

Nanopartículas de prata sintéticas, biogênicas e o nitrato de prata no metabolismo e desenvolvimento de plantas de sorgo

Ana Beatriz Sicchieri Ziotti

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutora no Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Interunidades entre o Instituto de Biociências do campus de Botucatu e Instituto de Biociências do campus de Rio Claro.

BOTUCATU – SP

2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

Nanopartículas de prata sintéticas, biogênicas e o nitrato de prata no
metabolismo e desenvolvimento de plantas de sorgo

Ana Beatriz Sicchieri Ziotti

ORIENTADOR: Profº Drº Milton Costa Lima Neto

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutora no Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Interunidades entre o Instituto de Biociências do campus de Botucatu e Instituto de Biociências do campus de Rio Claro.

BOTUCATU – SP

2023

Ficha catalográfica

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Ziotti, Ana Beatriz Sicchieri.

Nanopartículas de prata sintéticas, biogênicas e o nitrato de prata no metabolismo e desenvolvimento de plantas de sorgo / Ana Beatriz Sicchieri Ziotti. - Botucatu, 2023

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Milton Costa Lima Neto

Capes: 20303009

1. Nanotecnologia. 2. Nanopartículas. 3. Est oxidativo. 4. Fotossíntese. 5. Sorgo. 6. Stress (Fisiologia). 7. Correlação de dados.

Palavras-chave: Correlações; Estresse oxidativo; Fisiologia do estresse; Fotossíntese; Nanotecnologia.

Dedicatória

Este trabalho é dedicado à minha mãe Maria do Carmo Sicchieri, à minha irmã Vanessa Regina Sicchieri Ziotti, ao meu cunhado Gustavo João Rodrigues Pinto e à minha companheira Barbara de Castro Piauilino, os quais constituem meu núcleo familiar e minha fortaleza.

Agradecimentos

Agradeço inicialmente aos apoios financeiros a mim fornecidos para a realização desta pesquisa. Sem eles a efetivação do trabalho não seria possível, nem mesmo minha própria permanência em dedicação exclusiva à pós-graduação. Começo, citando a FAPESP (processo: 2019/19601-0) pelo apoio inicial com o fornecimento de bolsa para realização do programa de treinamento técnico exercido enquanto ainda não havia sido contemplada com a bolsa CNP-q de Mestrado (processo: 132518/2020-1), a qual se manteve vigente até minha promoção para o Doutorado direto. O presente trabalho foi realizado também com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento: 88887.513856/2020-00 com uma bolsa de Doutorado.

Agradeço a toda a equipe do Laboratório de Micologia e Aplicações Biotecnológicas e Nanotecnológicas (MICOBIO-NANOTEC) da UNESP IB CLP coordenado pela Prof. Dr^a Cristiane Angélica Ottoni, por toda a presteza como a produção e caracterização das AgNP. Agradeço ao Prof. Dr^o Luiz Fernando Rolim de Almeida por me receber em seu laboratório quando necessário. Agradeço também a Prof. Dra Carmem Silva Fernandes Boaro pelo empréstimo do Irga, conjuntamente com Felipe Giroto, o qual me auxiliou em todas as mensurações com equipamento.

Agradeço ao meu colega Mateus Zambon por todo auxílio excepcionalmente prestado com a edição dos textos e interpretações estatísticas. Agradeço ao Laboratório de Metabolismo de plantas (LAMEP) da UNESP IB CLP, por ser a base operacional de toda a pesquisa, citando ainda, a minha colega Heloísa Saballo pelo apoio técnico em boa parte da execução do projeto. Por fim, agradeço imensamente ao meu colega e orientador Prof. Dr^o Milton Costa Lima Neto por ter lapidado toda a trajetória deste trabalho, sempre me orientado nas tomadas de decisões importantes.

Prefácio

A presente tese de doutorado apresenta-se dividida em capítulos, os quais são constituídos cada um por um artigo independente que conjuntamente com os demais compõem a investigação completa proposta pelo objetivo geral do trabalho. A pergunta a tentar ser respondida por este estudo é: “Nanopartículas de prata (AgNP) de origens distintas (biogênicas ou sintéticas) causam respostas diferentes ao metabolismo de plantas?”.

Assim, em primeira instância, procuramos traçar um epítome geral sobre o tema trazendo uma revisão bibliográfica crítica, na qual tecemos e integramos os conceitos e as aplicações nanotecnológicas que compreendem a produção e a utilização das AgNP e sua interação com o metabolismo de plantas (capítulo 1). Posteriormente, seguimos com os capítulos de cunho experimental divididos em dois artigos. O primeiro (capítulo 2), contempla a análise investigativa da interação nanopartícula-planta, utilizando uma AgNP de origem biogênica produzida por fungos endofíticos e a sua matriz produtiva, o nitrato de prata (AgNO_3), em plantas de sorgo. Em seguida, na última seção experimental (capítulo 3), comparamos os padrões metabólicos das plantas de sorgo expostas a uma AgNP de origem biogênica, produzida por um fungo marinho, com uma AgNP de origem sintética e AgNO_3 . Por fim, trazemos um segmento final o qual contempla as considerações finais desta tese de doutorado.

Lista de abreviaturas e siglas

AgNP	Nanopartículas de prata
AgNP-b	Nanopartículas de prata biogênica
AgNP-s	Nanopartículas de prata sintética
AgNO ₃	Nitrato de prata
FvFm	Rendimento quântico máximo
Y(II)	Rendimento quântico efetivo
PSII	Fotossistema II
NPQ	Quenching não-fotoquímico
SOD	Superóxido dismutase
APX	Ascorbato peroxidases
CAT	Catalase
DM	Dano de membrana
CRA	Conteúdo relativo de água
PCA	Análise de componente principal
GSH	Glutathione reduzida
GSSG	Glutathione oxidada
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

Sumário

Capítulo 1: Interações entre nanopartículas de síntese verde e o metabolismo de plantas.....	1
Resumo.....	2
Abstract.....	3
Introdução.....	4
Mecanismos produtivos que diferenciam as AgNP biogênicas e sintéticas.....	5
O método produtivo das AgNP parece modular os efeitos no desenvolvimento das plantas expostas aos nanoproductos.....	7
O metabolismo antioxidativo das plantas é modulado de maneira distinta perante a presença de diferentes formas de oferta de Ag ⁺	9
O método produtiva das AgNP não parece ser determinante na modulação dos efeitos fotossintéticos sofridos pelas plantas.....	12
AgNP: de tecnologias promissoras para tecnologias indispensáveis.....	14
Conclusão.....	17
Referências bibliográficas.....	18
Capítulo 2: Differential physiological responses of a biogenic silver nanoparticle and its production matrix silver nitrate in <i>Sorghum bicolor</i>.....	25
Abstract.....	26
Introduction.....	26
Materials and methods.....	28
Nanoparticle biosynthesis and characterization.....	28

Plant material and growth conditions.....	28
Silver accumulation.....	28
Relative water content, membrane damage, and pigment content.....	28
Lipid peroxidation and hydrogen peroxide content.....	28
Preparation of crude extract, total soluble proteins, and enzymatic and non-enzymatic antioxidants.....	29
Morpho-anatomical characterization.....	29
Chlorophyll fluorescence analyses.....	29
Network analysis.....	29
Statistical analysis and experimental design.....	29
Results.....	29
Seed germination is less impacted by the exposure of AgNP than AgNO ₃	29
Silver accumulation impacts biomass accumulation and partition.....	30
Morpho-anatomical characterization.....	30
Stress indicators.....	31
Balance of photosynthetic yields in presence of AgNP and AgNO ₃	32
Hydrogen peroxide, enzymatic and non-enzymatic antioxidants.....	32
AgNP and AgNO ₃ alter the topology and connectivity of correlations-based networks.....	33
Discussion.....	33
Conclusions.....	36

References.....	37
-----------------	----

Capítulo 3: Nanopartículas de prata biogênica e sintética geram alterações metabólicas distintas em plantas de <i>Sorghum Bicolor</i>.....	40
---	-----------

Resumo.....	41
-------------	----

Abstract.....	42
---------------	----

Introdução.....	43
-----------------	----

Materiais e métodos.....	45
--------------------------	----

Obtenção e caracterização de nanopartículas de prata biogênica (AgNP-b) e nanopartículas de prata sintética (AgNP-s).....	45
---	----

Material vegetal.....	46
-----------------------	----

Ensaio de germinação.....	46
---------------------------	----

Crescimento e alocação de biomassa.....	47
---	----

Conteúdo relativo de água, dano de membrana e conteúdo de pigmentos.....	47
--	----

Peroxidação lipídica e teor de peróxido de hidrogênio.....	48
--	----

Preparação do extrato bruto e proteínas solúveis totais.....	48
--	----

Antioxidantes enzimáticos.....	48
--------------------------------	----

Trocas gasosas.....	49
---------------------	----

Fluorescência de clorofila a.....	49
-----------------------------------	----

Análise multivariada de componente principal (PCA).....	50
---	----

Redes de correlação.....	50
--------------------------	----

Delineamento experimental.....	50
--------------------------------	----

Resultados.....	51
Ensaio de germinação.....	51
Estabelecimento de plântulas.....	53
Indicadores de estresse.....	55
Peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) e antioxidantes enzimáticos.....	58
Trocax gasosa.....	60
Fluorescência de clorofila a.....	61
Análise multivariada de componentes principais (PCA).....	66
Topologia e conectividade de rede baseada na correlação de <i>Pearson</i>	67
Discussão.....	69
Efeitos da exposição de AgNO ₃ , AgNP-b e AgNP-s no crescimento e desenvolvimento de plantas de sorgo.....	69
Indicadores de estresse em plantas de sorgo expostas à AgNO ₃ , AgNP-b e AgNP-s.....	70
Aspectos do metabolismo antioxidante nas plantas expostas à AgNO ₃ , AgNP-b e AgNP-s.....	71
Plantas de sorgo expostas a AgNO ₃ , AgNP-b e AgNP-s apresentam indícios de restrição estomática e metabólica.....	72
Plantas de sorgo expostas a AgNO ₃ , AgNP-b e AgNP-s em concentrações superiores a 500 µM impactam negativamente o balanço fotossintético.....	73
Análise multivariada de componente principal (PCA).....	74
Redes de correlação.....	75
Conclusão.....	75

Referências bibliográficas.....	77
Considerações finais.....	86

Capítulo 1:

Interações entre nanopartículas de prata de síntese verde e o metabolismo de plantas

Este capítulo consiste em uma revisão bibliográfica crítica que integra os temas de nanotecnologia, nanopartículas de prata e as premissas das interações destes nanoprodutos com o metabolismo das plantas. Nesta primeira seção, apontamos e discutimos os diferentes efeitos fisiológicos e metabólicos sofridos pelas plantas expostas a AgNP oriundas de métodos produtivos sintéticos e biogênicos. Dessa forma, a partir de uma análise crítica, buscamos compreender se a modulação destes efeitos também está associada ao método de síntese das AgNP. O capítulo será submetido em forma de artigo nas normas da revista: "Theoretical and Experimental Plant Physiology", a qual apresenta fator de impacto de 2.656.

Interações entre nanopartículas de prata de síntese verde e o metabolismo de plantas

Ana Beatriz Sicchieri Ziotti^{1,2}, Milton Costa Lima Neto^{1,2}

¹Institute of Biosciences, São Paulo State University (UNESP), São Vicente, SP, Brazil

²Institute of Biosciences, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, SP, Brazil

ana.b.ziotti@unesp.br, milton.lima-neto@unesp.br

[Ana Beatriz S. Ziotti: ORCID https://orcid.org/0000-0002-7811-81000000-0002-7811-8100](https://orcid.org/0000-0002-7811-81000000-0002-7811-8100),
<https://orcid.org/MiltonMilton Costa Lima Neto: ORCID 0000-0002-8867-7301>

Resumo

As nanopartículas de prata (AgNP) são utilizadas em muitas indústrias e se apresentam como importantes ferramentas alternativas para a agricultura moderna, prevenção de doenças e tratamento de água no mundo globalizado. A produção em larga escala das AgNP utiliza métodos sintéticos que são custosas e tóxicas ao ambiente. Nos últimos anos métodos biogênicos alternativos para obtenção de AgNP vêm se mostrando serem mais econômicas e ambientalmente compatíveis. Recentemente, estudos que relatam prejuízos ao desenvolvimento das plantas submetidas a tratamentos com AgNP vem sendo publicados. Nestes trabalhos são relatados distúrbios morfológicos, estresse oxidativo, perda de rendimento fotossintético e em alguns casos a melhoria da produtividade de culturas específicas. No entanto, estes trabalhos são segmentados e discutem a modulação dos eventos fitotóxicos apenas acerca das características físico-químicas e da concentração das AgNP. O objetivo desta revisão foi comparar e compreender os diversos efeitos fisiológicos e metabólicos sofridos pelas plantas expostas a AgNP oriundas de métodos produtivos sintéticos e biogênicos. Apesar de ainda não ser possível dizer de maneira assertiva qual método produtivo ou característica uma AgNP deve ter para ser mais ambientalmente compatível e mais segura as plantas, fica claro que estas variáveis com certeza influenciam na modulação dos processos metabólicos.

