, concentração, índice de polidispersão e potencial zeta. A princípio foi realizado o NTA sem as NPs serem filtradas e os resultados estão na Tabela 1.

Tabela 1 - Caracterização físico-química das nanopartículas de ferro, nanopartículas de sílica e nanopartículas de ferro com sílica.

Protocolo	Filtragem	NPS	Tamanho (nm)	Concentração (NPs/mL)
Protocolo 1	Filtrada	NPFe-1f	304.6	5.77e+10
	Não filtrada	NPFe-1	207.7	3.67e+10
Protocolo 2	Filtrada	NPFe-2f	127.1	5.53e+10
	Não filtrada	NPFe-2	110.4	6.30e+10
Protocolo 3	Filtrada	NPFe-3f	399.8	5.56e+10
	Não filtrada	NPFe-3	205.8	2.25e+11
Protocolo 4	Filtrada	NPFe-4f	118.7	6.16e+10
	Não filtrada	NPFe-4	273.9	1.20e+10
Protocolo 5	Filtrada	NPFe-5f	393.9	4.96e+10
	Não filtrada	NPFe-5	372.8	3.50e+10
Protocolo 6	Filtrada	NPFe-6f	132.6	5.64e+10
	Não filtrada	NPFe-6	123.9	3.03e+10
Protocolo 7	Não filtrada	NPFe-7	95.8	6.96e+10
Protocolo 7m	Não filtrada	NPFemg	302	6.95e+09
Protocolo 3S	Não filtrada	NPSi	228	8.57e+09
Protocolo 3FS	Não filtrada	NPFeSi	229	1.71e+09

Após a seleção das três nanopartículas, estas foram filtradas em filtros de 0,45 µm e a seguir foi realizado o NTA novamente (Tabela 2). Alguns testes foram conduzidos com as nanopartículas sem filtrar, mas os resultados foram descartados e os testes foram repetidos.

Tabela 2 - Caracterização físico-química das nanopartículas de ferro, nanopartículas de sílica e nanopartículas de ferro com sílica após filtragem de 0,45 µm.

Protocolo	Filtragem	NPs	Tamanho (nm)	Concentração (NPs/mL)	Tamanho MEV (nm)
Protocolo 7m	Filtrada 0,45	NPFemg	215	1,39e+09	225,12
Protocolo 3S	Filtrada 0,45	NPSi	203	2,39e+09	183,67
Protocolo 3FS	Filtrada 0,45	NPFeSi	227	2,26e+09	210,99

Após a realização do NTA com as nanopartículas filtradas todas foram deixadas na concentração estoque de $1,39 \times 10^8$ NP/mL para dar continuidade aos testes.

Após a filtragem, foi realizada a microeletroforese para obter o potencial zeta, o índice de polidispersão (PDI) a partir do NTA e o pH das nanopartículas (Tabela 3).

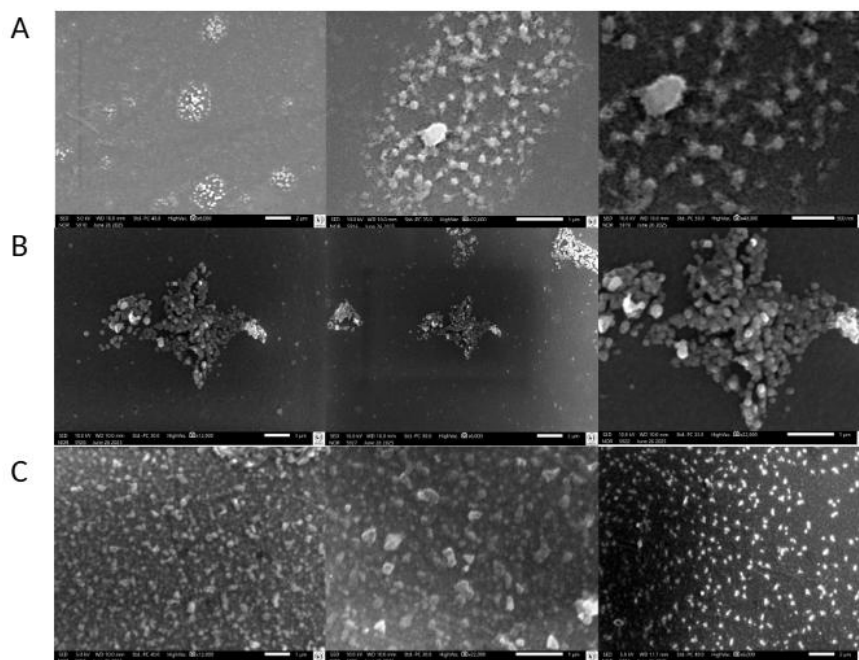
Tabela 3 Caracterização físico-química das nanopartículas de ferro, nanopartículas de sílica e nanopartículas de ferro com sílica após filtragem de 0,45 μm .

Amostra	Potencial zeta	PDI	pH
NPFemg	$-11,43 \pm 1$	4,15	6,77
NPSi	$-14,60 \pm 1,66$	1,96	6,87
NPFesi	$13,27 \pm 0,68$	2,06	7,18

A microscopia de varredura (MEV) foi realizada (Figura 3) através de gotejamento em lamínula, onde as nanopartículas foram pingadas e deixadas para secar no ambiente.

As NPFemg apresentaram um formato de colônia bem característico, onde as nanopartículas ficaram agrupadas de forma circular com maior concentração no centro (Figura 3A), também é possível observar que as NPFemg apresentaram formato esférico com superfície bem irregular, este efeito pode ser devido a técnica de gotejamento e secagem realizada ou pode ser devido ao capping existente nas nanopartículas que é formado por material biológico.

Figura 3- Imagens obtidas através de MEV das NPFemg filtradas em 0,45 μm . A: NPFemg, B: NPSi, C: NPFesi.



O tamanho obtido por microscopia foi em torno de 225,12 nm. A literatura diverge deste resultado, em que o tamanho de nanopartículas de ferro magnéticas obtidas em artigos, como exemplo a de 5 nm (Chin *et al.* 2025). O método usado foi de microscopia eletrônica de

transmissão, as nanopartículas encontradas são de formato esférico, assim como as do presente trabalho.

Os resultados observados nas NPSi (Figura 3B) foram o formato esférico com superfície regular, que pode ser resultado do uso do HCl utilizado no final da síntese, para retirada das impurezas. No presente estudo foi obtido um tamanho médio de 183,67 nm, resultado semelhante a outros estudos, como no caso de Wanli, Kobayashi e Murata (2025), que as nanopartículas chegaram até 200 nm.

O tamanho médio das NPFeSi (Figura 3C) foi de 210,99 nm, as nanopartículas apresentaram boas espalhabilidade, sem um formato geométrico definido, apresentaram formato cristalino. Estas apresentaram maior tamanho e divergiram de estudos realizados, como no trabalho de Azarnier *et al.* (2022), onde as nanopartículas magnéticas de ferro recobertas de sílica, usando o mesmo precursor (TEOS), as nanopartículas analisadas por MEV apresentaram tamanho de 58 nm.

O potencial zeta das NPFemg e das NPSi encontradas foi negativo neste estudo, o que concorda com um estudo realizado por Sankareswaran *et al.* (2022), em que as nanopartículas de sílica também apresentaram carga negativa. Já as NPFeSi apresentaram potencial zeta +13,27, resultado que concorda com Yilmaz, *et al.* (2021), onde nanopartículas magnéticas recobertas, assim como as NPFeSi, mostraram um potencial zeta positivo.

