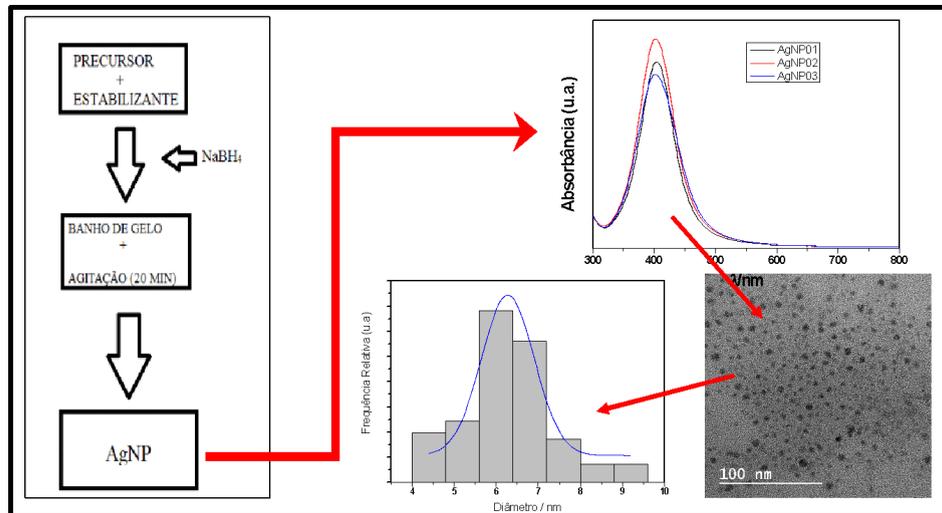


Graphical Abstract



SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FUNGITÓXICA

Gabriela F. Santana^a, Geisyane K. Gonzaga^b, Rafaella S. Lana^c, Willian E. Do Espírito Santo^d.

() Manuscrito com material suplementar

(x) Manuscrito sem material suplementar

SILVER NANOPARTICLES SYNTHESIS AND EVALUATION OF FUNGITOXIC ACTIVITY

Silver nanoparticles are notably known due their microbiological activity against several kinds of bacteria and their lack of toxicity for human been in low concentrations. Moreover, silver nanoparticles have presented not only bactericidal effect, but also presented response against filamentous fungi, yeasts and viruses. Thus, this nanomaterial is a candidate to be a fungitoxic agent. In Brazil, plant pathogenic fungi cause lots of economic losses in agriculture, decreasing fruits production and their exportation. Another recurring problem is the exaggerated use of agrochemicals, which cause environmental impact and increase resistance to phytopathogens. Thus, we study the chemical synthesis of silver nanoparticles and evaluated their antimicrobial activity. Nanoparticles were synthesized by reduction of silver nitrate (AgNO_3) in the presence of polyvinylpyrrolidone, and using sodium borohydride as reductant. Fungitoxic activity was evaluate using *Colletotrichum gloeosporioides* collected in passion fruits and was studied the effect of nanoparticles concentration in cell cultures. Nanoparticles presented colloidal stability over weeks after synthesized, however, Phytopathogens showed resistance to silver nanoparticles, possibly related to the ability of certain species to conduct the extracellular synthesis of nanoparticles and low nanoparticle concentration in cell media.

Keywords: silver nanoparticles, fungitoxic activity, *Colletotrichum gloeosporioides*

RESUMO:

A prata é um dos mais notáveis nanomateriais em relação a atividade bactericida, possuindo baixa toxicidade para o ser humano quando em baixas concentrações. Na forma nanoparticulada esta propriedade é potencializada, possibilitando diversas aplicações. Além da ação bactericida, as nanopartículas de prata (AgNPs) também apresentam efeitos contra fungos filamentosos, leveduras e vírus, apresentando potencial para a atuação como agente fungitóxico. No Brasil, um dos principais prejuízos econômicos no setor agrícola para a exportação de frutas é a ação de fungos que ocasionam a perda de produção. Outro problema recorrente é o uso exagerado de agrotóxicos, que causam impactos ambientais e aumento da resistência aos fitopatógenos. Assim, o presente trabalho consiste na síntese de AgNPs e na caracterização do material sintetizado quanto às suas propriedades físicas e químicas, além da avaliação da atividade antimicrobiana deste material. Para

isso, a síntese coloidal de AgNPs foi obtida através do método de redução de nitrato de prata (AgNO_3) por boroidreto de sódio (NaBH_4). Também foram produzidos meios de cultura do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, encontrado no maracujá, realizando quatro repetições compostas por três placas de petri contendo batata dextrose ágar (BDA), para cinco diferentes concentrações de alíquotas de AgNPs. Houve resistência dos fitopatógenos às nanopartículas de prata, possivelmente relacionada a habilidade de determinadas espécies em conduzir a síntese extracelular das nanopartículas.

