

Avaliação da atividade de nanopartículas de prata no controle de fitopatógenos

Evaluation of the activity of silver nanoparticles in the control of phytopathogens

RESUMO

Gabriela Cristina Pardiniho da Silva Souza
gabrielapardiniho@hotmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, Paraná, Brasil

Juliana Feijó de Souza Daniel
julianafeisouza@gmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, Paraná, Brasil

O objetivo do trabalho foi verificar a atividade antifúngica dos nanomateriais AgNWs e AuNBs no controle do fitopatógeno *Fusarium oxysporum*. Os testes foram realizados em meio BDA primeiramente nas concentrações de 5, 25, 45, 65 e 85 µg/placa de nanofios de prata (AgNWs) em triplicatas, no segundo teste aumentou-se a concentração para 10, 30 e 50 mg/placa do material em quintuplicatas e o terceiro teste realizado usou-se nanobastões de ouro (AuNBs) em solução aquosa. Para este último teste usou-se 20, 40 e 60 µL/placa da solução de concentração desconhecida para a realização dos testes em quintuplicatas. Os testes foram submetidos a irradiação de luz ultravioleta e também sem a irradiação. Em paralelo um teste antifúngico utilizando um fungicida foi preparado com intuito de comparação com os resultados dos tratamentos. A partir das medidas dos halos de crescimento dos fungos e cálculo da porcentagem de inibição durante 8 dias, em todos os testes não houve inibição de crescimento, somente no teste realizado com o fungicida.

PALAVRAS-CHAVE: Nanomateriais. Nanofios. Antifúngico.

Recebido: 19 ago. 2019.

Aprovado: 01 out. 2019.

Direito autorial: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



ABSTRACT

The objective of this work was to verify the antifungal activity of nanomaterials AgNWs and AuNBs in the control of phytopathogen *Fusarium oxysporum*. The tests were performed in BDA medium primarily at concentrations of 5, 25, 45, 65 and 85 µg/dish silver nanowires (AgNWs) in triplicates, in the second test the concentration was increased to 10, 30 and 50 mg/dish of quintuplicate material. and the third test was performed using gold nanobasts (AuNBs) in aqueous solution. For this last test, 20, 40 and 60 µL/dish of unknown concentration solution were used to perform the tests in quintuplicates. The tests were subjected to ultraviolet light irradiation and also without irradiation. In parallel an antifungal test using a fungicide was prepared for comparison with treatment results. From the measurements of fungal growth halos and calculation of the inhibition percentage during 8 days, in all tests there was no growth inhibition, only in the fungicide test.

KEYWORDS: Nanomaterials. Nanowires. Antifungal.

INTRODUÇÃO

O controle de doenças em plantações é uma das vertentes mais importantes para agricultura. Um dos grandes problemas é a antracnose, um sintoma fitopatológico que resulta da infecção das plantas por microrganismos como bactérias, vírus e várias espécies de fungos, sendo alguns dos gêneros *Colletrotrichum*, *Sclerotinia* e *Fusarium*. O controle dessas doenças é realizado principalmente pela aplicação de fungicidas sintéticos, no entanto, esses produtos estão perdendo sua eficiência, já que os fungos estão adquirindo resistência contra seu uso e além disso podem acarretar sérios problemas para a saúde humana.

Uma das alternativas para o controle dessas doenças está ligada ao uso de nanopartículas metálicas, devido as suas propriedades antimicrobianas, que podem ser provenientes da sua grande área superficial e também da interação química dos íons metálicos com a estrutura do microrganismo (Aguilar-Mendéz et al. 2011). Dentre esses materiais destacam-se as nanopartículas de prata, de acordo com Woo et al (2009) esses materiais podem causar danos as hifas fúngicas resultando em vazamento de citoplasma e eventualmente levando a morte do fungo. O objetivo do trabalho foi verificar a atividade antifúngica dos nanomateriais AgNWs e AuNBs no controle do fitopatógeno *Fusarium oxysporum*.

MATERIAIS E MÉTODOS

REATIVAÇÃO DO FUNGO

O fungo do gênero *Fusarium* disponível na micoteca do laboratório do Grupo QuimiBio-UTFPR, identificado com *Fusarium oxysporum* (9886) foi inoculado em placa de petri contendo meio BDA (batata, dextrose e ágar) por um período de 7 a 10 dias.