5.3 Exposição de sementes e análise de germinação

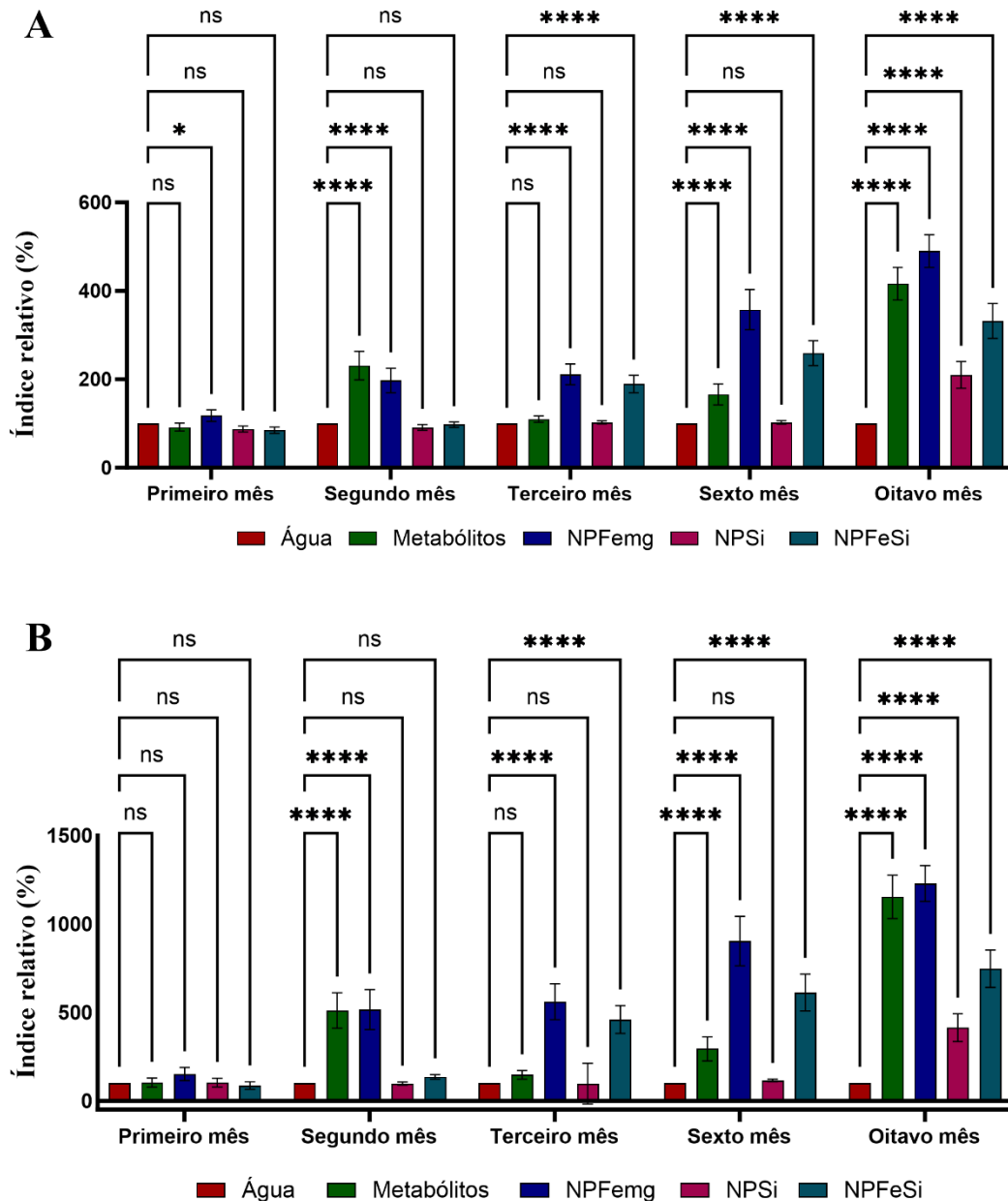
Para realizar o teste de germinação, as sementes de tomateiro e feijoeiro foram escolhidas como plantas modelo. O teste foi realizado com as nanopartículas na concentração de $1,39 \times 10^6$ NP/mL, como controle foram usadas a água e os metabólitos.

As sementes foram preparadas com o primer no tempo zero e germinadas ao longo do tempo. A germinação foi realizada nos três primeiros meses seguidos e depois de seis meses que as sementes foram colocadas expostas ao primer e depois novamente após oito meses de exposição. Para analisar se as sementes expostas às nanopartículas estariam mais saudáveis para germinar em relação às sementes controle (Figura 4).

Para a realização dos testes, as sementes foram expostas sem a higienização prévia, com a intenção de avaliar se as nanopartículas seriam capazes de proteger as sementes contra patógenos existentes, porém nem as sementes dos controles apresentaram contaminação por patógenos. A germinação de sementes foi testada a princípio com concentrações mais altas de

nanopartículas, sendo a concentração de $1,39 \times 10^6$ NP/mL selecionada para dar continuidade aos testes.

Figura 4- Análise de germinação das sementes de tomateiro. A diferença estatística significativa considerada é $P < 0,05$, onde NS significa $P > 0,05$, * significa $P \leq 0,05$, ** significa $P \leq 0,01$, *** significa $P \leq 0,001$ e **** significa $P \leq 0,0001$, onde A se refere ao caule e B se refere a raiz.



O crescimento das plantas de tomateiro no primeiro mês foi mais uniforme, apenas as plantas que ficaram em contato com as NPFemg apresentaram um crescimento maior que o controle, uma diferença de 1,18 vezes maior no caule, em relação ao controle (Figura 4).

No segundo mês as plantas que tiveram contato com a NPFemg se destacaram tanto no caule quanto na raiz, para a raiz foi um crescimento de 5 vezes maior que o controle e para o caule uma diferença de 1,97 vezes.

E a partir do terceiro mês há diferenças significativas tanto para as plantas que ficaram em contato com as NPFemg quanto para as plantas que ficaram em contato com as NPFeSi. No terceiro mês o caule das plantas NPFemg foi de 2,11 vezes maior que o controle, enquanto para o caule das plantas NPFeSi foi de 1,89 vezes maior que o controle. A maior diferença ocorreu nas raízes, as raízes de NPFemg cresceram 5 vezes mais que o controle e as raízes de NPFeSi 4 vezes mais que o controle.

No sexto mês a diferença do crescimento dos caules aumenta, as plantas NPFemg apresentaram um crescimento 3 vezes maior que o controle e as plantas NPFeSi um crescimento 2 vezes maior que o controle. Na raiz a diferença é ainda maior, as raízes NPFemg cresceram 9 vezes mais que o controle e as raízes NPFeSi 6 vezes mais.

E no último mês analisado todas as nanopartículas apresentam diferença em relação ao controle, sendo as NPFemg que apresentaram as maiores diferenças, um crescimento 4 vezes maior no caule e 10 vezes maior na raiz.