Palavras chave: Nanopartículas de prata, atividade fungitóxica, *Colletotrichum gloeosporioides*

INTRODUÇÃO

A nanotecnologia pode ser entendida como a manipulação da matéria nos níveis atômico e molecular¹, no qual ao menos uma das dimensões dos materiais tem entre 1,0 e 100,0 nm. O interesse da comunidade científica, em materiais em escala nanométrica, é decorrente da mudança das propriedades físicas e químicas de materiais sólidos em relação a redução de seu tamanho.² As mudanças que ocorrem em suas propriedades podem ser maiores dependendo do metal escolhido e resultam da maior contribuição dos efeitos de superfície nesta escala.³ Sendo assim, a nanotecnologia possui aplicação em diversas áreas, tais como eletrônicos, óptica, biomedicina, magnetismo, mecânica, catálise, agricultura, cosméticos, meio ambiente e embalagens de alimentos¹, de modo que sua importância se dá de maneira notável.

A primeira síntese coloidal de nanopartículas foi executada por Faraday no século XIX, sendo, a partir de então, desenvolvidas uma série de técnicas e métodos para o preparo de nanopartículas a partir de metais. Apesar de cada método possuir características específicas, a síntese coloidal, de maneira geral, baseia-se em quatro componentes: meio, precursor, agente redutor e estabilizante. Normalmente, a síntese se dá em fase líquida, podendo o meio ser aquoso ou outros solventes. Por precursor entende-se como o composto químico que irá fornecer o material para a formação das partículas, sendo no caso de nanopartículas metálicas um sal do metal. Para a transformação do íon em espécie metálica utiliza-se um agente redutor, que são compostos que fornecem elétrons por meio de uma reação química. O estabilizante, também conhecido como ligante, é a molécula que recobre a superfície das nanopartículas mantendo-as afastadas umas das outras e dispersas no meio.⁴

Dentre os nanomateriais, há destaque para as nanopartículas de prata (AgNPs), por apresentarem potencial como agente antimicrobiano⁵⁻⁷, visto que o uso desse metal com a finalidade de antisséptico remonta séculos, devido ao fato de possuir baixa toxicidade para o ser humano quando manipulado em baixas concentrações.⁵ Na forma de nanopartícula, suas propriedades antimicrobianas são potencializadas. Vários estudos têm demonstrado que a prata atua no controle do crescimento de cerca de 650 organismos patogênicos, dentre bactérias, fungos filamentosos, leveduras e vírus.^{5,8} A eficiência das AgNPs no controle dos microrganismos causadores de doenças em cultivos agrícolas e na pós colheita deve-se ao aumento da área superficial da partícula, o que resulta no aumento de permeabilidade celular ao composto, bem como os baixos níveis de resistência ao composto observado por parte dos microrganismos.⁹

Sabe-se que no Brasil, um dos principais prejuízos econômicos no setor agrícola para a exportação de frutas é a ação de fungos que ocasionam a perda de produção. Outro problema recorrente é o uso exagerado de agrotóxicos, que causam impactos ambientais e o aumento da resistência aos fitopatógenos.¹⁰ Assim, o presente trabalho consistiu na síntese de AgNPs e na caracterização do material sintetizado quanto as suas propriedades físicas e químicas, além da avaliação da atividade fungitóxica deste material em meios de cultura do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* encontrado no maracujá.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para a síntese, fez-se necessário o uso de: 100 mL de nitrato de prata (AgNO_3) $5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ com 99,5% de pureza (precursor), da marca Química Moderna; 250 mL de boroidreto de sódio (NaBH_4) $3 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ (reductor) com 98,0% de pureza, da marca: Sigma Aldrich; 12,5 mL de PVP (polivinilpirrolidona) 1% (m/v) (estabilizante) da marca Exodocientífica.