AQUISIÇÃO DO MATERIAL

Os materiais para os testes foram cedidos pelo grupo de Dispositivos Fotônicos e Materiais Nanoestruturados – UTFPR, Campus Londrina, em colaboração com o Prof. Dr. Sidney Alves Lourenço, sendo eles nanofios de prata (AgNWs) suspensos em etanol e solução de nanobastões de ouro (AuNBs) em água, ambas com concentrações desconhecidas.

TESTE ANTIFÚNGICO 1

Para o primeiro teste foram pegos 200 µL da suspensão de AgNws para realizar a secagem do etanol na estufa a 50°C, após secar o etanol adicionou-se água. Foram então determinadas as concentrações de 5, 25, 45, 65 e 85 µg/placa da solução de AgNWs em água para o teste. O teste foi realizado em triplicata e em meio de cultivo BDA, com e sem a irradiação de luz ultravioleta. Após a mistura do material com o meio, metade dos testes foram deixados por uma hora sob luz UV. Foram retirados pedaços de 5mm de diâmetro contendo o micélio fúngico de uma placa de petri com o fungo puro e inoculados nos meios de tratamento e de

controle. Foram realizadas medidas do diâmetro (cm) do micélio por um período de 8 dias, para monitorar o crescimento do fungo.

TESTE ANTIFÚNGICO 2

Para o segundo teste foram pegos alguns mLs da suspensão de AgNws para realizar a secagem do etanol na estufa a 50°C, após secar o etanol adicionou-se água. Foram então determinadas as concentrações de 10, 30 e 50 mg/placa da solução de AgNWs em água para o teste. O teste foi realizado em quintuplicata e em meio de cultivo BDA, com e sem a irradiação de luz ultravioleta. Após a mistura do material com o meio, metade dos testes foram deixados por uma hora sob luz UV. Foram retirados pedaços de 5mm de diâmetro contendo o micélio fúngico de uma placa de petri com o fungo puro e inoculados nos meios de tratamento e de controle. Foi realizado medidas do diâmetro(cm) do micélio por um período de 8 dias, para monitorar o crescimento do fungo.

TESTE ANTIFÚNGICO 3

Para o terceiro teste foram pegos 20, 40 e 60 µL/placa da solução desconhecida de AuNBs em água para o teste. O teste foi realizado em quintuplicata e em meio de cultivo BDA, com e sem a irradiação de luz ultravioleta. Após a mistura do material com o meio, metade dos testes foram deixados por uma hora sob luz UV. Foram retirados pedaços de 5mm de diâmetro contendo o micélio fúngico de uma placa de petri com o fungo puro e inoculados nos meios de tratamento e de controle. Foi realizado medidas do diâmetro(cm) do micélio por um período de 8 dias, para monitorar o crescimento do fungo.

Neste teste usou-se 0,003g do fungicida Fluazinam disponível no laboratório que foi diluído em 100mL de água destilada autoclavada, da qual foi pego 0,8 ml para cada placa do teste. O teste foi realizado em meio de cultivo BDA como um segundo controle. Foram retirados pedaços de 5mm de diâmetro contendo o micélio fúngico de uma placa de petri com o fungo puro e inoculados nos meios. Foi realizado medidas do diâmetro(cm) do micélio por um período de 8 dias, para monitorar o crescimento do fungo e comparar com os resultados dos tratamentos com os nanomateriais.

Durante todos os dias de todos os testes o crescimento dos halos do fungo *Fusarium* 9886 foi observado e medido com o auxílio de uma régua. O cálculo da porcentagem de inibição foi feito a partir da Equação (1) (TARIQ; YASMIN; HAFEEZ, 2010).

$$\text{Taxa de inibição} = \left(1 - \frac{\text{Diâmetro do tratamento}}{\text{Diâmetro do controle}}\right) \times 100\% \quad (1)$$

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O valores médios dos diâmetros dos halos fúngicos estão dispostos nas Tabelas de 1 a 3, referente aos três testes respectivamente.