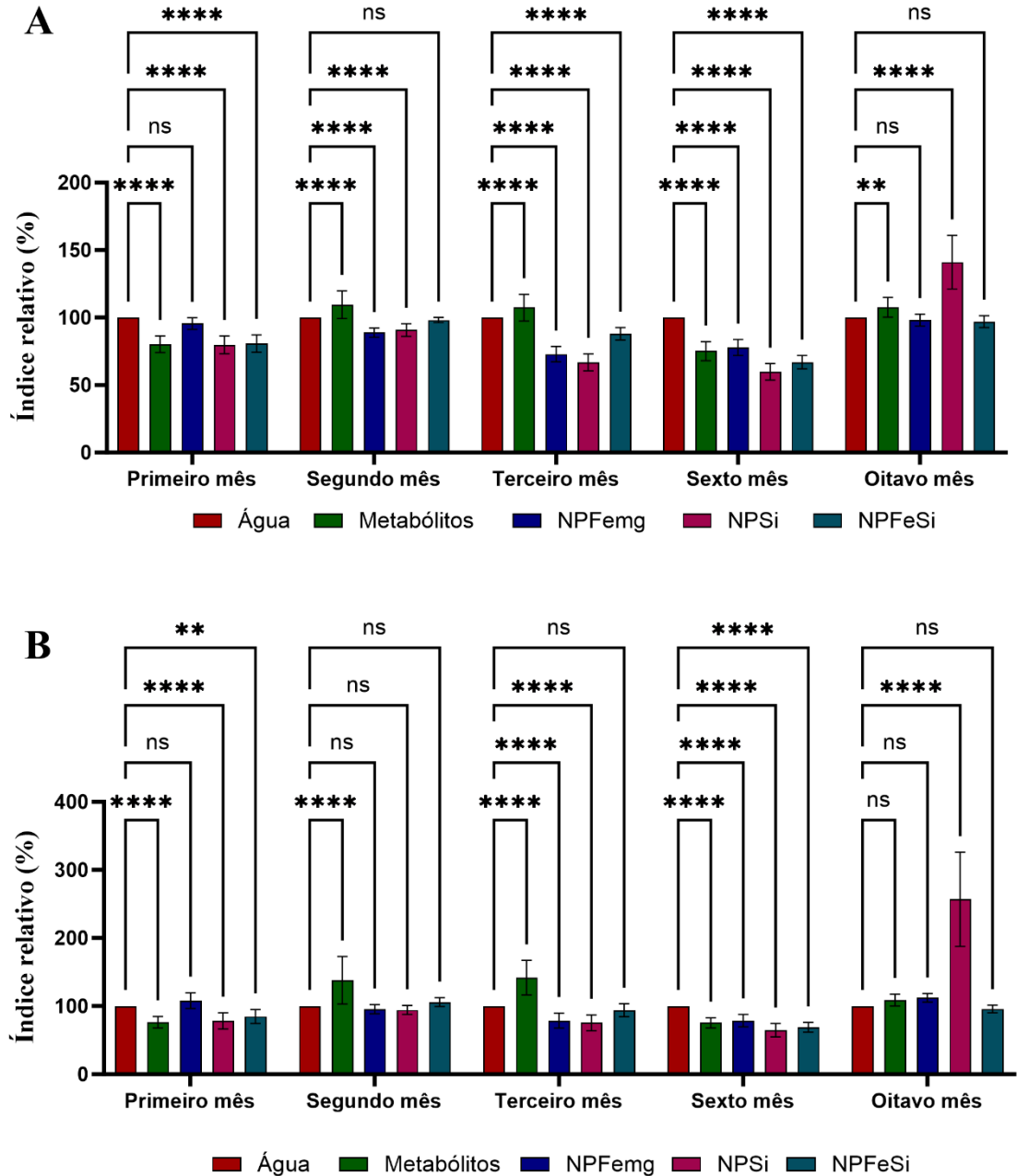
Foi possível identificar que as maiores diferenças foram em relação às raízes e é um resultado muito positivo já que o crescimento da raiz é importante devido a raiz ser a responsável pela aptidão da planta. A raiz é a parte responsável por ancorar a planta na terra, absorver, armazenar e distribuir água e nutrientes essenciais para o crescimento e desenvolvimento, além de ser a forma da planta se comunicar com a microbiota presente no solo (Cavallari, Artner, Benkova, 2021). E raízes melhores desenvolvidas são capazes de se adaptar melhor ao ambiente e tornar a planta mais forte em relação ao estresse abiótico e estresse biótico (Karlova, *et al*, 2021).

Em um estudo realizado por Rath *et al.* (2020), nanopartículas magnéticas de ferro biogênica foram avaliadas quanto à germinação de sementes de diferentes espécies e os resultados mostraram que quanto menor a concentração de nanopartículas maior crescimento e germinação das plantas.

Os resultados da exposição das nanopartículas às sementes de feijoeiro (Figura 5) mostraram que houve diferenças significativas em quase todos os tratamentos, porém de uma forma negativa. As plantas de feijoeiro expostas as nanopartículas cresceram menos que o controle. Apenas no oitavo as plantas NPSi mostraram crescer uma diferença positiva, houve

um crescimento 1,14 vezes maior que o controle no caule e um crescimento de 2,57 vezes maior que o controle na raiz das plantas.

Figura 5 - Análise de germinação das sementes de feijoeiro. A diferença estatística significativa considerada é $P < 0,05$, onde NS significa $P > 0,05$, * significa $P \leq 0,05$, ** significa $P \leq 0,01$, *** significa $P \leq 0,001$ e **** significa $P \leq 0,0001$, onde A se refere ao caule e B se refere a raiz.



No estudo de Sankareswaran *et al.* (2022) realizado utilizando baixas concentrações, nanopartículas de sílica estimularam o crescimento e a germinação das plantas, sendo a sílica também importante para a saúde das plantas.

Neste estudo, os resultados obtidos mostraram que as nanopartículas de sílica não aumentaram o crescimento das plantas de tomateiro, porém aumentaram o crescimento nas plantas de feijoeiro no último mês analisado. A comparação dos resultados obtidos na exposição das sementes indica que as sementes de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) expostas mostraram melhor resultado do que os obtidos com as sementes de feijoeiro.

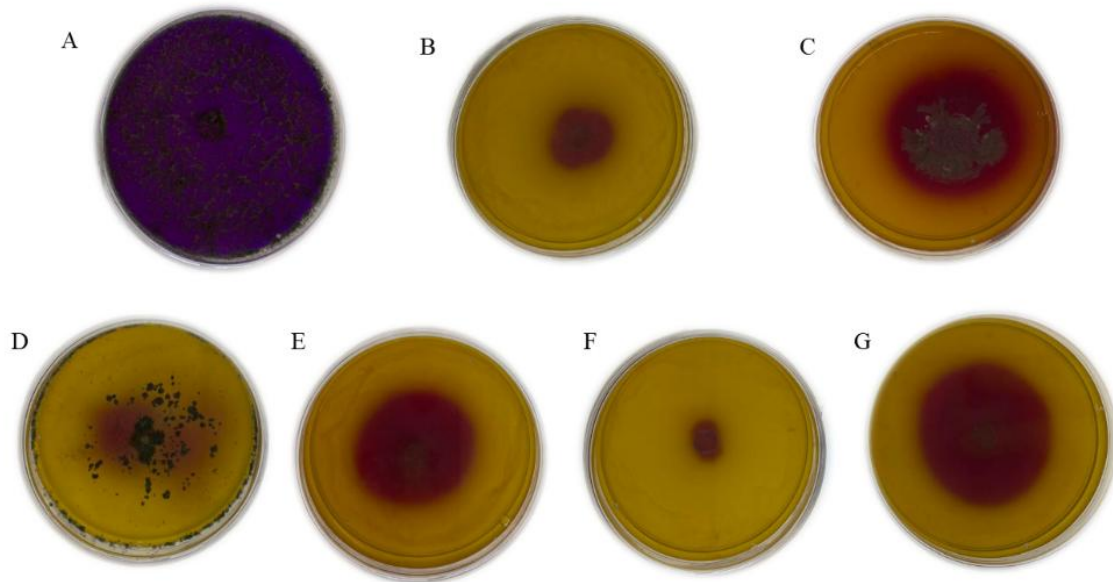
5.4 Detecção de quitinase nas nanopartículas

Para verificar a presença de quitinase no capping das nanopartículas, foi realizado inicialmente o teste em placa e posteriormente o teste em caldo. Para avaliação em placa, as amostras foram pingadas em cima dos discos de papel filtro (Figura 6), e para o teste em caldo foram usados 5 mL de caldo de quitinase e 10 µL de amostra pingada diretamente no caldo (Figura 6).

As nanopartículas foram usadas na concentração estoque de $1,39 \times 10^8$ NPs/mL. Para o controle foram usadas as bactérias *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense*, o fungo *Trichoderma harzianum*, e o mix de metabólitos na mesma proporção usada para a síntese das nanopartículas (1:1:1). As placas e os tubos de ensaio foram acompanhados por diferentes períodos, 24 horas, 48 horas, 72 horas e 168 horas para verificação de presença de atividade.

Quando existe produção de quitinase, há uma alteração na coloração devido à mudança de pH, de uma cor amarela escura passa para uma coloração arroxeadada. Foi possível identificar alteração na coloração após 168 horas em todas as placas, porém são nítidos os diferentes tamanhos dos halos formados (Figura 6).

Figura 6 - Placas de quitinase após sete dias, A: metabólitos, B: *Azospirillum brasilense*, C: *Bradyrhizobium japonicum*, D: *Trichoderma harzianum*, E: NPFemg, F: NPSi e G: NPFeSi.