Síntese utilizando Boroidreto de Sódio

Para a realização da síntese, utilizou-se o método Turkevich¹¹, sendo o agente precursor o nitrato de prata (AgNO_3), cuja concentração fora de $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, fazendo-se o uso de 25 mL da solução. Não obstante, a redução química se fez necessária, para isso adicionou-se 75 mL de NaBH_4 na concentração de $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, juntamente com 12,5 mL do estabilizante, PVP (polivinilpirrolidona), numa solução de 1% (m/v), procedimento representado na Figura 1. A síntese foi realizada em triplicata.

A análise iniciou-se com a mistura do precursor e estabilizante, sendo adicionado o agente reductor por gotejamento, com o auxílio de uma bureta. Para que a formação de AgNP's se desse de forma homogênea, a solução foi mantida por agitação durante 20 minutos. Devido a reação ser muito exotérmica foi necessário a utilização de banho de gelo.

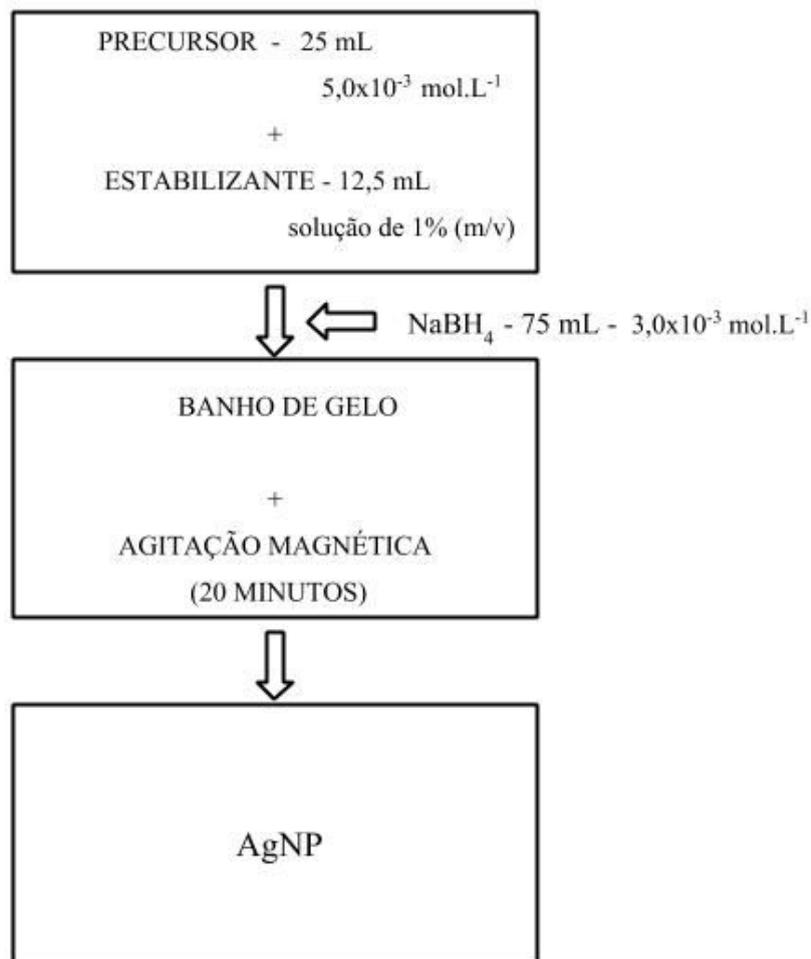


Figura 1. Fluxograma da síntese utilizando boroidreto de sódio

Caracterização das amostras

3.1 Análise por espectroscopia no UV-Vis e por microscopia eletrônica de transmissão

As amostras de nanopartículas de prata foram caracterizadas por espectroscopia de absorção na região do UV-Vis, sendo as amostras submetidas a uma leitura no espectrofotômetro de UV-VIS da marca Shimadzu UV – 1800. A leitura da absorção foi realizada em cubeta de quartzo de 1 cm de caminho ótico. Para a análise foram diluídos 5 μ L de dispersão da amostra em 3 mL de água, obtendo-se o espectro de absorção na região de 300 a 800 nm.

Para análise por microscopia eletrônica de transmissão, uma gota de dispersão da amostra assim que sintetizada foi depositada em uma rede de microscopia de transmissão, previamente recoberta polímero Formvar e carbono amorfo. A análise foi realizada no Laboratório de

Microscopia Eletrônica do Instituto de Química de São Carlos (LME-IQSC/USP) em microscópio de transmissão da Jeol modelo JEM2100 operando a 200 kV.