Palavras-chave

Nanotecnologia; métodos ambientalmente compatíveis, estresse oxidativo, fotossíntese

Abstract

Silver nanoparticles (AgNP) are used in many industries and present themselves as important alternative tools for modern agriculture, disease prevention and water treatment in the globalized world. Large-scale production of AgNP uses synthetic methodologies that are costly and toxic to the environment. In recent years alternative biogenic methodologies for obtaining AgNP have been shown to be more economical and environmentally compatible. Recently, studies reporting damage to the development of plants submitted to treatments with AgNP have been published. In these works, morphological disturbances, oxidative stress, loss of photosynthetic yield and in some cases improved productivity of specific crops are reported. However, these works are segmented and discuss the modulation of phytotoxic events only on the physicochemical characteristics and concentration of AgNP. The objective of this review was to compare and understand the different physiological and metabolic effects suffered by plants exposed to AgNP from synthetic and biogenic production methodologies. Although it is still not possible to say in an assertive way which productive methodology or characteristic an AgNP should have to be more environmentally compatible and safer for plants, it is clear that these variables certainly influence the modulation of metabolic processes.

Keywords

Environmentally compatible methods, nanotechnology, oxidative stress, photosynthesis

Introdução

A nanotecnologia é uma área intrinsecamente associada a vida contemporânea, uma vez que insumos contendo produtos nanotecnológicos são cada vez mais comuns (He et al., 2019; Vance et al., 2015). Entre os nanomateriais mais promissores estão as nanopartículas de prata (AgNP), as quais vem atraindo mais atenção da comunidade científica do que qualquer outra nanopartícula metálica (Siddiqi & Husen, 2021). As AgNP são originadas pela redução de sais de prata (Ag^+) em prata metálica (Ag^0) (Roy et al., 2019). Esta redução pode ser feita através de processos químicos (Martínez-Castañón et al., 2008), físicos (Yaqoob et al., 2020) ou eletroquímicos (Khan & Rizvi, 2014), gerando assim AgNP sintéticas. Alguns microorganismos como fungos (Ottoni et al., 2017), algas e plantas (Roy et al., 2019; Salem & Fouda, 2021) possuem biomoléculas que também são capazes de reduzir Ag^+ em Ag^0 , e nesse caso, as AgNP são ditas biogênicas (Ottoni et al., 2017; Roy et al., 2019; Salem & Fouda, 2021). Após seu processo de síntese as AgNP podem ou não ser envelopadas por compostos orgânicos para evitar a aglomeração das moléculas, melhorar a estabilidade química e a biocompatibilidade (Pereira et al., 2018). Estes compostos são variados e incluem: polivinilpirrolidona (PVP), brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), polietilenoglicol (PEG), citrato e lactato, por exemplo (Tkalec et al., 2019). Dessa maneira, dependendo do método produtivo, as AgNP podem variar quanto ao seu tamanho, área superficial e características de envelopamento. As AgNP são utilizadas principalmente nas indústrias farmacêuticas e de cosméticos (Antunes et al., 2013), e também na indústria médica, têxtil e eletrônica (Durán et al., 2007; Yaqoob et al., 2020). Recentemente, as AgNP vêm se mostrando como uma importante ferramenta para produção de alimentos na agricultura moderna (Gupta, Upadhyaya, et al., 2018) e até mesmo no tratamento alternativo de água e esgoto (Patanjali et al., 2019).

Nos últimos anos várias revisões bibliográficas e trabalhos de cunho experimental trazem indícios de prejuízos e benefícios oriundos da interação de AgNP-plantas (Jiang et al., 2017; Larue et al., 2014; Rani et al., 2016; Siddiqi & Husen, 2021; Ziotti et al., 2021). AgNP de origem sintética, mesmo em baixas concentrações, podem ser acumuladas e causar prejuízos na germinação e no desenvolvimento de plantas de *Lactuca sativa*, *Arabidopsis* e *Oryza sativa* (Geisler-Lee et al., 2014; Larue et al., 2014; Li et al., 2017). Em contrapartida, AgNP biogênicas parecem não ser prejudiciais às plantas de arroz e a microbiota do solo em baixas concentrações (Ottoni et al., 2020). Prejuízos na eficiência fotossintética associados a super produção de ROS

em *Spirodela polyrhiza* e *Sorghum moench* causados, respectivamente, pela interação com AgNP sintéticas e biogênicas são semelhantemente relatados (Jiang et al., 2017; Ziotti et al., 2021). Contudo, indícios de que AgNP de origem sintética em baixas concentrações podem promover o aumento da taxa germinativa (Yin et al., 2012), do crescimento (Mohamed et al., 2017; Tomacheski et al., 2017) e da capacidade fotossintética (Rani et al., 2016) de um conjunto de espécies taxonomicamente e funcionalmente diverso também são descritos na literatura.

É importante ressaltar que nos trabalhos previamente mencionados e na ínfima maioria das revisões disponíveis sobre o tema a modulação dos efeitos da interação AgNP-planta é discutida de acordo com as características físico-químicas e principalmente com a concentração das AgNP. No cenário mundial onde busca-se o aprimoramento de tecnologias mais ambientalmente compatíveis (Agbedahin, 2019), a produção biogênica de AgNP se torna uma irrefutável necessidade no campo da nanotecnologia. A “produção-verde” de AgNP não utiliza de produtos ambientalmente tóxicos, demanda menos energia e apresenta baixo custo operacional em comparação as produções convencionais que originam AgNP sintéticas (Singh et al., 2015). Entretanto, trabalhos recentes vêm demonstrando que estes nanomateriais também podem causar perturbações à níveis morfológicos, fisiológicos e oxidativos às plantas (Otoni et al., 2020; Rani et al., 2016; Ziotti et al., 2021). O que subsidia a necessidade de se incorporar à literatura revisões críticas que relacionem a modulação dos efeitos da interação AgNP-planta também com a método produtivo destes nanoprodutos.

Mecanismos produtivos que diferenciam as AgNP biogênicas e sintéticas

A formação das AgNP é realizada através de processos de redução de íons de prata (Ag^+) em prata metálica (Ag^0), de maneira que os íons Ag^+ são oriundos da dissociação de um sal, o nitrato de prata (AgNO_3) (Roy et al., 2019). Usualmente, para produção em larga escala, o processo de redução iônica envolvido na formação das AgNP pode ser mediado por redutores químicos ou físicos, originando as AgNP sintéticas (Yaqoob et al., 2020) (Figura 1). Os métodos sintéticos são amplamente utilizados para a produção de AgNP em larga escala e diversos trabalhos descrevem estes processos (Golinelli et al., 2017; Gupta, Pant, et al., 2018; Peng et al., 2014; Shao et al., 2015). O método sintético mais convencional para a produção das AgNP é através da redução química de sais, utilizando etilenoglicol (EG) e gluconato de sódio, por exemplo (Yaqoob et al., 2020). A eletrorredução de AgNO_3 em solução aquosa na presença de polietilenoglicol, e a fotorredução são exemplos de métodos sintéticos que utilizam

processos físicos como agentes redutores (Gupta, Pant, et al., 2018). A produção sintética de AgNP também pode ser eletroquímica englobando processos químicos e físicos conjuntamente, como descrito por (Golinelli et al. 2017). Neste caso, o óxido de grafeno reduzido (rGO) utilizado no processo de eletrorredução foi primariamente reduzido por agentes químicos como NaBH₄, hidrazina e vitamina C, por exemplo (Peng et al. 2014; Shao et al. 2015). Muito embora os métodos químicos sejam os mais descritos, estes utilizam agentes estabilizantes e redutores os quais são tóxicos e dependem de processos mais trabalhosos e custosos (Peng et al., 2014).

Visando essas desvantagens, nos últimos anos alguns estudos têm utilizado uma abordagem alternativa para a obtenção de AgNP de origem biogênica (Al-Bahrani et al., 2017; Ottoni et al., 2017; Salem & Fouda, 2021; Zhang et al., 2020; Zhao et al., 2018). A síntese biogênica de AgNP apresenta vantagens em comparação às obtidas por via química e física, uma vez que evitam o uso de produtos tóxicos e agressivos, não possuem alta demanda de energia e são considerados processos de baixo custo (Singh et al., 2015).

Neste tipo de síntese a redução iônica de Ag⁺, dissociado do AgNO₃, é feita por organismos como plantas, algas, bactérias e fungos que possuem moléculas bioativas capazes de atuar semelhantemente aos agentes redutores químicos. Dentre os diferentes organismos capazes de produzir estas moléculas bioativas, as plantas e os fungos filamentosos parecem ser os mais promissores (Zhao et al., 2018) (Figura 1). Estes organismos apresentam melhor tolerância e capacidade de bioacumulação de Ag⁺, além de apresentarem boa escala operacional e viabilidade econômica (Salem & Fouda, 2021; Tomacheski et al., 2017). De acordo com a Agenda 2030 para o desenvolvimento sustentável planejada pelas Nações Unidas, o objetivo 12 reforça a necessidade de criar estratégias inovadoras para padrões de consumo e produção responsáveis (Agbedahin, 2019). Nesse contexto, a síntese biogênica de AgNP é uma importante alternativa econômica e ecológica para a produção desse nanomaterial em larga escala (Zhang et al., 2020).

Independente dos métodos envolvidos no processo de síntese das AgNP, algumas técnicas podem ser utilizadas para caracteriza-las, como a espectroscopia UV-vis, o espalhamento dinâmico de luz (DLS), o potencial zeta (Pζ), o índice de polidispersão (PDI), a microscopia eletrônica de transmissão (TEM), a espectroscopia de infravermelho transformada de *Fourier* (FTIR), a análise de energia dispersiva de raios X (EDX), a difração de raios X (XRD), entre outros (Ottoni et al., 2017). Cada técnica possui parâmetros específicos de acordo com sua disponibilidade, custo, seletividade, precisão, natureza não destrutiva, simplicidade e afinidade

por determinadas composições ou materiais. A caracterização das AgNP é fundamental para avaliar em qual tipo de nanomaterial a nanopartícula pode ser incorporada (Ziotti et al., 2021). Apesar de importante, a caracterização das AgNP não é o foco desta revisão, uma vez que outros trabalhos relevantes discutem amiúde estas diversas técnicas produtivas e de caracterização de AgNP (Anjum et al., 2013; Cuenya, 2010; Dietz & Herth, 2011; Fabrega et al., 2011). Através do presente trabalho, ensinamos esclarecer melhor se o método produtivo das AgNP também modula as variações dos efeitos fisiológicos e metabólicos sofridos pelas plantas após exposição às nanoparículas.

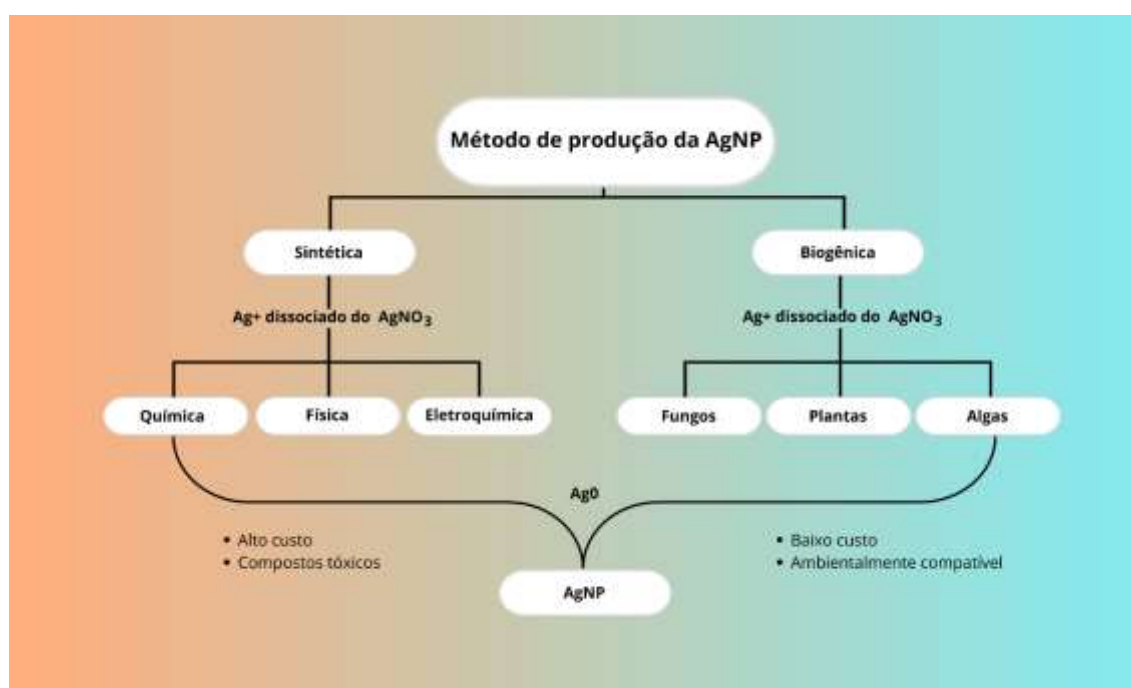


Figura 1 Esquema geral dos diferentes atributos que caracterizam os métodos sintético e biogênico de produção de AgNP.

O método produtivo das AgNP parece modular os efeitos no desenvolvimento das plantas expostas aos nanoproductos

Em plantas de *Cucumis sativus L.* expostas a concentrações superiores a 500 mM de AgNP sintéticas com tamanho entre 20- 80 nm, houve a diminuição do crescimento das raízes, da clorofila total, dos carotenoides e do teor de proteína total das plantas (Tripathi et al., 2017). Brotos de rabanete apresentaram diminuição significativa do alongamento das raízes e do conteúdo relativo de água de plantas expostas a concentrações superiores a 125 mg/L de AgNP de origem sintética (Zuverza-Mena et al., 2016). Para as plantas tratadas com AgNP de origem

sintética a diminuição do tamanho das raízes pode se tratar de uma consequência osmótica relativa a máxima aderência de AgNP a superfície radicular, impedindo a absorção de água pelas plantas. Estas características de adesão das AgNP são também descritas por (Lin & Xing, 2007). Em contrapartida, uma baixa concentração de AgNP sintéticas maiores que 200 nm adsorvidas a sílica promoveram uma melhora significativa na germinação e no crescimento de cultivares de *Raphanus sativus* e *Avena sativa* (Tomacheski et al., 2017). Estes fatos indicam, aparentemente, que para AgNP de origem sintética quanto menor for a dimensão do nanomaterial e maior for sua concentração, maior será a probabilidade dos efeitos no desenvolvimento das plantas submetida aos tratamentos serem maléficos.

