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

Iron Amoreli de Figueiredo Ribeiro

NANOPARTÍCULAS BIOGÊNICAS DE TITÂNIO BASEADAS EM *Bacillus velezensis* AGVL-005: SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO, TOXICIDADE E POTENCIAL AGRÍCOLA

Sorocaba/SP
2021

Iron Amoreli de Figueiredo Ribeiro

NANOPARTÍCULAS BIOGÊNICAS DE TITÂNIO BASEADAS EM *Bacillus velezensis* AGVL-005: SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO, TOXICIDADE E POTENCIAL AGRÍCOLA

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.

Orientador: Professora Dr(a) Renata de Lima

Sorocaba/SP
2021

Ficha Catalográfica

Ribeiro, Iron Amoreli de Figueiredo

R369n Nanopartículas biogênicas de titânio baseadas em *Bacillus velezensis* AGVL-005: síntese, caracterização, toxicidade e potencial agrícola / Iron Amoreli de Figueiredo Ribeiro. – 2021.

72 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Renata de Lima.

Dissertação (Mestrado em Processos Tecnológicos e Ambientais) – Universidade de Sorocaba, Sorocaba, SP, 2021.

1. Nanotecnologia. 2. Nanopartículas. 3. Titânio. 4. Fungos fitopatogênicos – Controle biológico. I. Lima, Renata, orient. II. Universidade de Sorocaba. III. Título.

Elaborada por Maria Carla P. F. Gonçalves – CRB-8/6721

Iron Amoreli de Figueiredo Ribeiro

NANOPARTÍCULAS BIOGÊNICAS DE TITÂNIO BASEADAS EM *Bacillus velezensis* AGVL-005: SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO, TOXICIDADE E POTENCIAL AGRÍCOLA

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 em:

BANCA EXAMINADORA:

Prof.(a) Dra. Renata de Lima
Universidade de Sorocaba

Dr. Eduardo Roberto de Almeida Bernardo
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

Dr.(a) Mariana Guilger Casagrande
Instituto de Ciência e Tecnologia de Sorocaba
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

RESUMO

A utilização de bactérias na síntese biogênica de nanopartículas de titânio tem mostrado ser uma alternativa promissora para solução de gargalos da agricultura, isto se dá devido à gama de biomoléculas produzidas por estes agentes mediadores, junto ao potencial do apresentado pelo titânio. As nanopartículas biogênicas apresentam um recobrimento formado por estas biomoléculas, as quais proporcionam estabilização, mediação de tamanho e conferem ou amplificam sua atividade. Uma potencial aplicação de nanopartículas sintetizadas por agentes de controle biológico é o controle de fitopatógenos que atingem culturas agrícolas. O presente estudo teve por objetivo sintetizar nanopartículas de titânio e o sobrenadante de cultivo de *Bacillus velezensis* AGVL-005 e investigar sua atividade biológica para supressão de fungos fitopatogênicos *in vitro* e suas implicações toxicológicas. A síntese foi bem-sucedida utilizando titânio isopropóxido como percursor e o sobrenadante do cultivo bacteriano como agente redutor e estabilizante. As nanopartículas de titânio biossintetizadas (TiNP-BvS) foram investigadas quanto à suas características físico-químicas pelas técnicas de espalhamento dinâmico da luz (DLS) e rastreamento de nanopartículas (DLS), apresentando baixa polidispersão (PDI). As TiNP-BvS apresentaram atividade biológica, promovendo a inibição concentração-dependente do desenvolvimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* e *Colletotrichum lindemuthianum,* inibição da germinação e formação de novos escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* e controle da infecção de sementes de feijoeiro por *Colletotrichum lindemuthianum.* As nanopartículas não apresentaram efeito genotóxico e fitotóxico significativo e impacto negativo significativo nas enzimas do solo, entretanto, efeitos citotóxicos em linhagens celulares V79 foram reportados. Em suma, as nanopartículas de titânio sintetizadas utilizando *B. velezensis* AGVL-005 foram capazes de inibir o desenvolvimento de fitopatógenos de alta relevância econômica. O recobrimento das nanopartículas exerce um papel importante nos aspectos físico-químicos e na atividade biológica das TiNP-BvS, entretanto, este precisa ser investigado com maior profundidade. Os resultados são promissores, principalmente, no que tange ao vislumbre de novas vias de síntese biogênica de nanopartículas, e aplicação das mesmas para o desenvolvimento de uma agricultura mais eficaz e sustentável.

Palavras-chave: Síntese biogênica. Nanopartículas de titânio. *Bacillus velezensis*. *Sclerotinia sclerotiorum*. *Rhizoctonia solani*. *Colletotrichum lindemuthianum.*

ABSTRACT

The application of bacteria in the biogenic synthesis of titanium nanoparticles has been reported as a promising alternative due to the range of biomolecules produced by the mediating agent. Biogenic nanoparticles can present a coating formed by these biomolecules, which can provide stabilization, size mediation and provide or amplify their biological activity. A potential application of nanoparticles biologically synthesized by biological control agents is the control of phytopathogens in agricultural crops. The present study aimed to synthesize titanium nanoparticles from *Bacillus velezensis* AGVL-005 culture filtrate, investigate its biological activity for *in vitro* suppression of phytopathogenic fungi and its toxicological implications. The synthesis was successful using isopropoxide titanium as a precursor to the synthesis mediated by the microbial culture filtrate. The biosynthesized nanoparticles (TiNP-BvS) had its physical-chemical characteristics investigated, showing low polydispersity (PDI). TiNP-BvS showed biological activity, promoting a dose-dependent inhibition of the mycelial development of *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* and *Colletotrichum lindemuthianum*, inhibition of germination and formation of new sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* and control of infection of bean seeds by *Colletotrichum lindemuthianum*. The nanoparticles did not show significant genotoxic effect, phytotoxic effect and any negative impact on soil enzymes, however, cytotoxic effects in V79 cell lines were reported. Thus, titanium nanoparticles synthesized using *B. velezensis* AGVL-005 can inhibit the development of high economically relevant phytopathogens. The possible nanoparticle coating may play an important role in the physical-chemical aspects and biological activity of TiNP-BvS, however, a further investigation must be performed to confirm this hypothesis. The results are encouraging, especially because of the glimpse of new pathways for the biogenic synthesis of nanoparticle and the functionalization of their activity in technological applications for a more efficient and sustainable agricultural development.

Keywords: Biogenic synthesis. Titanium nanoparticles. *Bacillus velezensis*. *Sclerotinia sclerotiorum*. *Rhizoctonia solani*. *Colletotrichum lindemuthianum.*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 8

2 OBJETIVOS 9

2.1 OBJETIVO GERAL 9
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 9

3 PRÉ ETAPAS DO DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO 10

3.1 ENSAIO DE ANTAGONISMO DE *BACILLUS VELEZENSIS* AGVL-005 CONTRA FUNGOS FITOPATOGÊNICOS 10
3.2 *SCREENING* DE METODOLOGIAS DE SÍNTESE BIOGÊNICA DE NANOPARTÍCULAS DE TITÂNIO BASEADAS EM *BACILLUS VELEZENSIS* AGVL-005 10

4 RESULTADOS 12

4.1 SÍNTESE BIOGÊNICA DE NANOPARTÍCULAS DE TITÂNIO: UMA PERSPECTIVA 13
4.2 NANOPARTÍCULAS BIOGÊNICAS DE TITÂNIO BASEADAS EM *BACILLUS VELEZENSIS* AGVL-005: SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO, TOXICIDADE E POTENCIAL AGRÍCOLA 39

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS 70

6 REFERÊNCIAS 71

1 INTRODUÇÃO

O significativo crescimento populacional e consequente demanda global por alimentos intensificam a preocupação quanto ao desenvolvimento de estratégias tecnológicas que promovam uma agricultura mais produtiva e, ao mesmo tempo, alinhada com as premissas sustentáveis. O desenvolvimento e seleção de cultivares de maior eficiência produtiva vem acompanhado de maior suscetibilidade destes aos fitopatógenos e pragas agrícolas, sendo estes os principais fatores limitantes do rendimento e qualidade da produção agrícola (SAVARY *et al*., 2019). Consequentemente, a intensificação do uso de agrotóxicos acompanha esta demanda, representando implicações à saúde e ao ambiente (MEENA *et al*., 2020).

O manejo integrado de pragas (MIP) e de doenças (MID) e a aplicação do controle biológico, dentro de seu contexto, apresentam-se como ferramentas poderosas para superar a resistência e resiliência de patógenos (KOGAN, M., 1998). Os biopesticidas, desta forma, se destacam em relação aos pesticidas convencionais, uma vez que, os agroquímicos apresentam disponibilidade reduzida, intensificam o ressurgimento e desenvolvimento de resistência de pragas e fitopatógenos, apresentam efeitos toxicológicos adversos e impacto a organismos não alvo, além de apresentarem alta persistência no ambiente (SINGH *et al*., 2019). Dentre vários agentes de controle biológico, a bactéria *Bacillus velezensis* é reportada como um potencial ativo para composição de biopesticidas (PYLRO *et al*., 2018; ADENIJI *et al*., 2019; FAN *et al*., 2018). Embora o controle biológico se configure como uma abordagem em ascensão, o desenvolvimento de produtos ainda é limitado por gargalos tecnológicos que envolvem o escalonamento de produção e formulação de alguns ativos (BURGES, H. D., 2012; LEGGETT *et al*., 2011). A alta atividade das nanopartículas, bem como suas propriedades particulares, são fatores relevantes para sua utilização para superar limitações atuais dos biopesticidas como o aumento do tempo de prateleira, atividade em campo e estabilidade frente a condições bióticas e abióticas extremas no campo (JALALI *et al*., 2020).

As nanopartículas metálicas apresentam grande potencial para aplicação na agricultura, seja em relação a proteção ou a nutrição de plantas, por apresentarem peculiaridades funcionais e físico-químicas associadas ao tamanho (GHORMAD *et al.,* 2011). Desta forma, a nanotecnologia ostenta um proeminente papel como alternativa para os desafios contemporâneos da agricultura (MANJUNATHA *et al*., 2016; DITTA, A. 2012), principalmente no que tange abordagens para o uso de nanopartículas com alta atividade e menor impacto ambiental (FRACETO *et al.*, 2016). Diversas metodologias são utilizadas para a obtenção de nanopartículas metálicas, entretanto, a síntese biogênica caracteriza-se como uma

rota de baixo custo e ambientalmente amigável, reduzido emprego de substâncias químicas. Além disso, o recobrimento de biomoléculas provenientes do organismo mediador da síntese confere às nanopartículas uma maior estabilidade e pode contribuir para sua atividade biológica (SHARMA *et al*., 2019).

Diante do exposto, o desenvolvimento de novas técnicas e estratégias para o controle de fitopatógenos e pragas agrícolas se faz necessário, principalmente no que tange o uso de tecnologias com maior efetividade e menor impacto ambiental. A nanotecnologia se destaca como um potencial agente de transformação do atual cenário e, nesta perspectiva, o êxito da abordagem passa por novas rotas para a síntese de nanopartículas funcionais. Desta forma, o presente trabalho propõe uma contribuição com a temática, revisando informações recentes da literatura e desenvolvendo uma abordagem experimental tecnológica para a síntese biogênica de nanopartículas de titânio. Assim, esta dissertação foi dividida em capítulos que correspondem a artigos para publicação em periódicos científicos internacionais.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Sintetizar de forma biogênica nanopartículas de titânio, utilizando como agente redutor e estabilizante a bactéria *Bacillus velezensis* AGLV-005 e seus metabólitos, além de avaliar sua atividade biológica e implicações toxicológicas.

2.2 Objetivos específicos

- Sintetizar nanopartículas de titânio, utilizando o filtrado de cultivo da bactéria *Bacillus velezensis* AGLV-005.
- Confirmar a ocorrência da síntese e realizar a caracterização físico-química das nanopartículas para determinar parâmetros como distribuição de tamanho, índice de polidispersão, potencial zeta e concentração.
- Avaliar a citotoxicidade e genotoxicidade das nanopartículas utilizando as linhagens celulares 3T3, HaCat e V79 e a espécie vegetal *Allium cepa* por meio de avaliação da viabilidade celular por atividade mitocondrial (MTT) e ensaio *Allium cepa*, respectivamente.
- Avaliar a atividade biológica *in vitro* das nanopartículas para inibição do crescimento dos fungos fitopatogênicos *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* e *Colletotrichum*

lindemuthianum.

- Avaliar os efeitos fitotóxicos das nanopartículas sobre sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris).*
- Avaliar os efeitos das nanopartículas sobre as enzimas bioindicadoras de qualidade do solo: arilsulfatase, fosfatase ácida e beta-glicosidase.

3 PRÉ ETAPAS DO DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

3.1 Ensaio de antagonismo de *Bacillus velezensis* AGVL-005 contra fungos fitopatogênicos

Afim de se investigar a atividade antagonista de *Bacillus velezensis* AGVL-005 contra os fitopatógenos *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* e *Colletotrichum lindemuthianum*, realizou-se um ensaio de antagonismo por pareamento em placa de Petri. Para tal, os fitopatógenos foram co-inoculados com o agente de controle biológico em meio de cultura PDA, cultivados em incubadora com demanda bioquímica de oxigênio (BOD) a 25ºC ± 1ºC com fotoperíodo de 12 horas por um período de 7 dias em triplicatas. Após o período de incubação, avaliou-se qualitativamente as repetições experimentais quanto à formação de halo de inibição do crescimento fúngico.

A bactéria *Bacillus velezensis* AGVL-005 apresentou halo de inibição positivo para os três fungos fitopatogênicos testados, vislumbrando assim o potencial de atividade biológica inibitória de nanopartículas biosintetizadas a partir desta. Desta forma, este estudo prévio impulsionou e justificou a avaliação de atividade biológica das nanopartículas bem como os fitopatógenos escolhidos para esta avaliação.

3.2 *Screening* de metodologias de síntese biogênica de nanopartículas de titânio baseadas em *Bacillus velezensis* AGVL-005

A triagem da metodologia de síntese foi realizada considerando diferentes variáveis no processo de síntese como, por exemplo, a escolha da condição de cultivo da bactéria, a escolha do melhor sal de titânio precursor e a realização da síntese na presença ou não das células bacterianas.

A determinação da condição de cultivo do agente mediador e do sal de titânio precursor

foi alcançada, realizando a síntese biogênica, avaliando dois meios de cultivo (nutriente *broth* e meio MET1), três sais de titânio precursores (titânio isopropóxido, titânio rutilo e titânio anatase), utilizando-se do sobrenadante de fermentação livre de células (SF) e padronizando-se a concentração final do sal precursor em 4,5 mM.

A confirmação da síntese, a partir das combinações propostas, foi realizada utilizando-se das técnicas de DLS (*Dynamic Light Scattering*) e NTA (*Nanoparticle Tracking Analysis*). A síntese de nanopartículas de titânio foi confirmada para a combinação em que foi utilizado o meio de cultura MET1 e titânio isopropóxido como sal precursor.

A confirmação de uma metodologia capaz de viabilizar a síntese de nanopartículas também direcionou novas tentativas de otimização e investigação do processo em questão. Para tal, o protocolo de síntese foi replicado, adotando-se uma menor concentração final de titânio (1mM) e a realização da síntese contendo células bacterianas do agente mediador. As alternativas testadas não apresentaram sucesso para a síntese das nanopartículas.

Com o objetivo de confirmar que a síntese biogênica das nanopartículas foi mediada por biomoléculas produzidas por *Bacillus velezensis* AGVL-005 e que a atividade biológica de inibição de fitopatógenos era potencializada com as nanopartículas, alguns protocolos de síntese foram propostos e testados. Para tal, o protocolo de síntese foi repetido, adotando-se como fração mediadora meio de cultivo MET1 estéril e água destilada estéril. As amostras foram submetidas às análises de DLS e NTA, além da atividade biológica para inibição dos fungos fitopatogênicos. A síntese biogênica de nanopartículas de titânio, bem como a atividade biológica, não foram atestadas para as sínteses utilizando MET1 e água destilada estéril como fração mediadora. Desta forma, confirmou-se a possibilidade de mediação da síntese por biomoléculas produzidas pela bactéria durante o processo fermentativo.

4 RESULTADOS

SÍNTESE BIOGÊNICA DE NANOPARTÍCULAS DE TITÂNIO: UMA PERSPECTIVA

O capítulo 1 compreende um artigo de revisão no qual são apresentados estudos que envolvem a síntese de nanopartículas de titânio utilizando agentes mediadores biológicos, destacando a síntese verde de nanopartículas de titânio mediadas por plantas e microrganismos, o vislumbre de suas aplicações na agricultura, medicina e meio ambiente, além de mecanismos de síntese e aspectos toxicológicos envolvidos.

NANOPARTÍCULAS DE TITÂNIO BASEADAS EM *Bacillus velezensis* AGVL-005 – SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO, ATIVIDADE BIOLÓGICA E AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA

O capítulo 2 descreve a síntese de nanopartículas de titânio utilizando o filtrado de cultivo da bactéria agente de controle biológico *Bacillus velezensis* AGVL-005. O potencial das nanopartículas na redução ou inibição do crescimento micelial de fungos fitopatogênicos é avaliado, vislumbrando sua aplicação agrícola. Neste também são reportadas avaliações de caracterização físico-química, efeito sobre enzimas bioindicadoras da qualidade do solo, fitotoxicidade, citotoxicidade e genotoxicidade das nanopartículas.

4.1 SÍNTESE BIOGÊNICA DE NANOPARTÍCULAS DE TITÂNIO: UMA PERSPECTIVA

SÍNTESE BIOGÊNICA DE NANOPARTÍCULAS DE TITÂNIO: UMA PERSPECTIVA

RESUMO

A nanotecnologia é uma ciência multidisciplinar com uma gama de aplicações devido à suas propriedades diferenciadas. As vias de obtenção de nanopartículas metálicas, muitas vezes complexas, tem instigado o desenvolvimento de métodos de síntese verde, destacando-se a biossíntese de nanopartículas de óxidos metálicos com métodos mais seguros, fáceis e escalonáveis. As nanopartículas de óxidos metálicos vêm sendo exploradas para diversas aplicações, com destaque para partículas de óxido de titânio (TiO_2). Estes nanomateriais vem sendo biossintetizados utilizando plantas, fungos, leveduras, bactérias e actinobactérias, apresentando características promissoras como atividade fotocatalítica, antimicrobiana e antioxidante. Mecanismos de síntese vem sendo descritos, propondo-se meios de interação de compostos do organismo mediador e o sal precursor do metal, além de implicações toxicológicas de nanopartículas de titânio biossintetizadas. Este artigo abordará a síntese biogênica de nanopartículas de titânio mediadas por diferentes agentes biológicos, o vislumbre de suas aplicações e mecanismos, além de aspectos toxicológicos envolvidos.

Palavras-chave: titânio; nanopartículas; síntese biogênica; nanotecnologia

INTRODUÇÃO

A nanotecnologia é uma ciência multidisciplinar que manipula a matéria a nível atômico e molecular com o objetivo de obter novos materiais com propriedades diferenciadas e maior potencial de aplicação em comparação aos materiais fora da nanoescala (BHAGYARAJ & OLUWAFEMI, 2018). Alguns órgãos classificam nanomaterial como todo aquele material que apresenta, pelo menos, uma de suas dimensões abaixo de 100 nm, porém existe uma discussão quanto à essa classificação devido às particularidades de cada tipo de material (BOVERHOF *et al*., 2015).

Dentre as áreas nas quais a nanotecnologia vem sendo aplicada e apresenta grandes avanços estão medicina e saúde, sistemas energéticos e ópticos, fármacos e cosméticos, agricultura e alimentos, e ambiente (RAKESH *et al*., 2015). Em especial as nanopartículas metálicas e de óxidos de metais, devido a suas propriedades físico-químicas diferenciadas, têm

sido direcionadas para diversas aplicações como o controle de bactérias e fungos patogênicos, tanto na área da saúde como na agricultura (YAQOOB *et al*., 2020). Estas podem ser sintetizadas por método químico, físico ou biogênico, sendo que esse último apresenta algumas vantagens por se tratar de um método simples e ambientalmente amigável (AHMAD *et al*., 2019).

Na síntese biogênica de nanopartículas metálicas são utilizados organismos como bactérias, fungos, plantas e algas ou os filtrados e extratos provenientes de seu metabolismo, os quais agem no processo de redução de íons metálicos e na estabilização das nanopartículas (JAMKHANDE *et al*., 2019; AHMAD *et al*., 2019). Quando comparadas às nanopartículas obtidas por síntese química, as nanopartículas biogênicas apresentam maior estabilidade, maior biocompatibilidade e menor toxicidade, sendo ainda, de acordo com alguns estudos, mais eficazes em suas aplicações (WAGHMODE *et al*., 2019; HUNAGUND *et al*., 2016; PATIL and CHANDRASEKARAN, 2020).

A alta atividade fotocatalítica das nanopartículas de dióxido de titânio se destaca dentre suas principais propriedades, conferindo a elas potencial para a degradação de poluentes ambientais, tais como corantes e fármacos e, devido a isto, são especialmente utilizadas em células solares e para tratamento de água e esgoto (WAGHMODE *et al*., 2019).

Logo, diante deste cenário, a presente revisão traz uma breve visão sobre a síntese biogênica de nanopartículas de titânio, explorando a síntese realizada por bactérias, actinobacterias, fungos e plantas, alguns mecanismos de síntese propostos além de exemplos e perspectivas de suas aplicações em diferentes áreas.

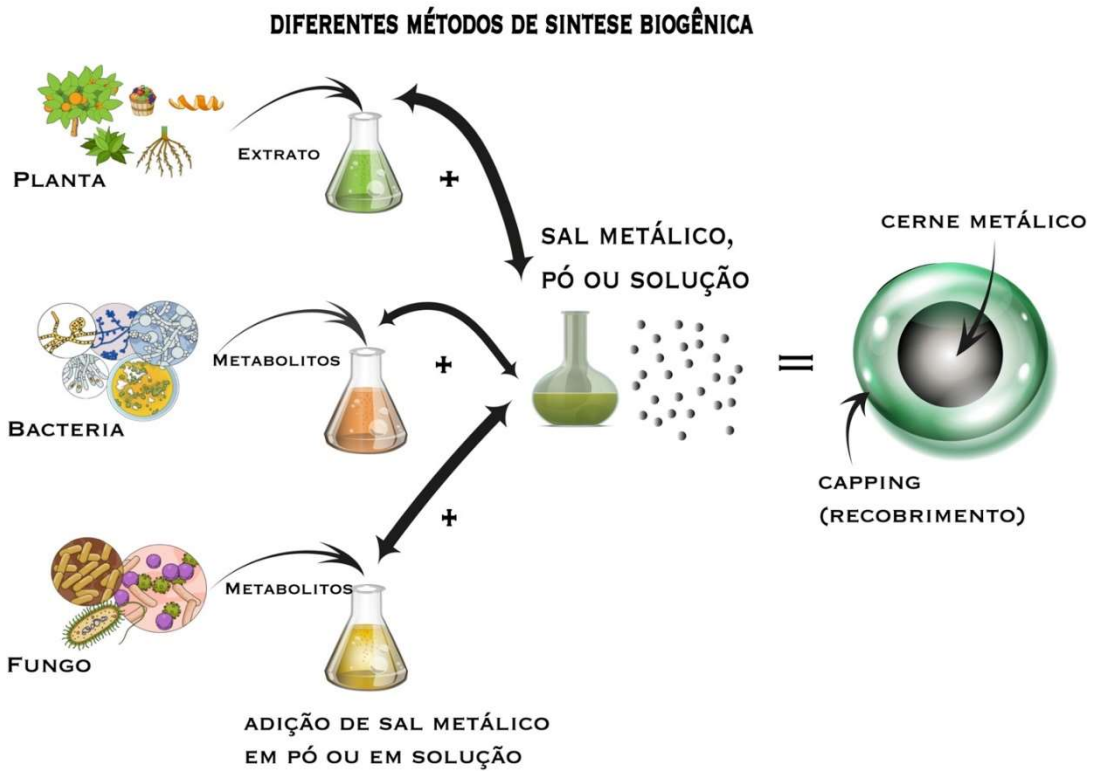
SÍNTESE BIOGÊNICA DE NANOPARTÍCULAS DE TITÂNIO

O dióxido de titânio (TiO_2), óxido natural do titânio, é um material bastante estudado entre os óxidos de metais devido a suas propriedades físicas e químicas, sendo aplicado em diversos setores como pigmento, como fotocatalisador, na composição de cosméticos, protetores solares e pomadas, em dispositivos eletrônicos e como aceptor de elétrons em células fotovoltaicas (DIEBOLD, 2003). Ele se apresenta em três diferentes fases cristalinas na natureza, sendo elas anatase, rutilo e broquita (MUTUMA *et al*., 2015; ALI *et al*., 2018).