3.2 Teste de Fungitoxicidade

3.2.1 Cultivo do *Colletotrichum Gloeosporioides*

Para o posterior cultivo do fungo *C. gloeosporioides*, primeiramente foi empregado o método segundo Júnior¹² (2009), onde ocorre o isolamento do microrganismo a partir de folhas de maracujazeiro, apresentando sintomas típicos da doença. Pedacos de tecido foliar de 0,2 — 0,5mm de diâmetro foram retirados de lesões, na região entre a área lesionada e a área sadia. Esses fragmentos foram superficialmente desinfetados com álcool 70% durante 45 segundos e hipoclorito de sódio 2,0% durante 40 segundos e mergulhado em água destilada estéril durante 1 minuto, para o enxágue. Em seguida, estes pedacos de tecido foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura BDA (batata, dextrose e ágar) sendo incubadas por 7 dias, sob fotoperíodo de 12h e temperatura de 25°C, em estufa incubadora. Após esse período, discos de 0,5mm foram retirados das bordas das colônias e transferidos para tubos contendo meio de BDA. A manutenção dos isolados foi realizada pelo armazenamento dos tubos em geladeira a 5°C.

3.2.2 Teste Fungitóxico

Para verificar o efeito da nanopartícula de prata sobre o crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causal da antracnose do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*), alíquotas de 0; 10; 25; 30 e 40 µL de nanopartícula foram colocadas, com o auxílio de uma pipeta automática, no centro de 60 placas de Petri com nove centímetros de diâmetro contendo meio de cultura BDA, e distribuídas sobre a superfície do meio com o auxílio da alça de Drigalsky.

Após trinta minutos, um disco de 0,5 cm de diâmetro do patógeno foi repicado para o centro das placas de Petri, as quais foram mantidas em estufa bacteriológica tipo B.O.D. a uma temperatura de 27°C, por um período de sete dias.

Diariamente, a partir do segundo dia de incubação e posteriormente a cada 24 horas por um período de sete dias, foram realizadas medições do crescimento micelial com o auxílio de régua milimetrada. Em cada placa foram efetuadas duas medições, seguindo como orientação o eixo desenhado na placa composto por duas linhas perpendiculares, que serviu como base para a determinação do centro da placa.

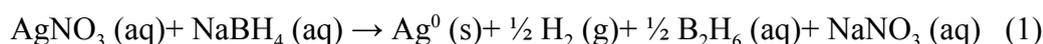
O experimento foi conduzido em um delineamento experimental inteiramente casualizado com cinco tratamentos (0; 10; 25; 30 e 40 μL de AgNPs) e quatro repetições, sendo cada repetição composta pela média de três placas.

Os resultados foram submetidos à análise de variância. As variáveis cujas variâncias mostraram-se homogêneas tiveram os efeitos dos tratamentos testados por meio do teste de F, em uma análise de variância. Quando os resultados revelaram existir diferenças estatisticamente significantes entre médias de tratamentos, estas foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade utilizando-se o software estatístico Statgraphics Centurion XV Versão 15.2.11.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Síntese de nanopartículas de prata

No presente projeto ocorreu a obtenção de nanopartículas de prata coloidal, a qual apresenta uma coloração amarela. O boroidreto de sódio atua na síntese como agente redutor dos cátions Ag^+ em solução, como representado na reação 1, além de promover a estabilização das partículas formadas. Contudo, a estabilidade coloidal das nanopartículas, utilizando apenas o boroidreto, é bastante reduzida e, em muitos casos, faz-se necessário o emprego de outros agentes estabilizantes, assim, optou-se por utilizar o PVP durante a síntese.



A fim de determinar o comprimento de onda resultante da nanopartícula, houve a caracterização por espectroscopia de absorção no UV-Vis, que possibilita avaliar, de forma preliminar, a qualidade morfológica do material formado. Logo após a realização da síntese, observou-se nas partículas a presença de uma banda de absorção centrada em 400 nm, Figura 2a, indicando a formação de nanopartículas de prata.

A análise por espectroscopia de absorção no UV-Vis foi repetida após 30 dias de realização da síntese e após a autoclavagem das dispersões para a realização dos testes de atividade fungitóxica, conforme Figura 2b e 2c. Muito embora não se observasse a olho nu a formação de precipitado na dispersão e nem a alteração de coloração, que seriam indícios da agregação das partículas, a caracterização por absorção possibilita a confirmação quanto a mudança de estabilidade das amostras. Não foi observada alteração apreciável na posição do máximo de absorção e nem na largura da banda.