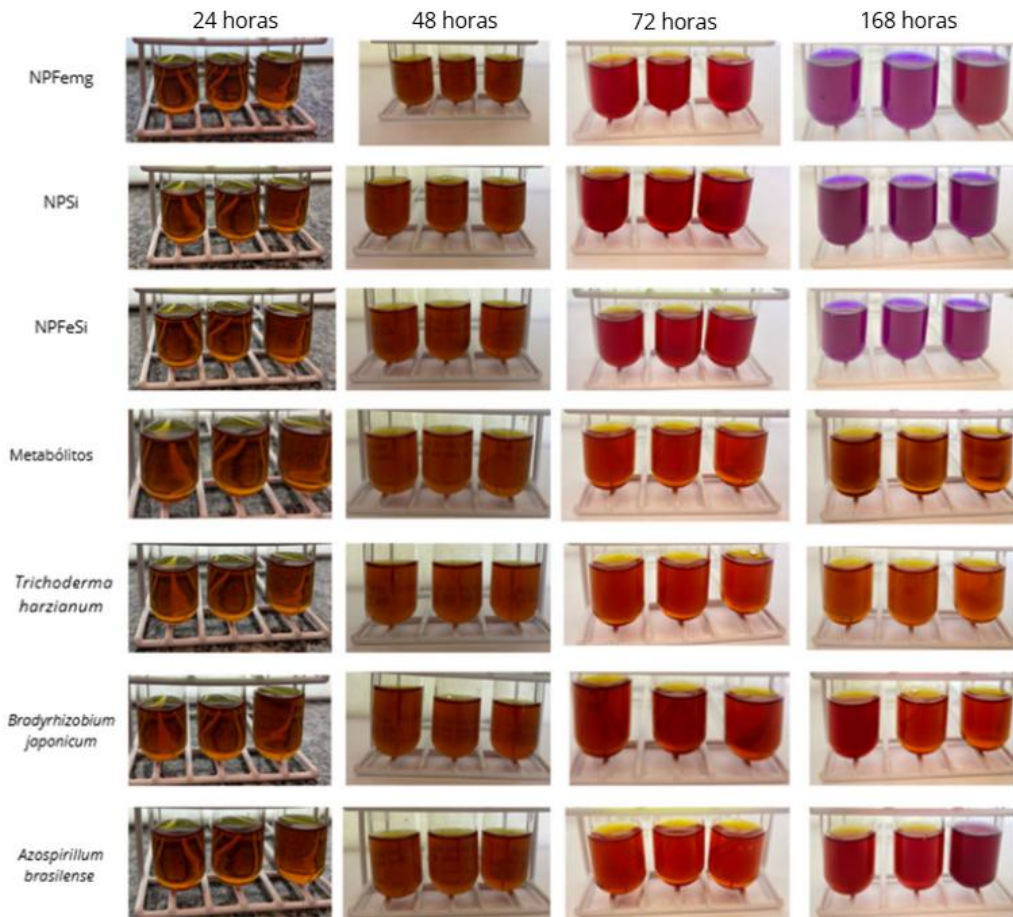
A produção de quitinase ocorre em alguns microrganismos e está ligada à capacidade de degradação de quitina, substância presente principalmente em microrganismos patogênicos. Após 168 horas é possível observar que a placa exposta ao mix de metabólitos (Figura 6A) apresentou forte cor roxa, indicativa de atividade, isto provavelmente ocorreu devido à concentração de metabólitos existentes no filtrado, mostrando a possível sinergia existente entre o mix.

As placas denominadas B, C e D (Figura 6B, C e D) são resultados referentes aos microrganismos, onde é possível visualizar a melhor atividade de *Bradyrhizobium japonicum*. As placas com as nanopartículas NPFemg, e NPFeSi apresentaram boa atividade, indicando que o capping continha quitinase ativa (Figura 6E e G). Menor atividade foi observada nas nanopartículas de sílica, que pode durante a sua síntese ter bloqueado a atividade da enzima, ou degradado as mesmas

Para comprovar a atividade da quitinase presente nas nanopartículas, foi realizado o teste em meio líquido. Os resultados (Figura 7) mostraram que após 168 horas todas as nanopartículas apresentaram atividade mais evidente que nos testes em placa.

Isto pode ter ocorrido devido ao teste de disco ser um teste específico para microrganismos, não possibilitando evidenciar a atividade real das nanopartículas.

Figura 7 - Imagem da análise de detecção da presença de quitinase nas nanopartículas.



Devemos lembrar que, em geral, a produção de quitinase nos microrganismos é dependente do seu crescimento, porém nas nanopartículas não existe a presença de microrganismos, uma vez que, estes foram eliminados em esterilização por filtragem.

Contudo, tanto no meio sólido (Figura 5) como no meio caldo (Figura 6) foi possível observar a atividade quitinolítica das nanopartículas NPFemg e a NPFeSi. Estes resultados são semelhantes aos encontrados em Guilger-Casagrande *et al.* (2023) e Bilesky-José *et al.* (2021), onde as nanopartículas de ferro biogênicas também apresentaram atividade da enzima quitinase, porém em ambos os trabalhos existiam microrganismos remanescentes da síntese biogênica realizada.

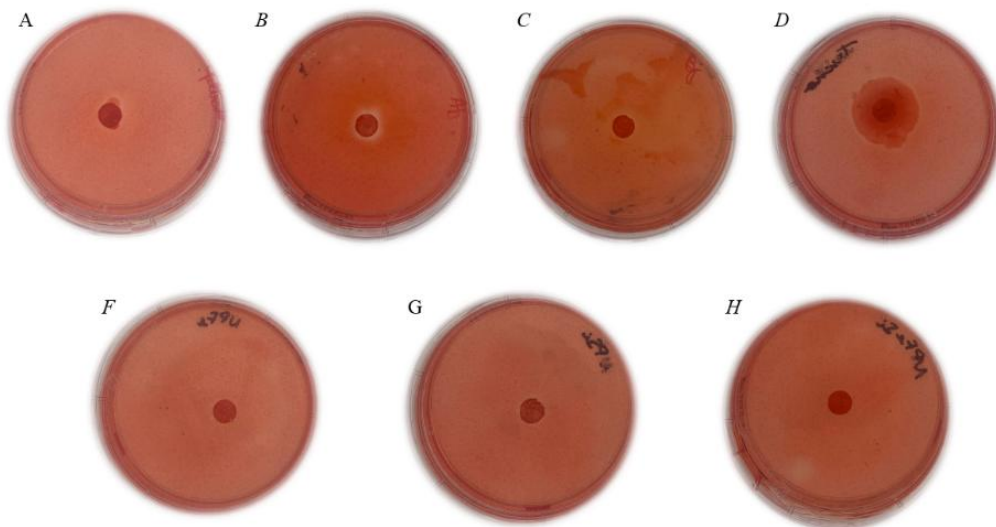
5.5 Detecção de presença de celulase nas nanopartículas

A atividade da celulase foi avaliada em placa (Figura 8), onde as nanopartículas foram gotejadas em discos de papel filtro no centro da placa. A celulase ocorre em alguns

microrganismos, é um conjunto de enzimas que fazem a quebra da celulose, sendo essa um dos principais componentes da parede celular das plantas.

Um halo de atividade mais evidente foi observado nas placas que continham *Azospirillum brasilense* (Figura 8B), *Bradyrhizobium japonicum* (Figura 8C). Embora as placas contendo mix de metabolitos (Figura 8A) e *Trichoderma harzianum* (Figura 8D) também tenham apresentado halos sutis.

Figura 8 - Placas da análise para detecção de celulase. Onde A: Mix de metabólitos, B: *Azospirillum brasilense*, C: *Bradyrhizobium japonicum*, D: *Trichoderma harzianum*, F: NPFemg, G: NPSi e H: NPFeSi.



Estudos de Zhang *et al.* (2020) e Sharifsadat, *et al.* (2023) mostraram a presença de atividade nos microrganismos *Trichoderma harzianum* e *Azospirillum brasilense*, assim como outros estudos evidenciam a presença desta enzima nestes microrganismos.

Em nenhuma das placas contendo nanopartícula ocorreu a formação de halos de atividade, embora haja estudos que mostram a atividade da celulase, como no estudo de Bilesky- José, *et al.* (2021), no entanto vale ressaltar que neste estudo ao final da síntese existiam estruturas reprodutoras que apresentavam crescimento em placa no momento do teste, sendo parte da atividade existente sendo provavelmente devido ao *Trichoderma harzianum* crescido.