As AgNP de origens biogênicas com diferentes características físico-químicas também parecem imprimir prejuízos consideráveis ao desenvolvimento e metabolismo de plantas. A exposição a AgNP biogênicas fitossintetizadas de 47 nm levou a redução de 5% e 11% de partes aéreas e raízes de mudas de *Brassica sp.*, respectivamente (Vishwakarma et al., 2017). Resultados semelhantes foram relatados por nosso grupo com crescimento de partes aéreas e raízes de plantas de sorgo expostas a AgNP biogênicas originadas por um fungo endofítico (Ziotti et al., 2021). Plantas de *Arabidopsis thaliana* apresentaram redução significativa da taxa germinativa, do conteúdo de pigmentos, do crescimento e massa fresca de partes aéreas e raízes quando expostas à 3.0 mg/L de AgNP biogênica de 10 nm (Qian et al., 2013). A diminuição das raízes e também das partes aéreas das plantas submetidas aos tratamentos podem indicar que as AgNP de origem biológica estejam sendo transportadas pelo corpo vegetal com mais facilidade do que as AgNP de origem sintética, devido a sua maior biocompatibilidade. Uma vez que as AgNP entram nos tecidos vasculares das plantas, podem ser transportados para as folhas ou outros órgãos, sendo possível que os frutos, sementes e outras partes vegetais consumíveis possam estar sujeitas à acumulação de Ag⁺ (Yan & Chen, 2019). As AgNP são facilmente acumuladas no corpo vegetal, já que se desconhece vias metabólicas vegetais para degradação de íons de prata (Yan & Chen, 2019). Alguns trabalhos relatam a bioacumulação de AgNP de origens e características físico-químicas distintas em mudas de *Arabidopsis thaliana* (Geisler-Lee et al., 2014), alface (Larue et al., 2014), arroz e soja (Li et al., 2017).

Interessante notar que no trabalho de Mohamed et al. (2017) a exposição de cultivares de *Triticum aestivum* em até 2 mM de AgNP biogênicas de 29 nm ajudaram as plantas a lidar com estresse salino perante a seca. As plantas sob estresse que não receberam o tratamento com AgNP tiveram germinação, crescimento e taxa fotossintética reduzidas. Entretanto, em

concentrações superiores a mencionada todos os parâmetros citados sofreram prejuízos e inibições severos. Fatos estes que estão relacionados a capacidade das plantas de trigo de imprimirem respostas antioxidativas eficientes quando expostas a concentrações baixas de AgNP biogênica, uma vez que o aumento da atividade de enzimas como a catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) podem ter interferido positivamente na melhor performance das respostas contra a seca. O caráter antioxidativo proveniente da interação AgNP-plantas será discutido melhor no próximo tópico.

O metabolismo antioxidativo das plantas é modulado de maneira distinta perante a presença de diferentes formas de oferta de Ag⁺

As espécies reativas de oxigênio (ROS) são produzidas em vários passos do metabolismo do vegetal, como subprodutos de cadeias transportadoras de elétrons nos cloroplastos e mitocôndrias (Foyer & Shigeoka, 2011). A superprodução de ROS em condições de estresse abiótico pode induzir uma perda geral das funções celulares por meio de processos como fotoinibição, peroxidação de lipídios e oxidação de proteínas nas plantas. Dessa maneira o acúmulo destes danos pode levar, em última instância, à morte do vegetal (Foyer et al., 2017). Para controlar os prejuízos causados pelas ROS, as plantas apresentam diversos mecanismos antioxidantes. Esses mecanismos podem ser não-enzimáticos, como o ascorbato e a glutathione, bem como enzimáticos como as enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e a ascorbato peroxidase (APX). Assim, para a manutenção da homeostase redox em plantas, deve haver um equilíbrio dinâmico entre a produção de ROS e seu sistema de remoção (Møller et al., 2007).

Apesar dos danos oxidativos causados pelo excesso de produção das ROS elas possuem papel crucial na sinalização celular. Ao invés de apresentarem duas atividades opostas, isto é, danos e sinalização, o conceito emergente é que todos os tipos de modificação/ dano oxidativo estão envolvidos na sinalização, principalmente na indução de processos de reparo através das vias de sinalização por meio de fitormônios (Foyer et al., 2017; Zwack et al., 2016). Dessa forma, a relevância biológica das alterações oxidativas deve ser entendida no contexto das funções celulares, cujo a perda de atividade de uma determinada proteína pode, por exemplo, ativar uma função no nível celular (Foyer et al., 2017).

Devido as suas dimensões diminutas, as AgNP apresentam maior permeabilidade através de membranas celulares. Uma vez dentro das células vegetais, as AgNP podem ter um

efeito de cavalo de *Tróia*, liberando íons de Ag^+ gradativamente (Jiang et al., 2017). A liberação de prata iônica dentro das células pode levar a inibição de enzimas respiratórias, impulsionando a superprodução de ROS e o estresse celular oxidativo (Ziotti et al., 2021). Em plantas de *Lycopersicon esculentum* (tomate) expostas a diferentes formas de oferta de prata como AgNP sintética envelopadas com PVP, nitrato de prata (AgNO_3) e prata pura (Ag^0) foram relatados aumento expressivo do conteúdo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e de malondialdeídos (Noori et al., 2020). Em concentrações superiores a 30 mg/L as AgNP sintéticas envelopadas com PVP representaram o tratamento que melhor induziu respostas antioxidativas eficientes, imprimindo o aumento da atividade das enzimas peroxidase e catalase. Respostas semelhantes foram observadas em plantas de *Cucumis sativus* (pepino) com o mais expressivo aumento das ROS e de malondialdeídos relatados nos tratamentos com AgNO_3 em comparação a AgNP sintéticas com tamanho entre 20-80 nm (Tripathi et al., 2017). Tratamentos de AgNP biogênicas com tamanho entre 30-70 nm de origem fitogênica e de fungos filamentosos quando comparados com tratamentos de AgNO_3 em concentrações equivalentes também parecem ser mais adequados para subsidiar respostas antioxidativas eficientes nas plantas de *Brassica sp* e *Sorghum Moench*, respectivamente (Vishwakarma et al., 2017; Ziotti et al., 2021).

Nos trabalhos mencionados nos quais são comparados os efeitos oxidativos causados pelo AgNO_3 e pelas AgNP sintéticas e biogênicas, o nitrato de prata imprime os danos fisiológicos mais devastadores às plantas. Fatos estes que estão relacionados com a capacidade das plantas de imprimirem respostas antioxidativas mais eficientes na presença de AgNP em comparação com AgNO_3 . Este padrão de modulação nas respostas das plantas pode indicar que a maior velocidade e o aporte de dissociação iônica evidenciados pelo contato do sal (AgNO_3) com a água, não subsidiem um cenário metabólico propício para ativação de respostas antioxidativas efetivas, o que pode ser extremamente prejudicial a fisiologia das plantas (Nordness & Brennecke, 2020). Em contrapartida, uma liberação iônica gradativa de Ag^+ representado pelo contato das AgNP com as células vegetais, parece ser um subsídio mais adequado para respostas o aumento da atividade das enzimas responsáveis pela neutralização das ROS, como a CAT, a SOD e as peroxidases, por exemplo (Figura 2).

Ainda não é claro se a método produtivo das AgNP (sintética ou biogênica) também tangência a modulação das respostas antioxidativas das plantas. Para que o campo de conhecimento acerca da interação AgNP-plantas evolua neste sentido, é indispensável o entendimento das forças dinâmicas e os componentes moleculares que moldam estas interações.

Em outras palavras, são necessários mais trabalhos de cunho experimental que comparem especificamente estas respostas entre AgNP de origens distintas e não só com o AgNO_3 . Estamos em um ponto em que os conhecimentos deste assunto reunidos estão fornecendo uma estrutura conceitual para guiar essa exploração. É cada vez mais reconhecido que para compreender a dinâmica e função de uma célula, bem como os níveis mais elevados de organização biológica, é necessário conhecer: os componentes que a constituem, as relações e interações desses componentes e seu comportamento dinâmico, ou seja, como as entidades biológicas se comportam ao longo do tempo sob diversas condições (Kitano, 2006). Nesse sentido acreditamos que a utilização da biologia de sistemas neste campo de conhecimento também poderia oferecer a oportunidade de aumentar nossa compreensão das plantas como organismos vivos, gerando uma visão holística do organismo com base no nível molecular.

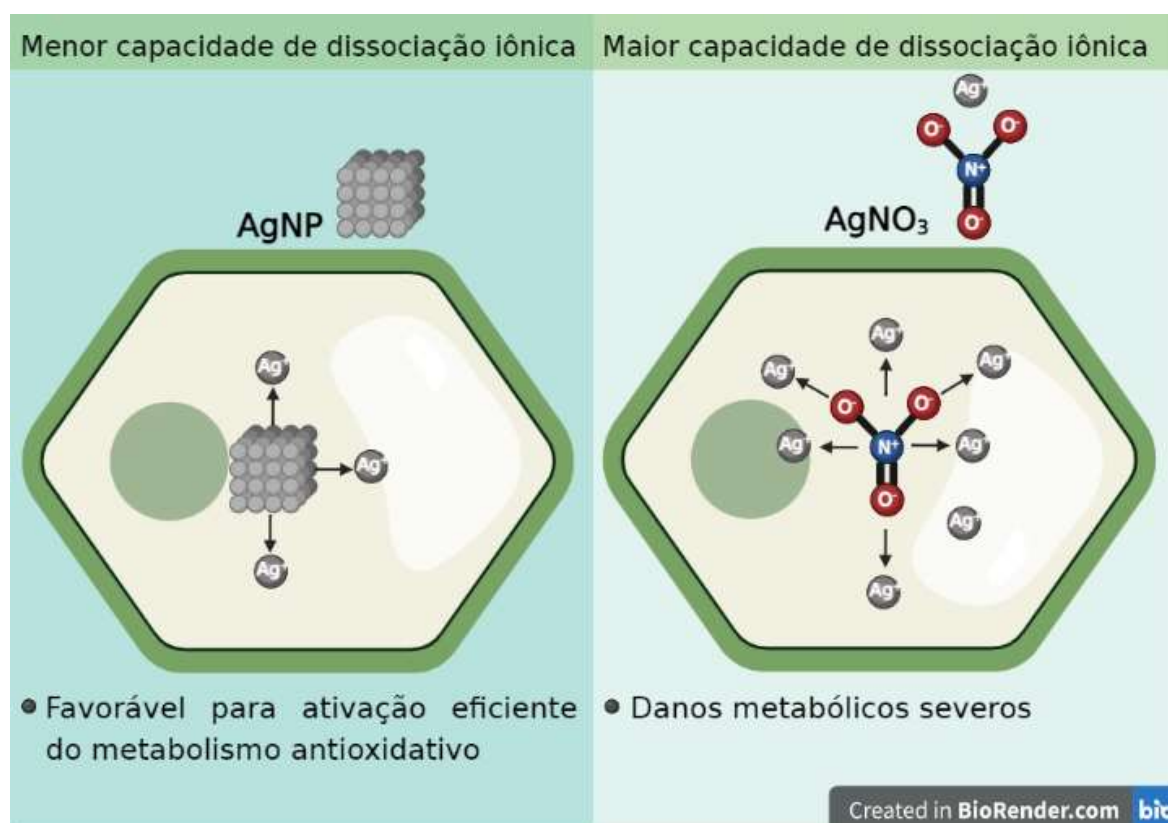


Figura 2 Modelo de dissociação de íons de prata provenientes de AgNP e AgNO_3 em células vegetais.

O método produtivo das AgNP não parece ser determinante na modulação dos efeitos fotossintéticos sofridos pelas plantas

As plantas, assim como todos os organismos fotossintetizantes, utilizam energia luminosa para sintetizar carboidratos a partir do gás carbônico (CO₂) e água. A fotossíntese é um processo de óxido-redução que envolve um fluxo linear de elétrons promovido pela energia luminosa absorvida nos pigmentos fotossintetizantes (Eberhard et al., 2008). Este fluxo linear de elétrons acontece entre dois fotossistemas (PSI e PSII), os quais estão embutidos nas membranas dos tilacóides presentes nos cloroplastos. Os fotossistemas trabalham em série gerando ATP e NADPH, os quais podem ser usados em diversos processos metabólicos nos cloroplastos, incluindo a assimilação de CO₂ no ciclo de Calvin-Benson. Diferentes condições de estresse abiótico e biótico podem diminuir a eficiência da geração de ATP e NADPH, levando ao redirecionamento de elétrons para rotas metabólicas alternativas (Eberhard et al., 2008).