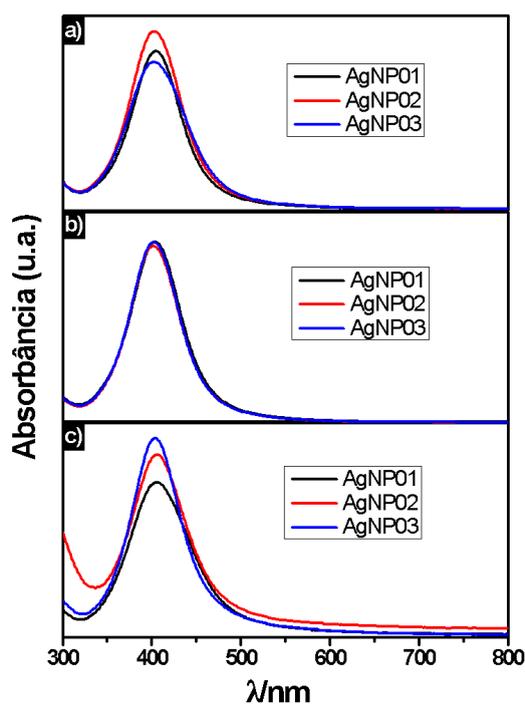


Figura 2. Espectros de absorção na região do UV-Vis para as amostras de nanopartículas de prata: a) assim que sintetizadas; b) após 30 dias; e v) após 30 e autoclavagem das amostras

O tamanho médio de partículas está diretamente associado à posição do máximo de absorção, de tal modo que qualquer efeito que promovesse o aumento do tamanho seria acompanhado de um deslocamento no comprimento do máximo de absorção para maiores valores de comprimento de onda. Além disso, a largura da banda está relacionada à distribuição de tamanho, sendo que seu alargamento seria consequência da alteração da homogeneidade da amostra. Assim, é possível concluir que as amostras apresentam elevada estabilidade coloidal,

podendo ser armazenadas por períodos superiores a um mês e mesmo após serem submetidas a autoclavagem.

Com o intuito de se obter mais informações quanto às características das amostras sintetizadas, foi realizada a caracterização por microscopia eletrônica de transmissão, Figura 3. Observou-se a formação de nanopartículas com diâmetro médio de 6,3 nm, Figura 3c, e que o material apresentou forma próxima a de esferas. Além disso, a presença do PVP não levou a formação de uma matriz em dispersão, promovendo apenas o recobrimento do material. Não é possível diferenciar o PVP da composição do suporte, Formvar e carbono amorfo, isso ocorre porque um dos efeitos para contraste nas imagens em microscopia eletrônica está associado ao número atômico. Assim, tanto o PVP quanto o suporte apresentam em sua composição majoritariamente átomos de carbono, não sendo possível diferenciar uma estrutura da outra.

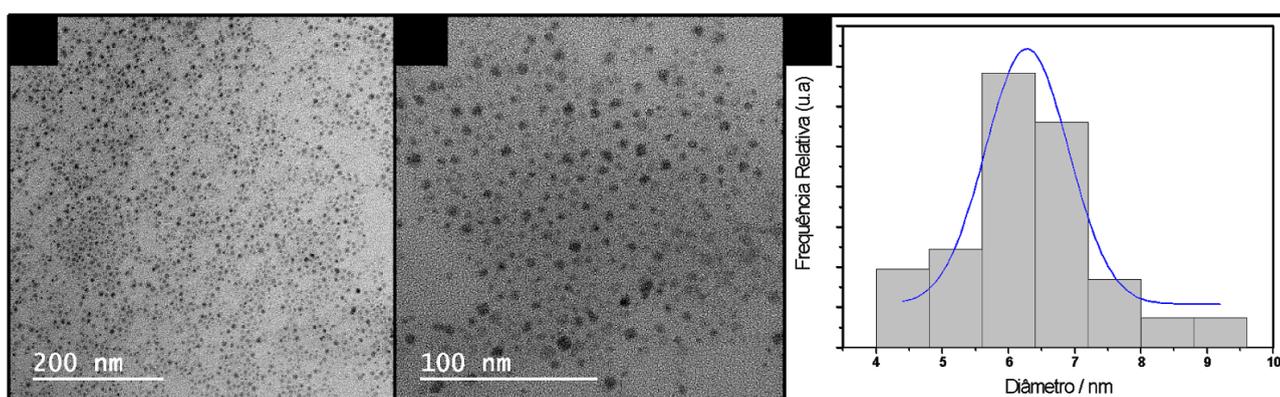


Figura 3. a) e b) Imagens representativas de nanopartículas de prata sintetizadas pelo método do boroidreto na presença de PVP. c) Histograma obtido pela contagem de 80 partículas e ajuste gaussiano sobre a distribuição: $d = 6,3 \pm 0,6$ nm; $r^2 = 0,94759$.