Com o advento da nanotecnologia, o dióxido de titânio passou a ser investigado em escala nanométrica, revelando características e propriedades exclusivas (ALI *et al*., 2018). As nanopartículas de dióxido de titânio são comumente sintetizadas por métodos como sol-gel, deposição química em fase vapor e hidrotermal, os quais requerem condições de altas temperaturas e pressão e utilizam substâncias químicas tóxicas (NYAMUKAMBA *et al*., 2018; ESFAHANI *et al*., 2019). Como uma alternativa ambientalmente amigável a esses métodos de

síntese, destaca-se a síntese biogênica (Figura 1), a qual utiliza organismos vivos e seus metabolitos como redutores e estabilizantes (KHAN & FULEKAR, 2016; NABI *et al*., 2018). O grupo de Sundrarajan & Gouri (2011) foi um dos primeiros a realizar a síntese biogênica de nanopartículas de dióxido de titânio, tendo utilizado o extrato da planta *Nyctanthes arbor-tristis* como agente redutor e estabilizante e tetraisopropóxido de titânio como precursor metálico.

Figura 1 – Esquema mostrando as possíveis alternativas para a síntese biogênica de nanopartículas metálicas



Fonte: Elaboração própria

Síntese biogênica de nanopartículas de titânio mediada por bactérias e actinobactérias

As bactérias são cotadas para a realização de síntese de nanopartículas metálicas devido a sua fácil adaptação a condições extremas, seu fácil cultivo e manipulação, rápido crescimento e baixo custo (PANTIDOS & HORSFALL, 2014; GAHLAWAT & CHOUDHURY, 2019). Outro fator é a ampla variedade de bactérias com potencial para a síntese (MAROOUFPOUR *et al*., 2019; GAHLAWAT & CHOUDHURY, 2019), onde se destacam as espécies do gênero Bacillus, as quais são referidas como agentes redutores e estabilizantes em diversos estudos (KHALEGHI *et al*., 2019; ALSAMHARY, 2020; ABD EL ATY e ZOHAIR, 2020). Outro grupo de interesse para a mediação da síntese de nanopartículas metálicas são as actinobactérias (MANIVASAGAN et al., 2016), bactérias gram-positivas com complexa diferenciação

morfológica, majoritariamente miceliais e filamentosas. Elas apresentam um vasto arsenal de metabólitos secundários, sendo produtoras da maioria dos antibióticos em uso clínico atualmente, bem como de vários compostos antifúngicos, anti-helmínticos e anticancerígenos (BARKA et al., 2016). Devido a isto, é possível verificar um aumento no número de estudos que utilizam bactérias na síntese biogênica de nanopartículas metálicas de titânio (Tabela 1).

Tabela 1 – Síntese biogênica de nanopartículas de dióxido de titânio mediada por bactérias e actinobactérias.

Redutor e estabilizante	Precursor de titânio	Aplicação	Referência
Aeromonas hydrophila	$TiO(OH)_2$	Antimicrobiano	JAYASEELAN *et al.* (2013)
Bacillus amyloliquefaciens	Sulfato de titanila	Fotocatálise	KHAN e FULEKAR (2016)
Bacillus licheniformis	$TiO(OH)_2$	-	SURIYARAJ & SELVAKUMAR (2014)
Bacillus subtilis	$TiO(OH)_2$	-	KIRTHI *et al*. (2011)
	Hexafluorotitanato dipotássico	Fotocatálise na supressão da formação de biofilme	RAJAKUMAR *et al.* (2012)
Bacillus thuringiensis	TiO_2	Proteção ultravioleta	JALALI *et al.* (2020)
Bacillus cereus	TiO_2	Anti-cancerígeno	SUNKAR *et al*. (2014)
Bacillus mycoides	TiO_2	Composição de painéis solares	ÓRDENES-AENISHANSLINS *et al.* (2014)
Staphylococcus aureus	Titânio tetraisopropóxido	Antimicrobiano e antibiofilme	LANDAGE *et al*. (2020)
Lactobacillus crispatus	TiO_2	Antimicrobiano	IBRAHEM, *et al*. (2014)
Lactobacillus johnsonii	TiO_2	-	AL-ZAHRANI *et al.* (2018)
Lactobacillus sp.	TiO_2	Antimicrobiano	ABDULSATTAR *et al*. (2014); LADAN *et al.* (2011).
Halomonas elongata	$TiO(OH)_2$	Antimicrobiano	TARAN *et al*. (2018)
Propionibacterium jensenii	$TiO(OH)_2$	Composição de curativo biológico cicatrizante	BABITHA & KORRAPATI (2013)
Actinobactérias	$TiO(OH)_2$	Anti-incrustração bacteriana	VEENA *et al*. (2016)

	TiO_2	Anticancerígeno	PRASEETHA *et al.* (2012)
	$TiO(OH)_2$	Biorremediação	PRIYARAGINI *et al.* (2014)
Streptomyces sp.	$TiO(OH)_2$	Antimicrobiano	AĞÇELI *et al.* (2020)

Síntese biogênica de nanopartículas de titânio mediada por fungos e leveduras

Os fungos apresentam a habilidade intrínseca de reduzir sais metálicos em sua forma elementar ou iônica via produção de enzimas e outros metabólitos (NADEEM *et al.*, 2018). Estes são considerados potenciais postulantes a agentes mediadores da síntese de nanopartículas metálicas por serem facilmente manipulados e apresentarem alta produtividade em larga escala, possuírem uma alta capacidade de captação de metais, apresentarem produção de redutases específicas e secretarem uma grande quantidade de proteínas, o que resulta em alta produtividade de nanopartículas. Quando a via de biossíntese de nanopartículas por fungos é comparada com a síntese por bactérias, é possível observar que esta apresenta uma alta produtividade, além de produzirem nanopartículas monodispersas com dimensões bem definidas, possibilitando desta maneira, a obtenção de nanopartículas de diferentes composições químicas e tamanhos (HULKOTI *et al.*, 2014). Em levantamento da literatura, foi possível encontrar diversos estudos que trazem como tema a síntese biogênica de nanopartículas de titânio utilizando fungos como agentes redutores (Tabela 2)

Tabela 2 – Síntese biogênica de nanopartículas de dióxido de titânio mediada por fungos

Redutor e estabilizante	**Precursor de titânio**	**Aplicação**	**Referência**
Trichoderma viride	$TiO(OH)_2$	Biopesticida (inseticida)	CHINNAPERUMAL *et al.* (2018)
Tricoderma citrinoviride	TiO_2	Antioxidante e antimicrobiano	ARYA *et al.* (2020)
Trichoderma harzianum	Hexafluorotitanato de potássio (K_2TiF_6)	Controle de fitopatógenos	FARHAT *et al.* (2018)
Aspergillus flavus	TiO_2;	Nutriente para plantas	RALIYA *et al.* (2015);
	TiO_2	Antimicrobiano.	RAJAKUMAR *et al.* (2012)
Aspergillus versicolor	TiO_2	Fungicida	EL-GAZZAR & ISMAIL (2020)
Aspergillus tubingensis	TiO_2	Incremendo do índice de clorofila em plantas	TARAFDAR *et al.* (2013)

Aspergillus niger	TiO_2	Larvicida	DURAIRAJ *et al*. (2014a)
	TiO_2	Proteção ultravioleta e antimicrobiano	DURAIRAJ *et al*. (2014b)
Metarhizium anisopliae	TiO2	Larvicida	YOSRI *et al*. (2018)
Fusarium oxysporum	TiF_6^{2-}	-	BANSAL *et al.* (2005)
Aspergillus niger, Rhizoctonia bataticola, Aspergillus fumigatus e *Aspergillus oryzae*	TiO_2	-	RALIYA et al. (2014)
Leveduras	$TiCl_3$	Atividade fotocatalítica e antimicrobiana	PEIRIS *et al*. (2018)
	$TiCl_4$	Fotocatalítica	HE *et al*. (2011)

Síntese biogênica de nanopartículas de titânio mediada por plantas

As plantas são conhecidas como fábricas biológicas de produtos químicos naturais, apresentam ampla cinética de síntese de nanopartículas, onde algumas partes da planta, como folhas, frutos, raízes, caule, sementes, têm sido utilizadas para a síntese de várias nanopartículas, devido à presença de fitoquímicos em seu extrato que atuam como agentes estabilizadores e redutores (JADOUN *et al*, 2020; NARAYANAN & SAKTHIVEL, 2011). As plantas contêm alguns compostos exclusivos que aumentam e contribuem para a qualidade das nanopartículas, neste sentido, diversos trabalhos vêm sendo conduzidos no âmbito da síntese de nanopartículas de titânio baseadas em extratos de plantas (Tabela 3), apresentando aplicações em vários campos de estudo por se tratar de nanopartículas obtidas por meio de um processo simples, com toxicidade bastante reduzida (JADOUN *et al*, 2020).

Tabela 3. Síntese biogênica de nanopartículas de dióxido de titânio mediada por fungos

Redutor e estabilizante	Precursor de titânio	Aplicação	Referência
Verbascum thapsus (planta)	TiO_2	Fotocatálise	ESFAHANI *et al*. (2019)
Prunus domestica L. (ameixa/casca), *Prunus persia* L. (pêssego/casca) e *Actinidia deliciosa* (Kiwi/casca)	TiO_2	Antibacteriano e antioxidante	AJMAL *et al*. (2019)
Monsonia burkeana (planta)	TiF_4	Atividade fotocatalítica e antimicrobiana	NGOEPE *et al*. (2020)
Caesalpinia pulcherrima (flor)	$TiO(SO_4)$	Síntese	DEVIKALA *et al*. (2020a)
Cola nitida	$TiO(OH)_2$	Antibacteriano, Antifúngico,	AKINOLA *et al*. (2020)

		Antioxidante, Anticoagulante e Catálise	
Trigonella foenum-graecum	Sulfato de titanila	Antimicrobiano	SUBHAPRIYA & GOMATHIPRIYA (2018)
Citrus sinensis	Di-hidróxido de titânio (IV) bis (lactato de amônio)	-	FALL *et al*. (2020)
Phyllanthus niruri	Titânio tetraisopropóxido	-	SHANAVAS *et al*. (2020)
Acacia catechu	Sulfato de titanila	Fotocatálise Antimicrobiano	CHAND *et al*. (2020)
Cardiospermum halibacacabum	Sulfato de titanila	-	DEVIKALA *et al*. (2020b)
Morinda citrifolia	$TiCl_4$	Antimicrobiano	SUNDRARAJAN *et al*. (2017)
Psidium guajava	$TiO(OH)_2$	Antibacteriano Antioxidante	SANTHOSHKUMAR *et al*., (2014)
Morinda citrifolia	$TiO(OH)_2$	Larvicida	SUMAN *et al*. (2015)
Calotropis gigantea	$TiO(OH)_2$	Acaricida	MARIMUTHU *et al*. (2013)
Musa AAA e *Jatropha curcas L . sap*	Óxido de titânio monohidratado (H_2TiO_3)	Antibacteriano	WAGUTU *et al*., (2019)
Syzygium cumini	Titânio tetraisopropóxido	Fotocatálise	SETHY *et al*. (2020)
Extrato de *Matricaria chamomilla*	Titânio tetraisopropóxido	Cátodos de baterías de lítio	PAKSERESHT *et al*. (2020)
Extrato de *Citrus aurantium*	Sulfato de titanila	Antimicrobiano Antiapoptotico Fotocatálise	PUNITHA *et al*. (2020)
Extrato de *Eclipta prostata*	$TiO(OH)_2$	Larvicida	RAJAKUMAR *et al*. (2011)
Extrato da casca de *Annona squamosa*	$TiO(OH)_2$	-	ROOPAN *et al*. (2012)

MECANISMOS DE SÍNTESE

Os mecanismos e compostos biológicos envolvidos na síntese biogênica de nanopartículas metálicas ainda não foram completamente elucidados. Há pouca informação na literatura sobre como são formadas as nanopartículas, especialmente as de dióxido de titânio. De uma forma geral, a síntese biogênica de nanopartículas metálicas ocorre por meio da interação entre os compostos do organismo utilizado, como proteínas e metabólitos secundários, e o sal precursor do metal (OVAIS *et al*., 2018; AHMAD *et al*., 2019).

De acordo com alguns estudos, a síntese biogênica mediada por bactérias e actinobactérias ocorre devido a capacidade das mesmas de reduzir íons metálicos tóxicos, como um mecanismo de defesa, dando origem a partículas em nanoescala com propriedades físicas, químicas e biológicas diferenciadas (IRAVANI, S., 2014; GHASHGHAEI & EMTIAZI, 2015).

Alguns estudos apresentam evidências dos possíveis compostos biológicos que atuam na síntese biogênica de nanopartículas de dióxido de titânio. Em relação à síntese mediada por

bactérias, actinobactérias e fungos, é sabido que esses microrganismos naturalmente produzem biomoléculas que se ligam à íons metálicos como um mecanismo de detoxificação (PARK *et al*., 2016).

Jha *et al*. (2009), ao realizar a síntese empregando uma bactéria do gênero *Lactobacillus* sp., sugerem que o processo ocorreu em decorrência da junção entre a atividade de oxido-redutases de membrana e a fonte de carboidrato presente no meio de cultura. Em um estudo no qual as nanopartículas foram sintetizadas a partir de *Bacillus subtilis*, Kirth *et al*. (2011) indicam a mesma interação como responsável pela síntese. Nanopartículas de dióxido de titânio sintetizadas utilizando o sobrenadante de cultivo da bactéria *Propionibacterium jensenii* apresentaram aminas primárias e secundárias e grupamentos carboxílicos passíveis de interação com íons metálicos atribuídos ao processo de síntese. Também foi observado um pico indicativo de uma ligação amida entre proteínas bacterianas e o dióxido de titânio estabelecida durante a reação (BABITHA & KORRAPATI, 2013).

Na síntese empregando o fungo unicelular *Saccharomyces cerevisiae* foi relatada a ação de oxido-redutases de membrana e quinonas. Neste caso, foi pressuposto que a síntese ocorre inicialmente com a atividade das enzimas impulsionada pela adição do sal precursor no meio, seguida da tautomerização de quinonas e oxidases sensíveis a baixos pHs e da disponibilização de oxigênio molecular para o processo (JHA *et al*., 2009). Em outro trabalho, He *et al* (2011) propuseram um mecanismo de mineralização biomimétrica, sugerindo que macromoléculas biosurfactantes na superfície da membrana de leveduras contendo grupos hidrofílicos acumulam mais cargas negativas na superfície, fornecendo pontos de nucleação orientados para cátions alvo. Por este mecanismo, os cátions de titânio positivamente carregados são automontados, combinados a grupos carboxil e $–OPO_3^{2-}$, na superfície das células de levedura por interação eletrostática.

Quanto à síntese de nanopartículas de dióxido de titânio mediada por plantas, diferentes compostos como ácidos fenólicos, alcalóides, proteínas, enzimas e carboidratos são descritos como atuantes nos processos de redução do sal metálico e estabilização (DOBRUCKA, 2017; MARIMUTHU *et al*., 2013). Grupos funcionais correspondentes à aminas alifáticas e alcóois foram detectados pela técnica FTIR em nanopartículas de titânio cuja síntese foi mediada pelo extrato da planta *Catharanthus roseus*. Essas biomoléculas foram consideradas possíveis atuantes no processo de síntese e na formação do recobrimento (VELAYUTHAM *et al*., 2012). Por meio da mesma técnica, Sundrarajan *et al*. (2017) detectaram ligações de grupamentos indicativas de uma forte interação entre biomoléculas provenientes do extrato da planta *Morinda citrifolia* e nanopartículas de dióxido de titânio.

Compostos fenólicos como antraquinonas, flavonoides e vitamina C provenientes do extrato da planta foram considerados importantes agentes estabilizantes. Os autores relatam a interação de grupamentos carbonila e hidroxila de antraquinonas com o precursor tetracloreto de titânio dando origem a um complexo intermediário posteriormente decomposto em nanopartículas.

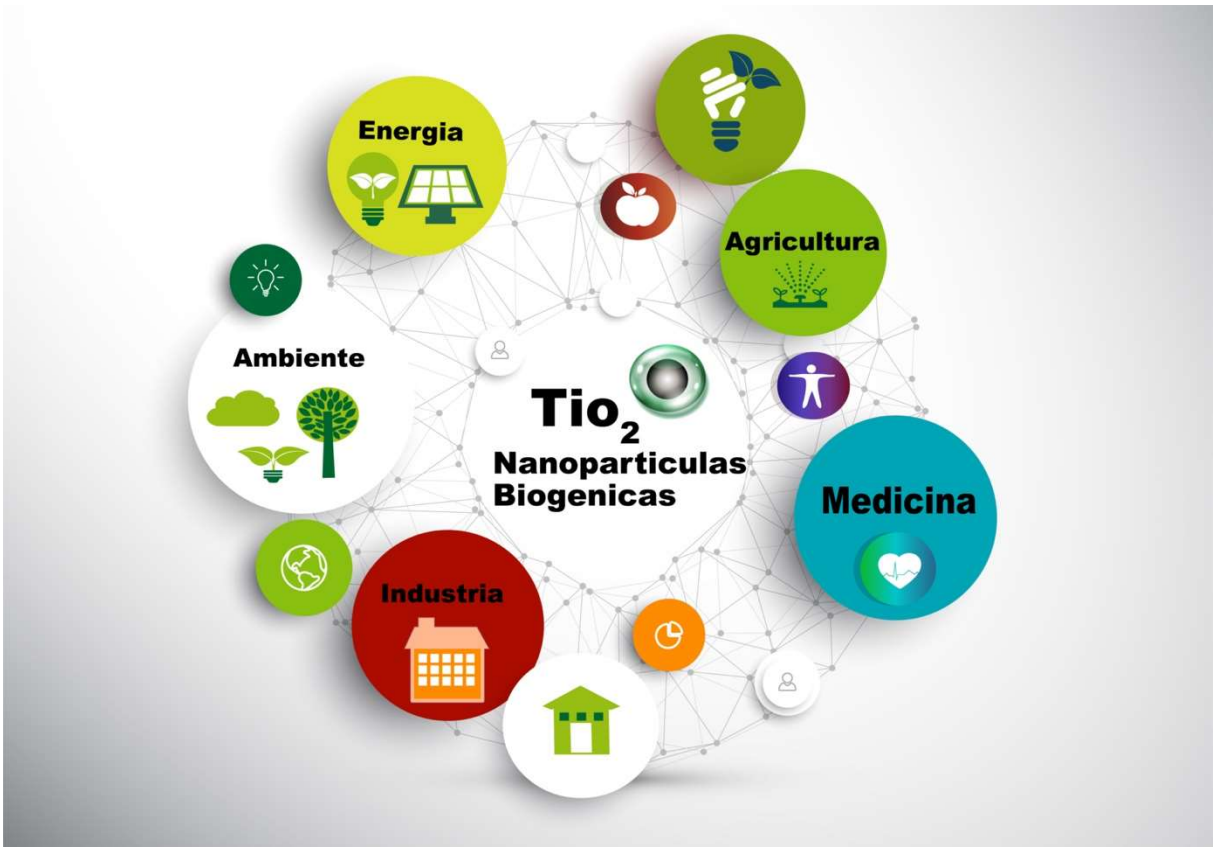
Ajmal *et al*. (2019) detectaram grupamentos hidroxila de compostos fenólicos, grupamentos aromáticos e carbonilas de proteínas e metabólitos, bem como outros grupamentos, em nanopartículas de titânio sintetizadas a partir de extratos da casca de diferentes frutas. Esses grupamentos foram atribuídos aos processos de redução e estabilização das nanopartículas. Em nanopartículas sintetizadas a partir do extrato de *Acacia catechu,* foram identificados grupamentos hidroxila e aminas atribuídos a flavonóides, e anéis de benzeno, característicos de terpenóides, flavonóides, fitoesteróides, dentre outros compostos considerados agentes redutores e estabilizantes (CHAND *et al*., 2020). Os grupamentos hidroxila também foram detectados por Roopan *et al*. (2012) pela técnica de GC-MS e os autores indicaram o possível papel de mediador do extrato da casca de *Annona squamosa* na biossíntese das nanopartículas.

A maioria dos estudos relata que grupos funcionais provenientes dos extratos e ou filtrados empregados na síntese permanecem na composição das nanopartículas, porém, devido ao potencial das nanopartículas biogênicas de dióxido de titânio para diversas aplicações e o fato destas serem ambientalmente amigáveis, são necessários maiores estudos para a elucidação dos mecanismos de síntese.

POSSIBILIDADES E APLICAÇÕES

As nanopartículas biogênicas de titânio são uma alternativa ambientalmente amigável, a qual pode ser promissora para aplicações em diferentes áreas, entre elas da biomedicina, bioengenharia, agricultura, eletrônica, sistemas ambientais, produção de energia (Figura 2) (ROOPAN *et al*., 2012; NADEEM *et al*., 2018).

Figura 2 – Esquema mostrando as principais aplicações das nanopartículas de dióxido de titânio



Fonte: Elaboração própria

Agricultura e controle de pragas

As nanopartículas biogênicas de dióxido de titânio são consideradas menos tóxicas em comparação com nanopartículas de outros metais, apresentando alto potencial para aplicações na agricultura e no controle de pragas (ALGHUTHAYMI *et al*., 2015; SINGH *et al*., 2019).

El-Gazzar & Ismail (2020) sintetizaram nanopartículas de titânio, prata e selênio utilizando o extrato enzimático do fungo *Aspergillus versicolor* e avaliaram o potencial das mesmas para o controle do fungo fitopatogênico *Alternaria alternata*, causador da doença ferrugem da folha de tomate, tanto *in vitro* como em plantas de tomate (estufa e em condições de campo). As nanopartículas de titânio apresentaram alto efeito inibitório, reduzindo a severidade da doença nas diferentes condições de teste, devido a estes resultados os autores sugerem o uso dessas nanopartículas como nanofungicidas para controle biológico.