Trabalhos recentes mostram que a exposição a AgNP pode impactar a fotossíntese das plantas em diferentes níveis de regulação. Estes impactos variam desde modulações no teor de pigmentos fotossintéticos até em parâmetros de fluorescência de clorofila a. Recentemente, foi relatado a diminuição significativa no teor de clorofilas e carotenóides em plantas de tabaco expostas a concentrações superiores a 50 µM de AgNP sintéticas com tamanho entre 110 – 450 nm envelopadas com PVP e CTAB (Peharec et al., 2021). Em contrapartida, plantas de pepino expostas a concentrações superiores a 500 µM de AgNP sintéticas com tamanho entre 20-80 nm, apesar de também apresentam um decréscimo do teor de clorofilas tiveram o conteúdo de carotenoides aumentado significativamente (Tripathi et al., 2017).

Um acréscimo no teor de clorofilas e carotenoides é descrito em plantas de *Trigonella foenum-graecum* (feno grego) submetidas a AgNP sintéticas com dimensões inferiores a 50 nm (Sadak, 2019). Por outro lado, AgNP biogênicas produzidas por fungos endofíticos com tamanho entre 15- 35 nm em concentrações superiores a 500 µM diminuíram o teor de clorofilas e carotenoides em plantas de trigo (Mohamed et al., 2017) e em plantas de sorgo (Ziotti et al., 2021). A diminuição generalista do conteúdo de pigmentos também foi relatada em plantas de pepino expostas a 3 mM de AgNP biogênicas fotossintetizadas de 70 nm (Vishwakarma et al., 2017). O conteúdo de pigmentos fotossintéticos é um indicador clássico da qualidade da fotossíntese em plantas superiores (Streit et al., 2005). Dessa maneira, os fatos descritos levam

a crer que provavelmente as AgNP sintéticas com tamanho inferior à 50 nm possam estar incitando respostas mais eficientes à fotossíntese das plantas, uma vez que promoveram modulações específicas no conteúdo de pigmentos e não só um decréscimo generalizado.

Além do conteúdo de pigmentos, a fluorescência de clorofila a representa um método altamente eficiente em revelar aspectos da qualidade fotossintética de plantas submetidas à diferentes estresses (Baker, 2008). Alguns trabalhos vêm relatando variações específicas em parâmetros como o rendimento quântico potencial (F_v/F_m) do fotossistema II (PSII), o rendimento quântico efetivo (YII) e o *quenching* não-fotoquímico (NPQ), em plantas submetidas a tratamentos com AgNP. Uma diminuição abrupta de F_v/F_m e NPQ são relatadas em plantas de trigo expostas a 5 mM de AgNP sintéticas de 40 nm envelopadas com PVP (Rastogi et al., 2019). Resultados muito semelhantes que incitam eventos de fotoinibição foram observados em plantas aquáticas *Spirodela polyrhiza* (Jiang et al., 2017) e *Lemna gibba* (Dewez et al., 2018) expostas a concentrações superiores a 1 mg L⁻¹ de AgNP sintéticas de 50 nm envelopadas com PVP e sem envelopamento, respectivamente.

Plantas de tabaco expostas até 100 µM de AgNP sintéticas com tamanho entre 100- 400 nm envelopadas com citrato conseguiram manter seus níveis F_v/F_m e YII similares ao do controle perante a ativação do mecanismo de *quenching* não-fotoquímico, evidenciado pelo acréscimo significativo dos níveis de NPQ. Em contrapartida, AgNP sintéticas da mesma natureza e com envelopamento distinto (PVP) imprimiram prejuízos fotossintético graves as plantas de tabaco nas mesmas concentrações (Peharec et al., 2021). Surpreendentemente, de maneira similar, a manutenção de níveis saudáveis de F_v/F_m e YII perante a ativação de mecanismos de *quenching* não-fotoquímico também foram relatados em plantas de sorgo (Ziotti et al., 2021) e *Brassica sp.* (Vishwakarma et al., 2017) expostas a AgNP de origem biogênica, já descritas anteriormente.

Os efeitos na qualidade da fotossíntese de plantas submetida a exposição de AgNP certamente é intermediado pelo aumento das ROS e o consequente acúmulo de H⁺ no lúmen do tilacóide (Hossain et al., 2015). Os fenômenos relacionados ao estresse oxidativo resultam em um aumento significativo de NPQ e na regulação negativa do fluxo linear de elétrons no citocromo b6/f nas plantas. Esta é uma das respostas fotoprotetoras mais importantes no cloroplasto, que protege a cadeia transportadora de elétrons contra o acúmulo indevido de ROS (Joliot & Johnson, 2011). Levando em consideração tais circunstâncias e os resultados dos trabalhos avaliados nesta revisão, as características de envelopamento das AgNP parecem estar

mais envolvidas na modulação dos efeitos fotossintéticos do que o próprio método produtivo das nanopartículas.

AgNP: de tecnologias promissoras para tecnologias indispensáveis

Até este ponto fica evidente que as AgNP podem causar perturbações e benefícios ao metabolismo e ao desenvolvimento das plantas. Apesar da difícil compreensão do assunto, nota-se que tanto as características físico-químicas das AgNP como seu método produtivo influenciam na modulação dos efeitos da interação AgNP-planta. Dessa maneira, investigações mais assertivas acerca das diferentes perspectivas desta interação, se tornam indispensáveis no cenário atual onde a nanotecnologia apresenta uma abertura de caminhos alternativos para a agricultura moderna (Fortunati et al., 2019), a prevenção de doenças (Durán et al., 2007) e até mesmo tratamento de água (Patanjali et al., 2019).

Na agricultura moderna, onde é imprescindível a utilização de defensivos mais ambientalmente compatíveis, o emprego das AgNP sintéticas vem sendo bastante explorado há algum tempo (Fortunati et al., 2019; Gupta, Upadhyaya, et al., 2018; Khan & Rizvi, 2014; Kim et al., 2012). Devido às doenças das plantas, a produção agrícola é reduzida em todo o mundo a cada ano. Dentre os métodos de controle de doenças, o uso de agrotóxicos é o mais prevalente (Gupta, Upadhyaya, et al., 2018). Nas últimas décadas, os riscos ambientais causados pelo uso excessivo de pesticidas têm sido amplamente discutidos (Chowdappa & Gowda, 2013).

A aplicação de AgNP na proteção contra doenças de plantas oferece uma grande promessa no manejo de insetos e patógenos (Fortunati et al., 2019). Por serem altamente estáveis e dispersivas em solução aquosa, as AgNP podem ser usadas para inibir o crescimento de fungos, bolores, bactérias e várias outras doenças das plantas através da pulverização sobre as folhas de diversas culturas (Gupta, Upadhyaya, et al., 2018). As AgNP são muito eficazes contra fitopatógenos com baixa toxicidade, podendo inibir diversas linhagens de fungos em cultivares de *Solanum lycopersicum* (tomate), *Solanum tuberosum* (batata) e *Capsicum* (pimenta), por exemplo (Kim et al. 2012). A atividade fungicida das AgNP varia de acordo com a espécie da planta, as características físico-químicas e o método produtivo das AgNP (Kim et al. 2012). Além disso, a atuação das AgNP sintéticas como fertilizantes e estimuladores de

crescimento nas plantas também já foi relatada em plantas de tabaco, por exemplo (Khodakovskaya et al. 2012).

A produtividade agrícola tem sido fundamental para reduzir a pobreza e a fome em todo o mundo desde de 1960 (Mason-D'Croz et al., 2019). Entretanto, as mudanças climáticas interferem negativamente neste aspecto devido a: redução da produção agrícola e a elevação dos preços dos alimentos atrelada a sua menor disponibilidade, como é debatido nos trabalhos mencionados (Mason-D'Croz et al., 2019; Springmann et al., 2016; Wiebe et al., 2015). Projeta-se, ainda, que as mudanças climáticas exponham mais de 77 milhões de pessoas ao risco de fome até 2050 e nesse sentido políticas para garantir a segurança alimentar vão desde novas variedades de culturas até o uso de uma agricultura ambientalmente compatível (Janssens et al., 2020). Nesta abordagem agrônômica moderna, os métodos biogênicos de produção de AgNP têm o potencial de mudar todo o cenário atual, minimizando os insumos de produção e maximizando os resultados da produção agrícola (Fortunati et al., 2019). Entretanto, para que as abordagens biogênicas da nanotecnologia deixem de ser "promissoras" e passem a ser "indispensáveis" para a agricultura, precisamos compreender melhor os princípios fisiológicos da interação AgNP-planta perante a perspectiva do método produtivo destas nanopartículas.

Para o melhor entendimento da dinâmica com que as AgNP são ofertadas as plantas é preciso compreender que a utilização destes nanoproductos vão além das aplicações agrícolas. O uso da prata (Ag) para finalidades antimicrobianas e bactericidas se trata de um conhecimento milenar (Durán et al., 2019). As AgNP trazem as propriedades antimicrobianas da Ag^+ aumentadas e consequentemente mais eficazes no combate a proliferações bacterianas, tendo em vista sua escala de organização nanométrica (Morones et al., 2005). Isso é facilmente compreendido se levarmos em consideração que o metal reduzido para nano-escala apresente ações diferenciadas e expressa novas propriedades quando comparado com sua matriz em macro escala. As nanopartículas metálicas apresentam maior superfície em relação ao volume, o que as tornam mais bioquimicamente ativas em relação a sua matriz macro (Khan & Rizvi, 2014). Dessa maneira, atualmente as indústrias médica e farmacêutica são as principais utilizadoras desses nanomateriais (Antunes et al., 2013; Cox et al., 2017). Adicionalmente, as AgNP também são bastante utilizadas nas indústrias de cosméticos, têxteis, biossensores e eletrônicos (Yaqoob et al., 2020).

As AgNP também são utilizadas como uma alternativa para o tratamento de água e esgoto (Gupta, Pant, et al., 2018; Lu & Astruc, 2018; Patanjali et al., 2019; Shukla et al., 2018).

Nas últimas décadas, um rápido aumento da população global e a superexploração das águas subterrâneas levaram à escassez moderada e severa de água em muitas partes do mundo (Patanjali et al., 2019). Os métodos convencionais do setor de tratamento de água incluem técnicas como a troca aniônica, a destilação líquida, a adsorção via carvão ativado, a ultrafiltração, a osmose reversa, a filtração ultravioleta (UV) e a deionização, os quais muitas vezes não são adequados o suficiente para a produção de água potável aos níveis atuais da demanda populacional (Patanjali et al., 2019). Em acréscimo, em alguns casos possuem dificuldade em atender as rigorosas diretrizes relacionadas à saúde humana (Sharma et al., 2019). Neste cenário, as AgNP se mostram como alternativas eficientes no contexto sanitário, por apresentarem baixo custo e serem mais ecologicamente corretos em relação aos materiais de tratamento existentes.

Muito embora a nanotecnologia promova avanços tecnológicos em diversos segmentos industriais e também na área ambiental, existem desafios que giram em torno da segurança humana e do meio ambiente, uma vez que as plantas são a principal via de incorporação das AgNP nos sistemas vivos (Siddiqi & Husen, 2021). O princípio da interação AgNP-plantas, pode ser compreendida por duas perspectivas distintas: I- As AgNP inevitavelmente atingem as terras agricultáveis e os ecossistemas naturais através dos resíduos de seu próprio processo de síntese e de suas aplicações variadas, da reciclagem e/ou do descarte de produtos que contenham AgNP. Dessa maneira, as plantas são a porta de entrada para a incorporação destas nanopartículas nos sistemas vivos; II- As AgNP são planejadamente expostas as plantas de cultivo por apresentarem características físico-químicas que as enquadram como potenciais métodos alternativos para elaboração de defensivos e fertilizantes agrícolas mais ambientalmente compatíveis. Tendo em vista as diferentes perspectivas de interação AgNP-plantas, fica evidente que para a utilização das AgNP ser de fato segura tanto na agricultura como nos outros diferentes setores é necessária uma sólida compreensão acerca da interferência metodológica das AgNP nos efeitos causados as plantas e ao ambiente.

Conclusão

Embora seja nobre a emergência da utilização das AgNP como alternativas para aplicações agrícolas, bem como nos demais setores produtivos mencionados, são fatídicas as interferências destes nanoproductos no metabolismo plantas superiores. Estas intervenções metabólicas exercidas pelas AgNP nos corpos vegetais estão intrinsecamente relacionadas com o desbalanço redox contínuo exercido pela liberação de Ag^+ . Entretanto, o panorama geral das modificações fisiológicas e metabólicas vivenciadas pelas plantas expostas as AgNP de diferentes origens e características físico-químicas, evidencia o quão jovem e incerta ainda é a ciência que estuda a fisiologia por trás da interação AgNP-planta. Apesar de ainda não ser possível dizer de maneira assertiva qual método produtivo ou característica uma AgNP deve ter para ser mais ambientalmente compatível e mais segura às plantas, estas variáveis com certeza influenciam na modulação dos processos metabólicos.

Anteriormente a preocupação com a utilização das AgNP girava em torno da segurança ambiental e consequentemente das possíveis perturbações sofridas pelas plantas expostas a elas. Apesar das AgNP muitas vezes serem nocivas as plantas, sabe-se que quando originadas por técnicas produtivas biogênicas podem ser a chave para um desenvolvimento mais sustentável, principalmente na agricultura. Entretanto, o caminho para compreensão da fisiologia do estresse das plantas expostas a estes nanoproductos ainda é longo. A literatura carece de trabalhos que direcionem a dimensão dos efeitos sofridos pelas plantas expostas as AgNP com o método produtivo destes nanoproductos, através de análises sistêmicas, holísticas e abrangentes.