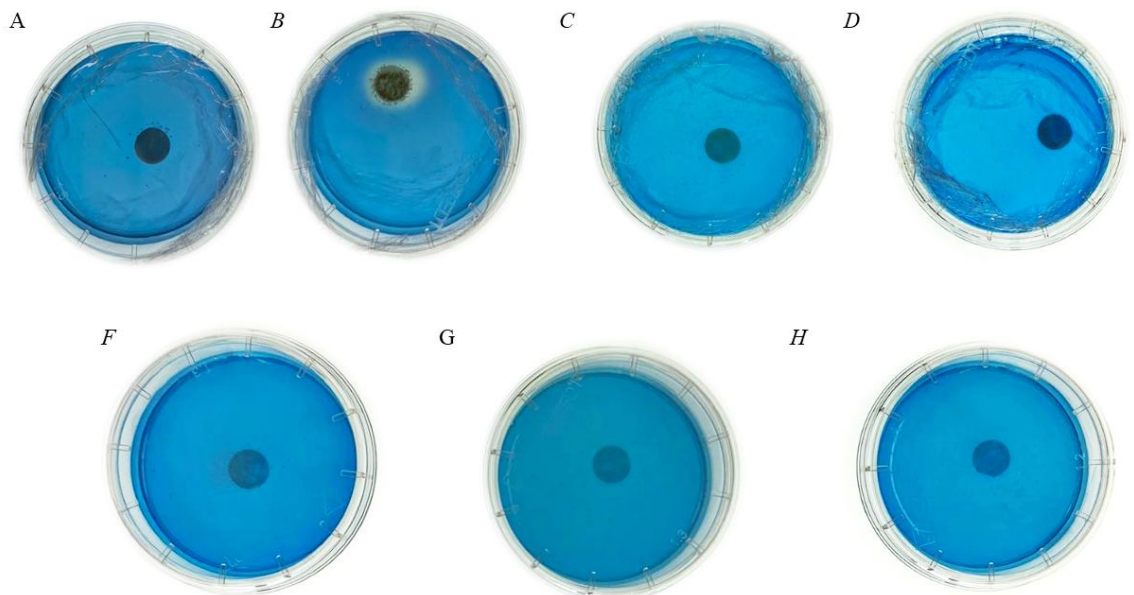
5.6 Detecção de sideróforos

Para avaliar a presença de sideróforos (Figura 9), que são moléculas naturais quelantes de ferro, facilitam o transporte de ferro para dentro das células (Sato; Yamawali, 2019), foi realizado o ensaio com Cromozaurol S, que detecta a presença de sideróforo formando um halo de uma cor diferente, é mais comum a formação de um halo alaranjado ou amarelado. As amostras foram pingadas nos discos de papel filtro.

É possível notar um halo sutil formado na placa de *T. harzianum* (Figura 9B) indicando a presença de sideróforos, o fungo *T. harzianum* é conhecido pela produção de sideróforos melhorando o ferro disponível na rizosfera (Kabir; Bennetzen, 2024).

Porém em mais nenhuma placa houve a formação de halo, indicando que as nanopartículas não possuem a presença de sideróforos no capping.

Figura 9- Placas da análise para detecção de celulase. Onde A: Mix de metabólitos, B: *Trichoderma harzianum*, C: *Azospirillum brasilense*, D: *Bradyrhizobium japonicum*, F: NPFemg, G: NPSi e H: NPFesi.



5.7 Avaliação de Citotoxicidade e Genotoxicidade

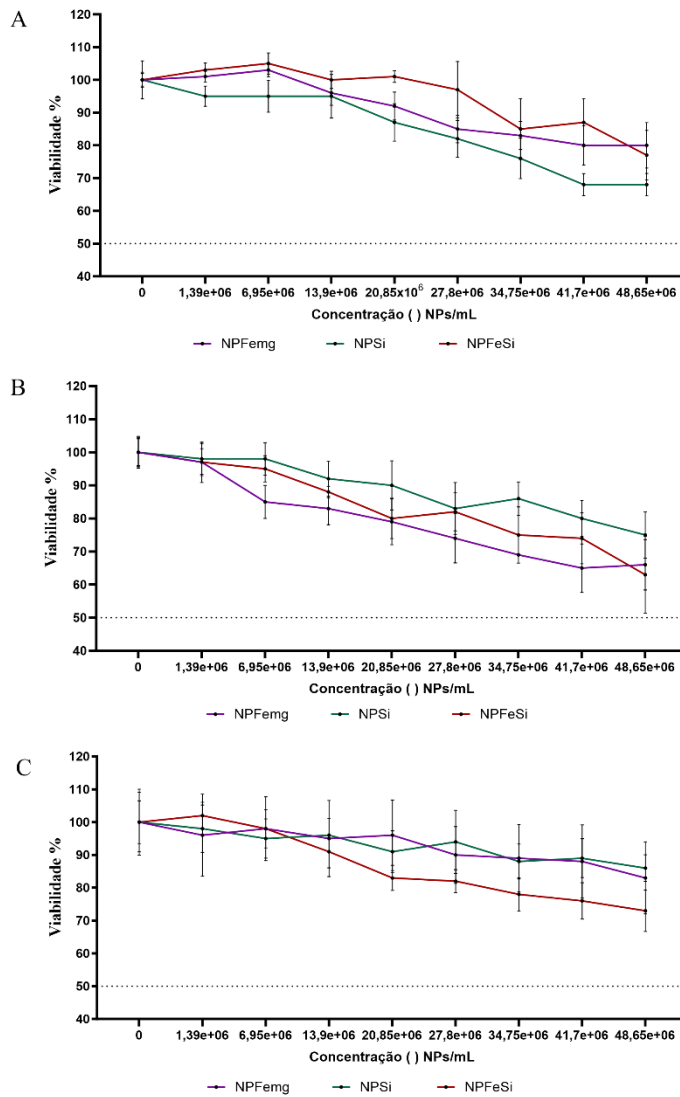
5.7.1 Avaliação da atividade mitocondrial por redução do Tetrazolium (MTT)

Para os testes de viabilidade foram usadas três linhagens celulares animais diferentes. A HaCat é uma linhagem celular que se refere a queratócitos humanos epidérmicos (Zhang et al., 2024). A V79 é uma linhagem celular de fibroblastos pulmonares de hamster chinês (Castillo, Winder, Smith, 2022). E a terceira linhagem celular usada foi a 3T3, linhagem celular de fibroblasto embrionário de camundongo (Leibiger et al., 2013).

Nenhuma das linhagens expostas às nanopartículas apresentou IC_{50} para os testes realizados, o que significa que as nanopartículas não interferem na viabilidade celular, nem nas concentrações mais altas, porém é possível observar que houve um decaimento da viabilidade celular de acordo com o aumento da concentração das nanopartículas. O teste foi realizado utilizando concentrações entre $48,65 \times 10^6$ NPs/mL e $1,39 \times 10^6$ NP/mL (Figura 10).

Em um estudo realizado por Ebadi *et al.* (2020), o resultado foi semelhante ao do presente trabalho, neste as nanopartículas magnéticas foram sintetizadas utilizando outra metodologia e os testes de viabilidade foram realizados com a linhagem 3T3. Outro estudo realizado por Uboldi *et al.* (2012) com exposição de nanopartículas de sílica à linhagem celular 3T3 mostrou não haver toxicidade das nanopartículas.