Tabela 1 – Média do diâmetro dos halos do primeiro teste antifúngico realizado sob tratamento de 5, 25, 45, 65 e 85 µg/placa de AgNWs.

Média do diâmetro do halo (cm)												
Dia	Sem luz UV						Com luz UV					
	5 µg	25 µg	45 µg	65 µg	85 µg	Controle	5 µg	25 µg	45 µg	65 µg	85 µg	Controle
1	1,1	1,1	1,0	1,0	1,1	1,1	1,1	1,0	1,1	1,1	1,1	1,1
2	2,5	2,4	2,2	2,0	2,2	2,2	2,2	2,2	2,3	2,1	2,2	2,3
3	3,4	3,3	3,0	2,8	3,0	3,0	3,2	3,2	3,2	2,9	3,0	3,2
4	4,4	4,2	3,9	3,7	3,9	3,9	4,2	4,3	4,2	3,8	3,9	4,1
5	5,4	5,1	4,7	4,5	4,8	4,8	5,2	5,3	5,2	4,6	4,9	5,1
6	6,4	6,1	5,6	5,3	5,7	5,8	6,3	6,3	6,3	5,5	5,9	6,1
7	7,3	6,9	6,5	5,9	6,5	6,6	7,1	7,3	7,1	6,2	6,8	6,9
8	8,5	8,0	7,4	6,8	7,5	7,7	8,2	8,4	8,2	7,2	7,6	8,0

Fonte: Autoria própria (2019).

Tabela 2 – Média do diâmetro dos halos do segundo teste antifúngico realizado sob tratamento de 10,30 e 50 mg/placa de AgNWs.

Média do diâmetro do halo (cm)								
Dia	Sem luz UV				Com luz UV			
	10 mg	30 mg	50 mg	Controle	10 mg	30 mg	50 mg	Controle
1	1,2	1,2	1,2	1,3	1,2	1,2	1,2	1,3
2	1,9	1,9	1,8	2,0	1,9	1,9	1,8	2,0
3	2,4	2,5	2,4	2,6	2,5	2,4	2,3	2,6
4	3,1	3,0	3,0	3,2	3,1	3,0	2,9	3,2
5	3,7	3,5	3,5	3,8	3,7	3,5	3,4	3,7
6	4,3	4,1	4,1	4,5	4,3	4,1	4,0	4,4
7	5,0	4,9	4,9	5,2	4,9	4,9	4,8	5,2
8	5,7	5,8	5,7	6,0	5,5	5,6	5,6	6,0

Fonte: Autoria própria (2019).

Tabela 3 – Média do diâmetro dos halos do terceiro teste antifúngico realizado sob tratamento de 20, 40 e 60 µL/placa de AuNBs.

Média do diâmetro do halo (cm)								
Dia	Sem luz UV				Com luz UV			
	20 µL	40 µL	60 µL	Controle	20 µL	40 µL	60 µL	Controle
1	1,7	1,7	1,7	1,7	1,8	1,8	1,7	1,7
2	2,9	2,9	2,9	2,9	3,1	3,0	3,0	3,0
3	4,1	4,1	4,0	4,0	4,3	4,2	4,2	4,3
4	4,9	4,9	4,8	4,8	5,2	5,1	5,0	5,2
5	5,7	5,7	5,6	5,5	6,0	5,9	5,7	6,1
6	6,5	6,5	6,5	6,5	6,8	6,7	6,5	6,9
7	7,2	7,2	7,3	7,4	7,6	7,5	7,4	7,6
8	8,1	8,0	8,1	8,3	8,4	8,3	8,1	8,3

Fonte: Autoria própria (2019).

A porcentagem de inibição de acordo com a Equação 1 foi de 0% para todos os testes realizados, tanto para os AgNWs, nos dois testes em concentrações variáveis, quanto para os AuNBs, no último teste.

Como pode-se observar analisando os dados coletados com os teste não mostraram significativa inibição do crescimento do fungo *Fusarium* (9886), já que as medidas para cada tratamento em cada teste realizado se mostraram iguais, tanto em relação aos controles, quanto quando comparado com e sem a irradiação de luz UV.