As nanopartículas biogênicas de dióxido de titânio também apresentaram potencial para o controle de lagartas, insetos adultos vetores e parasitas. Chinnaperumal *et al*. (2018) sintetizaram nanopartículas de dióxido de titânio utilizando o filtrado do fungo *Trichoderma*

viride e avaliaram sua atividade larvicida contra *Helicoverpa armigera*. Foi observado alto índice de mortalidade das larvas, atingindo 100% no primeiro e segundo *instars* para a maior concentração de exposição. Yosri *et al*. (2018) sintetizaram nanopartículas de titânio a partir do fungo *Metarhizium anisopliae* exposto e não-exposto à radiação gama. As nanopartículas sintetizadas utilizando os fungos submetidos à radiação gama apresentaram maior atividade larvicida contra *Galleria mellonella* em comparação com as sintetizadas pelo fungo não exposto à radiação. A radiação em baixas doses estimulou a produção de enzimas extracelulares de *M. anisopliae.*

Os endósporos e as toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis* (Bt) constituem os ingredientes ativos mais amplamente utilizados nos inseticidas biológicos e culturas transgênicas resistentes a insetos (VACHON *et al*., 2012). Entretanto, endósporos e toxinas podem perder sua estabilidade frente a condições bióticas e abióticas extremas, havendo necessidade de desenvolvimento de tecnologias de proteção para estes ativos. Em um contexto de formulação de biopesticidas, por exemplo, o estudo conduzido por Jalali *et al*. (2020) demonstrou o incremento de resistência de endósporos de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) à radiação UV em formulações contendo nanopartículas polimorfas de titânio biosintetizadas a partir de *Bt,* evidenciando seu potencial para aplicação na formulação de bioinseticidas baseados em *Bt.*

Além de apresentarem um bom desempenho no controle de pragas e fungos fitopatogênicos, as nanopartículas biogênicas de dióxido de titânio podem agir como estimulantes do desenvolvimento de plantas. Raliya *et al*. (2015) sintetizaram nanopartículas de dióxido de titânio a partir do fungo *Aspergillus flavus* e avaliaram seus efeitos sobre a planta *Vigna radiata* L. A aplicação das nanopartículas estimulou o crescimento das plantas, com aumento do comprimento das hastes e raízes, maior área de raiz, e maior quantidade de nódulos nas raízes. Também foi observado aumento dos pigmentos fotossintéticos e do conteúdo de proteína solúvel nas folhas.

Visando o controle de parasitas que têm efeitos negativos sobre a pecuária, afetando os rebanhos de gado, Velayutham *et al*. (2012) utilizaram o extrato da folha da planta *Catharantus roseus* para sintetizar nanopartículas de titânio e investigaram seu potencial no controle da mosca hematófaga *Hippobosca maculata* e do piolho de gado *Bovicola ovis* em fase adulta. Ambas as espécies de parasitas apresentaram sensibilidade às nanopartículas chegando a 100% de mortalidade na maior concentração de exposição. Ainda nesta direção, Marimuthu *et al*. (2013) sintetizaram nanopartículas de dióxido de titânio a partir de *Calotropis gigantea* e avaliaram a atividade antiparasitária sobre larvas de *Rhipicephalus microplus* e adultos de *Haemaphysalis bispinosa,* onde foi observada atividade concentração dependente contra ambas

as espécies atingindo mortalidade de 100% na maior concentração de exposição.

Os insetos vetores, transmissores de doenças, também são um alvo das nanopartículas biogênicas de dióxido de titânio. Suman *et al*. (2015) sintetizaram nanopartículas de dióxido de titânio a partir do extrato da planta *Morinda citrifolia* e avaliaram seu potencial larvicida sobre *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*. As nanopartículas apresentaram alto potencial larvicida contra as três espécies em comparação com o extrato aquoso de *M. citrifolia*. Rajakumar *et al*. (2011) utilizaram extrato aquoso de *Eclipta prostata* para a sintese de nanopartículas de dióxido de titânio e avaliaram seu potencial larvicida sobre *Anopheles subpictus*, vetor da Malaria. As nanopartículas ocasionaram mortalidade de 100% das larvas na maior concentração de exposição. Ainda, nanopartículas sintetizadas a partir do extrato de *Solanum trilobatum* apresentaram atividade concentração dependente contra piolhos humanos adultos *Pediculus humanus*, larvas de carrapato *Hyalomma anatolicum* e larvas do mosquito transmissor da malária *Anopheles subpictus*, com maior eficácia em comparação com uma solução de TiO_2. Os autores indicam as nanopartículas como promissoras para o controle de parasitas (RAJAKUMAR *et al*., 2014).

Saúde e medicina

Com perspectivas para aplicações na área da saúde, as nanopartículas biogênicas de dióxido de titânio apresentam potencial para o controle de microrganismos patogênicos. Rajakumar *et al*. (2012) sintetizaram nanopartículas de dióxido de titânio utilizando o fungo *Aspergillus flavus* e avaliaram seu potencial antimicrobiano sobre S*taphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Bacillus subtilis* por meio do teste de disco difusão em ágar. Foi observado que as nanopartículas apresentaram efeitos inibitórios sobre todas as bactérias, porém as gram-positivas apresentaram maior sensibilidade. Ambika & S (2016) sintetizaram nanopartículas de titânio utilizando o extrato de *Vitex negundo* combinado com o líquido iônico Imidazolium, utilizado como meio de reação, e avaliaram a atividade antibacteriana sobre *S. aureus* e *E. coli*, sendo observada inibição de ambas as bactérias. Sundrarajan *et al*. (2017) também observaram atividade antimicrobiana de nanopartículas de titânio sintetizadas a partir do extrato de *Morinda citrifolia* contra os patógenos *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* e *A. niger*, com maior potencial contra bactérias gram-positivas, de forma concentração-dependente. Segundo os autores o potencial antimicrobiano das nanopartículas pode estar relacionado ao menor tamanho, maior área de superfície ativa, estrutura da parede celular bacteriana, espessura da membrana da parede celular, liberação de íons TiO_4^+ de TiO_2, geração de peróxido de

hidrogênio e espécies reativas de oxigênio.

Nanopartículas de TiO_2, cuja síntese foi mediada pela bactéria *S. aureus*, apresentaram potencial antimicrobiano sobre *E. coli* e *B. subtilis* e redução da formação de biofilmes por essas bactérias, sendo uma nanopartícula sugerida para aplicação em equipamentos médicos, visando o controle de infecções bacterianas (LANDAGE *et al*., 2020). Jayaseelan *et al*. (2013) sintetizaram nanopartículas de dióxido de titânio a partir da bactéria *Aeromonas hydrophyla* e avaliaram seu potencial antibacteriano sobre a *A. hydrophyla*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes* e *Enterococcus faecalis*. As nanopartículas apresentaram potencial inibitório sobre todas as espécies, com os maiores halos de inibição para *S. aureus* seguida de *S. pyogenes*.

Subhapriya & Gomathipriya (2018) sintetizaram nanopartículas de dióxido de titânio a partir do extrato de *Trigonella foenum-graecum* e avaliaram seu potencial antimicrobiano, como resultado observaram atividade antimicrobiana contra *Yersinia enterocolitica*, *E. coli*, *S. aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus faecalis*. O efeito antibacteriano foi mais intenso sobre as bacterias gram-positivas, assim como já relatado em outros estudos (SUNDRARAJAN *et al*., 2017; RAJAKUMAR *et al*., 2012), o que provavelmente ocorre devido a sua fina parede celular com muitas camadas de lipopolissacarídeos e poucas camadas de peptideoglicanas (SUBHAPRIYA & GOMATHIPRIYA, 2018).

Bactérias do gênero Lactobacillus, que apresentam interesse alimentício e comumente são encontradas na microflora humana, têm sido reportadas como agentes mediadores para síntese de nanopartículas de titânio. Ibrahem, *et al*. (2014) demonstraram seu potencial antimicrobiano frente bactérias patogênicas multirresistentes. Também em um âmbito de aplicações antimicrobianas, Ağçeli *et al*. (2020) realizaram a síntese biológica de TiNP com diâmetro de 30 – 70 nm, apresentando atividade antimicrobiana *in vitro* frente à bactérias e fungos patogênicos humanos, além de efeito antagônico à formação de biofilme por *Pseudomonas aeruginosa.*

A promissora atividade antimicrobiana das nanopartículas desperta o interesse para o desenvolvimento de novas maneiras de combate a microrganismos. Em relação a sua ação, as nanopartículas de titânio dissolvem a membrana externa das bactérias em decorrência da presença de grupamentos hidroxila em sua composição (RAJAKUMAR *et al*., 2012). O efeito antimicrobiano das nanopartículas de dióxido de titânio está relacionado com sua propriedade altamente oxidante sobre exposição a luz solar ou ultravioleta. As partículas de TiO_2 irradiadas atingem a superfície dos microrganismos e geram espécies reativas de oxigênio, que ocasionam a peroxidação de membrana (MANESS *et al*., 1999).

Abordagens médicas e biomédicas também apresentam potencial para aplicação de propriedades peculiares de nanopartículas de titânio oriundas de síntese biológica por actinobactérias. Neste contexto, atividade anticancerígena foi atestada por Praseetha *et al*. (2012), quando células cancerosas foram expostas à nanopartículas de titânio fotoativadas sintetizadas biologicamente por actinobactérias produtoras de L-asparaginase, um composto anticancerígeno. Este exemplo de aplicação evidencia o potencial bionanotecnológico de TiO_2 também no desenvolvimento de agentes quimioterapêuticos para o câncer.

Em um âmbito de aplicações biomédicas, é também notório o potencial de nanopartículas biogênicas de titânio com múltipla função e aplicação. Peiris *et al*. (2018) realizaram a síntese de nanopartículas baseadas em leveduras e verificaram a atividade fotocatalítica e antimicrobiana do nanomaterial. Durairaj *et al*. (2014b) realizaram a síntese de nanopartículas de titânio baseadas em *Aspergillus niger* e foram capazes de desenvolver um tecido capaz de oferecer proteção ultravioleta e apresentar atividade antimicrobiana frente ao patógenos *S. aureus* e *E. coli.* Em outra síntese biogênica mediada por fungo, Arya *et al*. (2020) utilizaram *Tricoderma citrinoviride* para biossintetizar nanopartículas de titânio que apresentaram atividade antimicrobiana frente à *P. aeruginosa* ultra-resistente a drogas, assim como atividade antioxidante superior ao ácido gálico padrão.

Além dos efeitos antimicrobianos, alguns estudos relatam o potencial das nanopartículas biogênicas de dióxido de titânio como cicatrizante, segundo Babitha & Korrapati (2013) que sintetizaram nanopartículas de titânio a partir da bactéria resistente a metais *Propionibacterium jensenii*, que quando presentes em curativos de colágeno contendo as nanopartículas, apresentaram potencial de em acelerar a cicatrização de feridas de ratos. Sivaranjani & Philominathan (2016) sintetizaram nanopartículas de dióxido de titânio a partir do extrato de *Moringa oleifera* e também avaliaram sua atividade como promotores da cicatrização de feridas em ratos albinos *wistar*, o estudo mostrou um efeito acelerador da cicatrização nos ratos tratados com o gel contendo as nanopartículas em comparação com os ratos tratados com gel contendo sulfadiazina.

Ambiental

A biorremediação é uma alternativa ascendente a métodos convencionais para tratamentos de resíduos e ambientes, podendo degradar contaminantes utilizando-se da atividade de um organismo ou consórcios de microrganismos (JUWARKAR *et al.,* 2010). Vislumbrando possibilidades dentro do campo da biorremediação, nanopartículas de dióxido

de titânio obtidas por síntese biogênica mediada por actinobactérias marinhas apresentaram degradação eficiente de azocorantes (PRIYARAGINI *et al*., 2014). Consequentemente, tais aplicações comprovam o potencial e possibilidades na aplicação de nanopartículas de titânio biosintetizadas por bactérias na biorremediação como possibilidade eficiente e ecologicamente racional.

A degradação fotocatalítica mediada por nanopartículas de titânio vem sendo um importante objeto de estudo, por se tratar de um método eficiente e econômico para decompor poluentes orgânicos em compostos de menor toxicidade e, portanto, o incremento da atividade fotocatalítica abre precedentes para otimização deste processo (SUDHA & SIVAKUMAR, 2015). Neste sentido, em um trabalho de Khan & Fulekar (2016), *Bacillus amyloliquefaciens* foi explorado na biossíntese de nanopartículas de TiO_2, demonstrando o papel da enzima amilase na biossíntese e fornecendo nanopartículas que puderam apresentar atividade fotocatalítica aumentada na degradação do corante vermelho reativo 31 (RR31). Nithya *et al*. (2013) sintetizaram nanopartículas de titânio utilizando extrato de *Aloe vera* e avaliaram seu efeito fotocatalítico sobre o modelo de poluente Rhodamin B sobre irradiação de luz. As nanopartículas apresentaram maior porcentagem de descontaminação em comparação com o TiO_2 em macroescala. Akinola *et al*. (2020) sintetizaram nanopartículas de dióxido de titânio a partir do extrato de *Cola nitida*, as quais apresentaram atividade catalítica na degradação do corante poluente da indústria têxtil verde malaquita.

Chand *et al*. (2020) sintetizaram nanopartículas de prata e titânio a partir do extrato de *Acacia catechu* e avaliaram sua atividade fotocatalítica sobre a degradação dos corantes Rose bengal e Rhodamine B, e a redução de 4-nitrofenol. Ambas as nanopartículas apresentaram potencial fotocatalítico sobre os corantes, com maior eficiência das nanopartículas de prata. Esfahani *et al*. (2019) sintetizaram nanopartículas de dióxido de titânio utilizando o extrato da planta *Verbascum thapsus* e avaliaram a atividade catalítica das mesmas sobre íons de cromo hexavalente Cr(VI), metal altamente tóxico, em solução aquosa. Foi obtida uma eficiência de fotoredução de 79%. Ainda visando remediar a contaminação por cromo hexavalente, Goutam *et al*. (2018) sintetizaram nanopartículas de titânio a partir do extrato de *Jatropha curca* L. e avaliaram o potencial para tratamento fotocatalítico de esgoto de curtume, após tratamento secundário, onde foi observada uma remoção simultânea de 82,26% de demanda química de oxigênio e 76,48% de cromo hexavalente. Os autores atribuem a alta atividade fotocatalítica das nanopartículas à escala nanométrica, à fase cristalina anatase pura, à grande quantidade de grupamento hidroxila de superfície e à grande área de superfície.

Muniandy *et al*. (2017) sintetizaram nanopartículas de dióxido de titânio anatase

mesoporosas utilizando amido solúvel e avaliaram a atividade fotocatalítica das mesmas sobre solução aquosa do corante azul de metileno sobre irradiação de luz solar. As nanopartículas apresentaram alta atividade fotocatalítica, com 100% de degradação do corante no primeiro ciclo, e 86,7% no décimo ciclo, o que indica alta estabilidade. Ngoepe *et al*. (2020) sintetizaram nanopartículas de dióxido de titânio utilizando o extrato da planta *Monsonia burkeana* e sua atividade fotocatalítica foi avaliada sobre o corante azul de metileno sobre irradiação de luz ultravioleta. A atividade fotocatalítica foi bem-sucedida, porém a porcentagem de degradação foi sendo reduzida ao longo dos ciclos, indicando perda da eficiência fotocatalítica. Ainda utilizando o corante azul de metileno como um modelo de poluente, Punitha *et al*. (2020) avaliaram a atividade fotocatalítica de nanopartículas de dióxido de titânio sintetizadas a partir do extrato da casca de *Citrus aurantium* e obtiveram uma redução de 90,8% do corante.

Sethy *et al*. (2020) sintetizaram nanopartículas de dióxido de titânio a partir do extrato de *Syzygium cumini* e avaliaram o potencial delas para a degradação fotocatalítica de contaminação por chumbo Pb^{2+} em esgoto de indústria de explosivos, como resultado foi observada remoção de 75,5% da demanda química de oxigênio e 82,53% de chumbo. Singh *et al*. (2020) sintetizaram nanopartículas de dióxido de titânio a partir do extrato da folha de *Phyllanthus emblica* e observaram seu potencial fotocatalítico sobre o corante Coralline Red com eficiência de degradação de 93%.

Dhandapani *et al*. (2012) realizaram a síntese biogênica de nanopartículas de titânio mediada por *Bacillus subtilis* e estas foram utilizadas para revestir lâminas de vidro, no qual permitiu-se a formação de biofilme bacteriano para que fosse submetido à irradiação de luz policromática para compreender a atividade fotocatalítica no controle do biofilme aquático. Os autores reportaram que o nanomaterial biogênico atuou como um bom fotocatalisador, gerando H_2O_2 na interfaces TiO_2-biofilme para suprimir o desenvolvimento de biofilme aquático, um sério problema em sistemas hidráulicos.

Outras aplicações

Pakseresht *et al*. (2020) sintetizaram nanopartículas de dióxido de titânio a partir do extrato da flor de *Matricaria chamomilla* e utilizaram como eletrodo em baterias de lítio-oxigênio com o objetivo de melhorar a ciclagem das células Li-O_2. Foi observado bom desempenho eletroquímico das baterias, com estabilidade por 30 ciclos.

Nanopartículas de dióxido de titânio também têm sido empregadas na composição de painéis solares, como alternativa mais barata e ecologicamente viável. Neste sentido, Órdenes-Aenishanslins *et al*. (2014) reportaram a biossíntese de nanopartículas de TiO_2 por *Bacillus*

mycoides com estrutura anatase polimórfica e diâmetro médio de 40 – 60 nm. Alternativamente à nanopartículas obtidas quimicamente, as nanopartículas biossintetizadas não apresentaram fototoxicidade e apresentaram a mesma capacidade de transporte de elétrons, quando aplicadas em células solares.

A bioincrustação, ou incrustação biológica, é o acúmulo indesejado de materiais em superfícies por multiplicação microbiana, geralmente ocorrendo pela produção de biofilme e culminando em perdas econômicas. Em um estudo conduzido por Veena *et al*. (2016), nanopartículas de titânio foram biossintetizadas por actinobactérias marinhas e apresentaram um efeito anti-incrustação contra bactérias bioincrustantes.

IMPLICAÇÕES TOXICOLÓGICAS

Casos e mecanismos de toxicidade de nanopartículas de titânio vêm sendo reportados, entretanto, são encontrados menor toxicidade em nanopartículas biogênicas, além de maior atividade e biocompatibilidade (MUSIAL *et al*., 2020). Desta maneira, são necessários mais estudos para que se conheça os potenciais efeitos das nanopartículas biogênicas de titânio sobre organismos não-alvo.

Chavan *et al*. (2020) investigaram os efeitos de nanopartículas de titânio sobre bactérias promotoras do crescimento de plantas e observaram efeitos inibitórios sobre as bactérias, principalmente as gram-positivas. Em outro trabalho, Srinivasan *et al*. (2019) realizaram a síntese biogênica de nanopartículas mediada por *Sesbania grandiflora* e observaram efeitos tóxicos das mesmas sobre embriões de zebrafish.

Sunkar *et al*. (2014) sintetizaram nanopartículas de dióxido de titânio utilizando o filtrado da bactéria *Bacillus cereus* e avaliaram sua toxicidade sobre sementes de *Vigna radiata*, *Trigonella foenum-graecum* e *Sesbania bispinosa*. Não foram observados efeitos sobre a taxa de germinação das sementes, porém foi observada redução da elongação radicular. Também foi avaliada a citotoxicidade das nanopartículas pelo ensaio MTT utilizando as linhagens de celulares Vero (saudável) e Hep2 (cancerosa). A citotoxicidade foi observada para as células cancerosas, sugerindo o potencial anticancer das nanopartículas, enquanto as células saudáveis não apresentaram IC_{50} nas concentrações de exposição, culminando na sugestão dos autores para a aplicação biomédica das nanopartículas.

Babitha & Korrapati (2013) estudando nanopartículas de titânio sintetizadas a partir da bactéria *Propionibacterium jensenii* avaliaram a hemólise de eritrócitos de rato e a citotoxicidade pelo ensaio MTT sobre a linhagem celular NHI/3T3 (fibroblastos embrionários de camundongo). Os dados mostram a não ocorrência de hemólise nem efeitos citotóxicos, nem

mesmo na maior concentração de exposição.

CONCLUSÃO

Embora diversos métodos físico-químicos possam ser empregados na síntese de nanopartículas de titânio, novas abordagens são desenvolvidas visando criar vias alternativas de menor custo, complexidade e toxicidade, aliado ao amento da atividade do nanomaterial. Logo, a busca de atividade aliada à baixa toxicidade resulta no desenvolvimento de métodos diferenciados de síntese. Até o momento, a síntese biogênica de nanopartículas, desponta como uma opção promissora de síntese, porém o levantamento realizado neste trabalho mostra que ainda são necessários maiores estudos em relação a sua atividade e toxicidade. Além disso, é necessário desvendar as etapas e mecanismos envolvidos no processo de síntese, afim de se caracterizar compostos mediadores e variáveis envolvidas. Evidentemente, uma compreensão mais profunda deste processo pode levar a otimizações na produção e escalonamento deste nanomaterial e, consequentemente, impulsionar a aplicação da tecnologia a níveis industriais e comerciais.

Agradecimentos

Agrivalle Brasil, Laboratório de Nanotecnologia Ambiental (UNESP – Sorocaba), Universidade de Sorocaba (UNISO).

Referências

ABD EL ATY, A. A.; ZOHAIR, M. M. Green-synthesis and optimization of an eco-friendly nanobiofungicide from *Bacillus amyloliquefaciens* MH046937 with antimicrobial potential against phytopathogens. **Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management**, v. 14, 2020.

ABDULSATTAR, J. (2014). Effect of culture media on biosynthesis of titanium dioxide nanoparticles using *Lactobacillus crispatus*. **International Journal**, 2(5), 1014-1021.

AĞÇELI, G. K., HAMMACHI, H., KODAL, S. P., CIHANGIR, N., & AKSU, Z. (2020). A Novel Approach to Synthesize TiO2 Nanoparticles: Biosynthesis by Using *Streptomyces* sp. HC1. **Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials**, *30*(8), 3221-3229.

AHMAD, F., ASHRAF, N., ASHRAF, T., ZHOU, R. B., & YIN, D. C. (2019). Biological synthesis of metallic nanoparticles (MNPs) by plants and microbes: their cellular uptake, biocompatibility, and biomedical applications. **Applied microbiology and biotechnology**, *103*(7), 2913-2935.

AJMAL, N., SARASWAT, K., BAKHT, M. A., RIADI, Y., AHSAN, M. J., & NOUSHAD, M. (2019). Cost-effective and eco-friendly synthesis of titanium dioxide (TiO_2) nanoparticles using fruit's peel agro-waste extracts: characterization, *in vitro* antibacterial, antioxidant activities. **Green Chemistry Letters and Reviews**, 12(3), 244-254.

ALI, I.; SUHAIL, M.; ALOTHMAN, Z.A.; ALWARTHAN, A. Recent advances in syntheses, properties and applications of TiO2 nanostructures. **RSC**, v. 8, p. 30125-30147, 2018.

ALSAMHARY, K. I. Eco-friendly synthesis of silver nanoparticles by *Bacillus subtilis* and their antibacterial activity. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 27, p. 2185-2191.

AL-ZAHRANI, H., EL-WASEIF, A., & EL-GHWAS, D. (2018). Biosynthesis and evaluation of TiO_2 and ZnO nanoparticles from in vitro stimulation of *Lactobacillus johnsonii*. **J Innov Pharm Biol Sci**, 5, 16-20.

AMBIKA, S., & SUNDRARAJAN, M. (2016). [EMIM] BF4 ionic liquid-mediated synthesis of TiO2 nanoparticles using *Vitex negundo* Linn extract and its antibacterial activity. **Journal of Molecular Liquids**, 221, 986-992.

AKINOLA, P. O., LATEEF, A., ASAFA, T. B., BEUKES, L. S., HAKEEM, A. S., & IRSHAD, H. M. (2020). Multifunctional titanium dioxide nanoparticles biofabricated via phytosynthetic route using extracts of *Cola nitida*: antimicrobial, dye degradation, antioxidant and anticoagulant activities. **Heliyon**, 6(8), e04610.

ARYA, S., SONAWANE, H., MATH, S., TAMBADE, P., CHASKAR, M., & SHINDE, D. (2020). Biogenic titanium nanoparticles (TiO_2 NPs) from *Tricoderma citrinoviride* extract: synthesis, characterization and antibacterial activity against extremely drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **International Nano Letters**, 1-8.

BABITHA, S., & KORRAPATI, P. S. (2013). Biosynthesis of titanium dioxide nanoparticles using a probiotic from coal fly ash effluent. **Materials Research Bulletin**, 48(11), 4738-4742.

BANSAL, V., RAUTARAY, D., BHARDE, A., AHIRE, K., SANYAL, A., AHMAD, A., & SASTRY, M. (2005). Fungus-mediated biosynthesis of silica and titania particles. **Journal of Materials Chemistry**, 15(26), 2583-2589.