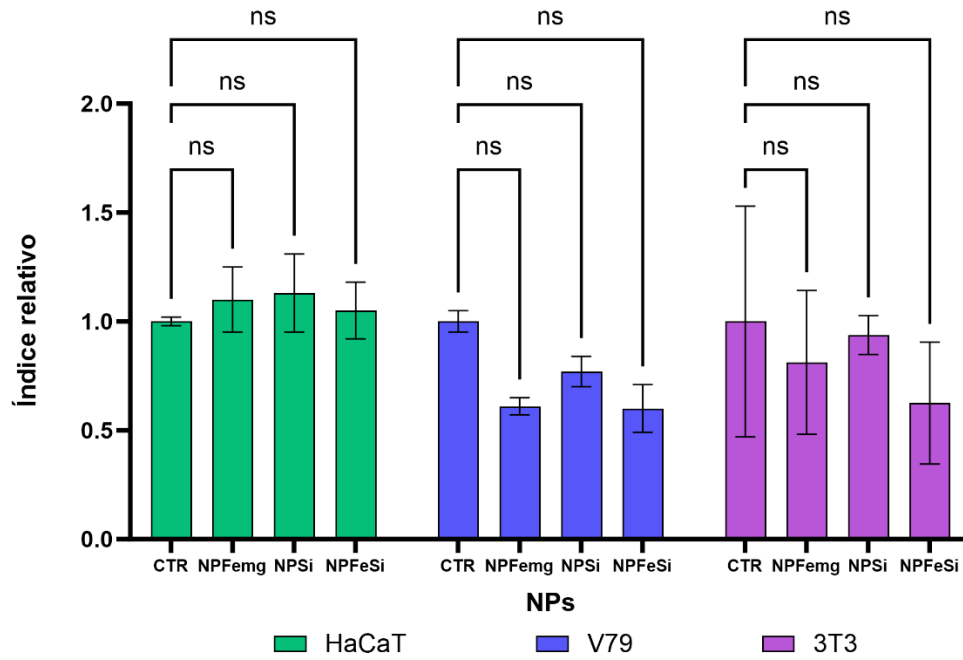
Figura 10 – Resultados de viabilidade das nanopartículas em diferentes linhagens celulares. Em A: HaCat, B: V79 e C: 3T3.



5.7.2 *Viabilidade celular direta com azul de Tripam*

Os resultados da viabilidade utilizando azul de tripam em células expostas às nanopartículas na concentração $48,65 \times 10^6$ NPs/mL não apresentaram diferença significativa quando comparadas com as amostras controle. O resultado está em concordância com o que foi encontrado na avaliação de viabilidade obtida por MTT, já que em nenhuma linhagem houve IC_{50} (Figura 11).

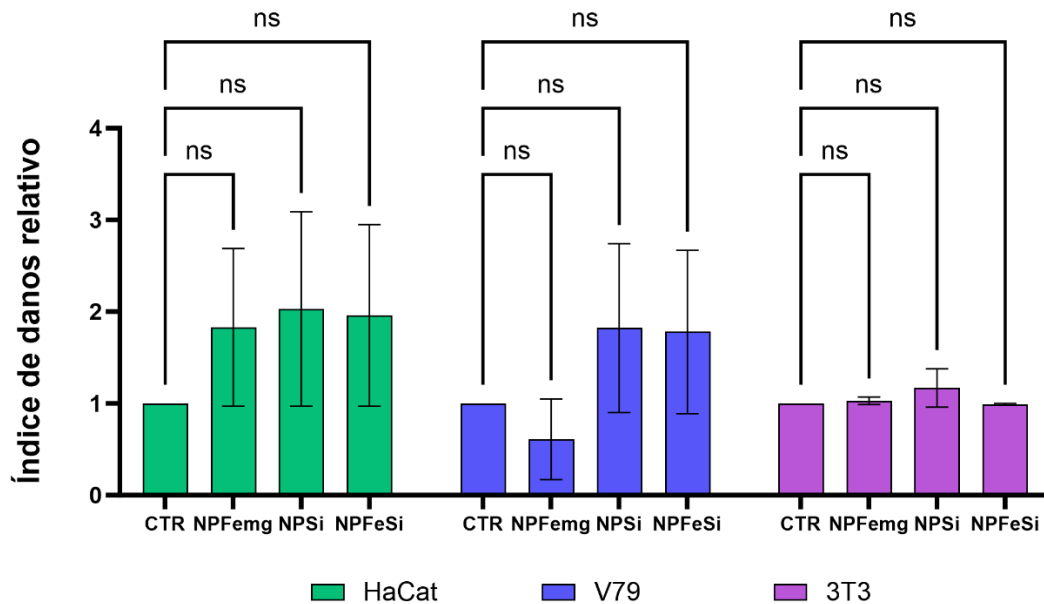
Figura 11 - Gráfico do resultado do teste de viabilidade direta Azul de Tripán, com as linhagens celulares HaCat, V79 e 3T3.



5.7.1 Avaliação da genotoxicidade das nanopartículas pelo ensaio cometa

Os resultados não mostram diferença significativa nos índices de danos em nenhuma das nanopartículas testadas quando comparadas ao controle (Figura 12).

Figura 12- Gráfico do resultado do Ensaio Cometa para determinar genotoxicidade nas linhagens celulares HaCat, V79 e 3T3.



A genotoxicidade é um parâmetro utilizado para medir a capacidade de interferência do material no DNA das células. O estudo de Hwang, Kim e Lee (2021) realizado com nanopartículas de ferro mostrou que linhagens celulares hepáticas e renais, também não apresentaram genotoxicidade. Em outro estudo, Ali *et al.* (2024) investigaram a genotoxicidade de nanopartículas de sílica, usando diversas linhagens celulares de rim, cérebro e coração de camundongo, e indicaram que a nanopartícula de sílica gera uma genotoxicidade significativa.

Em um estudo realizado por Malvindi *et al.* (2014), nanopartículas de ferro recobertas com sílica foram expostas à linhagem celular pulmonar; o resultado do ensaio cometa mostrou que as nanopartículas de ferro com sílica apresentaram maiores danos nas células quando comparadas aos controles.

Neste trabalho, o ensaio cometa mostrou que não houve danos significativos nas células expostas às nanopartículas quando comparado com o controle, o que evidencia que as nanopartículas não causam danos no DNA das células.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As nanopartículas de óxido de ferro (NPFe), ferro magnético (NPFemg), sílica (NPSi) e sílica/ferro magnético (NPFeSi) foram sintetizadas e os protocolos foram estabelecidos.

As nanopartículas apresentaram atividade em relação à enzima quitinase, porém em relação à celulase não foi observada atividade na concentração testada.

Todas as nanopartículas não apresentaram toxicidade nas concentrações testadas, seja nas análises de viabilidade com MTT, seja com azul de tripam. Também não foi observada genotoxicidade em nenhuma das nanopartículas.

Foram observadas diferenças significativas nas plantas de tomateiro a partir do segundo mês analisado para as plantas que ficaram em contato com as NPFemg e a partir do terceiro mês analisado para as plantas que ficaram em contato com as NPFeSi, mostrando que as nanopartículas estimularam o crescimento das raízes e dos caules. Já para as plantas de feijoeiro a NPSi se destacou no oitavo mês testado, estimulando o crescimento tanto da raiz quanto do caule, mostrando que a utilização do priming proposto pode ser uma opção para melhor conservação das sementes, principalmente em relação às sementes de tomateiro.

REFERÊNCIAS

AFRIDI, M. *et al.* Long- term benefit contribution of chemical and biological nematicide in coffee nematode management in soil microbial diversity and crop yield perspectives. **Microbiological Research**, v. 282, 2024.

AHMAD, S. *et al.* Rice seed biofortification using biogenic iron oxide nanoparticles synthesized by using *Glycyrrhiza glabra*: a study on growth and yield improvement. **Sci. Rep.**, v. 14, 2024.

ALAM, T. *et al.* Biogenic synthesis of iron oxide nanoparticles via *Skimmia laureola* and their antibacterial efficacy against bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*. **Materials Science and Engineering**, v. 98, 2019

ALZATE- CORREA, D. *et al.* Nanotechnology- driven cell- based therapies in regenerative medicine. **AAPS J**, V. 24, 2022

ANSARI, I. *et al.* A review on the fatal impact of pesticide toxicity on environment and human health. **Global Climate Change**, 2021.