Referências bibliográficas

- Agbedahin, A. V. (2019). Sustainable development, Education for Sustainable Development, and the 2030 Agenda for Sustainable Development: Emergence, efficacy, eminence, and future. *Sustainable Development*, 27(4), 669–680. <https://doi.org/10.1002/sd.1931>
- Al-Bahrani, R., Raman, J., Lakshmanan, H., Hassan, A. A., & Sabaratnam, V. (2017). Green synthesis of silver nanoparticles using tree oyster mushroom *Pleurotus ostreatus* and its inhibitory activity against pathogenic bacteria. *Materials Letters*, 186(March 2016), 21–25. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2016.09.069>
- Anjum, N. A., Gill, S. S., Duarte, A. C., Pereira, E., & Ahmad, I. (2013). Silver nanoparticles in soil-plant systems. *Journal of Nanoparticle Research*, 15(9). <https://doi.org/10.1007/s11051-013-1896-7>
- Antunes, F., Dal'Acqua, N., Bergmann, C., & Giovanela, M. (2013). Síntese, caracterização e aplicação de nanopartículas de prata como agentes antimicrobianos. *Estudos Tecnológicos Em Engenharia*, 9(1), 20–26. <https://doi.org/10.4013/ete.2013.91.03>
- Baker, N. R. (2008). Chlorophyll fluorescence: A probe of photosynthesis in vivo. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 89–113. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092759>
- Chowdappa, P., & Gowda, S. (2013). *Nano Bac Khang Nám Xoài.Pdf*. 19(2), 131–151.
- Cox, A., Venkatachalam, P., Sahi, S., & Sharma, N. (2017). Reprint of: Silver and titanium dioxide nanoparticle toxicity in plants: A review of current research. *Plant Physiology and Biochemistry*, 110, 33–49. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.08.007>
- Cuenya, B. R. (2010). Synthesis and catalytic properties of metal nanoparticles: Size, shape, support, composition, and oxidation state effects. *Thin Solid Films*, 518(12), 3127–3150. <https://doi.org/10.1016/j.tsf.2010.01.018>
- Dewez, D., Goltsev, V., Kalaji, H. M., & Oukarroum, A. (2018). Inhibitory effects of silver nanoparticles on photosystem II performance in *Lemna gibba* probed by chlorophyll fluorescence. *Current Plant Biology*, 16(October), 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2018.11.006>
- Dietz, K. J., & Herth, S. (2011). Plant nanotoxicology. *Trends in Plant Science*, 16(11), 582–589. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.08.003>
- Durán, N., Marcato, P. D., de Souza, G. I. H., Alves, O. L., & Esposito, E. (2007). Antibacterial effect of silver nanoparticles produced by fungal process on textile fabrics and their effluent treatment. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 3(2), 203–208. <https://doi.org/10.1166/jbn.2007.022>
- Durán, N., Rolim, W. R., Durán, M., Fávaro, W. J., & Seabra, A. B. (2019). *Quim. Nova.*, 42(2), 206–213.

- Eberhard, S., Finazzi, G., & Wollman, F. A. (2008). The dynamics of photosynthesis. *Annual Review of Genetics*, 42, 463–515. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.42.110807.091452>
- Fabrega, J., Luoma, S. N., Tyler, C. R., Galloway, T. S., & Lead, J. R. (2011). Silver nanoparticles: Behaviour and effects in the aquatic environment. *Environment International*, 37(2), 517–531. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2010.10.012>
- Fortunati, E., Mazzaglia, A., & Balestra, G. M. (2019). Sustainable control strategies for plant protection and food packaging sectors by natural substances and novel nanotechnological approaches. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(3), 986–1000. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9341>
- Foyer, C. H., Ruban, A. v., & Noctor, G. (2017). Viewing oxidative stress through the lens of oxidative signalling rather than damage. *Biochemical Journal*, 474(6), 877–883. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160814>
- Foyer, C. H., & Shigeoka, S. (2011). Understanding oxidative stress and antioxidant functions to enhance photosynthesis. *Plant Physiology*, 155(1), 93–100. <https://doi.org/10.1104/pp.110.166181>
- Geisler-Lee, J., Brooks, M., Gerfen, J., Wang, Q., Fotis, C., Sparer, A., Ma, X., Berg, R., & Geisler, M. (2014). Reproductive Toxicity and Life History Study of Silver Nanoparticle Effect, Uptake and Transport in *Arabidopsis thaliana*. *Nanomaterials*, 4(2), 301–318. <https://doi.org/10.3390/nano4020301>
- Golinelli, D. L. C., Machado, S. A. S., & Cesarino, I. (2017). Synthesis of Silver Nanoparticle-Graphene Composites for Electroanalysis Applications using Chemical and Electrochemical Methods. *Electroanalysis*, 29(4), 1014–1021. <https://doi.org/10.1002/elan.201600669>
- Gupta, N., Pant, P., Gupta, C., Goel, P., Jain, A., Anand, S., & Pundir, A. (2018). Engineered magnetic nanoparticles as efficient sorbents for wastewater treatment: a review. *Materials Research Innovations*, 22(7), 434–450. <https://doi.org/10.1080/14328917.2017.1334846>
- Gupta, N., Upadhyaya, C. P., Singh, A., Abd-Elsalam, K. A., & Prasad, R. (2018). Applications of Silver Nanoparticles in Plant Protection. *Nanotechnology in the Life Sciences*, August, 247–265. https://doi.org/10.1007/978-3-319-91161-8_9
- He, X., Deng, H., & Hwang, H. min. (2019). The current application of nanotechnology in food and agriculture. In *Journal of Food and Drug Analysis* (Vol. 27, Issue 1, pp. 1–21). Elsevier Taiwan LLC. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2018.12.002>
- Hossain, Z., Mustafa, G., & Komatsu, S. (2015). Plant responses to nanoparticle stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(11), 26644–26653. <https://doi.org/10.3390/ijms161125980>
- Janssens, C., Havlík, P., Krisztin, T., Baker, J., Frank, S., Hasegawa, T., Leclère, D., Ohrel, S., Ragnauth, S., Schmid, E., Valin, H., Van Lipzig, N., & Maertens, M. (2020). Global hunger

- and climate change adaptation through international trade. *Nature Climate Change*, 10(9), 829–835. <https://doi.org/10.1038/s41558-020-0847-4>
- Jiang, H. S., Yin, L. Y., Ren, N. N., Zhao, S. T., Li, Z., Zhi, Y., Shao, H., Li, W., & Gontero, B. (2017). Silver nanoparticles induced reactive oxygen species via photosynthetic energy transport imbalance in an aquatic plant. *Nanotoxicology*, 11(2), 157–167. <https://doi.org/10.1080/17435390.2017.1278802>
- Joliot, P., & Johnson, G. N. (2011). Regulation of cyclic and linear electron flow in higher Plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(32), 13317–13322. <https://doi.org/10.1073/pnas.1110189108>
- Khan, M. R., & Rizvi, T. F. (2014). Nanotechnology: Scope and Application in Plant Disease Management. *Plant Pathology Journal*, 13(3), 214–231. <https://doi.org/10.3923/ppj.2014.214.231>
- Khodakovskaya, M. V., De Silva, K., Biris, A. S., Dervishi, E., & Villagarcia, H. (2012). Carbon nanotubes induce growth enhancement of tobacco cells. *ACS Nano*, 6(3), 2128–2135. <https://doi.org/10.1021/nn204643g>
- 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. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2012.40.1.053>
- Kitano, H. (2006). Computational systems biology. In *Computational Systems Biology* (Vol. 420, Issue November). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-088786-6.X5019-9>
- Larue, C., Castillo-Michel, H., Sobanska, S., Cécillon, L., Bureau, S., Barthès, V., Ouerdane, L., Carrière, M., & Sarret, G. (2014). Foliar exposure of the crop *Lactuca sativa* to silver nanoparticles: Evidence for internalization and changes in Ag speciation. *Journal of Hazardous Materials*, 264, 98–106. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.10.053>
- Li, C. C., Dang, F., Li, M., Zhu, M., Zhong, H., Hintelmann, H., & Zhou, D. M. (2017). Effects of exposure pathways on the accumulation and phytotoxicity of silver nanoparticles in soybean and rice. *Nanotoxicology*, 11(5), 699–709. <https://doi.org/10.1080/17435390.2017.1344740>
- Lin, D., & Xing, B. (2007). Phytotoxicity of nanoparticles: Inhibition of seed germination and root growth. *Environmental Pollution*, 150(2), 243–250. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.01.016>
- Lu, F., & Astruc, D. (2018). Nanomaterials for removal of toxic elements from water. *Coordination Chemistry Reviews*, 356, 147–164. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2017.11.003>
- Martínez-Castañón, G. A., Niño-Martínez, N., Martínez-Gutierrez, F., Martínez-Mendoza, J. R., & Ruiz, F. (2008). Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles with different sizes. *Journal of Nanoparticle Research*, 10(8), 1343–1348. <https://doi.org/10.1007/s11051-008-9428-6>

- Mason-D'Croz, D., Sulser, T. B., Wiebe, K., Rosegrant, M. W., Lowder, S. K., Nin-Pratt, A., Willenbockel, D., Robinson, S., Zhu, T., Cenacchi, N., Dunston, S., & Robertson, R. D. (2019). Agricultural investments and hunger in Africa modeling potential contributions to SDG2 – Zero Hunger. *World Development*, 116, 38–53. <https://doi.org/10.1016/j.worlddev.2018.12.006>
- Mohamed, A. K. S. H., Qayyum, M. F., Abdel-Hadi, A. M., Rehman, R. A., Ali, S., & Rizwan, M. (2017). Interactive effect of salinity and silver nanoparticles on photosynthetic and biochemical parameters of wheat. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 63(12), 1736–1747. <https://doi.org/10.1080/03650340.2017.1300256>
- Møller, I. M., Jensen, P. E., & Hansson, A. (2007). Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 58, 459–481. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.58.032806.103946>
- Morones, J. R., Elechiguerra, J. L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J. B., Ramírez, J. T., & Yacaman, M. J. (2005). The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 16(10), 2346–2353. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/16/10/059>
- Noori, A., Donnelly, T., Colbert, J., Cai, W., Newman, L. A., & White, J. C. (2020). Exposure of tomato (*Lycopersicon esculentum*) to silver nanoparticles and silver nitrate: physiological and molecular response. *International Journal of Phytoremediation*, 22(1), 40–51. <https://doi.org/10.1080/15226514.2019.1634000>
- Nordness, O., & Brennecke, J. F. (2020). Ion Dissociation in Ionic Liquids and Ionic Liquid Solutions. In *Chemical Reviews* (Vol. 120, Issue 23, pp. 12873–12902). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00373>
- Ottoni, C. A., Lima Neto, M. C., Léo, P., Ortolan, B. D., Barbieri, E., & de Souza, A. O. (2020). Environmental impact of biogenic silver nanoparticles in soil and aquatic organisms. *Chemosphere*, 239. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124698>
- Ottoni, C. A., Simões, M. F., Fernandes, S., dos Santos, J. G., da Silva, E. S., de Souza, R. F. B., & Maiorano, A. E. (2017). Screening of filamentous fungi for antimicrobial silver nanoparticles synthesis. *AMB Express*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0332-2>
- Patanjali, P., Singh, R., Kumar, A., & Chaudhary, P. (2019). Nanotechnology for water treatment: A green approach. In *Green Synthesis, Characterization and Applications of Nanoparticles*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-102579-6.00021-6>
- Peharec, P., Štefanić, Š., Košpić, K. K., Lyons, D. M., Jurković, L. J., Balen, B., & Tkalec, M. (2021). *Phytotoxicity of Silver Nanoparticles on Tobacco Plants: Evaluation of Coating Effects on Photosynthetic Performance and Chloroplast Ultrastructure*. <https://doi.org/10.3390/nano>
- Peng, X., Tan, F., Wang, W., Qiu, X., Sun, F., Qiao, X., & Chen, J. (2014). Conductivity improvement of silver flakes filled electrical conductive adhesives via introducing silver-

- graphene nanocomposites. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, 25(3), 1149–1155. <https://doi.org/10.1007/s10854-013-1671-7>
- Pereira, S. P. P., Jesus, F., Aguiar, S., de Oliveira, R., Fernandes, M., Ranville, J., & Nogueira, A. J. A. (2018). Phytotoxicity of silver nanoparticles to *Lemna minor*: Surface coating and exposure period-related effects. *Science of the Total Environment*, 618, 1389–1399. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.275>
- Qian, H., Peng, X., Han, X., Ren, J., Sun, L., & Fu, Z. (2013). Comparison of the toxicity of silver nanoparticles and silver ions on the growth of terrestrial plant model *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Environmental Sciences (China)*, 25(9), 1947–1956. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(12\)60301-5](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(12)60301-5)
- Rani, P. U., Yasur, J., Loke, K. S., & Dutta, D. (2016). Effect of synthetic and biosynthesized silver nanoparticles on growth, physiology and oxidative stress of water hyacinth: *Eichhornia crassipes* (Mart) Solms. *Acta Physiologiae Plantarum*, 38(2), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s11738-016-2074-1>
- Rastogi, A., Zivcak, M., Tripathi, D. K., Yadav, S., Kalaji, H. M., & Brestic, M. (2019). Phytotoxic effect of silver nanoparticles in *triticum aestivum*: Improper regulation of photosystem I activity as the reason for oxidative damage in the chloroplast. *Photosynthetica*, 57(1), 209–216. <https://doi.org/10.32615/ps.2019.019>
- Roy, A., Bulut, O., Some, S., Mandal, A. K., & Yilmaz, M. D. (2019). Green synthesis of silver nanoparticles: Biomolecule-nanoparticle organizations targeting antimicrobial activity. *RSC Advances*, 9(5), 2673–2702. <https://doi.org/10.1039/c8ra08982e>
- Sadak, M. S. (2019). Impact of silver nanoparticles on plant growth, some biochemical aspects, and yield of fenugreek plant (*Trigonella foenum-graecum*). *Bulletin of the National Research Centre*, 43(1). <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0077-y>
- Salem, S. S., & Fouda, A. (2021). Green Synthesis of Metallic Nanoparticles and Their Prospective Biotechnological Applications: an Overview. *Biological Trace Element Research*, 199(1), 344–370. <https://doi.org/10.1007/s12011-020-02138-3>
- Shao, W., Liu, X., Min, H., Dong, G., Feng, Q., & Zuo, S. (2015). Preparation, characterization, and antibacterial activity of silver nanoparticle-decorated graphene oxide nanocomposite. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 7(12), 6966–6973. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b00937>
- Sharma, V. K., Sayes, C. M., Guo, B., Pillai, S., Parsons, J. G., Wang, C., Yan, B., & Ma, X. (2019). Interactions between silver nanoparticles and other metal nanoparticles under environmentally relevant conditions: A review. *Science of the Total Environment*, 653, 1042–1051. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.411>