BHAGYARAJ, S. M., & OLUWAFEMI, O. S. (2018). Nanotechnology: the science of the invisible. In **Synthesis of inorganic nanomaterials** (pp. 1-18). Woodhead Publishing.

BOVERHOF, D. R., BRAMANTE, C. M., BUTALA, J. H., CLANCY, S. F., LAFRANCONI, M., WEST, J., & GORDON, S. C. (2015). Comparative assessment of nanomaterial definitions and safety evaluation considerations. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, *73*(1), 137-150.

CHAND, K., CAO, D., FOUAD, D. E., SHAH, A. H., LAKHAN, M. N., DAYO, A. Q., ... & MOHAMED, A. M. A. (2020). Photocatalytic and antimicrobial activity of biosynthesized silver and titanium dioxide nanoparticles: A comparative study. **Journal of Molecular Liquids**, 316, 113821.

CHAVAN, S., SARANGDHAR, V., & NADANATHANGAM, V. (2020). Toxicological effects of TiO_2 nanoparticles on plant growth promoting soil bacteria. **Emerging Contaminants**, 6, 87-92.

CHINNAPERUMAL, K., GOVINDASAMY, B., PARAMASIVAM, D., DILIPKUMAR, A., DHAYALAN, A., VADIVEL, A., ... & PACHIAPPAN, P. (2018). Bio-pesticidal effects of Trichoderma viride formulated titanium dioxide nanoparticle and their physiological and biochemical changes on *Helicoverpa armigera* (Hub.). **Pesticide biochemistry and physiology**, 149, 26-36.

DHANDAPANI, P., MARUTHAMUTHU, S., & RAJAGOPAL, G. (2012). Bio-mediated synthesis of TiO_2 nanoparticles and its photocatalytic effect on aquatic biofilm. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 110, 43-49.

DEVIKALA, S., ABISHARANI, J. M., & BHARATH, M. (2020). Biosynthesis of TiO_2 nanoparticles from *Caesalpinia pulcherrima* flower extracts. **Materials Today: Proceedings**.

DEVIKALA, S., ABISHARANI, J. M., & RUBAVATHI, P. (2020). Preparation and characterization of TiO_2 nanoparticles using *Cardiospermum halibacacabum* leaves extract. **Materials Today: Proceedings**.

DIEBOLD, U. (2003). The surface science of titanium dioxide. **Surface science reports**, 48(5-8), 53-229.

DOBRUCKA, R. (2017). Synthesis of titanium dioxide nanoparticles using *Echinacea purpurea* herba. **Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR**, 16(2), 756.

DURAIRAJ, B., XAVIER, T., & MUTHU, S. Research Article Fungal Generated Titanium Dioxide Nanoparticles: A Potent Mosquito (*Aedes aegypti*) Larvicidal Agent. **Scholars Academic Journal of Biosciences (SAJB)**.,2014; 2(9): 651-658

DURAIRAJ, B., XAVIER, T., & MUTHU, S. (2014). Fungal generated titanium dioxide nanopartilces for uv protective and bacterial resistant fabrication. **International Journal of Engineering Science and Technology**, *6*(9), 621.

EL-GAZZAR, N., & ISMAIL, A. M. (2020). The potential use of Titanium, Silver and Selenium nanoparticles in controlling leaf blight of tomato caused by *Alternaria alternata*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 27, 101708.

ESFAHANI, R. N.; KHAGHANI, S.; AZIZI, A.; MORTAZAEINEZHAD, F.; Gomarian, M. Facile and eco-friendly synthesis of TiO_2 NPs using extracts of *Verbascum thapsus* plant: an efcient photocatalyst for reduction of Cr(VI) ions in the aqueous solution. **Journal of the Iranian Chemical Society**, 2019.

FALL, A., NGOM, I., BAKAYOKO, M., SYLLA, N. F., MOHAMED, H. E. A., JADVI, K., ... & NGOM, B. D. (2020). Biosynthesis of TiO_2 nanoparticles by using natural extract of *Citrus sinensis*. **Materials Today: Proceedings**.

GAHLAWAT, G., CHOUDHURY, A. R. A review on the biosynthesis of metal and metal salt nanoparticles by microbes. **RSC Adv**., 2019, 9, 12944.

GHASHGHAEI, S., & EMTIAZI, G. (2015). The methods of nanoparticle synthesis using bacteria as biological nanofactories, their mechanisms and major applications. **Current Bionanotechnology**, 1(1), 3-17.

GOUTAM, S. P., SAXENA, G., SINGH, V., YADAV, A. K., BHARAGAVA, R. N., & THAPA, K. B. (2018). Green synthesis of TiO_2 nanoparticles using leaf extract of *Jatropha curcas* L. for photocatalytic degradation of tannery wastewater. **Chemical Engineering Journal**, 336, 386-396.

HE, W., CUI, J., YUE, Y., ZHANG, X., XIA, X., LIU, H., & LUI, S. (2011). High-performance TiO_2 from Baker's yeast. **Journal of colloid and interface science**, *354*(1), 109-115

HULKOTI, N. I., & TARANATH, T. C. (2014). Biosynthesis of nanoparticles using microbes—a review**. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 121, 474-483.

HUNAGUND, S. M., DESAI, V. R., KADADEVARMATH, J. S., BARRETTO, D. A., VOOTLA, S., & SIDARAI, A. H. (2016). Biogenic and chemogenic synthesis of TiO_2 NPs via hydrothermal route and their antibacterial activities. RSC advances, 6(99), 97438-97444.

IBRAHEM, K. H., SALMAN, J. A. S., & ALI, F. A. (2014). Effect of Titanium Nanoparticles Biosynthesis by *Lactobacillus crispatus* on Urease, Hemolysin& Biofilm Forming by Some Bacteria Causing Recurrent UTI in Iraqi Women. **European Scientific Journal**, 10(9).

IRAVANI, S. (2014). Bacteria in nanoparticle synthesis: current status and future prospects. International scholarly research notices, 2014.

JADOUN, S., ARIF, R., JANGID, N. K., & MEENA, R. K. (2020). Green synthesis of nanoparticles using plant extracts: a review. **Environmental Chemistry Letters**, 1-20.

JALALI, E.; MAGHSOUDI, S.; NOROOZIAN, E.. A novel method for biosynthesis of different polymorphs of TiO2 nanoparticles as a protector for *Bacillus thuringiensis* from Ultra Violet. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 1–9, 2020. DOI: 10.1038/s41598-019-57407-6.

JAMKHANDE, P. G., GHULE, N. W., BAMER, A. H., & KALASKAR, M. G. (2019). Metal nanoparticles synthesis: An overview on methods of preparation, advantages and disadvantages, and applications. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, 53, 101174.

JAYASEELAN, C., RAHUMAN, A. A., ROOPAN, S. M., KIRTHI, A. V., VENKATESAN, J., KIM, S. K., ... & SIVA, C. (2013). Biological approach to synthesize TiO_2 nanoparticles using *Aeromonas hydrophila* and its antibacterial activity. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, *107*, 82-89.

JHA, A. K., PRASAD, K., & KULKARNI, A. R. (2009). Synthesis of TiO_2 nanoparticles using microorganisms. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 71(2), 226-229.

JUWARKAR, A. A.; SINGH, S. K.; MUDHOO, A.. A comprehensive overview of elements in bioremediation. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, [S. l.], v. 9, n. 3, p. 215–288, 2010. DOI: 10.1007/s11157-010-9215-6.

KHALEGHI, M.; KHORRAMI, S.; RAVAN, H. Identification of *Bacillus thuringiensis* bacterial strain isolated from the mine soil as a robust agent in the biosynthesis of silver

nanoparticles with strong antibacterial and anti-biofilm activities. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 18, 2019.

KIRTHI, A. V., RAHUMAN, A. A., RAJAKUMAR, G., MARIMUTHU, S., SANTHOSHKUMAR, T., JAYASEELAN, C., ... & BAGAVAN, A. (2011). Biosynthesis of titanium dioxide nanoparticles using bacterium *Bacillus subtilis*. **Materials Letters**, 65(17-18), 2745-2747.

KHAN, R., & FULEKAR, M. H. (2016). Biosynthesis of titanium dioxide nanoparticles using *Bacillus amyloliquefaciens* culture and enhancement of its photocatalytic activity for the degradation of a sulfonated textile dye Reactive Red 31. **Journal of colloid and interface science**, 475, 184-191.

LANDAGE, K. S., ARBADE, G. K., KHANNA, P., & BHONGALE, C. J. (2020). Biological approach to synthesize TiO_2 nanoparticles using *Staphylococcus aureus* for antibacterial and anti-biofilm applications. **J. Microbiol**. Exp, 8.

MARIMUTHU, S., RAHUMAN, A. A., JAYASEELAN, C., KIRTHI, A. V., SANTHOSHKUMAR, T., VELAYUTHAM, K., ... & RAO, K. V. B. (2013). Acaricidal activity of synthesized titanium dioxide nanoparticles using *Calotropis gigantea* against *Rhipicephalus microplus* and *Haemaphysalis bispinosa*. **Asian Pacific journal of tropical medicine**, 6(9), 682-688.

MANESS, P. C., SMOLINSKI, S., BLAKE, D. M., HUANG, Z., WOLFRUM, E. J., & JACOBY, W. A. (1999). Bactericidal activity of photocatalytic TiO_2 reaction: toward an understanding of its killing mechanism. **Applied and environmental microbiology**, 65(9), 4094-4098.

MANIVASAGAN, P.; VENKATESAN, J.; SIVAKUMAR, K.; KIM, S. K. Actinobacteria mediated synthesis of nanoparticles and their biological properties: A review. **Critical Reviews in Microbiology**, [S. l.], v. 42, n. 2, p. 209–221, 2016. DOI: 10.3109/1040841X.2014.917069.

MAROOUFPOUR, N., ALIZADEH, M., HATAMI, M., & LAJAYER, B. A. (2019). Biological Synthesis of Nanoparticles by Different Groups of Bacteria. **In Microbial Nanobionics** (pp. 63-85). Springer, Cham.

MUNIANDY, S. S., KAUS, N. H. M., JIANG, Z. T., ALTARAWNEH, M., & LEE, H. L. (2017). Green synthesis of mesoporous anatase TiO_2 nanoparticles and their photocatalytic activities. **RSC advances**, 7(76), 48083-48094.

MUSIAL, J., KRAKOWIAK, R., MLYNARCZYK, D. T., GOSLINSKI, T., & STANISZ, B. J. (2020). Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products—what do we know about their safety?. **Nanomaterials**, 10(6), 1110.

MUTUMA, B. K.; SHAO, G.N.; KIM, W.D.; KIM, H.T. Sol–gel synthesis of mesoporous anatase–brookite and anatase–brookite–rutile TiO_2 nanoparticles and their photocatalytic properties. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 442, p.1-7, 2015.

NARAYANAN, K. B., & SAKTHIVEL, N. (2011). Green synthesis of biogenic metal nanoparticles by terrestrial and aquatic phototrophic and heterotrophic eukaryotes and

biocompatible agents. **Advances in colloid and interface science**, 169(2), 59-79.

NABI, G., KHALID, N. R., TAHIR, M. B., RAFIQUE, M., RIZWAN, M., HUSSAIN, S., ... & MAJID, A. (2018). A review on novel eco-friendly green approach to synthesis TiO_2 nanoparticles using different extracts. **Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials**, 28(4), 1552-1564.

NADEEM, M., TUNGMUNNITHUM, D., HANO, C., ABBASI, B. H., HASHMI, S. S., AHMAD, W., & ZAHIR, A. (2018). The current trends in the green syntheses of titanium oxide nanoparticles and their applications. **Green Chemistry Letters and Reviews**, 11(4), 492-502.

NGOEPE, N. M., MATHIPA, M. M., & HINTSHO-MBITA, N. C. (2020). Biosynthesis of titanium dioxide nanoparticles for the photodegradation of dyes and removal of bacteria. **Optik**, 224, 165728.

NITHYA, A., ROKESH, K., & JOTHIVENKATACHALAM, K. (2013). Biosynthesis, characterization and application of titanium dioxide nanoparticles. **Nano vision**, 3(3), 169-174.

NYAMUKAMBA, P., OKOH, O., MUNGONDORI, H., TAZIWA, R., & ZINYA, S. (2018). Synthetic methods for titanium dioxide nanoparticles: a review. **Titanium Dioxide—Material for a Sustainable Environment**; Yang, D., Ed, 151-175.

ÓRDENES-AENISHANSLINS, N. A.; SAONA, L. A.; DURÁN-TORO, V. M.; MONRÁS, J. P.; BRAVO, D. M.; PÉREZ-DONOSO, J. M. Use of titanium dioxide nanoparticles biosynthesized by *Bacillus mycoides* in quantum dot sensitized solar cells. **Microbial Cell Factories**, [S. l.], v. 13, n. 1, p. 1–10, 2014. DOI: 10.1186/s12934-014-0090-7.

OVAIS, M., KHALIL, A. T., AYAZ, M., AHMAD, I., NETHI, S. K., & MUKHERJEE, S. (2018). Biosynthesis of metal nanoparticles via microbial enzymes: a mechanistic approach. **International journal of molecular sciences**, 19(12), 4100.

PARK, T. J., LEE, K. G., & LEE, S. Y. (2016). Advances in microbial biosynthesis of metal nanoparticles. **Applied microbiology and biotechnology**, 100(2), 521-534.

PANTIDOS, N., HORSFALL, L. Biological Synthesis of Metallic Nanoparticles by Bacteria, Fungi and Plants**. J Nanomed Nanotechnol** 2014, 5:5 http://dx.doi.org/10.4172/2157-7439.1000233.

PAKSERESHT, S., CETINKAYA, T., AL-OGAILI, A. W. M., HALEBI, M., & AKBULUT, H. Biologically synthesized TiO_2 nanoparticles and their application as lithium-air battery cathodes. **Ceramics International**, 47(3), 3994-4005.

PEIRIS, M. M. K., GUANSEKERA, T. D. C. P., JAYAWEERA, P. M., & FERNANDO, S. S. N. (2018). TiO_2 Nanoparticles from Baker's Yeast: A Potent Antimicrobial. **Journal of microbiology and biotechnology**, *28*(10), 1664-1670.

PRASEETHA, P. K., VB, S. C., VB, C. C., BC, V., & CHAVALIA, M. S. (2012). Biosynthesis of titanium nanoparticles and their role in killing colon cancer cells 3. **Studies**, 36, 37.

PRIYARAGINI, S., VEENA, S., SWETHA, D., KARTHIK, L., KUMAR, G., & RAO, K. B. (2014). Evaluating the effectiveness of marine actinobacterial extract and its mediated titanium dioxide nanoparticles in the degradation of azo dyes. **Journal of Environmental Sciences**, *26*(4), 775-782.

PUNITHA, V. N., VIJAYAKUMAR, S., SAKTHIVEL, B., & PRASEETHA, P. K. (2020). Protection of neuronal cell lines, antimicrobial and photocatalytic behaviours of eco-friendly TiO_2 nanoparticles. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, 8(5), 104343.

RAKESH, M., DIVYA, T. N., VISHAL, T., & SHALINI, K. (2015). Applications of nanotechnology. **Journal of Nanomedicine & Biotherapeutic Discovery**, *5*(1), 1.

RALIYA, R., & TARAFDAR, J. C. (2014). Biosynthesis and characterization of zinc, magnesium and titanium nanoparticles: an eco-friendly approach. **International Nano Letters**, 4(1), 93.

RALIYA, R., BISWAS, P., & TARAFDAR, J. C. (2015). TiO_2 nanoparticle biosynthesis and its physiological effect on mung bean (*Vigna radiata* L.). **Biotechnology Reports**, 5, 22-26.

RAJAKUMAR, G., RAHUMAN, A. A., ROOPAN, S. M., KHANNA, V. G., ELANGO, G., KAMARAJ, C., ... & VELAYUTHAM, K. (2012). Fungus-mediated biosynthesis and characterization of TiO_2 nanoparticles and their activity against pathogenic bacteria. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, 91, 23-29.

RAJAKUMAR, G., RAHUMAN, A. A., PRIYAMVADA, B., KHANNA, V. G., KUMAR, D. K., & SUJIN, P. J. (2011). *Eclipta prostrata* leaf aqueous extract mediated for the synthesis of titanium dioxide nanoparticles and its larvicidal activity against malaria vector. **In 2011 IEEE Nanotechnology Materials and Devices Conference** (pp. 563-566).

ROOPAN, S. M., BHARATHI, A., PRABHAKARN, A., RAHUMAN, A. A., VELAYUTHAM, K., RAJAKUMAR, G., ... & MADHUMITHA, G. (2012). Efficient phyto-synthesis and structural characterization of rutile TiO_2 nanoparticles using *Annona squamosa* peel extract. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, 98, 86-90.

SANTHOSHKUMAR, T., RAHUMAN, A. A., JAYASEELAN, C., RAJAKUMAR, G., MARIMUTHU, S., KIRTHI, A. V., ... & KIM, S. K. (2014). Green synthesis of titanium dioxide nanoparticles using *Psidium guajava* extract and its antibacterial and antioxidant properties. **Asian Pacific journal of tropical medicine**, 7(12), 968-976.

SETHY, N. K., ARIF, Z., MISHRA, P. K., & KUMAR, P. (2020). Green synthesis of TiO_2 nanoparticles from *Syzygium cumini* extract for photo-catalytic removal of lead (Pb) in explosive industrial wastewater. **Green Processing and Synthesis**, 9(1), 171-181.

SHANAVAS, S., PRIYADHARSAN, A., KARTHIKEYAN, S., DHARMABOOPATHI, K., RAGAVAN, I., VIDYA, C., ... & ANBARASANA, P. M. (2020). Green synthesis of titanium dioxide nanoparticles using *Phyllanthus niruri* leaf extract and study on its structural, optical and morphological properties. **Materials Today: Proceedings**, 26, 3531-3534.

SUBHAPRIYA, S., GOMATHIPRIYA, P. Green synthesis of titanium dioxide (TiO_2) nanoparticles by *Trigonella foenum*-graecum extract and its antimicrobial properties. **Microbial Pathogenesis** 116 (2018) 215–220.

SUMAN, T. Y., RAVINDRANATH, R. R. S., ELUMALAI, D., KALEENA, P. K., RAMKUMAR, R., PERUMAL, P., ... & CHITRARASU, P. S. (2015). Larvicidal activity of titanium dioxide nanoparticles synthesized using Morinda citrifolia root extract against *Anopheles stephensi, Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* and its other effect on non-target fish. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, 5(3), 224-230.

SUNDRARAJAN, M., & GOWRI, S. (2011). Green synthesis of titanium dioxide nanoparticles by Nyctanthes arbor-tristis leaves extract. **Chalcogenide Lett**, 8(8), 447-451.

SUNDRARAJAN, M., BAMA, K., BHAVANI, M., JEGATHEESWARAN, S., AMBIKA, S., SANGILI, A., ... & SUMATHI, R. (2017). Obtaining titanium dioxide nanoparticles with spherical shape and antimicrobial properties using *M. citrifolia* leaves extract by hydrothermal method. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 171, 117-124.

SANGILI, A., ... & SUMATHI, R. (2017). Obtaining titanium dioxide nanoparticles with spherical shape and antimicrobial properties using *M. citrifolia* leaves extract by hydrothermal method. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 171, 117-124.

SINGH, A., GOYAL, V., SINGH, J., & RAWAT, M. (2020). Structural, morphological, optical and photocatalytic properties of green synthesized TiO2 NPs. **Current Research in Green and Sustainable Chemistry**, 3, 100033.

SIVARANJANI, V., & PHILOMINATHAN, P. (2016). Synthesize of Titanium dioxide nanoparticles using *Moringa oleifera* leaves and evaluation of wound healing activity. **Wound Medicine**, 12, 1-5.

SRINIVASAN, M., VENKATESAN, M., ARUMUGAM, V., NATESAN, G., SARAVANAN, N., MURUGESAN, S., ... & PUGAZHENDHI, A. (2019). Green synthesis and characterization of titanium dioxide nanoparticles (TiO2 NPs) using *Sesbania grandiflora* and evaluation of toxicity in zebrafish embryos. ***Process Biochemistry***, *80*, 197-202.

SUDHA, D.; SIVAKUMAR, P. Review on the photocatalytic activity of various composite catalysts. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, [S. l.], v. 97, p. 112–133, 2015. DOI: 10.1016/j.cep.2015.08.006. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.cep.2015.08.006.

SUNKAR, S.; NACHIYAR, C. V.; RENUGADEVI, R. L. K. Biogenesis of TiO_2 nanoparticles using endophytic *Bacillus cereus*. [S. l.], 2014. DOI: 10.1007/s11051-014-2681-y.

SURIYARAJ, S. P., & SELVAKUMAR, R. (2014). Room temperature biosynthesis of crystalline TiO_2 nanoparticles using *Bacillus licheniformis* and studies on the effect of calcination on phase structure and optical properties. **RSC Advances**, 4(75), 39619-39624.

TARAN, M., RAD, M., & ALAVI, M. (2018). Biosynthesis of TiO_2 and ZnO nanoparticles by *Halomonas elongata* IBRC-M 10214 in different conditions of medium. BioImpacts: BI, 8(2), 81.

TARAFDAR, A., RALIYA, R., WANG, W. N., BISWAS, P., & TARAFDAR, J. C. (2013). Green synthesis of TiO_2 nanoparticle using *Aspergillus tubingensis*. **Advanced Science, Engineering and Medicine**, 5(9), 943-949.

VACHON, V.; LAPRADE, R.; SCHWARTZ, J. L. Current models of the mode of action of Bacillus thuringiensis insecticidal crystal proteins: A critical review. **Journal of Invertebrate Pathology**, [S. l.], v. 111, n. 1, p. 1–12, 2012. DOI: 10.1016/j.jip.2012.05.001. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2012.05.001.

VEENA, S., SWETHA, D., KARTHIK, L., GAURAV, K., & RAO, B. K. (2016). Antibiofouling activity of marine actinobacterial mediated titanium dioxide nanoparticles.

VELAYUTHAM, K., RAHUMAN, A. A., RAJAKUMAR, G., SANTHOSHKUMAR, T., MARIMUTHU, S., JAYASEELAN, C., ... & ELANGO, G. (2012). Evaluation of *Catharanthus roseus* leaf extract-mediated biosynthesis of titanium dioxide nanoparticles against Hippobosca maculata and Bovicola ovis. **Parasitology research**, 111(6), 2329-2337.

WAGHMODE, M. S., GUNJAL, A. B., MULLA, J. A., PATIL, N. N., & NAWANI, N. N. (2019). Studies on the titanium dioxide nanoparticles: Biosynthesis, applications and remediation. **SN Applied Sciences**, *1*(4), 1-9.

WAGUTU, A. W., YANO, K., SATO, K., PARK, E., ISO, Y., & ISOBE, T. (2019). Musa AAA and *Jatropha curcas* L. sap mediated TiO_2 nanoparticles: Synthesis and characterization. **Scientific African**, 6, e00203.

YAQOOB, A. A., AHMAD, H., PARVEEN, T., AHMAD, A., OVES, M., ISMAIL, I. M., ... & MOHAMAD IBRAHIM, M. N. (2020). Recent advances in metal decorated nanomaterials and their various biological applications: a review. **Frontiers in chemistry**, *8*, 341.

YOSRI, M., ABDEL-AZIZ, M. M., & SAYED, R. M. (2018). Larvicidal potential of irradiated myco-insecticide from Metarhizium anisopliae and larvicidal synergistic effect with its mycosynthesized titanium nanoparticles (TiNPs). **Journal of radiation research and applied sciences**, 11(4), 328-334.