AWADA, H. *et al.* Controlled anchoring of iron oxide nanopartilces on polymeric nanofibers: easy access to coreshell organic- inorganic nanocomposites for magneto- scaffolds. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 11, 2019

BALUSAMY, S. *et al.* Advancing sustainable agriculture: a critical review of smart and eco- friendly nanomaterial applications. **J. Nanotechnology**, v. 21, 2023

BASHYAL, B. *et al.* Molecular Programming of Drought- Challengeg *Trichoderma harzianum* Bioprimered Rice. **Front. Microbiol**, v.12, 2021

BATOOL, F. *et al.* Biologically synthesized iron nanoparticles (FeNPs) from *Phoenix dactylifera* have anti- bacterial activities. **Sci. Rep.**, v. 11, 2021

BENDER, F. *et al.* genetic variation in symbiotic islands of natural variant strains of soybean *Bradyrhizobium japonicum* and *Bradyrhizobium diazoefficiens* differing in competitiveness and in the efficiency of nitrogen fixation. **Micob. Genom.**, v. 8, 2022

BHATIA, R.; GULATI, D.; SETHI, G. Biofilms and nanoparticles: applications in agriculture. **Folia Microbiologica**, v. 66, 2021

BILESKY-JOSÉ; N. *et al.* Biogenic Fe₂O₃ nanoparticles enhance the biological activity of *Trichoderma* against the plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. **ACS Sustain. Chem. Eng.**, v. 9, 2021.

BITIRE, T. *et al.* Impact of nitrogen- fixation bacteria on nitrogen- fixation efficiency of Bambara groundnut genotypes. **Front. Microbiol.**, v. 14, 2023

BJORK, P. *et al.* *Trichoderma harzianum* Peptaibols Stimulate Plant Plasma Membrane H⁺ - ATPase Activity. **ACS Omega**, v. 8, 2023

CAVALLARI, N.; ARTNER, C.; BENKOVA, E. Auxin- regulated lateral root organogenesis. **Cold Spring Harb Perspect Biol.**, v 13, 2021

CHIN, S. *et al.* Impact of multi- factorial composition on the size of superparamagnetic iron oxide nanoparticles using box- Behnken statistical design. **Nano- structures and Nano - objects**, v. 43, 2025

CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL (CNA). **Balanco 2023 e Perspectivas 2024**. Brasília, DF: CNA, 2024. Disponível em: <https://cnabrasil.org.br/storage/arquivos/pdf/Balanco2023-Perspectivas2024.pdf>. Acesso em: 21 set. 2025.

CORTIVO, C. *et al.* Effects of Seed – Applied Biofertilizers on Rhizosphere Biodiversity and Growth of Common Wheat (*Triticum aestivum* L.) in the Field. **Front. Plant Sci.**, v. 11, 2020

CROPLIFE BRASIL. **Mercado de bioinsumos cresceu 15% na safra 2023/2024**. São Paulo: CropLife Brasil, 2024. Disponível em: <https://croplifebrasil.org/mercado-de-bioinsumos-cresceu-15-na-safra-2023-2024/>. Acesso em: 21 set. 2025.

DEGON, Z. *et al.* *Azospirillum brasilense* improves rice growth under salt stress by regulating the expression of key genes involved in salt stress response, abscisic acid signaling, and nutrient transport, among others. **Front. Agron.**, v. 5, 2023

DONADELLI, J. *et al.* Soybeans peroxidase immobilized onto silica- coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles: effect of silica layers on the enzymatic activity. **Colloids and surfaces B: Biointerfaces**, v. 161, 2018.

DU, Z. *et al.* Biogenic metal nanoparticles with microbes and their applications in water treatment: a review. **Environ. Science and Pollu. Research**, v. 29, 2022

DULINSKA-LITEWKA, J. *et al.* Superparamagnetic iron oxide nanoparticles- current and prospective medical applications. **Materials**, v. 12, 2019

EBRAHIMINEZHAD, A. *et al.* Plant- mediated synthesis and applications of iron nanoparticles. **Molecular Biotechnology**, v. 60, 2017

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **Global status of pulses production, supply, and demand**. Rome: FAO, 2023. DOI: 10.4060/cc7945en. Disponível em: <https://www.fao.org/documents/card/en/c/cc7945en>. Acesso em: 21 set. 2025.

FRANTELLIZZI, V. *et al.* New frontiers in molecular imaging with superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): efficacy, toxicity, and future applications. **Nucl. Med. Mol. Imaging**, v. 54, 2020

FUSCO, G. *et al.* Can Microbial Consortium Applications Affect Yield and Quality of Conventionally Managed Processing Tomato? **Plants**, v. 12, 2022

GOMEZ, M. *et al.* *Bradyrhizobium japonicum* IRAT FA3 promotes salt tolerance through jasmonic priming in *Arabidopsis thaliana*. **BMC Plant Biol.**, v. 23, 2023

GUHA, T. *et al.* Nanocomposites for Delivering Agrochemicals: A Comprehensive Review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, 2020

GUILGER- CASAGRANDE, *et al.* *Beauveria bassiana* biogenic nanoparticles for the control of noctuidae pests. **Pest Management Science**, v. 80, 2023.

HENDRICKS, A. *et al.* Cloneable inorganic nanopartilces. **Chem Commum**, v. 59, 2023

HOUSH, A. *et al.* *Azospirillum brasilense* Bacteria Promotes Mn²⁺ Uptake in Maize wit Benefits to Leaf Photosynthesis. **Microorganisms**, v. 10, 2022

HUANG, Y. *et al.* Silica nanoparticles: biomedical applications and toxicity. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 151, 2022

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Produção Agrícola Municipal (PAM) 2023**. Rio de Janeiro: IBGE, 2024. Disponível em: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2012-agencia-de-noticias/noticias/40133-pam-2023-valor-da-producao-agricola-cai-3-9-e-chega-a-r-783-2-bilhoes>. Acesso em: 21 set. 2025.

IRUM, S. *et al.* Biogenic iron oxide nanoparticles enhance callogenesis and regeneration pattern of recalcitrant *Cicer arietinum* L. **Plos One**, v. 15, 2020.

JIANG, Y. *et al.* Green synthesis of metal—based nanoparticles for sustainable agriculture. **Environmental Pollution**, v. 309, 2022.

JUÁREZ- MALDONADO, A. *et al.* Nanoparticles and nanomaterials as plant biostimulants. **Molecular Sci.**, v. 20, 2019.

KAH, G CHANDRAN, R.; ABRAHAMSE, H. Biogenic Silver Nanoparticles for Target Cancer Therapy and Enhancing Photodynamic Therapy. **Cells**, v. 12, 2012.

KAJIC, S. *et al.* Effects of co- inoculation with *Bradyrhizobium* and *Trichoderma harzianum* on soybeans nitrogen nutrition and multispectral traits. **Environmental Technology and Innovation**, v. 39, 2025.

KARLOVA, R. *et al.* Root plasticity under abiotic stress. **Plant Physiology**, v. 187, 2021

KARNWAL, A.; DAHROO, A.; MALIK, T. Unveiling the potencial of bioinoculants and nanoparticles in sustainable agriculture for enhanced plant growth and food security **Biomed. Res. Int.**, v. 2023, 2023

KAUR, A; GUPTA, H; DHIMAN, S. Biogenic Metallic Nanoparticles: Synthesis and Applications Using Medicinal Plants. **Handbook of Green and Sustainable Nanotechnology**, 2023

KHAN, I. *et al.* Metak nanoparticles in agriculture. **Expanding Nanobiotechnol. Appl. And Commercialization**, v. 1, 2025

KUDAIBERGEN, D. *et al.* silica- based advanced nanoparticles for treating ischemic disease. **Tissue Eng. Regen. Med.**, v. 20, 2023

KUMAR, A. *et al.* Biogenic metallic nanoparticles: biomedical, analytical, food preservation, and applications in other consumable products. **Front. Nanotechnol.**, v. 5, 2023

KUMAR, A; DUBEY, A. Rhizosphere microbiome: engineering bacterial competitiveness for enhancing crop production. **Journal od Advanced Research**, v. 24, 2020

LASSEBERGER, A. *et al.* Individually stabilized, superparamagnetic nanoparticles with controlled shell and size leading exceptional stealth properties and high relaxivities. **ACS Appl. Mater Interfaces**, v. 9, 2017

LI, Q. *et al.* Silica- coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles targeting of EPCs in schemic brain injury. **Biomaterials**, v. 34, 2013.