Efeito fungitóxico de nanopartículas de prata

Não houve efeito das concentrações de nanopartícula de prata sobre o crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* durante o período de avaliação do experimento (Tabela 1).

Tabela 1. Crescimento radial diário (médias) de *Colletotrichum gloeosporioides* exposto a diferentes concentrações de nanopartículas de prata durante um período de sete dias.

Tratamento (μ l)	Diâmetro final (cm)
10	3,4 a*
20	3,3 a

30	3,3 a
40	3,1 a
0	3,4 a

* médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Apesar de serem escassos os dados na literatura sobre o efeito fungistático de AgNPs sobre o crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*, alguns trabalhos apresentam resultados positivos da substância sobre diferentes fungos.

Araújo¹³(2014), em experimento avaliando o efeito de AgNPs no controle *in vitro* de fungos fitopatogênicos pertencentes às espécies *Fusarium pallidoroseum*, *Colletotrichum musae*, *Colletotrichum gloeosporioides* e *Rhizoctonia solani*, não observou efeito de tratamento sobre *Fusarium pallidoroseum* e resultados variados em relação às diferentes espécies avaliadas, sendo os menores efeitos observados em *Colletotrichum gloeosporioides*. Segala¹⁴ (2012) e Carreira¹⁵ (2009) observaram a inibição total do crescimento de *Candida albicans* por AgNps.

Kim¹⁶ (2009), avaliando o efeito fungistático das nanopartículas de prata sobre o crescimento *in vitro* de *Rafaella* sp., observaram efeito positivo da substância sobre o crescimento da espécie, com efeitos negativos sobre o crescimento micelial e germinação de conídios, no volume de 25 µL. Kim et al.¹⁷ (2012), avaliando o efeito fungistático da espécie no controle *in vitro* de 18 espécies de fungos fitopatogênicos, observou que a inibição total do crescimento da maioria dos fitopatógenos foi observada somente em volumes superiores a 100 µL.

Villamizar-Gallardo et al.¹⁸ (2017), em experimento avaliando o efeito fungicida de nanopartículas de prata sobre o crescimento de fungos toxicogênicos em cacauero (*Theobroma cacao*) pertencentes as espécies *Aspergillus flavus* e *Fusarium solani*, observaram que os ensaios de inibição realizados tanto em meios sintéticos sólidos quanto líquidos, não apresentaram efeito inibitório sobre os patógenos, mesmo em volumes superiores a 100 µL, e efeito positivo, com inibição total do crescimento, no volume de 80 µL quando da inoculação do patógeno no tecido vegetal.

A resistência dos patógenos às AgNPs podem ser atribuídas a uma série de fatores, a exemplo da produção de metabólitos secundários, como policetídeos, peptídeos ribossomais e não ribossomais e terpenóides.^{19,20}

Uma outra hipótese que pode explicar a resistência de fitopatógenos às AgNPs pode estar relacionada a habilidade de determinadas espécies em conduzir a síntese extracelular de nanopartículas de prata, o que implicaria na presença de enzimas redutoras de prata no patógeno, o que poderia vir a induzir resistência ao metal.

Outros fatores, como a morfologia e tamanho das NPs também devem ser consideradas, havendo relatos na literatura que o poder fungistático das mesmas é incrementado quando estas apresentam diâmetro inferior a 10 nm.²¹

CONCLUSÃO

A síntese de AgNPs empregando o método do boroidreto, na presença de PVP, ocorreu de forma eficiente, sendo perceptível tanto pela alteração da coloração da solução, quanto pelas técnicas instrumentais de caracterização. Além disso, a presença do PVP levou ao aumento da estabilidade das nanopartículas em dispersão, podendo ser armazenado sem alterações apreciáveis de suas propriedades mesmo para períodos superiores a um mês. Essa estabilidade é resultante de um impedimento estérico entre as cadeias do polímero sobre as diferentes partículas, impedindo que ocorra o processo de agregação, o que foi observado mesmo com os procedimentos de esterilização em autoclave para os testes de fungitoxicidade.