O que pode-se observar de mudança nesse crescimento é a taxa de crescimento dos teste 1 e 2. Para o primeiro teste obteve-se um crescimento de aproximadamente 8 cm em oito dias, logo uma taxa de 1cm/dia, enquanto que no segundo teste em oito dias o crescimento corresponde a cerca de 6 cm resultando em uma taxa de 0,75cm/dia. Logo percebe-se que com o aumento da concentração do material no meio houve uma redução da velocidade de crescimento do fungo.

No trabalho de Aguilar-Méndez et al. (2011) os testes foram realizados com dois diferentes tamanhos de nanopartículas de prata (AgNPs) em três diferentes concentrações. O teste foi realizado contra o fungo *Colletotrichum gloesporioides*, que mostrou alta inibição de crescimento do fungo para os dois tamanhos de partícula, ficando entre 73% a 89% de inibição, de acordo com a variação de concentração, maiores concentrações de nanopartículas maior se mostrou a inibição do crescimento do fungo.

Para o teste controle realizado com o fungicida obteve-se os resultados mostrados na tabela 4 dos quais percebe-se uma inibição de crescimento em relação ao controle de aproximadamente 60%.

Tabela 4 – Média do diâmetro dos halos do teste antifúngico realizado com fungicida.

Dia		1	2	3	4	5	6	7	8
Média do halo (cm)	Controle	1,7	2,9	4,0	4,8	5,5	6,5	7,4	8,3
	Fungicida	0,5	0,9	1,3	1,7	2,0	2,4	2,8	3,3

CONCLUSÃO

Este projeto é de suma importância econômica e ambiental, portanto é importante a continuidade do mesmo com novos materiais que possuam propriedades antimicrobianas a serem exploradas.

AGRADECIMENTOS

A Prof Dr^a Juliana Feijó pelo empenho dedicado à elaboração deste trabalho. Ao grupo de pesquisa de Dispositivos Fotônicos e Materiais Nanoestruturados – UTFPR, Campus Londrina, por ceder gentilmente o material. A DIRPPG e PROPPG pelos recursos financeiros através de editais internos.

REFERÊNCIAS

Aguilar-Méndez, M. A., San Martín-Martínez, E., Ortega-Arroyo, L., Cobián-Portillo, G., & Sánchez-Espíndola, E. Synthesis and characterization of silver

nanoparticles: effect on phytopathogen *Colletotrichum gloesporioides*. *Journal of Nanoparticle Research* (2011) 13:2525–2532.

Woo K.S., Kim, K.S., Lamsal, K., Kim, Y.-J., Kim, S.B., Jung, M., Sim, S.-J., Kim, H.-S., Chang, S.-J., Kim, J. K., Lee, Y. S. An In Vitro Study of the Antifungal Effect of Silver Nanoparticles on Oak Wilt Pathogen *Raffaelea* sp. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2009 ; 19(8): 760~764. Disponível em:
<http://www.jmb.or.kr/journal/viewJournal.html?year=2009&vol=19&num=8&page=760>. Acesso em: 15 ago. 2019.

Lee, K.-J., Park, S.-H., Govarthanan, M., Hwang, P.-H., Seo, Y.-S., Cho, M., Lee, W.-H., Lee, J.-Y., Kamala-Kannan, S., Oh, B.-T. Synthesis of silver nanoparticles using cow milk and their antifungal activity against phytopathogens. *Materials Letters*, 105, 128–131 (2013). Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0167577X13005508>. Acesso em: 10 abr. 2019.

Raja muthuramalingam, T., Shanmugam, C., Gunasekaran, D., Duraisamy, N., Nagappan, R., & Krishnan, K.. Bioactive bile salt-capped silver nanoparticles activity against destructive plant pathogenic fungi through in vitro system. *RSC Advances*, (2015) 5(87), 71174–71182. Disponível em:
<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2015/ra/c5ra13306h#!divAbstract>. Acesso em: 10 abr. 2019.

Tariq, M., Yasmin, S., Hafeez, F. Y. Biological control of potato black scurf by rhizosphere associated bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology* (2010) 41: 439-451. Disponível em:
https://www.researchgate.net/publication/247852273_Biological_control_of_potato_black_scurf_by_rhizosphere_associated_bacteria. Acesso em: 15 ago. 2019.