LIU, L. *et al.* Effects of *Trichoderma harzianum* biofertilizer on growth, yield, and quality of *Bupleurum chinense*. **Plant Direct**, v. 6, 2022

MADHOGARIA, B. *et al.* Synergistic impacts of plant growth promoting pseudomonas geniculate TIU16A3 and green- synthesized iron- oxide nanoparticles from Eichhornia crassipes for the amelioration of heavy metal stress in *Vigna radiata* L. Dínponivel em: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-4863542/v1>, 2024.

MAHAWAR, L. *et al.* Silicon nanoparticles: comprehensive review on biogenic synthesis and applications in agriculture. **Environmental Research**, v. 232, 2023

MARRA, R. Mineral Biofortification and Growth Stimulation of Lentil Plants Inoculated with *Trichoderma* Strains and Metabolites. **Micoorganisms**, v. 10, 2021

MARTÍNEZ, M. *et al.* Polyhydroxybutyrate Metabolism in *Azospirillum brasilense* and its applications, a Review. **Polymers**, v. 15, 2023

MATAR, G; ANDAC, M. Highly efficient degradation of basic dyes using gold- coated nature- based superparamagnetic iron oxide nanoparticles as eco- friendly nanocatalyts. **Environ Sci. Pollut. Int.**, v. 31, 2024

MÉNDEZ-GÓMEZ, M. *et al.* *Azospirillum brasilense* Sp245 triggers cytokinin signaling in root tips and improves biomass accumulation in *Arabidopsis* through canonical cytokinin receptors. **Physiol. Mol. Biol. Plants**, v. 27, 2021

MINHAS, L. *et al.* Biogenic frabrication of iron nanoparticles from *Leptolyngbya* sp. L-2 and multiple in vitro Paharmacogenetic properties. **Toxics**, v. 11, 2023

MIRONENKA, J. *et al.* *Trhicoherma harzianum* metabolites disturb *Fusarium culmorum* metabolismo: metabolomic and proteomic studies. **Microbiological Research**, v. 249, 2021

MUKHOPADHYAY, R; KUMAR, D. *Trichoderma*: a beneficial antifungal agent and insights into its mechanism of biocontrol potencial. **Egypt J Biol Pest Control**, v. 30, 2020

NAJAH- MISSAOUI, W.; ARNOLD, R.; CUMMINGS, B. Safe nanoparticles: are we there yet? **Int. J. Mol. Sci.**, v. 22, 2020

NILE, S. *et al.* Nano- priming as emerging seed priming technology for sustainable agriculture- recent developments and future perspectives. **J. Nanotechnology**, v. 20, 2022

ONG, A; O'BRIAN, M. Microbe of the month: *Bradyrhizobium japonicum*. **Trends Microbiol.**, v. 32, 2024

PERIAKARUPPAN, R. *et al.* Biosynthesis of siloca nanoparticles using leaf extract of *Punica Granatum* and assessment of its antibacterial activities against humam pathogens. Disponível em: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1458242/v1>, 2022.

PREMA, P. *et al.* Hexavalent chromium removal from aqueous solutions using biogenic iron nanoparticles: kinetics and equilibrium study. **Environmental Research**, v. 205, 2022

PRIYA, S. *et al.* Biogenic nanoparticles from waste fruit peels: synthesis, applications, challenges and future perspectives. **Inttern, Journ. of Pharmaceutics**, v. 643, 2023

RECZYNSKA, K. *et al.* Superparamagnetic iron oxide nanoparticles modified with silica layers as potencial agents for lung cancer treatment. **Nanomaterials**, v. 10, 2020

RODRIGUES, M. *et al.* Biogenic synthesis and antimicrobial activity of silica- coated silver nanoparticles for the esthetic dental applications. **Journal of Dentist**, v. 96, 2020

SANKARESWARAN, M. *et al.* Bio- fabrication of bio- inspired silica nanomaterials from bryophyllum pinnatum leaf for agriculture applications. **Appli. Biochemistry and Biotechnology**, v. 194, 2022

SANTÁS- MIGUEL, V. *et al.* Use of metal nanoparticles in agricultural. A review on the effects on plant germination. **Environ. Pollut.**, v. 334, 2023

SCHROEDER, M. *et al.* *Bradyrhizobium japonicum* IRAT FA3 Alters *Arabidopsis thaliana* Root Architectures via Regulation of auxin Efflux Transporters PIN2, PIN3 PIN7, and ABCB19. **MPMI**, v. 35, 2022

SEGHIR, B. *et al.* Methods for the preparation of silica and its nanoparticles from different natural sources. **Biological Trace Element Research**, v. 201, 2023

SHAH, D. *et al.* Biogenic metallic nanoparticles: from green synthesis to clinical translation. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, v. 397, 2024.

SHARIFSADAT, S. *et al.* Harmonized biochemical modification of cell walls to get permission for entrance of *Azospirillum* sp. To rice roots. **Plant Science**, v. 335, 2023

SIDDIQI, k. *et al.* Biogenic fabrication of iron/ iron oxide nanoparticles and their application. **Nanoscale Res. Lett.**, v. 11, 2016.

SILVA, P. *et al.* *Azospirillum brasilense* and zinc rates effects on fungal root colonization and yield of wheat- maize in tropical savannah conditions. **Plants**, v. 11, 2022.

SINGH, A. *et al.* Nanotechnology- based approaches applied to nutraceuticals. **Drug Deliv. and Transl. Res.**, v. 12, 2021.

SINGH, H. *et al.* Extracellular synthesis of silver nanoparticles by *Pseudomonas* sp. THG- LS 1.4 and their antimicrobial application. **J. Pharmaceutical Analysis**, v. 8, 2018.

SINGH, P. *et al.* Antimicrobial Effects of Biogenic Nanoparticles. **Nanomaterials**, v. 812, 2018.

SINGH, R.; HANDA, R.; MANCHANDA, G. Nanoparticles in sustainable agriculture: An emerging opportunity. **J. Control. Release**, v. 10, 2021.

SUMAN, S. *et al.* **Futuristic Trend in Chemical Material Sciences e Nano Technology**, v. 3, 2024.

TORRES, D. *et al.* New insights into auxin metabolism in *Bradyrhizobium japonicum*. **Research in Microbiology**, v. 169, 2018.

UBOLDI, C. *et al.* Amorphous silica nanoparticles do not induce cytotoxicity, cell transformation or genotoxicity in Balb/ 3T3 mouse fibroblasts. **Mutation Research/ Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 745, 2021

WANG, L. *et al.* Role of silica nanopartilces in abiotic and bioteic stress tolarence in plants: A riview. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 23, 2022.

WANLI, M; KOBAYASHI, K.; MURATA, S. Wettability modification of muscovite surfaces using silica nanoparticles synthesized from rice husk. **Surfaces and Interfaces**, v.70, 2025

WU, H; LI, Z. Nano-enabled agriculture: how do nanoparticles cross barriers in plants? **Plant. Commun.**, v. 14, 2022.

WU, V. *et al.* Brain and bone cancer targeting by a ferrofluid composed of superparamagnetic iron-oxide/ silica/ carbon nanoparticles (earthicles). **Acta Biomaterialia**, v. 88, 2019.

XU, B. *et al.* Multifunctional mesoporous silica nanoparticles for biomedical applications. **Signal Transduct Taget Ther.**, v. 8, 2023.

YANG, Y. *et al.* Iron oxide nanoparticle- based nanocomposites in biomedical application. **Trends in biotechnology**, v. 41, 2023.

ZEFFA, D. *et al.* *Azospirillum brasilense* promotes increases in growth and nitrogen use efficiency of maize genotypes. **Plos One**, v. 14, 2019.

ZHANG, X. *et al.* Biogenic synthesis of gold nanoparticles by yeast *Magnusiomyces ingens* LH- F1 for catalytic reduction of nitrophenols. **Colloids and surfaces: a physicochemical and engineering aspects**, v.497, 2016.

ZHAO, H. *et al.* *Azospirillum brasilense* activates peroxidase- mediated cell wall modification in inhibit root cell elongation. **iScience**, v. 26, 2023.

ZHAO, L. *et al.* Nano-Biotechnology in Agriculture: Use of Nanomaterials to Promote Plant Growth and Stress Tolerance. **Journal of Agriculture and Food chemistry**, v. 68, 2020.