4.2 NANOPARTÍCULAS BIOGÊNICAS DE TITÂNIO BASEADAS EM *Bacillus velezensis* AGVL-005: SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO, TOXICIDADE E POTENCIAL AGRÍCOLA

NANOPARTÍCULAS BIOGÊNICAS DE TITÂNIO BASEADAS EM *Bacillus velezensis* AGVL-005: SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO, TOXICIDADE E POTENCIAL AGRÍCOLA

Resumo

A síntese biogênica de nanopartículas utilizando microrganismos é vantajosa em relação aos demais métodos, pois origina um recobrimento formado por biomoléculas provenientes do agente mediador, o qual confere estabilidade e pode contribuir para a atividade biológica das nanopartículas. No presente estudo, nanopartículas de titânio foram sintetizadas utilizando o filtrado de cultivo do agente de controle biológico *Bacillus velezensis* AGVL-005 e isopropóxido de titânio como sal metálico precursor. Após a síntese foi realizada a caracterização físico-química das nanopartículas formadas e a avaliação quanto à sua atividade biológica para o controle dos fungos fitopatogênicos *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* e *Colletotrichum lindemuthianum in vitro*. As nanopartículas sintetizadas biogenicamente (TiNP-BvS) também foram testadas quanto aos seus possíveis efeitos de citotoxicidade, genotoxicidade, fitotoxicidade e impactos sobre enzimas bioindicadoras de qualidade do solo arisulfatase, fosfatase ácida e ß-glicosidase. A TiNP-BvS apresentou diâmetro hidrodinâmico de 58,14±12,56 nm e potencial inibitório concentração dependente para todos os fungos testados. Nenhum efeito genotóxico, fitotóxico e impacto negativo em enzimas de solo foi apresentado pelas nanopartículas, que exibiram apenas efeito citotóxico sobre a linhagem celular V79. Os resultados deste estudo reforçam o potencial da síntese biogênica de nanopartículas mediada por agentes de controle biológico no que tange sua aplicação na supressão de fitopatógenos, abrindo perspectivas para a compreensão dos seus efeitos a nível de campo e utilização em soluções para a agricultura.

Palavras-chave: Síntese biogênica. Nanopartículas de titânio. *Bacillus velezensis*. *Sclerotinia sclerotiorum*. *Rhizoctonia solani*. *Colletotrichum lindemuthianum*.

INTRODUÇÃO

A agricultura contemporânea enfrenta diversos desafios, sendo o principal, atender uniformemente à demanda por alimentos em um cenário de expansão demográfica (FOLEY *et al.*, 2011). Em meados de 2017 a população mundial já alcançava 7,6 bilhões de habitantes com previsão de expansão para 8,6 bilhões até 2030 (UNITED NATIONS, 2017). Diante deste quadro, a produtividade agrícola cresce constantemente, principalmente em relação ao desenvolvimento e ampliação do acesso à novas tecnologias produtivas (TESTER & LANGRIDGE, 2010). Entretanto, este ganho em produtividade é frequentemente acompanhado de um aumento da vulnerabilidade das culturas aos fitopatógenos (OERKE *et al.*, 2012), representando, em média, 35% de perda do potencial produtivo das culturas em todo o mundo (OERKE *et al.*, 2004).

Doenças de plantas causadas por fitopatógenos de solo e foliares que afetam as lavouras são reconhecidas como um fator crucial para a perda de produtividade, havendo dificuldade para a erradicação destes patógenos, principalmente em sistemas de cultivo contínuo e intensivo (JAMBHULKAR *et al.*, 2015). Neste contexto, o mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum*), a Podridão-radicular de rizoctonia (*Rhizoctonia solani*) e a antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) caracterizam-se como responsáveis por grandes perdas em diversas culturas de relevância econômica (DEAN *et al.*, 2012; JULIATTI *et al.*, 2010; JULIATTI *et al.*, 2004; SARTORATO *et al.*, 1994). Esses fitopatógenos têm seu controle dificultado devido à permanência de estruturas de resistência viáveis no solo por longos períodos, transmissão e infecção de sementes e susceptibilidade dos hospedeiros cultivados (MEYER, M. C., 2002; BOLTON *et al.*, 2006; ANSARI *et al.*, 2004).

O desenvolvimento de pesticidas, majoritariamente representados pelos agroquímicos, significou um importante ganho tecnológico na busca por soluções para o controle de pragas agrícolas. Contudo, os defensivos químicos já enfrentam limitações quanto à descoberta de novas moléculas (LAMBERTH *et al.*, 2013), o aumento da resistência de fitopatógenos e pragas (HAHN *et al.*, 2014; LUCAS *et al.*, 2015; NAUEN & DENHOLM, 2005) e desafios quanto ao apelo em questões toxicológicas e ecotoxicológicas (GILDEN *et al.*, 2010; RIGOTTO *et al.*, 2014; SCHMITZ *et al.*, 2014; SMAGGHE *et al.*, 2012). Neste contexto, o manejo integrado de pragas (MIP) e de doenças (MID) desponta como uma alternativa sustentável (FLINT *et al.*, 2012). Desta maneira, técnicas integradas e complementares, como o controle biológico, são utilizadas para superar limitações de abordagens clássicas de manejo (CHANDLER *et al.*, 2011).

Dentre muitas definições, o controle biológico consiste no uso de organismos vivos para controlar a população de outro organismo (HEIMPEL & MILLS, 2017). Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), a produção de produtos biológicos para controle de insetos-pragas e doenças agrícolas cresceu mais de 70% em 2018, movimentando R$ 464,5 milhões ante R$ 262,4 milhões em 2017. Embora o número de microrganismos potenciais como agentes de controle biológico seja muito grande, limitações em metodologias produtivas e formulação são desafios para seu desenvolvimento tecnológico (EMMERT *et al*., 1999).

Bactérias formadoras de endósporos apresentam uma série de vantagens quando se trata de sua utilização para formulação de produtos para aplicação agrícola (PÉREZ-GARCÍA *et al*., 2011). Dentre outros mecanismos, algumas destas bactérias produzem uma gama de compostos inseticidas e antimicrobianos além de promover crescimento vegetal e induzir respostas de defesa na planta hospedeira (FRANCIS *et al.*, 2010). Em especial, espécies do gênero *Bacillus* são capazes de produzir endósporos, estruturas resistentes à condições abióticas adversas, provendo maior flexibilidade para a formulação e, consequentemente, representam a classe mais importante de produtos comerciais microbiológicos para uso fitossanitário (FRAVEL *et al*., 2005; JACOBSEN *et al*., 2004).

A aplicação agrícola mais relevante para o grupo Bacillus se dá pela utilização como agentes de controle biológico, majoritariamente representada pela utilização da bactéria *Bacillus subtilis* e de seus mecanismos (SANTOYO *et al*., 2012), porém não se restringe apenas a esta espécie (FRAVEL *et al.*, 2005). Neste sentido, o principal mecanismo de biocontrole se dá por antagonismo, alcançado via produção de enzimas de degradação de parede celular (SHODA *et al*., 2000) e lipopeptídeos antibióticos (iturinas, fengicinas ou surfactinas) (ONGENA & JACQUES, 2008), que também estão envolvidos com a indução da resistência sistêmica vegetal (CHOUDHARY & JOHRI, 2009). Isolados de *Bacillus amyloliquefaciens* têm sido reportados como agentes de controle biológico expressivos, apresentando antagonismo por produção de lipopeptídeos (CHOWDHURY *et al.*, 2015), além disso alguns estudos indicam sua ação como rizobactéria promotora de crescimento de plantas (PGRP) (IDRIS *et al.*, 2007). Recentemente, *Bacillus amyloliquefaciens* subespécie *plantarum* foram reportados como sinônimos heterotípicos posteriores de *Bacillus velezensis* (DUNLAP *et al*., 2016).

A nanotecnologia é a ciência que lida com a produção e aplicação de sistemas físicos, químicos e biológicos, os quais apresentam características diferenciadas quando utilizados em nanoescala (MAYNARD *et al.*, 2011). Especialmente na agricultura, as propriedades

exclusivas destes materiais evidenciam seu potencial para o desenvolvimento de ferramentas para uma agricultura sustentável. Dentre as diferentes vertentes de ação, estão o aumento da produtividade com a utilização de nanofertilizantes e o controle de pragas e doenças com nanopesticidas, que melhoram a qualidade do solo e estimulam o crescimento vegetal. Assim como, a utilização de nanodispositivos para manipulação genética de plantas, monitoramento e diagnóstico inteligente através de nanosensores (FRACETO *et al.*, 2016; SEKHON *et al.*, 2014).

Metodologias ecologicamente sustentáveis para a síntese de nanopartículas são denominadas de "síntese verde" (SHARMA *et al.*, 2009) e, dentre várias alternativas, a síntese biogênica de nanopartículas se destaca devido as suas diversas aplicações (SCHRÖFEL *et al.*, 2014), como também estudos de mecanismos da biossíntese baseada em proteínas, bactérias, fungos e plantas (DURÁN *et al.*, 2011). Especialmente no contexto fitossanitário, exemplos de nanopartículas biogênicas baseadas em microrganismos como *Trichoderma harzianum* (GUILGER *et al.*, 2017) e bactérias do gênero *Bacillus* (GOPINATH & VELUSAMY, 2013) apresentam-se como potenciais alternativas para o desenvolvimento de uma agricultura mais produtiva e sustentável.

Embora o controle biológico mostre sucesso na sua utilização, a otimização de biopesticidas ainda apresenta limitações no que tange o desenvolvimento de novas formulações, escalonamento de produção e sensibilidade a fatores ambientais. Neste sentido, a síntese biogênica de nanopartículas por agentes de controle biológico pode elucidar vias alternativas de desenvolvimento de insumos para a agricultura, sendo uma tecnologia aliada na potencialização de técnicas vigentes e da atividade e viabilidade de biopesticidas. Diante disso, neste estudo, o agente de controle biológico *Bacillus velezensis* AGVL-005 (PYLRO *et al.*, 2018) foi utilizado para a biossíntese de nanopartículas de titânio e a atividade biológica das mesmas sobre fitopatógenos e sua toxicidade foram avaliadas.

MATERIAL E MÉTODO

Síntese biogênica de nanopartículas

O cultivo de *Bacillus velezensis* AGVL-005 foi realizado em condição de cultivo otimizada para alta densidade celular em meio MET1 (extrato de levedura 7,5 $g.L^{-1}$, KH_2PO_4 6,8 $g.L^{-1}$, $MgSO_4.7H_2O$ 0,123 $g.L^{-1}$, $MnSO_4.H_2O$ 0,0017 $g.L^{-1}$, $ZnSO_4.7H_2O$ 0,014 $g.L^{-1}$, $Fe(SO_4)_4.7H_2O$ 0,02 $g.L^{-1}$, $CaCl_2.2H_2O$ 0,147 $g.L^{-1}$, glicose 10,0 $g.L^{-1}$) a 28ºC ± 1ºC e 150 rpm

por 48 horas. O cultivo foi centrifugado a 15000 rpm a 4ºC por 20 minutos e o sobrenadante submetido a filtração em filtro microbiológico de 0,2 µm. Ao filtrado obtido foi adicionado titânio isopropóxido $Ti[OCH(CH_3)_2]_4$ para a concentração final de 4,5 mM e esta solução foi incubada a temperatura ambiente sob agitação orbital de 150 rpm por 5 dias para síntese das nanopartículas de titânio biogências (TiNP-BvS).

Caracterização físico-química das nanopartículas

Após a síntese, foi realizada a avaliação do diâmetro hidrodinâmico e da polidispersão das nanopartículas por espalhamento dinâmico de luz e do potencial zeta por microeletroforese, com auxílio do analisador de partículas ZS90 (Malvern Instruments). As avaliações foram conduzidas em triplicata, a 25ºC, com um ângulo fixo de 90º. O tamanho das nanopartículas e a concentração destas em nanopartículas por mL ($NPs.mL^{-1}$) também foram verificados pela técnica de rastreamento de nanopartículas, utilizando o equipamento NanoSight LM 10 cell com câmera acoplada ao software NanoSight v 2.3. As amostras de nanopartículas foram diluídas 1000 vezes em água ultrapura e foram realizadas 5 medidas por amostra. O pH da suspensão final de nanopartículas obtida também foi aferido em medidor de pH Quimis 0400AS.

Atividade biológica das nanopartículas sobre fungos fitopatogênicos

A atividade biológica das nanopartículas de titânio biogênicas foi averiguada avaliando seu potencial para inibição de fungos fitopatogênicos que apresentaram susceptibilidade no ensaio de antagonismo. Para tal, foi verificado o potencial de inibição do crescimento micelial dos fitopatógenos *in vitro,* a inibição da formação e germinação de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* e seu potencial para controlar a infecção de sementes de feijoeiro por *Colletotrichum lindemuthianum*.

Inibição do crescimento micelial de fitopatógenos in vitro

O potencial das nanopartículas para inibição do desenvolvimento de fungos fitopagênicos foi averiguado pelo índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) (OLIVEIRA, 1991), inoculando-se discos de micélio de 4 mm de culturas monospóricas dos fungos fitopatogênicos *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* e *Colletotrichum*

lindemuthianum em meio de cultura PDA (*Potato Dextrose Ágar)* suplementado para diferentes concentrações finais crescentes de nanopartículas (2,5 x 10^{10} NPs.mL^{-1}, 5,0 x 10^{10} NPs.mL^{-1}, 7,5 x 10^{10} NPs.mL^{-1} e 1,0 x 10^{11} NPs.mL^{-1}). O controle negativo foi conduzido inoculando-se as culturas fúngicas em meio de cultivo sem suplementação com nanopartículas. Um segundo controle foi proposto suplementando-se o meio de cultivo (20% m/m) com o sobrenadante de fermentação (SF) de *Bacillus velezensis* AGVL-005 utilizado para a síntese das nanopartículas de titânio.

Desta forma, um delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC) foi conduzido com 5 réplicas para cada tratamento. As avaliações foram realizadas com o auxílio de um paquímetro, por um período de 7 dias, aferindo-se o diâmetro de crescimento dos fungos cultivados em incubadora com demanda bioquímica de oxigênio (BOD) a 25ºC ± 1ºC com fotoperíodo de 12 horas.

A partir das medidas obtidas, também foi possível avaliar a fungitoxicidade das nanopartículas pela porcentagem de inibição do crescimento micelial (PICM) (EDGINGTON *et al*.,1971). O IVCM e PICM foram obtidos pelas seguintes equações:

$$\boldsymbol{IVCM} = \Sigma \frac{(\mathrm{D}-\mathrm{Da})}{\mathrm{N}} \quad (1) \qquad\qquad \boldsymbol{PICM} = \frac{(Dc- \quad)}{Dc} \; x \; 100 \quad (2)$$

Sendo: D= diâmetro médio atual da colônia, Da= diâmetro médio da colônia do dia anterior, N= número de dias após a inoculação, Dc = diâmetro médio final do controle e Dt = diâmetro médio final do tratamento.

Inibição da germinação miceliogênica de escleródios de Sclerotinia sclerotiorum

O potencial de aplicação das nanopartículas também foi averiguado para sua capacidade de inibir a germinação e formação de novos escleródios de *S. sclerotiorum.* Para tal, primeiramente realizou-se a produção dos escleródios em sementes de girassol previamente esterilizadas, inoculando-se discos de micélio de 4 mm de culturas monospóricas de *Sclerotinia sclerotiorum* e procedendo com cultivo por 14 dias em incubadora BOD a 25ºC ± 1ºC com fotoperíodo de 12 horas, conforme adaptação de Garcia *et al*. (2011). Após a formação dos escleródios, estes foram desinfestados superficialmente em álcool 70% por 2 minutos, hipoclorito de sódio a 1% por 3 minutos, lavados com água destilada autoclavada por 1 minuto

e, finalmente, secos em condições assépticas.

Para a avaliação da germinação dos escleródios, em cada parcela experimental, 4 escleródios foram inoculados em meio de cultura PDA e estes foram tratados com 100 µL de suspensão de nanopartículas TiNP-BvS em concentrações finais crescentes (2,5 x 10^{10} NPs.mL^{-1} a 1,0 x 10^{11} NPs.mL^{-1}), sendo o controle negativo conduzido com escleródios tratados com água destilada estéril. Para esta avaliação, também se adotou um tratamento com sobrenadante de fermentação (SF) de *Bacillus velezensis* AGVL-005. Assim, um DIC foi conduzido em incubadora BOD a 25ºC ± 1ºC com fotoperíodo de 12 horas com 5 réplicas para cada tratamento, avaliando-se após 7 dias o número de escleródios germinados e, após 14 dias, o número de novos escleródios formados. Desta forma, foi possível aferir o percentual de germinação micelial de escleródios (GME) e o número de novos escleródios formados (NEF).

Controle de infecção de sementes in vitro por Colletotrichum lindemuthianum

O potencial controle de *Colletotrichum lindemuthianum*, fungo causador da antracnose do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*), foi avaliado quanto à atividade das nanopartículas para mitigar a infecção de sementes de feijoeiro pelo fungo.

Para a avaliação sementes de feijoeiro, foram desinfetadas superficialmente com etanol 70% (v/v) por 1 minuto, hipoclorito de sódio 2% (v/v) por 1 minuto, enxaguadas com água destilada estéril e secas em câmara de fluxo laminar.

As sementes desinfetadas foram tratadas com com pulverização da suspensão de nanopartículas nas concentrações de 1,0 x 10^{11} NPs.mL^{-1} e 7,5 x 10^{10} NPs.mL^{-1} e com o sobrenadante de fermentação (SF) na concentração de 100 mL.L^{-1}, adotando-se uma dose de 60 mL.kg^{-1} de sementes. As sementes tratadas foram mantidas por 48 horas sobre culturas fúngicas de *C. lindemuthianum*, previamente cultivadas por 14 dias em meio de cultivo PDA suplementado com manitol na concentração de 30 g.L^{-1}, de modo que se viabilizasse uma condição de infecção destas sem que houvesse germinação. Os controles experimentais negativo e positivo foram realizados com sementes não infectadas e sementes infectadas tratadas com água destilada estéril, respectivamente.

Após o procedimento de infecção, as sementes foram submetidas à uma condição germinativa em câmaras de germinação (gerbox). Desta forma, o ensaio foi conduzido em incubadora BOD a 25ºC com fotoperíodo de 12 horas por 6 dias, adotando-se cinco réplicas por tratamento. Dado o tempo de incubação, foram avaliados o percentual de sementes

germinadas e avaliou-se a incidência da infecção.

Avaliação da toxicidade das nanopartículas biogênicas

Avaliação de fitotoxicidade das nanopartículas

A fitotoxicidade das nanopartículas foi avaliada quanto ao seu efeito na inibição da germinação e crescimento das radículas de sementes de feijoeiro (*P. vulgaris*). As sementes foram tratadas com concentrações crescentes de nanopartículas até 1,0 x 10^{11} NPs.mL^{-1}, utilizando-se uma dose de 60 mL.kg^{-1} de sementes, adotando-se o tratamento com água destilada previamente esterilizada como controle.

Após o tratamento, as sementes foram distribuídas em papel *germitest* umidificado com água estéril (2,5x m/m), previamente posicionado em câmaras de germinação (gerbox). O ensaio foi inteiramente casualizado, com 4 réplicas por tratamento e conduzido em incubadora BOD a 25ºC com fotoperíodo de 12 horas por 6 dias. Dado o tempo de incubação, foram avaliados a quantidade de sementes germinadas e comprimento das radículas, possibilitando o cálculo da porcentagem relativa da germinação (RSG – *Relative seed germination*) e porcentagem relativa do crescimento das raízes (RRG – *Relative root growth*) e do índice de germinação (GI) (BELO, 2011). A classificação do grau de fitotoxicidade presente nas amostras foi realizada conforme descrito por Lumbaque *et al*. (2016) e Belo (2011).

Avaliação dos efeitos citotóxicos das nanopartículas

O estudo dos efeitos citotóxicos das nanopartículas foi realizado utilizando-se das linhagens celulares V79 (fibroblasto pulmonar de hamster chinês), 3T3 (fibroblasto embrionário de *swiss* albino) e HaCat (queratinócito humano), avaliando-se a atividade mitocondrial por redução do tetrazólio (MTT).

As células foram previamente cutivadas em Dulbecco's modified eagle médium (DMEM), plaqueadas em placas de 96 poços (5,0 x 10^4 células/poço) e, posteriormente, expostas às nanopartículas em concentrações crescentes de TiNP-BvS entre 0,5 x 10^{11} NPs.mL^{-1} e 3,5 x 10^{11} NPs.mL^{-1} por 24 horas. Após a exposição, as células foram submetidas a lavagem com tampão PBS e adição de solução de MTT (5 mg.mL^{-1}) por 3 horas, seguida de fixação com DMSO e leitura da absorbância em espectrofotômetro com leitor de microplacas a um comprimento de onda de 540 nm.

Avaliação dos efeitos genotóxicos das nanopartículas

A genotoxicidade das nanopartículas de titânio foi avaliada pelo ensaio de *Allium cepa.* As raízes de cebola (*Allium cepa*) previamente germinadas foram expostas às amostras de nanopartículas de titânio nas concentrações de 7,5 x 10^{10} NP.mL^{-1} e 1,0 x 10^{11} por 24 horas e, em seguida, estas foram fixadas em etanol:ácido acético (3:1). Para o preparo das lâminas para avaliação por microscopia, as raízes foram hidrolisadas em HCl 1M a 60ºC e coradas com reativo de Schiff seguido de corte da região meristemática, coloração com carmin acético e esmagamento sob lamínulas. As lâminas de cada amostra foram preparadas em triplicata e a contagem de células foi realizada em microscópico ótico Olympus CH30, considerando a quantidade de células em divisão para a obtenção do índice mitótico (IM) e a quantidade de células em divisão apresentando alterações cromossômicas, visando obter o índice de alterações cromossômicas (IA).

Efeito das nanopartículas sobre enzimas do solo

Para as análises enzimáticas de solo, foram preparados microcosmos compostos de aproximadamente 50g de solo previamente ajustados à capacidade de campo e mantidos a temperatura ambiente por 7 dias para estabilização.

Após este período de estabilização, cada tratamento foi preparado em 5 repetições amostrais com TiNP-BvS simulando doses de campo de 10,0 L.ha^{-1}, 1,0 L.ha^{-1} e 0,1 L.ha^{-1}, correspondendo a concentrações finais de 1,0 x 10^{11} NP.mL^{-1}, 1,0 x 10^{10} NP.mL^{-1} e 1,0 x 10^{9} NP.mL^{-1}, respectivamente. Os tratamentos também foram constituídos de um controle tratado com água destilada autoclavada e um tratamento utilizando o sobrenadante de fermentação de *B. velezensis* AGVL-005 (SF), simulando uma dose de campo de 10,0 L.ha^{-1}. Após os tratamentos, as amostras foram mantidas a temperatura ambiente e as atividades enzimáticas foram avaliadas nos períodos de 10 e 20 dias.

Para a avaliação do efeito das nanopartículas sobre as enzimas do solo foram selecionadas as enzimas arilsulfatase, fosfatase ácida e beta-glicosidase, relacionadas à ciclagem de nutrientes (mineralização) no solo. A quantificação foi baseada na determinação colorimétrica do p-nitrofenol após incubação de solo previamente exposto às nanopartículas com uma solução tamponada (MUB – *Modified universal buffer)* com substratos específicos para as enzimas, sendo estes p-nitrofenil sulfato (PNS), p-nitrofenil fosfato (PNF) e p-

nitrofenil-β-D-glicopiranosídeo (PNG), respectivamente, conforme metodologia adaptada de Tabatabai *et al*. (1994). Os valores obtidos em leitura realizada em espectrofotômetro Shimadzu UV-1900 a 410 nm foram interpolados em uma curva padrão com concentrações padrão de p-nitrofenol, sendo possível determinar a atividade enzimática em µg de substrato.g^{-1} de solo.$hora^{-1}$.