Não foi observado o efeito das nanopartículas de prata no controle do crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides in vitro*, para o intervalo de concentração estudado. Os resultados podem ser explicados por fatores como as baixas concentrações de partículas utilizada, bem como mecanismos de resistência desenvolvidos pelos microrganismos, como a síntese de metabólitos secundários, bem como pela presença extracelular de enzimas redutoras do metal. Estudos adicionais empregando-se maiores concentrações podem levar a uma melhor análise da ação das AgNPs e sua potencialidade no controle do crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*.

REFERÊNCIAS

1. Rai, M.; *Ciência e Cultura* **2013**, 65, 3.

2. Melo Junior, M. A.; Santos, L. S. S.; Gonçalves, M. Do C.; Nogueira, A. F.; *Química Nova* **2012**, 35, 1872.
3. Pedrosa, C. B. Do V.; Rodrigues, F. A.; *In: Congresso de iniciação científica da universidade de Mogi das Cruzes*, Mogi das Cruzes, Brasil, 2015.
4. Rocha, T. C. R.; *Tese de Doutorado*, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2008.
5. Bechtold, M.; *Dissertação*, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil, 2011.
6. Fernandes, P. É.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal de Viçosa, Brasil, 2014.
7. Smanio, J. A.; *Tese de Doutorado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 2017.
8. Serafim, R. A. C.; *Dissertação*, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil, 2010.
9. Araújo, E. A., Passos, F. R., Ribeiro, L. Pereira, A. A., Júnior, J. F. Q. F.; *Pesqui. Agropecu. Trop.* **2015**, 45, 138.
10. O., Santos, S. O., de Oliveira, V. B., Trindade, L., Macedo, M. L., da Costa, L. P., & Lopez, J. A.; *Resumo da 18ª Semana de Pesquisa da Universidade Tiradentes*, Aracaju, Brasil, 2016.
11. Olyveira, G.M.; Carvalho, A. J. F.; Pessan, L. A.; *Dissertação*, Universidade Federal de São Carlos, Brasil, 2009.
12. Júnior, I. T. S.; Sales, N. L. P.; Martins, E. R.; *Revista Biotemas* **2009**, 22, 77.
13. Araújo, J. A. M.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Brasil, 2014.

14. Segala, K.; Bizarria, M. T.; Silva, A. S. F.; Martinez, E. F.; Mei, L. H. I.; *7º Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais (COLAOB)*, Natal, Brasil, 2012.
15. Carreira, C. M.; Pereira, C. A.; Bombana, A. C.; Jorge, A. O. C.; *XIII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e IX Encontro Latino Americano de Pós-Graduação – Universidade do Vale do Paraíba*, Brasil, 2009.
16. Kim, S. W.; Kim, K. S.; Lamsal, K.; Kim, Y.; Kim, S. B.; Jung, M.; Sim, S.; Kim, H.; Chang, S.; Kim, J. K.; Lee, Y. S.; *Journal of Microbiology and Biotechnology* **2009**, *19*, 760.
17. Kim, S. W.; Jung, J. H.; Lamsal, K.; Kim, Y. S.; Min, J. S.; Lee, Y. S.; *Mycobiology* **2012**, *40*, 53.
18. VILLAMIZAR-GALLARDO, R.; CRUZ, J. F. O; ORTÍZ-RODRIGUEZ, O. O.; *Pesquisa Agropecuária Brasileira* **2016**, *51*, 1929.
19. Andersen , M.R.; Nielsen , J.B.; Klitgaard , A.; Petersen , L.M.; Zachariasen , M.; Hanse N, T.J.; Blicher , L.H.; Gotfredsen, C.H.; Larsen, T.O.; Nielsen, K.F.; Mortensen, U.H.. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2013**, *110*, 99.
20. Pulit, J.; Banach, M.; Szczglowska, R.; Bryk, M.; *Acta Biochimica Polonica* **2013**, *60*, 795.
21. Kim , J.S.; Kuk , E.; Yu, K.N.; Kim , J.H.; Park , S.J.; Lee H.J.; Kim , S.H.; Park , Y.K.; Park , Y.H.; Hwang , C.-y.; Kim, Y.-k.; Lee , Y.-s.; Jeong , D.H.; Cho , M.-h.; *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* **2007**, *3*, 95.