- Shukla, S. P., Kumar, S., Gita, S., Bharti, V. S., Kumar, K., & Rathi Bhuvaneswari, G. (2018). Recent technologies for wastewater treatment: A brief review. *Wastewater Management Through Aquaculture*, 225–234. https://doi.org/10.1007/978-981-10-7248-2_11
- Siddiqi, K. S., & Husen, A. (2021). Plant response to silver nanoparticles: a critical review. In *Critical Reviews in Biotechnology*. Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/07388551.2021.1975091>
- Singh, R., Shedbalkar, U. U., Wadhwani, S. A., & Chopade, B. A. (2015). Bacteriogenic silver nanoparticles: synthesis, mechanism, and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(11), 4579–4593. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6622-1>
- Springmann, M., Mason-D'Croz, D., Robinson, S., Garnett, T., Godfray, H. C. J., Gollin, D., Rayner, M., Ballon, P., & Scarborough, P. (2016). Global and regional health effects of future food production under climate change: A modelling study. *The Lancet*, 387(10031), 1937–1946. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)01156-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)01156-3)
- Streit, N. M., Canterle, L. P., Canto, M. W. do, & Hecktheuer, L. H. H. (2005). As clorofilas. *Ciência Rural*, 35(3), 748–755. <https://doi.org/10.1590/s0103-84782005000300043>
- Tkalec, M., Peharec Štefanić, P., & Balen, B. (2019). Phytotoxicity of silver nanoparticles and defence mechanisms. In *Comprehensive Analytical Chemistry* (Vol. 84, pp. 145–198). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/bs.coac.2019.04.010>
- Tomacheski, D., Pittol, M., Simões, D. N., Ribeiro, V. F., & Santana, R. M. C. (2017). Impact of silver ions and silver nanoparticles on the plant growth and soil microorganisms. *Global Journal of Environmental Science and Management*, 3(4), 341–350. <https://doi.org/10.22034/gjesm.2017.03.04.001>
- Tripathi, A., Liu, S., Singh, P. K., Kumar, N., Pandey, A. C., Tripathi, D. K., Chauhan, D. K., & Sahi, S. (2017). Differential phytotoxic responses of silver nitrate (AgNO₃) and silver nanoparticle (AgNps) in *Cucumis sativus* L. *Plant Gene*, 11, 255–264. <https://doi.org/10.1016/j.plgene.2017.07.005>
- Vance, M. E., Kuiken, T., Vejerano, E. P., McGinnis, S. P., Hochella, M. F., & Hull, D. R. (2015). Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 6(1), 1769–1780. <https://doi.org/10.3762/bjnano.6.181>
- Vishwakarma, K., Shweta, Upadhyay, N., Singh, J., Liu, S., Singh, V. P., Prasad, S. M., Chauhan, D. K., Tripathi, D. K., & Sharma, S. (2017). Differential phytotoxic impact of plant mediated silver nanoparticles (AgNPs) and silver nitrate (AgNO₃) on *Brassica* sp. *Frontiers in Plant Science*, 8(October), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01501>
- Wiebe, K., Lotze-Campen, H., Sands, R., Tabeau, A., Van Der Mensbrugghe, D., Biewald, A., Bodirsky, B., Islam, S., Kavallari, A., Mason-D'Croz, D., Müller, C., Popp, A., Robertson, R.,

- Robinson, S., Van Meijl, H., & Willenbockel, D. (2015). Climate change impacts on agriculture in 2050 under a range of plausible socioeconomic and emissions scenarios. *Environmental Research Letters*, 10(8). <https://doi.org/10.1088/1748-9326/10/8/085010>
- Yan, A., & Chen, Z. (2019). Impacts of silver nanoparticles on plants: A focus on the phytotoxicity and underlying mechanism. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(5), 23–25. <https://doi.org/10.3390/ijms20051003>
- Yaqoob, A. A., Umar, K., & Ibrahim, M. N. M. (2020). Silver nanoparticles: various methods of synthesis, size affecting factors and their potential applications—a review. *Applied Nanoscience (Switzerland)*, 10(5), 1369–1378. <https://doi.org/10.1007/s13204-020-01318-w>
- Yin, L., Colman, B. P., McGill, B. M., Wright, J. P., & Bernhardt, E. S. (2012). Effects of Silver Nanoparticle Exposure on Germination and Early Growth of Eleven Wetland Plants. *PLoS ONE*, 7(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047674>
- Zhang, L., Wei, Y., Wang, H., Wu, F., Zhao, Y., Liu, X., Wu, H., Wang, L., & Su, H. (2020). Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Mushroom *Flammulina velutipes* Extract and Their Antibacterial Activity Against Aquatic Pathogens. *Food and Bioprocess Technology*, 13(11), 1908–1917. <https://doi.org/10.1007/s11947-020-02533-7>
- Zhao, X., Zhou, L., Riaz Rajoka, M. S., Yan, L., Jiang, C., Shao, D., Zhu, J., Shi, J., Huang, Q., Yang, H., & Jin, M. (2018). Fungal silver nanoparticles: synthesis, application and challenges. *Critical Reviews in Biotechnology*, 38(6), 817–835. <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1414141>
- Ziotti, A. B. S., Ottoni, C. A., Correa, C. N., de Almeida, O. J. G., de Souza, A. O., & Neto, M. C. L. (2021). Differential physiological responses of a biogenic silver nanoparticle and its production matrix silver nitrate in *Sorghum bicolor*. *Environmental Science and Pollution Research*. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-13069-4>
- Zuverza-Mena, N., Armendariz, R., Peralta-Videa, J. R., & Gardea-Torresdey, J. L. (2016). Effects of silver nanoparticles on radish sprouts: Root growth reduction and modifications in the nutritional value. *Frontiers in Plant Science*, 7(FEB2016). <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00090>
- Zwack, P. J., de Clercq, I., Howton, T. C., Hallmark, H. T., Hurny, A., Keshishian, E. A., Parish, A. M., Benkova, E., Mukhtar, M. S., van Breusegem, F., & Rashotte, A. M. (2016). Cytokinin response factor 6 represses cytokinin-associated genes during oxidative stress. *Plant Physiology*, 172(2), 1249–1258. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00415>

Capítulo 2:

Differential physiological responses of a biogenic silver nanoparticle and its production matrix silver nitrate in *Sorghum bicolor*

Neste seguimento foi realizada uma investigação acerca dos padrões de desenvolvimento, metabolismo antioxidativo e fotossintético de plantas de sorgo expostas a 0, 10, 100, 500 e 1000 μM de AgNP biogênica e AgNO_3 . Aqui revelaremos que de fato, ambos os tratamentos imprimem modulações metabólicas e prejuízos no desenvolvimento das plantas. Entretanto, os tratamentos com AgNO_3 se mostraram mais tóxicos e prejudiciais aos organismos fotossintetizantes em relação as AgNP de origem biogênica sintetizada por um fungo marinho. Este capítulo consiste em um artigo completo já publicado na revista: "Environmental Science and Pollution Research", a qual apresenta fator de impacto de 4.222.



Differential physiological responses of a biogenic silver nanoparticle and its production matrix silver nitrate in *Sorghum bicolor*

Ana Beatriz Sicchieri Ziotti^{1,2} · Cristiane Angélica Ottoni^{1,3} · Cláudia Neves Correa¹ · Odair José Garcia de Almeida¹ · Ana Olivia de Souza⁴ · Milton Costa Lima Neto^{1,2}

Received: 25 November 2020 / Accepted: 16 February 2021

© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH, DE part of Springer Nature 2021

Abstract

Silver nanoparticles (AgNP) have been extensively applied in different industrial areas, mainly due to their antibiotic properties. One of the environmental concerns with AgNP is its incorrect disposal, which might lead to severe environmental pollution. The interplay between AgNP and plants is receiving increasing attention. However, little is known regarding the phytotoxic effects of biogenic AgNP on terrestrial plants. This study aimed to compare the effects of a biogenic AgNP and AgNO₃ in *Sorghum bicolor* seedlings. Seeds were germinated in increasing concentrations of a biogenic AgNP and AgNO₃ (0, 10, 100, 500, and 1000 µM) in a growth chamber with controlled conditions. The establishment and development of the seedlings were evaluated for 15 days. Physiological and morpho-anatomical indicators of stress, enzymatic, and non-enzymatic antioxidants and photosynthetic yields were assessed. The results showed that both AgNP and AgNO₃ disturbed germination and the establishment of sorghum seedlings. AgNO₃ released more free Ag⁺ spontaneously compared to AgNP, promoting increased Ag⁺ toxicity. Furthermore, plants exposed to AgNP triggered more efficient protective mechanisms compared with plants exposed to AgNO₃. Also, the topology and connectivity of the correlation-based networks were more impacted by the exposure of AgNO₃ than AgNP. In conclusion, it is plausible to say that the biogenic AgNP is less toxic to sorghum than its matrix AgNO₃.

Keywords Antioxidant metabolism, · *Aspergillus tubingensis*, · Nanomaterials, · Photoprotection, · Reactive oxygen species

Introduction

Silver nanoparticles (AgNP) are used abundantly in industry and daily life products due to their particular anti-biological properties (Vishwakarma et al. 2017, Geranio et al. 2009; Yan and Chen 2019). AgNP are significantly different from their

bulk counterpart (Ag⁺), and extensive research on their effects on living systems, including plants and other organisms, has been carried out recently (Benn and Westerhoff 2008; Mueller and Nowack 2008; Rani et al. 2016). Moreover, nano-green approaches have been investigated and applied to produce AgNP with less environmental impact. According to Roy et al. (2019), plants, algae, bacteria, yeasts, and fungi have bio-active molecules that reduce salts from silver (Ag⁺) to metallic silver Ag⁰, and subsequently stabilizing them by coating the particle with organic materials. The coating has a multifunctional purpose preventing nanoparticle agglomeration, decreasing toxicity and improving antimicrobial activity (Roy et al. 2019).

According to the 2030 Agenda for sustainable development planned by the United Nations, objective 12 reinforces the necessity to create innovative strategies for responsible consumption and production patterns (Agbedahin, 2019). In this context, the biogenic synthesis of AgNP is an important economic and ecological alternative to produce this nanomaterial in a large scale (Zhang et al., 2020). Fungi are

Responsible Editor: Gangrong Shi

✉ Milton Costa Lima Neto
milton.lima-neto@unesp.br

¹ Institute of Biosciences, São Paulo State University (UNESP), Praça Infante Don Henrique, s/n, Parque Bitarú, São Vicente, SP 11380-972, Brazil

² Institute of Biosciences, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, SP, Brazil

³ Instituto de Estudos Avançados do Mar (IEAMar), São Paulo State University, São Vicente, SP, Brazil

⁴ Innovation and Development Laboratory, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brazil

one of the most promising organisms to produce biogenic AgNP due to their tolerance and bio-accumulation capacity, easy to scale and economic viability (Salem and Fouda, 2020, Simões et al. 2020). Depending on the organisms synthesizing the biogenic AgNP, several techniques could be used to characterize these nanoparticles such as UV–vis spectroscopy, dynamic light scattering (DLS), zeta potential ($P\zeta$), polydispersion index (PDI), transmission electron microscopy (TEM), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), energy-dispersive X-ray analysis (EDX), X-ray diffraction (XRD), among others (Ottoni et al., 2017). Each technique has specific parameters according to its availability, cost, selectivity, precision, non-destructive nature, simplicity, and affinity to certain compositions or materials. The nanomaterial characterization is fundamental to evaluate in which type of material the nanomaterial can be incorporated.

AgNP are released into the environment and natural ecosystems through various pathways, including their synthesis process, incorporating these nanomaterials into supplies for daily use and recycling and disposal of waste or products containing AgNP (Rani et al. 2016). Consequently, the growing consumption of AgNP inevitably increases the chance of their release into the atmosphere, soil and, sewage. These nanomaterials are deposited in the environment, persisting for a long time, or organisms, such as plants, first take them up (Larue et al. 2014). Therefore, AgNP are inevitably taken up by crops and quickly enter the food chain, impacting food production and quality and posing a risk to human health (Yan and Chen 2019). AgNP can leach silver ions (Ag^+), which are persistent, bio-accumulative, and highly toxic to living organisms (Cvjetko et al. 2017). Thus, despite the importance and commercial interest of these nanomaterials, recent studies have demonstrated the harmful effects of AgNP on both human and environmental health (Dietz and Herth 2011).