Análises estatísticas

Para o tratamento estatístico dos dados, foi empregada análise de variância (ANOVA) unilateral seguida do teste de Tukey, com nível de significância de $p < 0,05$. As análises foram realizadas com o software Sisvar, versão 5.6 (FERREIRA, 2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Síntese e caracterização físico-química das nanopartículas

A síntese biogênica das nanopartículas de titânio baseadas em *Bacillus velezensis* AGVL-005 (TiNP-BvS) foi bem-sucedida, sendo observada alteração de cor e formação de precipitado, imediatamente após a adição de titânio ao filtrado, conforme reportado na síntese biogênica de nanopartículas por *Bacillus amyloliquefaciens*, realizada por Khan *et al*. (2016).

Os resultados do diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e potencial zeta das nanopartículas foram verificados pelas técnicas de espalhamento dinâmico de luz e microeletroforese (Tabela 1). A técnica de rastreamento de nanopartículas (NTA) também foi realizada, a fim de investigar o tamanho e a concentração das nanopartículas. Após a caracterização, a concentração das nanopartículas foi padronizada em estoque de 1,0 x 10^{12} NPs.mL^{-1}.

Tabela 1. Caracterização físico-química das nanopartículas TiNP-BvS

Amostra	DLS			NTA	
	Diâmetro médio (nm)	Índice de polidispersão	Potencial zeta (mV)	Diâmetro médio (nm)	Concentração
TiNP-BvS	58,14±12,56	0,24±0,02	-0,83±0,08	143,5±5,3	1,71 x 10^{12} NPs.mL^{-1}

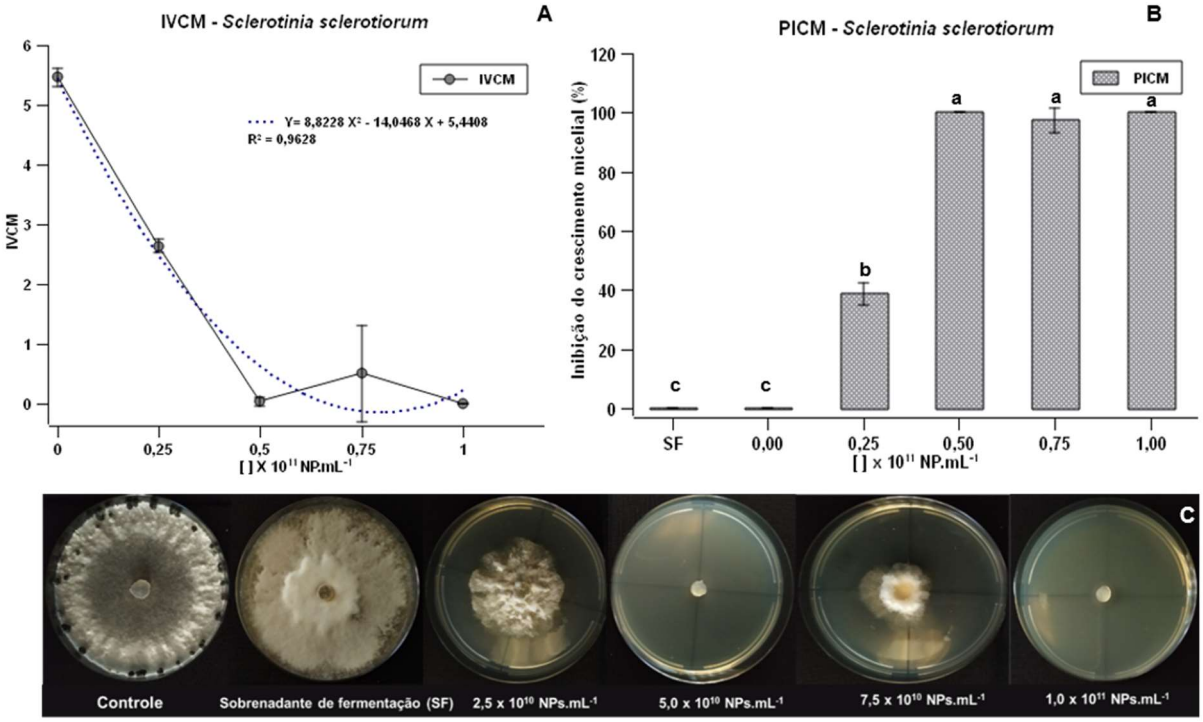
Os resultados da caracterização físico-química das nanopartículas corroboram com características físico-químicas reportadas em outros estudos de síntese biogênica de nanopartículas de titânio baseadas em bactérias do gênero Bacillus (JALALI *et al*., 2020;

KHAN *et al*., 2016, SUNKAR *et al*., 2014; SURIYARAJ *et al*., 2014; KIRTHI *et al*., 2011; ÓRDENES-AENISHANSLINS *et al*., 2014). Uma série de fatores impactam os parâmetros físico-químicos das nanopartículas, dentre eles as condições de cultivo do agente redutor e as biomoléculas produzidas no processo (LUO *et al*., 2018). Os biosurfactantes produzidos por microrganismos são exemplos destas biomoléculas e vêm sendo reportados como agentes estabilizantes da síntese biogênica de nanopartículas (KIRAN *et al*., 2011; PŁAZA *et al*., 2014; TOMAR *et al*., 2015; REDDY *et al*., 2009). O agente mediador utilizado neste trabalho é caracterizado como produtor de biosurfactantes (RABBEE *et al*., 2019), os quais podem estar relacionados aos resultados da síntese, assim como com as características físico-químicas observadas.

Atividade biológica das nanopartículas sobre fungos fitopatogênicos

A atividade biológica das nanopartículas biogênicas foi avaliada verificando-se o potencial destas para a inibição do desenvolvimento de fungos fitopatogênicos *in vitro.* Os efeitos inibitórios sobre *Sclerotinia sclerotiorum* foram avaliados verificando o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), porcentagem de inibição do crescimento micelial (PICM), germinação e formação de novos escleródios (NEF). No que tange a velocidade (IVCM) e desenvolvimento micelial absoluto (PICM), atestou-se atividade inibitória significativa em concentrações iguais ou superiores a 2,5 x 10^{10} $NP.mL^{-1}$(Figura 1a e 1b), quando comparado ao sobrenadante de fermentação (SF) e controle negativo (Figura 1c).

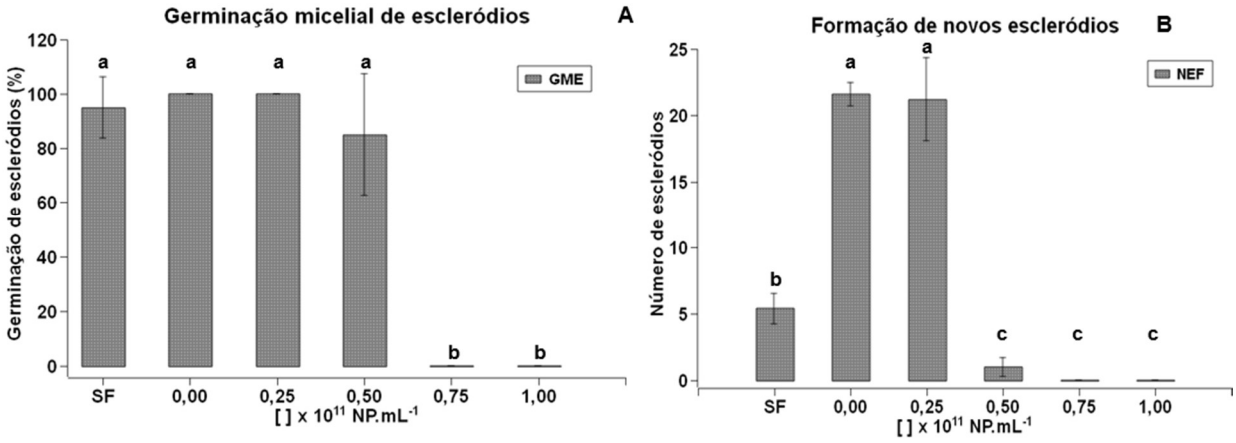
Figura 1. Ensaio de atividade biológica de TiNP-BvS para *S. sclerotiorum.* A. Índice de velocidade do crescimento micelial (IVCM). B. Porcentagem da inibição do crescimento micelial. C. Inibição do desenvolvimento de *S. sclerotiorum in vitro.* Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística pelo teste de Tukey (p<0,05)**.**



Fonte: Elaboração própria

Em relação à germinação e formação de novos escleródios, a atividade inibitória significativa foi averiguada em concentrações iguais ou superiores a 7,5 x 10^{10} NP.mL^{-1} (Figura 2a e 2b).

Figura 2. Ensaio de atividade biológica de TiNP-BvS para *S. sclerotiorum.* A germinação micelial de escleródios (GME). B. Formação de novos escleródios (NEF). Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística pelo teste de Tukey (p<0,05)**.**



Fonte: Elaboração própria

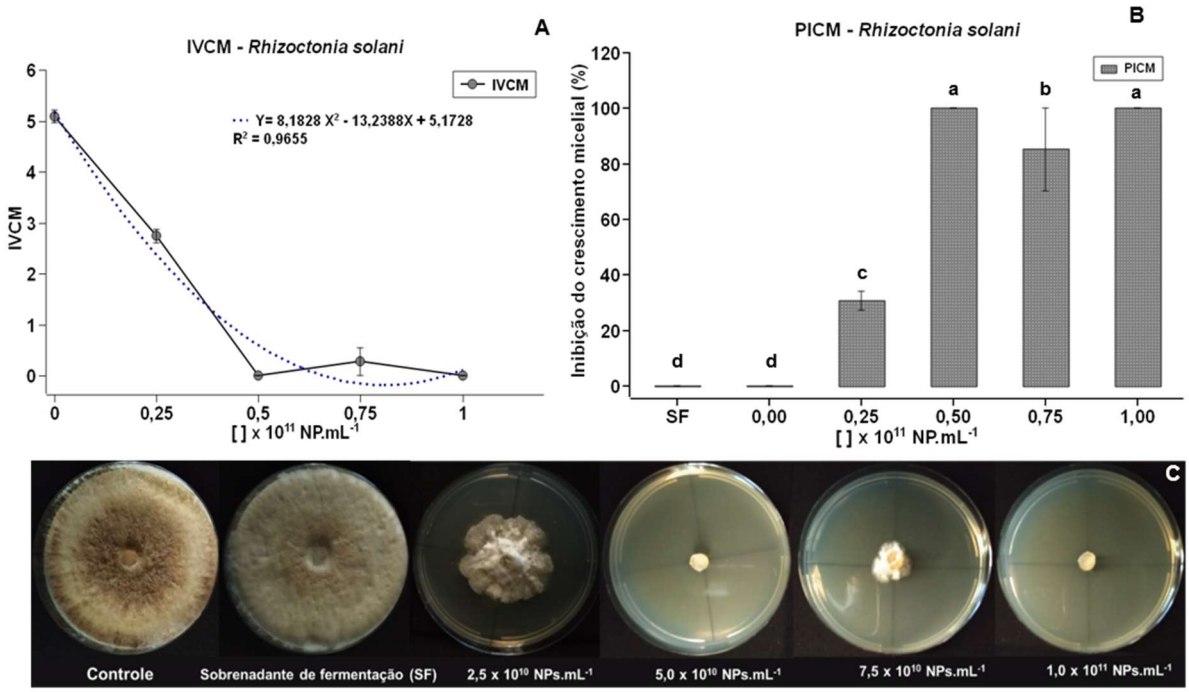
Os resultados da atividade biológica das nanopartículas corroboram com outros trabalhos que demonstraram o potencial de nanopartículas biogênicas no controle de *Sclerotinia sclerotiorum* (ELGORBAN *et al*., 2016; MITTAL *et al*., 2017; KRISHNARAJ *et al*., 2012), entretanto, pouco se tem descrito sobre o efeito de nanopartículas biogênicas de titânio, principalmente em relação a síntese biogênica de nanopartículas mediada por agentes de controle microbiológico (IRSHAD *et al*., 2020). Guilger-Casagrande *et al*. (2019) realizaram a biossíntese de nanopartículas de prata baseada em *Trichoderma harzianum* e Kaman *et al*. (2017) realizaram a síntese biogênica baseada em *Trichoderma asperellum*, relatando o potencial de nanopartículas baseadas em agentes de controle biológico para o controle do mofo branco.

O fitopatógeno *S. sclerotiorum* apresenta uma gama de hospedeiros (JULIATTI, 2010), possuindo a capacidade de formar estruturas de resistência que garantem a sobrevivência duradoura do fungo no solo, mesmo na ausência de plantas hospedeiras, os escleródios (ROCHA, 2007). Ainda, sob determinadas condições, os escleródios podem realizar a germinação miceliogênica e carpogênica, sendo a segunda relacionada à formação de apotécios formadores de ascósporos, caracterizando-se como a maior fonte de inóculo do fungo em condições de campo (STEADMAN, 1983). Neste sentido, novas tecnologias que apresentem atividade inibitória sobre o desenvolvimento micelial, germinação e formação de escleródios podem ser alternativas para o controle de *S. sclerotiorum,* evidenciando assim o potencial das

nanopartículas biogênicas para tal.

Os efeitos das nanopartículas sobre *Rhizoctonia solani* atestaram atividade inibitória significativa, em concentrações iguais ou superiores a 2,5 x 10^{10} NP.mL^{-1} (Figura 3a, 3b, 3c), reduzindo a velocidade de crescimento micelial e o desenvolvimento absoluto, quando comparado ao sobrenadante de fermentação (SF) e controle negativo.

Figura 3. Ensaio de atividade biológica de TiNP-BvS para *R. solani.* A. Índice de velocidade do crescimento micelial (IVCM). B. Porcentagem da inibição do crescimento micelial. C. Inibição do desenvolvimento de *R. solani in vitro.* Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística pelo teste de Tukey (p<0,05)**.**



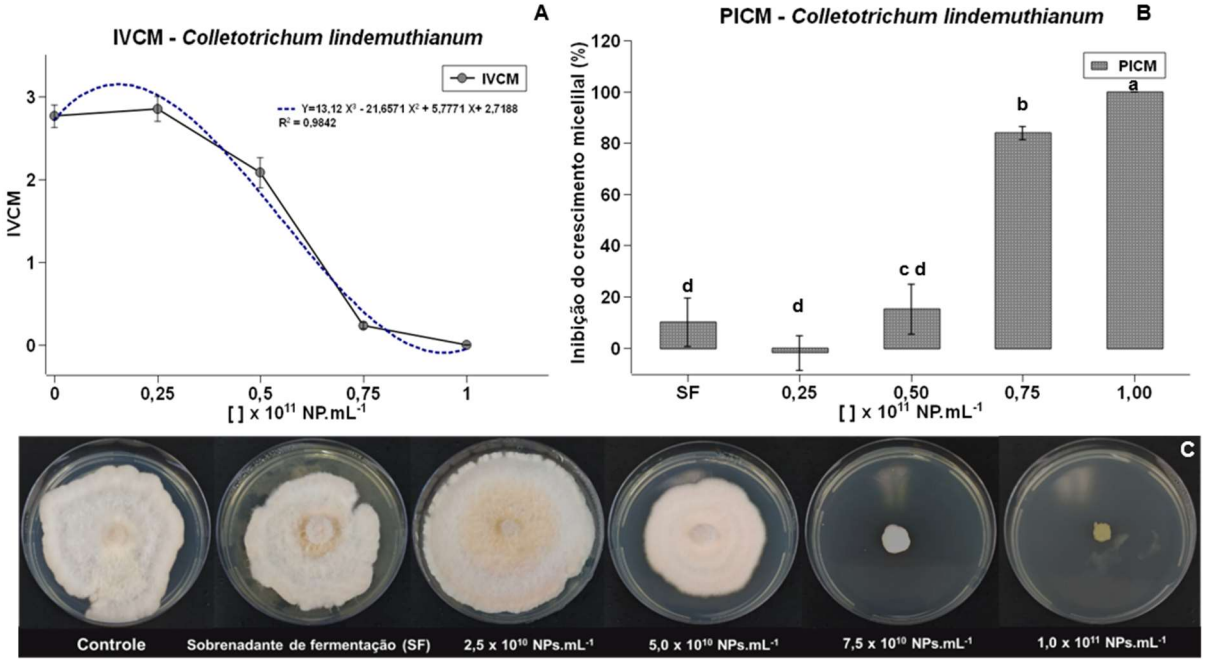
Fonte: Elaboração própria

Até o momento, não existem relatos de nanopartículas de titânio biossintetizadas com atividade inibitória para *R. solani*, entretanto, alguns trabalhos já têm reportado esta característica para nanopartículas biogênicas de prata, ouro e cobre (SHENDE *et al*., 2016; KRISHNARAJ *et al*., 2012; KHATAMI, *et al*., 2016; KAMAN *et al*., 2019; DAS *et al*., 2017; KORA *et al*., 2020). O *Rhizoctonia solani* é caracterizado por sua alta capacidade saprofítica no solo, os escleródios e o micélio do fungo constituem a fonte primária de infecção, sendo as sementes também importantes fontes de contaminação primária (LUZ *et al*., 1978; GALINDO *et al*., 1983; ONESIROSAN, P. T.,1975). O controle químico aliado ao manejo correto e integrado são as vias de controle mais eficientes (MEYER, 2002), entretanto, alternativas complementares ao uso de agroquímicos que possam inibir as vias de infecção apresentam-se

como importantes ferramentas para um controle mais sustentável deste patógeno.

Os efeitos inibitórios das nanopartículas sobre *Colletotrichum lindemuthianum* apresentaram um comportamento concentração dependente, em concentrações iguais ou superiores a 7,5 x 10^{10} NP.mL^{-1} (Figuras 4a, 4b e 4c), reduzindo a velocidade de crescimento micelial e o desenvolvimento absoluto, quando comparado ao sobrenadante de fermentação (SF) e controle negativo.

Figura 4. Ensaio de atividade biológica de TiNP-BvS para *C. lindemuthianum.* A. Índice de velocidade do crescimento micelial (IVCM). B. Porcentagem da inibição do crescimento micelial. C. Inibição do desenvolvimento de *C. lindemuthianum in vitro.* Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística pelo teste de Tukey (p<0,05)**.**



Fonte: Elaboração própria

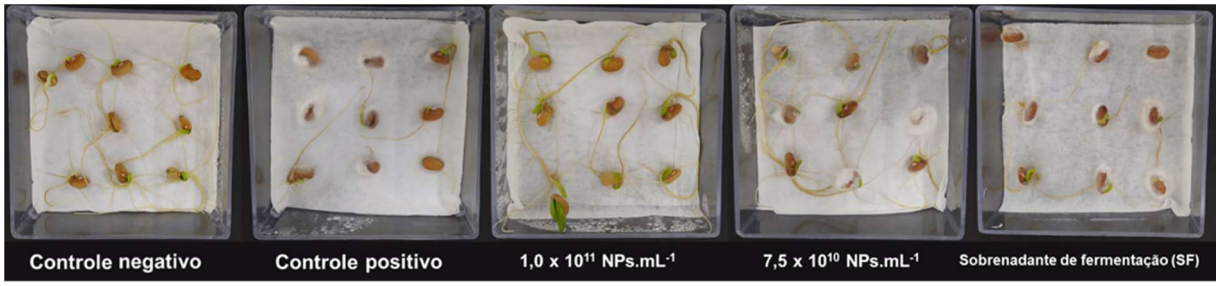
O potencial das nanopartículas para o controle de *C. lindemuthianum* também foi atestado no que tange o controle da infecção de sementes de feijoeiro. As nanopartículas e o sobrenadante de fermentação (SF) foram eficientes para mitigar a incidência de infecção em sementes tratadas (Tabela 3), sendo significativamente semelhante ao controle negativo em sementes tratadas com nanopartículas na concentração de 1,0 x 10^{11} NP.mL^{-1} (Figura 5).

Tabela 2. Incidência e germinação de sementes infectadas com *C. lindemuthianum.* Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística pelo teste de Tukey (p<0,05).

Tratamentos	Germinação (%)	Incidência de infeção (%)
Controle positivo	84,44	95,56 a

Sobrenadante de fermentação (SF)	75,56	69,36 b
TiNP-BvS – 7,5 x 10^{10} NP.mL^{-1}	83,27	62,22 b
TiNP-BvS – 1,0 x 10^{11} NP.mL^{-1}	97,78	8,80 c
Controle negativo	100,00	0,00 c

Figura 5. Ensaio de controle de infecção de sementes por *C. lindemuthianum*



Fonte: Elaboração própria

Estes resultados estão em sinergia com resultados de inibição obtidos em estudos realizados por Shende *et al*. (2016) com nanopartículas de cobre sintetizadas biologicamente. A incidência de patógenos causadores de doenças é um dos principais fatores limitantes à produção do feijoeiro comum (DEAN *et al*., 2012) e, dentre estas doenças, a antracnose do feijoeiro é predominante e mais destrutiva durante todo o ciclo em todos os países onde o feijoeiro comum é cultivado (SCHWARTZ *et al*., 1989; KELLY *et al*., 1994). As opções mais viáveis e econômicas para o controle da antracnose do feijoeiro são a utilização de cultivares resistentes e a utilização de fungicidas, entretanto, a existência de várias raças fisiológicas do patógeno aumentam a possibilidade de surgimento de cepas resistentes, sendo um obstáculo para o controle (VIDIGAL-FILHO *et al*., 2007; RAVA *et al*., 1991).

Desta forma, os resultados deste estudo indicam novas possibilidades de rotas de obtenção de nanomateriais que possam complementar as ferramentas empregadas no controle da antracnose do feijoeiro, principalmente no que tange à via de infecção pelas sementes.

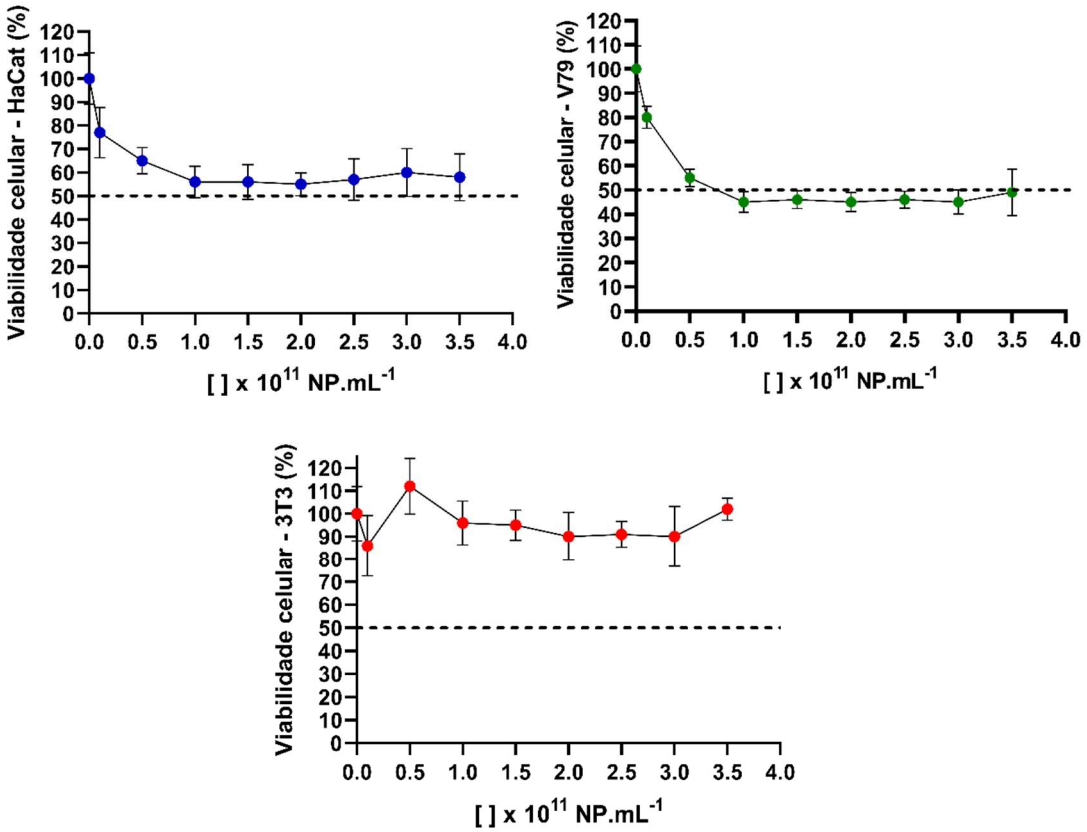
Em relação à atividade biológica das nanopartículas *in vitro,* evidencia-se o potencial das nanopartículas obtidas por esta via para aplicação no controle de fitopatógenos. Ainda, a atividade inibitória observada revela um papel potencializador das nanopartículas no controle quando comparado à utilização individual do agente de controle biológico (SF). Entretanto, avalições em condições *in vivo* em casa de vegetação ou campo precisam ser realizadas para confirmação do real potencial e compreensão de seu efeito na sistemática fitopatológica a níveis de incidência em campo e produtividade.

Avaliação da toxicidade das nanopartículas biogênicas

Citotoxicidade e genotoxicidade das nanopartículas

Na faixa de concentração de exposição à TiNP-BvS não foram verificados valores de IC50 nos ensaios com as linhagens celulares 3T3 e HaCat, indicando baixa citotoxicidade. Contudo, no ensaio com a linhagem celular V79 verificou-se um valor de IC50 de 4,4 x 10^{11} NPs.mL^{-1} (Figura 6).

Figura 6. Ensaio de citotoxicidade de TiNP-BvS.



Fonte: Elaboração própria

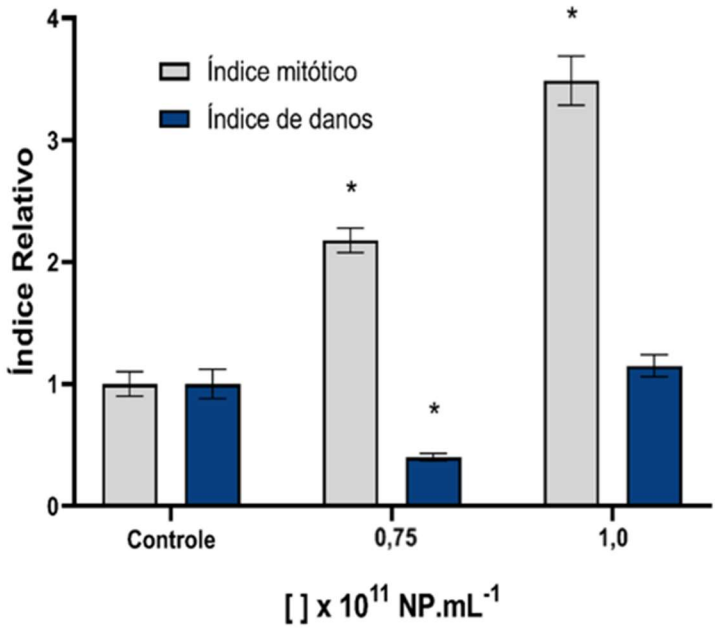
Entretanto, apesar dos efeitos apresentados, estudos mostram que as nanopartículas oriundas de síntese biogênica podem apresentar comportamento diferenciado devido a peculiaridade do *capping* existente, o qual em geral, faz com que estas apresentem menor citoxicidade quando comparadas às nanopartículas quimicamente sintetizadas (LIMA *et al.,* 2012). Além disso, diferentes linhagens celulares apresentam diferentes níveis de sensibilidade quando em exposição à nanopartículas metálicas. Sunkar *et al*. (2014) realizaram a síntese biogênica de nanopartículas de TiO_2 mediada por uma cepa de *Bacillus cereus* endofítico, sendo possível demonstrar que estas não apresentaram citotoxicidade significativa em células normais

(Vero) em comparação com células cancerosas (Hep2).

Em relação aos mecanismos de toxicidade, as nanopartículas de titânio oriundas de síntese química têm sido reportadas como indutoras do stress oxidativo ou respostas inflamatórias, resultando em efeitos genotóxicos e citotóxicos (FARD *et al*., 2015; SHI *et al*., 2013).

A avaliação dos efeitos genotóxicos das nanopartículas bem como possíveis alterações nos índices mitóticos foi realizada através do ensaio *Allium cepa*. Ambas as concentrações de exposição avaliadas ocasionaram aumento significativo no índice mitótico, quando comparadas ao controle. Em relação ao índice de alterações (danos) cromossômicos, ambas as concentrações de exposição não apresentaram valores significativamente superiores ao controle (Figura 7).

Figura 7. Ensaio de genotoxicidade de TiNP-BvS pelo ensaio Allium cepa. (*) Média de tratamentos apresentando diferença estatisticamente significativa em relação ao respectivo controle.



Fonte: Elaboração própria

Os efeitos genotóxicos de nanopartículas de titânio foram reportados em alguns estudos (PAKRASHI *et al*., 2014; GHOSH *et al*., 2010; CHEN *et al*., 2014), sendo os efeitos observados não apenas em relação a nanopartículas de síntese química, mas também em relação às nanopartículas biologicamente sintetizadas (KOCA *et al*., 2019). Entretanto, Syed *et al*.

(2017) reportaram o efeito anti-genotóxico de nanopartículas biogênicas de titânio baseadas em *Turbinaria ornata*. Neste sentido, os resultados do presente estudo podem vir a colaborar para o entendimento do efeito genotóxico de nanopartículas biogênicas de titânio baseadas em agentes de controle biológico bem como para seu potencial de aplicação em escala de campo e implicações ambientais.

Fitotoxicidade das nanopartículas

Os resultados das avaliações de percentual de germinação e comprimento de raiz das sementes germinadas, com base na porcentagem relativa da germinação (RSG), porcentagem relativa do crescimento das raízes (RRG) e no índice de germinação (GI) estão descritas na Tabela 3.

Tabela 3. Avaliação de fitotoxicidade de TiNP-BvS

Tratamentos	RSG (%)	RRG (%)	GI*
Sobrenadante de fermentação (SF)	96,50	93,39	88,71
TiNP-BvS – 1,0 x 10^{11} NP.mL^{-1}	105,00	95,35	99,50
TiNP-BvS – 1,0 x 10^{10} NP.mL^{-1}	99,90	92,09	92,02
TiNP-BvS – 1,0 x 10^{9} NP.mL^{-1}	99,90	99,27	99,19

(*) Classificação proposta por Belo (2011): > 100: material aumenta a germinação e o crescimento da raiz das plantas, 80-100: não fitotóxico, 60-80: moderadamente fitotóxico, 30-60: fitotóxico, <30: muito fitotóxico.

Como observado, baseando-se no índice de germinação, os resultados evidenciam que as nanopartículas apresentam uma classificação não fitotóxica nas concentrações testadas, inclusive na concentração de 1,0 x 10^{11} NP.mL^{-1}, em que a atividade biológica foi reportada.

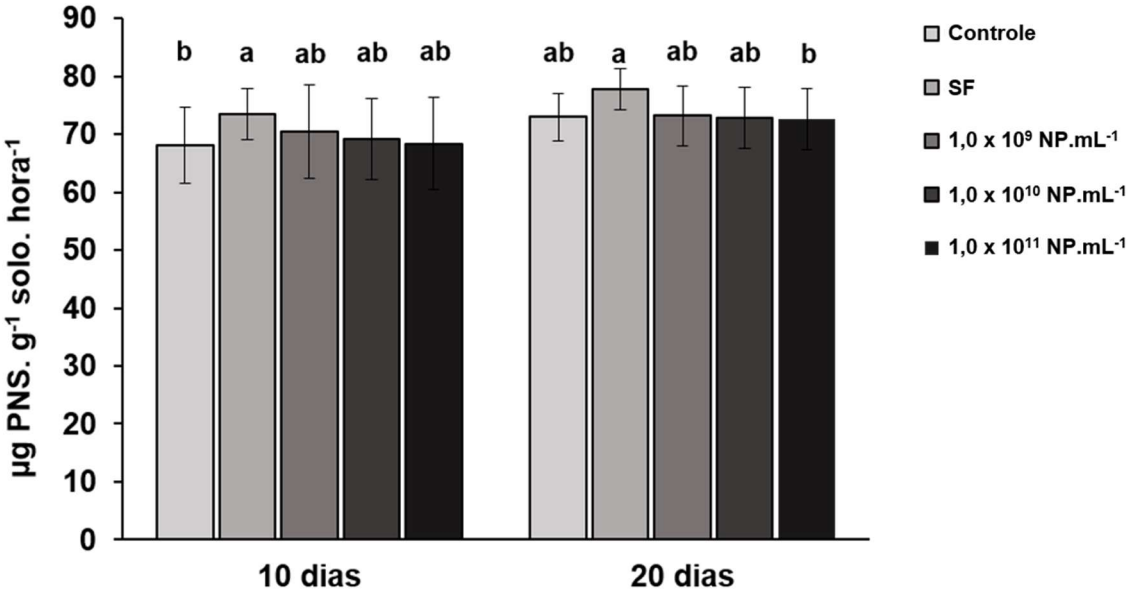
Alguns trabalhos reportam fitotoxicidade de nanopartículas em diferentes estágios de desenvolvimento de plantas (LIN *et al*., 2007; LEE *et al.,* 2007). Especialmente para nanopartículas biogênicas, diferentes níveis de fitotoxicidade são reportados, dependendo da composição da nanopartícula, tamanho, agente mediador, entre outros fatores (CHOUDHURY *et al*., 2016, VERMA *et al*., 2020; TRIPATHI *et al*., 2017).

Efeito das nanopartículas sobre enzimas do solo

Os resultados da análise de atividade da enzima arilsulfatase demonstraram que o tratamento SF apresentou aumento significativo em relação ao controle na avaliação após 10 dias da aplicação, diferentemente dos demais ensaios de exposição, que foram semelhantes ao tratamento controle. Na avaliação de 20 dias, nenhuma resposta significativa foi obtida nos

ensaios de exposição, quando comparados ao controle (Figura 8).

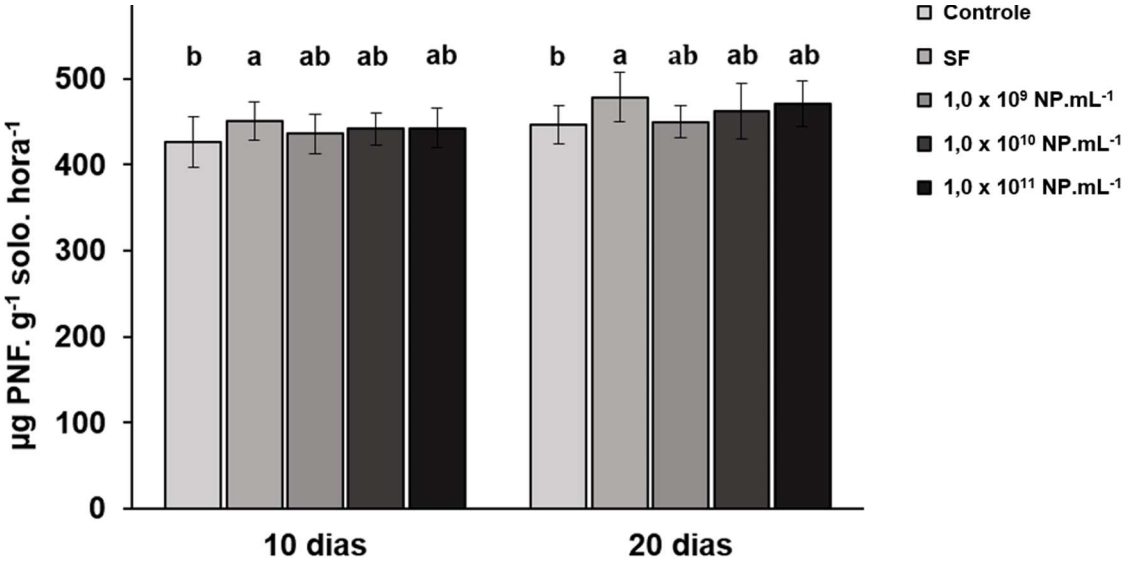
Figura 8. Efeito de TiNP-BvS sobre arilsulfatase de solo. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística pelo teste de Tukey (p<0,05).



Fonte: Elaboração própria

A análise da atividade da fosfatase ácida apresentou a mesma resposta aos 10 e 20 dias após a aplicação dos produtos. Os resultados mostraram diferenças significativas entre a exposição SF em relação ao controle, não sendo observado o mesmo efeito em relação aos demais ensaios de exposição (Figura 9).

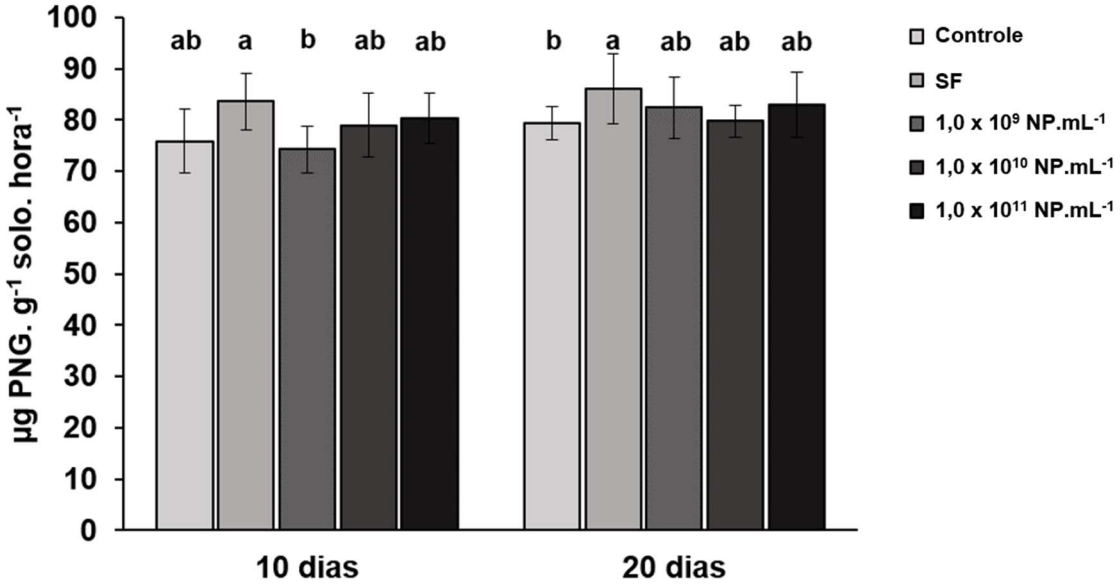
Figura 9. Efeito de TiNP-BvS sobre fosfatase ácida de solo. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística pelo teste de Tukey (p<0,05).



Fonte: Elaboração própria

A partir dos resultados da análise de atividade da enzima β-glicosidase, evidencia-se que na avaliação de 10 dias não foi observada resposta dos ensaios de exposição em relação ao controle, porém é possível observar diferença significativa em relação a SF. Na avaliação de 20 dias após a aplicação, o ensaio SF diferiu do ensaio controle e os demais ensaios foram semelhantes ao controle (Figura 10).

Figura 10. Efeito de TiNP-BvS sobre β-glicosidase do solo. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística pelo teste de Tukey ($p<0,05$).



Fonte: Elaboração própria

Os microrganismos do solo são indicadores de qualidade do solo devido às importantes funções do sistema e, por serem eficientes na detecção e resiliência em relação a perturbações no ambiente em que vivem (SCHLOTER *et al*., 2003). Por consequência, o solo é um sistema vivo onde toda a atividade bioquímica se procede através de processos enzimáticos e, neste sentido, a atividade enzimática do solo tem sido frequentemente sugerida como indicador sensível de sua qualidade ecológica. Logo, por meio dessas análises é possível medir facilmente as principais reações microbianas envolvendo os ciclos de nutrientes no solo e respostas às mudanças no solo por fatores naturais ou antropogênicos (KARACA *et al*., 2010). Assim, a investigação de eventuais efeitos negativos de nanopartículas na atividade das principais enzimas envolvidas nos processos biológicos do solo caracteriza-se como um importante parâmetro para o entendimento do impacto ambiental da aplicação deste tipo de ativo no solo.

Alguns estudos apresentam resultados de investigações realizadas na presença de

nanopartículas de titânio, sendo a maioria destes em relação a nanopartículas de síntese química, mostraram que existe efeito negativo em relação a atividade enzimática do solo, reduzindo sua atividade (SIMONIN *et al*., 2016; DINESH *et al*., 2012). Du *et al*. (2011) reportaram efeito negativo de nanopartículas de titânio e zinco, oriundos de síntese química, no crescimento de trigo e na atividade de enzimas de solo. Este efeito negativo também foi reportado em nanopartículas de prata (EIVAZI *et al*., 2018). Entretanto, até o momento, não há trabalhos que tenham investigado o efeito de nanopartículas biogênicas de titânio na atividade enzimática do solo. Neste sentido, os resultados deste estudo se mostram promissores, principalmente, no que tange ao potencial da via biogênica de síntese de nanopartículas com mitigação do impacto deste nanomaterial na atividade biológica e enzimática do solo.

Conclusão

As nanopartículas de titânio obtidas por síntese biogênica a partir do extrato de *Bacillus velezensis* apresentam atividade biológica contra fitopatógenos. O nanomaterial biosintetizado também apresenta uma baixa citotoxicidade, nenhuma genotoxicdade e não apresenta efeitos negativos em enzimas do solo. Neste sentido, além da atividade biológica comprovada, os resultados fornecem informações importantes para rotas e nanomateriais alternativos, seguros e sustentáveis, utilizando-se da síntese biogênica de nanopartículas. O entendimento do potencial inibitório e aplicação deste nanomaterial pode ser expandido em trabalhos futuros em condições de campo *in vivo* bem como confrontando outros fitopatógenos de relevância econômica.

Agradecimentos

Agrivalle Brasil, Laboratório de Nanotecnologia Ambiental (UNESP – Sorocaba), Universidade de Sorocaba (UNISO), Agrivalle Brasil.

Referências

ANSARI, K. I., PALACIOS, N., ARAYA, C., LANGIN, T., EGAN, D., & DOOHAN, F. M. (2004). Pathogenic and genetic variability among *Colletotrichum lindemuthianum* isolates of different geographic origins. Plant Pathology, 53(5), 635-642.

BELO, SARA RODRIGUES SANTOS. Avaliação de fitotoxicidade através de *Lepidium sativum* no âmbito de processos de compostagem. 2011. Tese de Doutorado.

BOLTON, M. D., THOMMA, B. P., & NELSON, B. D. (2006). *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. Molecular plant pathology, 7(1), 1-16.

BOTELHO, S. A., RAVA, C. A., & LEANDRO, W. M. (2001). Supressividade induzida a *Rizoctonia solani* pela adição de diferentes resíduos vegetais. Fitopatologia Brasileira, 31(1), 35-42.

CHANDLER, D., BAILEY, A. S., TATCHELL, G. M., DAVIDSON, G., GREAVES, J., & GRANT, W. P. (2011). The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 366(1573), 1987-1998.

CHEN, T., YAN, J., & LI, Y. (2014). Genotoxicity of titanium dioxide nanoparticles. Journal of food and drug analysis, 22(1), 95-104.

CHOUDHARY, D. K., & JOHRI, B. N. (2009). Interactions of Bacillus spp. and plants–with special reference to induced systemic resistance (ISR). Microbiological research, 164(5), 493-513.

CHOUDHURY, R., MAJUMDER, M., ROY, D. N., BASUMALLICK, S., & MISRA, T. K. (2016). Phytotoxicity of Ag nanoparticles prepared by biogenic and chemical methods. International Nano Letters, 6(3), 153-159.

CHOWDHURY, S. P., HARTMANN, A., GAO, X., & BORRISS, R. (2015). Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42–a review. Frontiers in microbiology, 6, 780.

COLMAN, B. P., ARNAOUT, C. L., ANCIAUX, S., GUNSCH, C. K., HOCHELLA JR, M. F., KIM, B., ... & UNRINE, J. M. (2013). Low concentrations of silver nanoparticles in biosolids cause adverse ecosystem responses under realistic field scenario. PloS one, 8(2), e57189.

DAS, N., & KUNDU, S. (2017). Inhibitory effect of Mycosynthesized gold nanoparticles on Hyphal branching of the phytopathogen *Rhizoctonia solani*. International Journal of Sciences & Applied Research, 4(7), 121-128.

DEAN, R., VAN KAN, J. A., PRETORIUS, Z. A., HAMMOND-KOSACK, K. E., DI PIETRO, A., SPANU, P. D., ... & FOSTER, G. D. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. Molecular plant pathology, 13(4), 414-430.

DINESH, R., ANANDARAJ, M., SRINIVASAN, V., & HAMZA, S. (2012). Engineered nanoparticles in the soil and their potential implications to microbial activity. Geoderma, 173, 19-27.

DU, W., SUN, Y., JI, R., ZHU, J., WU, J., & GUO, H. (2011). TiO_2 and ZnO nanoparticles negatively affect wheat growth and soil enzyme activities in agricultural soil. Journal of Environmental Monitoring, 13(4), 822-828.

DUNLAP, C. A., KIM, S. J., KWON, S. W., & ROONEY, A. P. (2016). Bacillus velezensis is not a later heterotypic synonym of Bacillus amyloliquefaciens; Bacillus methylotrophicus, Bacillus amyloliquefaciens subsp. plantarum and 'Bacillus oryzicola'are later heterotypic synonyms of Bacillus velezensis based on phylogenomics. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 66(3), 1212-1217.

DURÁN, N., MARCATO, P. D., DURÁN, M., YADAV, A., GADE, A., & RAI, M. (2011). Mechanistic aspects in the biogenic synthesis of extracellular metal nanoparticles by peptides, bacteria, fungi, and plants. Applied microbiology and biotechnology, 90(5), 1609-1624.

EDGINGTON, L. V.; KHEW, K. L.; BARRON, G. L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. Phytopathology, v. 61, n. 1, p. 42-+, 1971.

EIVAZI, F., AFRASIABI, Z., & ELIZABETH, J. O. S. E. (2018). Effects of silver nanoparticles on the activities of soil enzymes involved in carbon and nutrient cycling. Pedosphere, 28(2), 209-214.

ELGORBAN, A. M., AREF, S. M., SEHAM, S. M., ELHINDI, K. M., BAHKALI, A. H., SAYED, S. R., & MANAL, M. A. (2016). Extracellular synthesis of silver nanoparticles using Aspergillus versicolor and evaluation of their activity on plant pathogenic fungi. Mycosphere, 7(6), 844-852.

EMMERT, E. A. B. Biocontrol of plant disease : a (Gram-) positive perspective. v. 171, p. 1–9, 1999.

FARD, J. K., JAFARI, S., & EGHBAL, M. A. (2015). A review of molecular mechanisms involved in toxicity of nanoparticles. Advanced pharmaceutical bulletin, 5(4), 447.

FARIA, M. R. DE; WRAIGHT, S. P. Mycoinsecticides and Mycoacaricides : A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types q. v. 43, p. 237–256, 2007.

FERREIRA, DANIEL FURTADO. Sisvar: a computer statistical analysis system. Ciência e Agrotecnologia (UFLA), v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.

FISKESJÖ, G. The Allium test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas*, v. 102, n. 1, p. 99–112, 1985.

FLINT, M. L.; VAN DEN BOSCH, R. *Introduction to integrated pest management*. [S.l.]: Springer Science & Business Media, 2012.

FOLEY, J. A., RAMANKUTTY, N., BRAUMAN, K. A., CASSIDY, E. S., GERBER, J. S., JOHNSTON, M., ... & BALZER, C. (2011). Solutions for a cultivated planet. Nature, 478(7369), 337-342.

FRACETO, L. F. *et al.* Nanotechnology in Agriculture: Which Innovation Potential Does It Have? *Frontiers in Environmental Science*, v. 4, n. March, p. 1–5, 2016.