The soil environment is a significant source of AgNP that comes from diverse pathways, including wastewater management, bio-solids application, improper disposal, and AgNP fertilizers or pesticides (Anjum et al. 2013). However, most of these studies have examined the effects of AgNP in aquatic environments (Benn and Westerhoff 2008; Liu and Hurt 2010; Dewez et al. 2018; Pereira et al. 2018; Courtois et al. 2019). On the other hand, few studies have shown that plants can accumulate AgNP, and the major pathway of terrestrial plant exposure and accumulation of AgNP is through the soil (Dietz and Herth 2011). In a previous study, the root system was considered the main route of AgNP absorption and accumulation in plants (Anjum et al. 2013). It was recently demonstrated the entrapment of AgNP by the cuticle and penetration in the leaf tissue through stomata (Larue et al. 2014). These results are contradictory and not conclusive as recent researches showing that different nanomaterials had variable effects on root length, biomass partition and accumulation, seed germination, and seedling development (Lin and Xing

2007; Jiang et al. 2017; Yan and Chen 2019; Ottoni et al. 2020). The interaction between plants and AgNP is unclear and the results are contradictory in terms of bio-transformation, translocation, toxicity, accumulation, and physiological impacts (Ottoni et al. 2020). Thus, as plants are in the primary trophic level in ecosystems, representing the food chain base, understanding the impacts of AgNP on plants is crucial (Lin and Xing 2007; Tripathi et al. 2017; Rastogi et al. 2019a, b).

AgNP induce oxidative stress by inhibiting respiratory and photosynthetic enzymes through the direct effects of the free Ag^+ that produces reactive oxygen species (ROS) (Fayez et al. 2017; Rastogi et al. 2019a, b; Ottoni et al. 2020). Studies with an aquatic plant (*Spirodela polyrrhiza* Schleid.) showed that the intracellular synthetic polyvinylpyrrolidone-coated AgNP (size around 20 nm) dissociates into high toxic Ag^+ , which had the same capacity to generate reactive oxygen species (ROS) compared with the exposure to the ionic form of Ag^+ (Jiang et al. 2017). The exposure to AgNP decreased the photosynthetic assimilation rate, the potential, and the effective quantum yields of the photosystem II and impaired the non-photochemical quenching (NPQ). These results suggest that AgNP inhibits the photoprotective capacity of PSII, inducing ROS burst in chloroplasts (Jiang et al. 2017). In addition, recent work with *Triticum aestivum* L. showed that synthetic AgNP with a size less than 100 nm triggered improper regulation of the photosystem I (PSI) activity resulting in oxidative damage in chloroplasts (Rastogi et al. 2019a, b). In contrast, a biosynthesized AgNP enhanced plant growth with fewer minor effects on water hyacinth plants (*Eichhornia crassipes* Solms) over chemically synthesized AgNP, increasing the activities of antioxidative enzymes such as catalase, peroxidases, and superoxide dismutase (Rani et al. 2016).

Besides the importance of studying AgNP phytotoxicity in higher terrestrial plants, few studies consider the biochemical and physiological responses on higher plants' growth and development. In particular, AgNP toxicity studies regarding antioxidant metabolism in plants have been poorly explored (Rastogi et al. 2019a, b). Sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] is related to sugarcane and maize, commonly grown for food, fiber, and fuel. This species has a C4 photosynthetic metabolism with rapid growth, and its genome is already sequenced (Paterson et al. 2009). Thus, sorghum is an excellent model for phytotoxic studies. The effects of AgNP and $AgNO_3$ exposure on plant germination, growth, biomass partition, stress indicators, antioxidant metabolism, and photosynthesis were evaluated. Our finds are discussed in terms of the physiological importance of the interactions between a biogenic AgNP and its matrix $AgNO_3$ in sorghum plants and the possible mechanisms responsible for alleviating AgNP and free silver's detrimental effects.

Material and methods

Nanoparticle biosynthesis and characterization

The endophytic fungus *Aspergillus tubingensis* isolated from *Rhizophora mangle* was used for the biogenic synthesis of the AgNP using AgNO₃ as its matrix, as previously reported (Rodrigues et al. 2013; Ottoni et al., 2020). Briefly, 3 plugs of 6 mm diameter from the peripheral area of the colony previously grown in potato dextrose agar (PDA) were transferred to 150 mL of potato dextrose broth (PDB) in a 1L Erlenmeyer flask. The culture was incubated on an orbital shaker at 25 °C and 150 rpm for 72 h. Biomass was then harvested by filtration through polypropylene membrane and washed with sterile distilled water. Mycelia (10 g) was introduced in 100 mL of distilled water previously sterilized and incubated in the same conditions and period. After 72 h, the filtrate was collected through a polypropylene membrane. Finally, the suspension was filtrated through a 0.22-μm filter (Millipore) and treated with a silver nitrate (AgNO₃) solution (1 mM), followed by incubation in the dark.

The biogenic AgNP were characterized by UV-VIS spectrophotometry, transmission electron microscopy (TEM), size measurements by dynamic light scattering, and zeta potential measurements. According to the TEM images, the AgNP have a spherical shape and an average of 35 ± 10 nm. The crystal structure of silver was detected by X-ray diffraction. In addition, AgNP showed a polydispersity index of 0.337, zeta potential +7.8, and stability over 90 days (Rodrigues et al. 2013).

Plant material and growth conditions

In these experiments, sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] seeds, cultivar BRS-658, provided by EMBRAPA, Brazil, were used as model plants. Fifteen seeds were placed in *Petri* dishes between sheets of germination paper. Seeds were exposed to AgNP and AgNO₃ solutions in different concentrations (0, 10, 100, 500 and 1000 μM). The treatment with 0 μM was taken as control. The seeds were germinated in a growth chamber under controlled conditions (28°C day and 25°C night temperatures; 65% relative humidity; 300 μmol m⁻² s⁻¹ PPFD and 12 h photoperiod). The germination rate was monitored daily for three days (100% germination of control). Germination was assessed when the radicle was at least 5 mm long. The assay was performed with five replicates per treatment, with 15 seeds per replicate.

A second experiment was designed in order to evaluate the impact of different concentrations of AgNP and AgNO₃ on seedling development and growth. This experiment was performed with the same concentrations and in the same controlled conditions as described above. Ten seeds of sorghum were placed on germination paper rolls covered with translucent plastic to maintain humidity. After 15 days from

germination, the samples were harvested, and the length of the shoot and roots was measured. Also, the fresh weight of roots and shoots was assessed. Samples were immersed in liquid N₂ and stored at -80°C for future analysis.

Silver accumulation

Plants were harvested, washed with double-distilled water, and dried at 80°C until mass was constant (~3 days). A sample with known weight was acid-digested in 5 mL 70% HNO₃ at 90°C for 8 h. The silver concentration was determined by atomic absorption spectrophotometry (Jiang et al. 2012).

Relative water content, membrane damage, and pigment content

The fresh weight (FW) of shoot and roots was measured just after harvesting. Seedling samples were stored in test tubes with deionized water at 7°C in the dark and then weighted to determine the turgid weight (TW). The samples were dried in a forced-air circulation oven at 70°C until weight stabilization to determine the dry weight (DW). The relative water content (RWC) was calculated as: $RWC = [(FW - DW) / (TW - DW)] \times 100$ (Lima Neto et al. 2017).

The electrolyte leakage was measured with 100 mg of leaves or roots segments into test tubes containing deionized water. The tubes were incubated in a shaking bath at 25°C for 12 h. The electric conductivity of the medium (L1) was measured. The segments were boiled at 95°C for 60 min in closed test tubes and then cooled to 25°C. The electric conductivity (L2) was measured. The membrane damage was estimated by $MD = L1/L2 \times 100$ (Lima Neto et al., 2017). Chlorophylls and total carotenoids were determined after extraction of leaf samples in cold acetone 80% in dark, for 12 h. The extract was measured by a spectrophotometer (VERSAMAX, Molecular Devices, USA) at 665, 649, and 470 nm and calculated according to Lichtenthaler et al. (1983).

Lipid peroxidation and hydrogen peroxide content

The lipid peroxidation was assessed by evaluating the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) (Cakmak and Horst 1991). The concentration of TBARS was calculated by the absorption coefficient 155 mM cm⁻¹, and the results expressed as nmol MDA-TBA g⁻¹ FM. The H₂O₂ content was measured by the Amplex Red oxidation method in leaf segments (Zhou et al. 1997). Leaf segments were ground with K-phosphate buffer 100 mM pH 7.5. The extract was centrifuged 4°C, and the supernatant was used. The supernatant was supplemented with 10 mM Amplex-Red (Sigma-Aldrich) and 10 U of horseradish peroxidase. The production of resorufin was measured at 560 nm, and the data were expressed μmol g⁻¹ FM.

Preparation of crude extract, total soluble proteins, and enzymatic and non-enzymatic antioxidants

Fresh leaf samples were ground in liquid N₂, 100 mM K-phosphate buffer (pH 7.5) containing 1 mM EDTA, and 1 mM ascorbate (ASC). All extraction was carried out at 4°C. Total soluble protein content was measured using a standard curve of BSA (Bradford 1976).

Catalase (CAT E.C 1.11.1.6) activity was measured following the oxidation of H₂O₂ at 240 nm. CAT activity was determined with the crude extract in the presence of 50 mM K-phosphate buffer (pH 7.0) and 20 mM H₂O₂ at 30°C. The absorbance was monitored at 240 nm over 300 s, and the activity was calculated by the extinction coefficient of H₂O₂ (36 M⁻¹ cm⁻¹) and expressed as $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ protein min}^{-1}$ (Havir and McHale 1987). Ascorbate peroxidase (APX) activity (EC. 1.11.1.11) was measured following ascorbate oxidation as decreases in absorbance at 290 nm. The activity was assayed with the enzymatic extract in 100 mM K-phosphate buffer, pH 7.0, 0.5 mM ascorbate, 0.1 mM EDTA. The enzyme activity was measured at 25 °C over 300 s and expressed as $\mu\text{mol ascorbate mg}^{-1} \text{ protein min}^{-1}$ (Nakano and Asada 1981a). Superoxide dismutase (SOD) activity (EC 1.15.1.1) was determined from the inhibition of the blue formazane production by the nitroblue tetrazolium chloride (NBT) photoreduction (Giannopolitis and Ries 1977).

The reduced form of glutathione was measured as previously reported (Griffith 1980). Total glutathione content was measured by a reaction in the presence of 1 U of glutathione reductase, 0.15 mM NADPH, 100 mM Na-phosphate buffer, pH 7.0, and 30 mM DTNB. The absorbance was read at 412 nm. The glutathione redox state was calculated as $[\text{GSH}/(\text{GSH} + \text{GSSG})] \times 100$, and expressed in % (Griffith 1980).

Morpho-anatomical characterization

Plants were photographed and then fixed in FAA50 (Johansen 1940). Samples of the leaf sheath and leaf blade were dissected and submitted to a graded ethanol series from 70 to 100%, embedded in 2-hydroxyethyl methacrylate Leica historesin (according to the manufacturer instructions), and then cross-sectioned (7 μm thickness) with a rotary microtome. Sections from leaf sheath and leaf blade tissue were stained with 0.05% toluidine blue pH 4.6 and mounted on slides with Entellan synthetic resin. The anatomical illustrations were made using photographs taken with the image capturing system of a Leica microscope.

Chlorophyll fluorescence analyses

F_o and F_m were assessed in dark-adapted leaves with a Jr-PAMIII (Walz, Germany). The leaves were then light-adapted

(800 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) for at least 30 min to achieve steady-state photosynthesis. The intensity and duration of the saturation pulses were 7200 $\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ and 0.6 s, respectively. The potential quantum yield of PSII [$F_v/F_v = (F_m - F_o)/F_m$]; the effective quantum yield of PSII [$Y(II) = (F_m' - F_s)/F_m'$], and the non-photochemical quenching [$\text{NPQ} = (F_m - F_m')/F_m'$] were assessed (Maxwell and Johnson 2000).

Network analysis

Correlation-based networks were calculated comparing different treatments at the highest concentration [1000 μM]. The nodes correspond to the different parameters evaluated and the links to the strength of the connection between the nodes (in module) by Pearson correlation. Networks were designed by restricting the strength of the connections to a specific limit of Pearson correlation coefficient [r] ($-0.5 > r > 0.5$). The parameters calculated from the networks were obtained as described in previous work by Assenov et al. 2008.

Statistical analysis and experimental design

The experiments were arranged in a completely randomized design. The germination analysis was performed with a Petri dish containing 15 seeds, with three independent replicates. The development and growth analysis was performed with a germination paper roll with 10 seeds for each treatment, with three replicates per treatment. Data were analyzed by ANOVA, and the means were compared by Tukey's test ($P < 0.05$). Correlation analysis were performed by Pearson correlation using the CorrelationCalculator software (Basu et al. 2017) and correlation-based networks were calculated using MetScape on Cytoscape v.3.8 and the plugin NetworkAnalyzer.

Results

Seed germination is less impacted by the exposure of AgNP than AgNO₃

Sorghum plants exposed to 10 μM AgNP showed no significant difference in the germination rate compared with control (Fig. 1A). In contrast, the germination rate was decreased by increasing AgNP concentration, showing a significant delay in germination (Fig. 1A). The exposure of 10 μM AgNO₃ delayed the germination rate from the first day, and higher concentrations of AgNO₃ significantly decreased germination in sorghum compared with control (Fig. 1B). Our data show that the germination of seeds was not severely affected by the exposure of AgNP. In contrast, higher concentrations of AgNO₃ significantly decreased the germination rate compared with the same concentration of AgNP (Fig. 1).