FRANCIS, I.; HOLSTERS, M.; VEREECKE, D. The Gram-positive side of plant–microbe interactions. *Environmental Microbiology*, v. 12, n. 1, p. 1–12, 2010.

FRAVEL, D. R. Commercialization and implementation of biocontrol. *Annu. Rev. Phytopathol.*, v. 43, p. 337–359, 2005.

GALINDO, J. J., ABAWI, G. S., THURSTON, H. D., & GALVEZ, G. (1983). Effect of mulching on web blight of beans in Costa Rica. Phytopathology, 73(4), 610-615.

GARCIA, R. Á., JULIATTI, F. C., & CASSEMIRO, T. A. (2012). Produção de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* (LIB.) de Bary em meio de cultura. Bioscience Journal, 28(1).

GHOSH, M., BANDYOPADHYAY, M., & MUKHERJEE, A. (2010). Genotoxicity of titanium dioxide (TiO2) nanoparticles at two trophic levels: plant and human lymphocytes. Chemosphere, 81(10), 1253-1262.

GILDEN, R. C., HUFFLING, K., & SATTLER, B. (2010). Pesticides and health risks. Journal of Obstetric, Gynecologic & Neonatal Nursing, 39(1), 103-110.

GUILGER-CASAGRANDE, M., GERMANO-COSTA, T., PASQUOTO-STIGLIANI, T., FRACETO, L. F., & de Lima, R. (2019). Biosynthesis of silver nanoparticles employing Trichoderma harzianum with enzymatic stimulation for the control of *Sclerotinia sclerotiorum*. Scientific reports, 9(1), 1-9.

GUILGER, M., PASQUOTO-STIGLIANI, T., BILESKY-JOSE, N., GRILLO, R., ABHILASH, P. C., FRACETO, L. F., & DE LIMA, R. (2017). Biogenic silver nanoparticles based on *Trichoderma harzianum*: synthesis, characterization, toxicity evaluation and biological activity. Scientific reports, 7, 44421.

GOPINATH, V.; VELUSAMY, P. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using Bacillus sp. GP-23 and evaluation of their antifungal activity towards Fusarium oxysporum. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 106, n. 2013, p. 170–174, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2012.12.087>.

HAHN, M. The rising threat of fungicide resistance in plant pathogenic fungi : Botrytis as a case study. 2014.

HEIMPEL, G. E., and MILLS, N. Biological Control - Ecology and Applications. Cambridge: Cambridge University Press, 2017.

IDRIS, E. E., IGLESIAS, D. J., TALON, M., & BORRISS, R. (2007). Tryptophan-dependent production of indole-3-acetic acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. Molecular plant-microbe interactions, 20(6), 619-626.

IRSHAD, M. A., NAWAZ, R., UR REHMAN, M. Z., IMRAN, M., AHMAD, M. J., AHMAD, S., ... & ALI, S. (2020). Synthesis and characterization of titanium dioxide nanoparticles by chemical and green methods and their antifungal activities against wheat rust. Chemosphere, 127352.

JACOBSEN, B. J.; ZIDACK, N. K.; LARSON, B. J. The role of Bacillus-based biological

control agents in integrated pest management systems: plant diseases. *Phytopathology*, v. 94, n. 11, p. 1272–1275, 2004.

JAMBHULKAR, P. P., SHARMA, M., LAKSHMAN, D., & SHARMA, P. (2015). Natural mechanisms of soil suppressiveness against diseases caused by Fusarium, Rhizoctonia, Pythium, and Phytophthora. In Organic Amendments and Soil Suppressiveness in Plant Disease Management (pp. 95-123). Springer, Cham.

JALALI, E., MAGHSOUDI, S., & NOROOZIAN, E. (2020). A novel method for biosynthesis of different polymorphs of TiO_2 nanoparticles as a protector for Bacillus thuringiensis from Ultra Violet. Scientific Reports, 10(1), 1-9.

JULIATTI, FERNANDO CESAR, AND F. C. A. JULIATTI. "Podridão branca da haste da soja: Manejo e uso de fungicidas em busca da sustentabilidade nos sistemas de produção." Uberlândia: Composer 2 (2010): 29.

JULIATTI, F. C., POLIZEL, A. C., & JULIATTI, F. C. (2004). Manejo integrado de doenças na cultura da soja. Uberlândia: EDUFU.

JULIATTI, F. C., & JULIATTI, F. C. A. (2010). Podridão branca da haste da soja: Manejo e uso de fungicidas em busca da sustentabilidade nos sistemas de produção. Uberlândia: Composer, 2, 29.

KAMAN, P. K., & DUTTA, P. (2017). In vitro evaluation of biosynthesized silver nanoparticles (Ag NPs) against soil borne plant pathogens. Int J Nanotechnol Appl, 11, 261-264.

KAMAN, P. K., & DUTTA, P. (2019). Synthesis, characterization and antifungal activity of biosynthesized silver nanoparticle. Indian Phytopathology, 72(1), 79-88.

KARACA, A., CETIN, S. C., TURGAY, O. C., & KIZILKAYA, R. (2010). Soil enzymes as indication of soil quality. In Soil enzymology (pp. 119-148). Springer, Berlin, Heidelberg.

KELLY, J. D., AFANADOR, L., & CAMERON, L. S. (1994). New races of Colletotrichum lindemuthianum in Michigan and implications in dry bean resistance breeding. Plant Disease, 78(9), 892-894.

KHAN, R., & FULEKAR, M. H. (2016). Biosynthesis of titanium dioxide nanoparticles using Bacillus amyloliquefaciens culture and enhancement of its photocatalytic activity for the degradation of a sulfonated textile dye Reactive Red 31. Journal of colloid and interface science, 475, 184-191.

KHATAMI, M., NEJAD, M. S., SALARI, S., & ALMANI, P. G. N. (2016). Plant-mediated green synthesis of silver nanoparticles using Trifolium resupinatum seed exudate and their antifungal efficacy on Neofusicoccum parvum and Rhizoctonia solani. IET nanobiotechnology, 10(4), 237-243.

KIEWNICK, S.; SIKORA, R. A. Biological control of the root-knot nematode Meloidogyne incognita by *Paecilomyces lilacinus* strain 251. v. 38, p. 179–187, 2006.

KIM, S. W., JUNG, J. H., LAMSAL, K., KIM, Y. S., MIN, J. S., & LEE, Y. S. (2012). Antifungal effects of silver nanoparticles (AgNPs) against various plant pathogenic fungi. Mycobiology, 40(1), 53-58.

KIRAN, G. S., SELVIN, J., MANILAL, A., & SUJITH, S. (2011). Biosurfactants as green stabilizers for the biological synthesis of nanoparticles. Critical reviews in biotechnology, 31(4), 354-364.

KIRTHI, A. V., RAHUMAN, A. A., RAJAKUMAR, G., MARIMUTHU, S., SANTHOSHKUMAR, T., JAYASEELAN, C., ... & BAGAVAN, A. (2011). Biosynthesis of titanium dioxide nanoparticles using bacterium *Bacillus subtilis*. Materials Letters, 65(17-18), 2745-2747.

KOCA, F. D., & DUMAN, F. (2019). Genotoxic and cytotoxic activity of green synthesized TiO2 nanoparticles. Applied Nanoscience, 9(5), 815-823.

KORA, A. J., MOUNIKA, J., & JAGADEESHWAR, R. (2020). Rice leaf extract synthesized silver nanoparticles: An in vitro fungicidal evaluation against *Rhizoctonia solani*, the causative agent of sheath blight disease in rice. Fungal Biology.

KRISHNARAJ, C., RAMACHANDRAN, R., MOHAN, K., & KALAICHELVAN, P. T. (2012). Optimization for rapid synthesis of silver nanoparticles and its effect on phytopathogenic fungi. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 93, 95-99.

LAMBERTH, C., JEANMART, S., LUKSCH, T., & PLANT, A. (2013). Current challenges and trends in the discovery of agrochemicals. Science, 341(6147), 742-746.

LAMOVŠEK, J.; UREK, G.; TRDAN, S. Biological Control of Root-Knot Nematodes (Meloidogyne spp .): Microbes against the Pests. n. september, p. 263–275, 2013.

LUCAS, J. A.; HAWKINS, N. J.; FRAAIJE, B. A. *The Evolution of Fungicide Resistance*. [S.l.]: Elsevier, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.aambs.2014.09.001>.

LEE, W. M., KWAK, J. I., & AN, Y. J. (2012). Effect of silver nanoparticles in crop plants *Phaseolus radiatus* and *Sorghum bicolor*: media effect on phytotoxicity. Chemosphere, 86(5), 491-499.

LIMA, R., SEABRA, A. B., & DURÁN, N. (2012). Silver nanoparticles: a brief review of cytotoxicity and genotoxicity of chemically and biogenically synthesized nanoparticles. Journal of Applied Toxicology, 32(11), 867-879.

LIN, D., & XING, B. (2007). Phytotoxicity of nanoparticles: inhibition of seed germination and root growth. Environmental pollution, 150(2), 243-250.

LUMBAQUE, E. C., GOMES, M. F., CARVALHO, V. D. S., DE FREITAS, A. M., & TIBURTIUS, E. R. L. (2017). Degradation and ecotoxicity of dye Reactive Black 5 after reductive-oxidative process. Environmental Science and Pollution Research, 24(7), 6126-

6134.

LUZ, E. D. M. N. (1978). Principais enfermidades do feijão (Phaseolus vulgaris L.) no Estado do Acre. I. Microregião do Alto Purus. Embrapa Acre-Comunicado Técnico (INFOTECA-E).

MAYNARD, A. D. Don't define nanomaterials. *Nature*, v. 475, n. 7354, p. 31, 2011.

MEYER, M. C. (2002). Caracterização de Rhizoctonia solani Kühn, agente causal da mela da soja (Glycine max (L.) Merrill), seleção de genótipos e controle químico.

MITTAL, J., SINGH, A., BATRA, A., & SHARMA, M. M. (2017). Synthesis and characterization of silver nanoparticles and their antimicrobial efficacy. Particulate Science and Technology, 35(3), 338-345.

MONTESINOS, E. Development , registration and commercialization of microbial pesticides for plant protection. p. 245–252, 2003.

NAUEN, R.; DENHOLM, I. Resistance of Insect Pests to Neonicotinoid Insecticides : Current Status and Future Prospects. v. 215, p. 200–215, 2005.

OERKE, E. C.; DEHNE, H. W. Safeguarding production - Losses in major crops and the role of crop protection. *Crop Protection*, v. 23, n. 4, p. 275–285, 2004.

OLIVEIRA, J. A., & MACHADO, J. C. (1991). Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (Cucumis sativus L.) e pimentão (Capsicum annum L.). Lavras MG. Universidade Federal de Lavras.

ONESIROSAN, P. T. (1975). Seedborne and weedborne inoculum in web blight [*Rhizoctonia solani*] of cowpea [Fungus diseases]. Plant Disease Reporter.

ONGENA, M.; JACQUES, P. Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in microbiology*, v. 16, n. 3, p. 115–125, 2008.

ÓRDENES-AENISHANSLINS, N. A., SAONA, L. A., DURÁN-TORO, V. M., MONRÁS, J. P., BRAVO, D. M., & PÉREZ-DONOSO, J. M. (2014). Use of titanium dioxide nanoparticles biosynthesized by *Bacillus mycoides* in quantum dot sensitized solar cells. Microbial cell factories, 13(1), 90.

PAKRASHI, S., JAIN, N., DALAI, S., JAYAKUMAR, J., CHANDRASEKARAN, P. T., RAICHUR, A. M., ... & MUKHERJEE, A. (2014). In vivo genotoxicity assessment of titanium dioxide nanoparticles by Allium cepa root tip assay at high exposure concentrations. PloS one, 9(2), e87789.

PALOMINO, J.-C. *et al.* Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 46, n. 8, p. 2720–2722, 2002.

PÉREZ-GARCÍA, A.; ROMERO, D.; DE VICENTE, A. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: Biotechnological applications of Bacilli in agriculture.

Current Opinion in Biotechnology, v. 22, n. 2, p. 187–193, 2011.

PŁAZA, G. A., CHOJNIAK, J., & BANAT, I. M. (2014). Biosurfactant mediated biosynthesis of selected metallic nanoparticles. International Journal of Molecular Sciences, 15(8), 13720-13737.

RABBEE, M. F., ALI, M., CHOI, J., HWANG, B. S., JEONG, S. C., & BAEK, K. H. (2019). *Bacillus velezensis*: a valuable member of bioactive molecules within plant microbiomes. Molecules, 24(6), 1046.

RAVA, C., MOLINA, J., KAUFFMAN, M., & BRIONES, I. (1991). Determinación de razas fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* en Nicaragua. Ministerio de Agricultura y Ganadería, Estelí (Nicaragua). Centro Nacional de Investigación de Granos Básicos.

REDDY, A. S., CHEN, C. Y., BAKER, S. C., CHEN, C. C., JEAN, J. S., FAN, C. W., ... & WANG, J. C. (2009). Synthesis of silver nanoparticles using surfactin: A biosurfactant as stabilizing agent. Materials letters, 63(15), 1227-1230.)

RIGOTTO, R. M. Pesticide use in Brazil and problems for public health Uso de agrotóxicos no Brasil e problemas para a saúde pública Uso de pesticidas en Brasil y los problemas para la salud pública. v. 30, n. 7, p. 1360–1362, 2014.

ROCHA, R. P. D. (2007). Manejo da podridão de Sclerotinia (*Sclerotinia sclerotiorum*) e Míldio (Bremia lactucae) na cultura de alface.

SARTORATO, A., & RAVA, C. A. (1994). Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle. EMBRAPA-CNPAF. Documentos.

SÁNCHEZ-BAYO, F.; TENNEKES, H. A. Environmental Risk Assessment of Agrochemicals — A Critical Appraisal of Current Approaches. p. 1–38, [S.d.].

SCHALLMEY, M.; SINGH, A.; WARD, O. P. Developments in the use of Bacillus species for industrial production. *Canadian journal of microbiology*, v. 50, n. 1, p. 1–17, 2004.

SCHMITZ, J.; HAHN, M.; BRÜHL, C. A. Agriculture , Ecosystems and Environment Agrochemicals in field margins – An experimental field study to assess the impacts of pesticides and fertilizers on a natural plant community. *"Agriculture, Ecosystems and Environment"*, v. 193, p. 60–69, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.agee.2014.04.025>.

SCHLOTER, M., DILLY, O., & MUNCH, J. C. (2003). Indicators for evaluating soil quality. Agriculture, Ecosystems & Environment, 98(1-3), 255-262.

SCHRÖFEL, A., KRATOŠOVÁ, G., ŠAFAŘÍK, I., ŠAFAŘÍKOVÁ, M., RAŠKA, I., & SHOR, L. M. (2014). Applications of biosynthesized metallic nanoparticles–a review. Acta biomaterialia, 10(10), 4023-4042.

SCHWARTZ, H. F., & CORRALES, M. A. P. (Eds.). (1989). Bean production problems in the tropics. CIAT.

SEKHON, B. S. Nanotechnology in agri-food production: an overview. *Nanotechnology, science and applications*, v. 7, p. 31, 2014.

SHARMA, V. K.; YNGARD, R. A.; LIN, Y. Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 145, n. 1–2, p. 83–96, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cis.2008.09.002>.

SHENDE, S., GAIKWAD, N., & BANSOD, S. (2016). Synthesis and evaluation of antimicrobial potential of copper nanoparticle against agriculturally important phytopathogens. Synthesis, 1(4), 41-47.

SHI, H., MAGAYE, R., CASTRANOVA, V., & ZHAO, J. (2013). Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. Particle and fibre toxicology, 10(1), 15.

SHODA, M. Bacterial control of plant diseases. *Journal of bioscience and bioengineering*, v. 89, n. 6, p. 515–521, 2000.

SIMONIN, M., RICHAUME, A., GUYONNET, J. P., DUBOST, A., MARTINS, J. M., & POMMIER, T. (2016). Titanium dioxide nanoparticles strongly impact soil microbial function by affecting archaeal nitrifiers. Scientific reports, 6(1), 1-10.

SIEUWERTS, A. M., KLIJN, J. G., PETERS, H. A., & FOEKENS, J. A. (1995). The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: how to use this assay reliably to measure metabolie activity of cell cultures in vitro for the assessment of growth characteristics, IC50-values and cell survival.

SMAGGHE, G. Neonicotinoids in bees : a review on concentrations , side-effects and risk assessment. p. 973–992, 2012.

STEADMAN, J. R. (1983). White mold--a serious yield-limiting disease of bean. Plant Disease, 67(4), 346-350.

SUNKAR, S., NACHIYAR, C. V., LERENSHA, R., & RENUGADEVI, K. (2014). Biogenesis of TiO2 nanoparticles using endophytic *Bacillus cereus*. Journal of nanoparticle research, 16(11), 2681.

SURIYARAJ, S. P., & SELVAKUMAR, R. (2014). Room temperature biosynthesis of crystalline TiO_2 nanoparticles using *Bacillus licheniformis* and studies on the effect of calcination on phase structure and optical properties. RSC Advances, 4(75), 39619-39624.

SYED ALI, M., ANURADHA, V., SRIPRIYA, V., YOGANANTH, N. AND SHEEBA, H. 2017. "Evaluation of anti-genotoxicity of the TiO2 nanoparticle biosynthesized from *Turbinaria conoides*", International Journal of Current Research, 9, (10), 59085-59091.

TABATABAI, M. A. (1994). Soil enzymes. Methods of Soil Analysis: Part 2 Microbiological and Biochemical Properties, 5, 775-833.

TESTER, M.; LANGRIDGE, P. Breeding technologies to increase crop production in a

changing world. *Science*, v. 327, n. 5967, p. 818–822, 2010.

TIAN, B.; YANG, J.; ZHANG, K. Bacteria used in the biological control of plant-parasitic nematodes : populations , mechanisms of action , and future prospects. 2007.

TRIPATHI, D. K., SINGH, S., SINGH, S., PANDEY, R., SINGH, V. P., SHARMA, N. C., ... & CHAUHAN, D. K. (2017). An overview on manufactured nanoparticles in plants: uptake, translocation, accumulation and phytotoxicity. Plant Physiology and Biochemistry, 110, 2-12.

TOMAR, R. S., BANERJEE, S., KAUSHIK, S., SINGH, S., & VIDYARTHI, A. S. (2015). Microbial synthesis of gold nanoparticles by biosurfactant producing Pseudomonas aeruginosa. Int. J. Adv. Life Sci., 8(4), 520-527.

TSAVKELOVA, E. A. *et al.* Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, v. 42, n. 2, p. 117–126, 2006.

UNITED NATIONS DEPARTMENT OF ECONOMIC AND SOCIAL AFFAIRS/POPULATION DIVISION. *World Population Prospects: The 2008 Revision*. . New York: [s.n.], 2017.

VERMA, D. K., PATEL, S., & KUSHWAH, K. S. (2020). Green biosynthesis of silver nanoparticles and impact on growth, chlorophyll, yield and phytotoxicity of Phaseolus vulgaris L. Vegetos, 1-10.

VIDIGAL-FILHO, P. S., GONÇALVES-VIDIGAL, M. C., KELLY, J. D., & KIRK, W. W. (2007). Sources of resistance to anthracnose in traditional common bean cultivars from Paraná, Brazil. Journal of phytopathology, 155(2), 108-113.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Um grande número de estudos sobre a síntese biogênica de nanopartículas metálicas vem sendo reportados, entretanto, pouco direcionamento tem sido dado para nanopartículas de titânio, principalmente no que tange a utilização de agentes de controle biológico como mediadores da síntese e sua aplicação como alternativa para gargalos atuais na agricultura. Diante disto, evidencia-se a relevância do presente trabalho, tendo em vista o potencial inibitório das nanopartículas de titânio frente a três fitopatógenos de relevância agrícola bem como seu potencial de incremento na atividade de agentes de controle biológico. Por nosso conhecimento, esse é o primeiro trabalho que realiza a síntese biogênica de nanopartículas de titânio com o agente de controle biológico *Bacillus velezensis* AVLG-005 e investiga sua atividade contra os fitopatógenos reportados. Além disso, considerando a relevância da segurança no desenvolvimento de nanomateriais ambientalmente assegurados, foram realizados ensaios para a avaliação dos possíveis efeitos tóxicos das nanopartículas, sendo observados baixos níveis de citotoxicidade e ausência de genotoxicidade, com variações conforme as linhagens celulares e organismos expostos.

Em sintonia com os resultados satisfatórios, ainda se fazem necessárias maiores investigações para uma compreensão mais profunda da composição deste nanomaterial, principalmente no que tange ao possível recobrimento de biomoléculas e seu impacto na atividade e características físico-químicas das nanopartículas. O entendimento da sistemática de funcionamento de nanomateriais ainda é uma ciência de compreensão em crescimento, entretanto, muitos trabalhos já têm reportado seu potencial como agente transformador de gargalos atuais em rotas tecnológicas de soluções para a agricultura.

6 REFERÊNCIAS

ADENIJI, A. A., & BABALOLA, O. O. (2019). Bacillus velezensis: phylogeny, useful applications, and avenues for exploitation. Applied microbiology and biotechnology, 103(9), 3669-3682.

BURGES, H. D. (2012). Formulation of microbial biopesticides: beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments. Springer Science & Business Media.

DITTA, A. (2012). How helpful is nanotechnology in agriculture?. Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology, 3(3), 033002.

FAN, B., WANG, C., SONG, X., DING, X., WU, L., WU, H., ... & BORRISS, R. (2018). Bacillus velezensis FZB42 in 2018: the gram-positive model strain for plant growth promotion and biocontrol. Frontiers in microbiology, 9, 2491.

GHORMADE, V., DESHPANDE, M. V., & PAKNIKAR, K. M. (2011). Perspectives for nano-biotechnology enabled protection and nutrition of plants. Biotechnology advances, 29(6), 792-803.

KOGAN, M. (1998). Integrated pest management: historical perspectives and contemporary developments. Annual review of entomology, 43(1), 243-270.

LEGGETT, M., LELAND, J., KELLAR, K., & EPP, B. (2011). Formulation of microbial biocontrol agents–an industrial perspective. Canadian Journal of Plant Pathology, 33(2), 101-107.

MEENA, R. S., KUMAR, S., DATTA, R., LAL, R., VIJAYAKUMAR, V., BRTNICKY, M., ... & PATHAN, S. I. (2020). Impact of agrochemicals on soil microbiota and management: A review. Land, 9(2), 34.

MANJUNATHA, S. B., BIRADAR, D. P., & ALADAKATTI, Y. R. (2016). Nanotechnology and its applications in agriculture: A review. J. farm Sci, 29(1), 1-13.

PRASAD, R., BHATTACHARYYA, A., & NGUYEN, Q. D. (2017). Nanotechnology in sustainable agriculture: recent developments, challenges, and perspectives. Frontiers in microbiology, 8, 1014.

PYLRO, V. S., DIAS, A. C. F., ANDREOTE, F. D., MORAIS, D. K., DE MELLO VARANI, A., ANDREOTE, C. C. F., ... & ZUCCHI, T. (2018). Closed Genome Sequence of Phytopathogen Biocontrol Agent Bacillus velezensis Strain AGVL-005, Isolated from Soybean. Genome announcements, 6(7).

SHARMA, D., KANCHI, S., & BISETTY, K. (2019). Biogenic synthesis of nanoparticles: A review. Arabian journal of chemistry, 12(8), 3576-3600.

SINGH, A., BHARDWAJ, R., & SINGH, I. K. (2019). Biocontrol Agents: Potential of Biopesticides for Integrated Pest Management. In Biofertilizers for Sustainable Agriculture and Environment (pp. 413-433). Springer, Cham.

SAVARY, S., WILLOCQUET, L., PETHYBRIDGE, S. J., ESKER, P., MCROBERTS, N., & NELSON, A. (2019). The global burden of pathogens and pests on major food crops. Nature ecology & evolution, 3(3), 430-439.