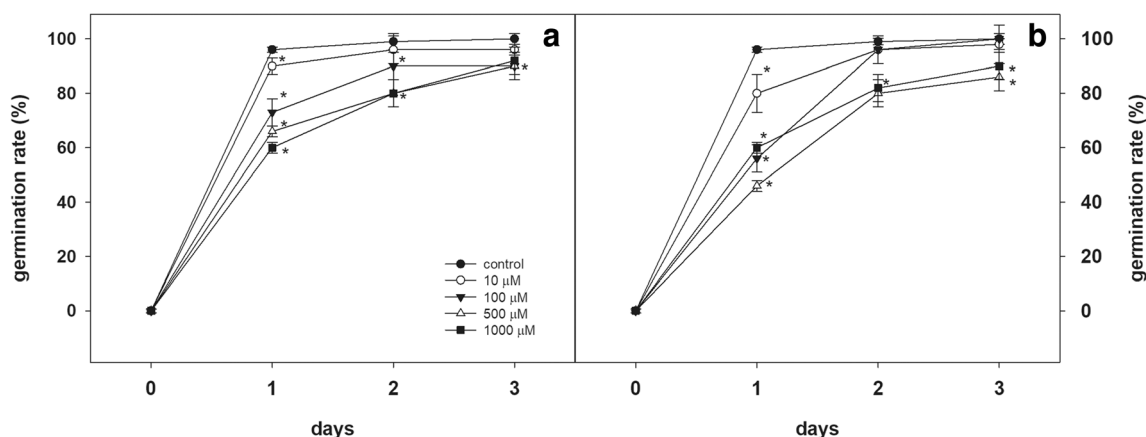


Fig. 1 Germination rate in *Sorghum* seeds exposed to increasing concentrations of AgNP and AgNO₃. Values represent the means $\pm$ SD of thirty replicates. * represents significant differences compared with control by *t*-test ($P<0.05$)

Silver accumulation impacts biomass accumulation and partition

The accumulation of Ag⁺ was concentration-dependent and increased significantly for both treatments, reaching the highest concentration of 9.03 mg g⁻¹ DM in plants exposed to 1000 μ M AgNO₃ (Fig. 2). Interesting to note that the Ag⁺ concentration of plants exposed to AgNP (1000 μ M) was significantly lower compared with plants exposed to the same concentration of AgNO₃ (Fig. 2).

Plants exposed to 10 μ M AgNP showed a slight increase in root length, but the shoot length did not change compared with control (Fig. 3A). Higher concentrations of AgNP led to decreases in the growth of both roots and shoots compared with control (Fig. 3A). Roots' length was decreased in plants exposed to 10 μ M AgNO₃, but the shoot did not change (Fig.

3B). AgNO₃ showed a dose-dependent effect, inhibiting growth in both roots and shoots (Fig. 3B), and the highest concentration of AgNO₃ strongly inhibited growth in both roots and shoots compared with the highest concentration of AgNP (Fig. 3A, B).

The biomass accumulation was compromised in plants exposed to all treatments compared with control (Fig. 3C–D). The biomass partition between roots and shoots was adjusted in the presence of 10 μ M AgNP, with plants displaying less biomass in shoots to promote root growth (Fig. 3C). At higher concentrations (100–1000 μ M), the AgNP impaired biomass accumulation in both roots and shoots (Fig. 3C). However, at 10 μ M, AgNO₃ promoted more severe stress than AgNP, inhibiting plants' growth accumulating less biomass (Fig. 3C–D). These effects were more intense for AgNO₃ at the higher concentrations compared with AgNP (Fig. 3C–D).

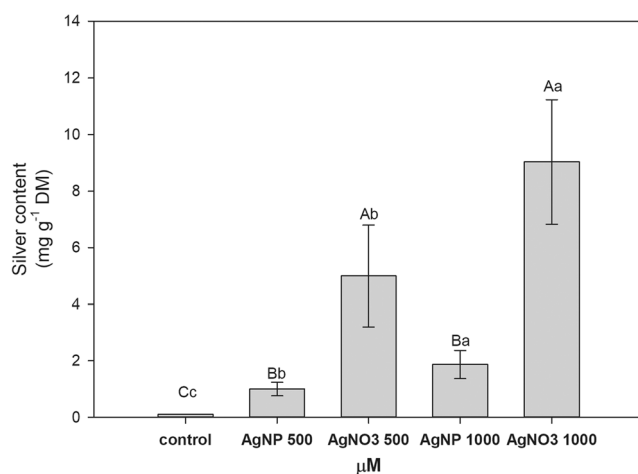


Fig. 2 The silver content in leaves of *Sorghum* plants exposed to increasing concentrations of AgNP and AgNO₃. Values represent the means $\pm$ SD of five replicates and, when labeled with different letters, are significantly different. Uppercase letters represent differences between AgNP and AgNO₃ at the same concentration. Lowercase letters represent significant differences between different concentrations of the same treatment (two-way ANOVA, Tukey's test; $P<0.05$)

Morpho-anatomical characterization

AgNP at 1, 10, and 100 μ M did not promote significant changes in the stress indicators (described above), and due to that, the biochemical and morpho-anatomical analyses were assessed only with the two highest concentrations (500 and 1000 μ M). Corroborating the previous results, the anatomical analyses show that AgNO₃ caused more injury in plant tissues compared with AgNP (Fig. S1). The anatomical profile of the leaf sheaths of seedlings in the absence of AgNP or AgNO₃ (control) displayed epidermis with cuboid cells of different sizes and predominance of stomata in the abaxial side. The cells were slightly cylindrical; the mesophyll had four layers of homogeneous parenchyma with large intercellular spaces. The collateral vascular bundles, along with the xylem and phloem cells, had sclerenchyma and gelatinous fibers, between the phloem and abaxial epidermis (Fig. S1B).

The leaf sheath of seedlings exposed to 500 μ M AgNP showed the epidermis similar to the control. However, the mesophyll had less intercellular spaces and cells with an irregular

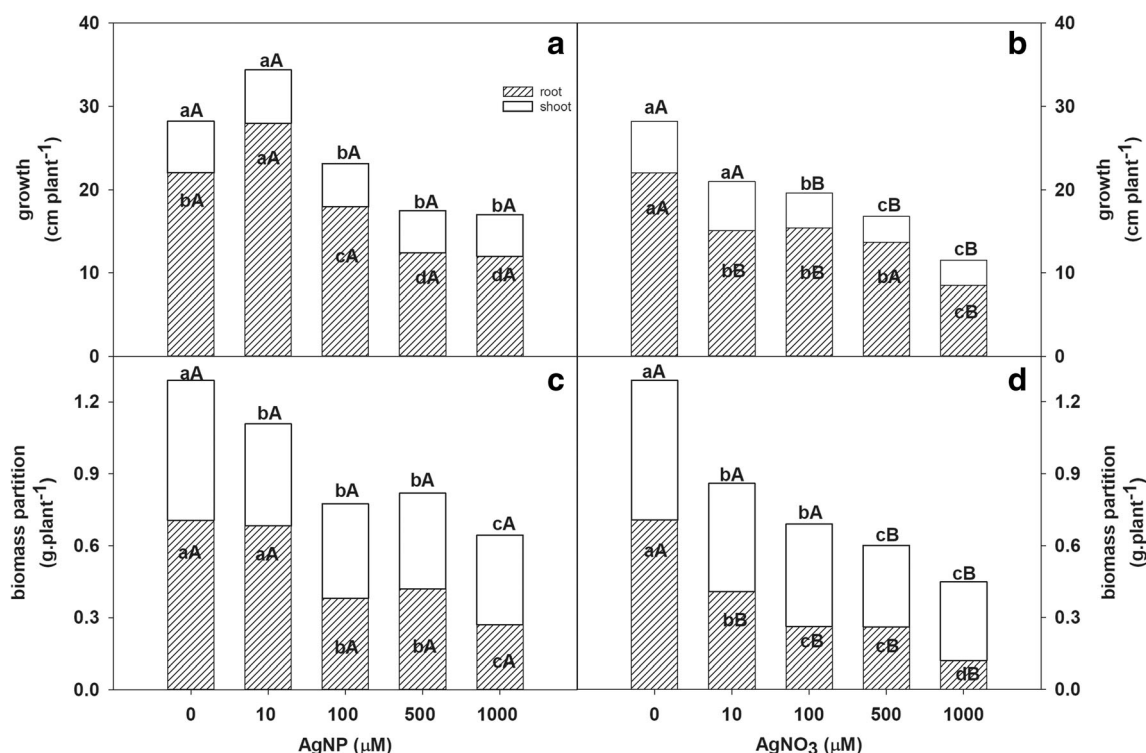


Fig. 3 Growth (A and B) and biomass partition (C and D) of roots and shoot of Sorghum plants exposed to increasing concentrations of AgNP and AgNO₃. Values represent the means $\pm$ SD of thirty replicates and are significantly different when labeled with different letters. Uppercase

letters represent differences between AgNP and AgNO₃ at the same concentration and lowercase letters represent significant differences between different concentrations of the same treatment (two-way ANOVA, Tukey's test; $P < 0.05$)

shape. The vascular bundle showed cells, qualitatively, smaller, and compacted (Fig. S1E), compared with the control (Fig. S1B). The seedling exposed to 1000 μ M AgNP, besides the general arrangement similar to the control, exhibited more structural differences: the mesophyll's parenchymatous cells were less turgid, and the vascular bundles showed cells that seem more immature compared with the control (Fig. S1H), for instance, a cell with the cellular wall not differentiated yet.

The leaf sheath of the seedling exposed to 500 μ M AgNO₃ showed the epidermis similar to the control. However, the mesophyll had less intercellular spaces and cells with an irregular shape, and the vascular bundle showed smaller, and compacted cells (Fig. S1K), compared with control (Fig. S1B). The seedling exposed to 1000 μ M AgNO₃ showed similar features compared with the plants exposed to 500 μ M AgNO₃, unlike the vascular bundles that exhibited cells considerably different on its arrangement, since the parenchymatous cells of the xylem up to the gelatinous fibers, that were not developed at all (Fig. S1N).

The leaf blade of the seedlings from the control treatment showed epidermis with cuboid to spherical cells on both surfaces, and stomata occurring only on the abaxial side. The mesophyll has 4-5 layers of chlorophyll parenchyma with smaller cells compared with the epidermis, showing intercellular spaces and vascular bundles smaller than those in the sheath (Fig. S1C). The leaf blade of the seedlings exposed to 500 μ M AgNP showed a general arrangement similar to

control (Fig. S1F), and the leaf blades of plants exposed to 1000 μ M AgNP also had a similar anatomical profile compared with control, except for the presence of stomata in both epidermis surface (Fig. S1I). The leaf blade of seedlings treated with AgNO₃ 500 μ M differed from the control in the epidermis with normal withered cells and qualitatively more stomata in the abaxial surface. Also, the mesophyll displayed fewer layers than the control (Fig. S1L). Besides, the vascular bundles were still similar to those found in the control leaf blade. Concerning the highest concentration (AgNO₃ 1000 μ M), few modifications were compared with control, as the epidermis in the abaxial surface that showed more papillose, and the mesophyll was relatively more flaccid, and also there were stomata in both epidermis surface (Fig. S1O).

Stress indicators

The relative water content (RWC), an indicator of the plant water status, was slightly increased in plants exposed to 500 μ M and 1000 μ M of AgNP, but it was significantly decreased in plants exposed to 500 μ M (8.5%) and 1000 μ M (5.6%) AgNO₃ (Table 1). The electrolyte leakage, a physiological indicator of membrane damage, did not change in plants exposed to 500 μ M AgNP, and it was significantly increased by two-fold in plants exposed to 1000 μ M AgNP. In contrast, plants exposed to 500 μ M AgNO₃ displayed

higher electrolyte leakage compared with the same concentrations of AgNP (Table 1). For plants exposed to 500 μM and 1000 μM of AgNP, the chlorophyll *a* content decreased while chlorophyll *b* was increased (Table 1). In contrast, the exposure to AgNO₃ in both concentrations decreased both chlorophylls' content compared with control (Table 1). Concerning the carotenoid content, at 500 μM and 1000 μM , AgNP increased its concentration, while AgNO₃ induced a significant decrease (Table 1).

The total soluble protein was maintained in the control level in plants exposed to 500 μM AgNP and significantly decreased in plants exposed to 1000 μM AgNP. The exposure of AgNO₃ caused more substantial effects on the accumulation of proteins compared with AgNP treatments (Table 1). The lipid peroxidation (TBARS) was significantly increased in plants exposed to AgNP and AgNO₃, at 500 and 1000 μM . This effect was more intense to AgNO₃ by more than twofold compared with the control, reaching 57.63% for 1000 μM and 40.9% for AgNP at 1000 μM (Table 1).

Balance of photosynthetic yields in presence of AgNP and AgNO₃

The potential quantum yield of PSII (FvFm) was significantly decreased in plants exposed to AgNP and AgNO₃ (Fig. 4A). However, the exposure of 1000 μM AgNO₃ possibly promoted PSII photoinhibition in sorghum leaves. The effective quantum yield of PSII [Y(II)] did not change in plants exposed to 500 μM AgNP (Fig. 4B). The exposure of 500 and 1000 mM AgNO₃ and 1000 mM AgNP decreased the Y(II) compared with control (Fig. 4B). The non-photochemical quenching was increased in plants exposed to 500 and 1000 mM AgNP and strongly increased in plants exposed to 500 mM AgNO₃ (Fig. 4C). Interesting to note that the

exposure of 1000 mM AgNO₃ disrupted the NPQ activation, with plants showing lower values of NPQ, as control (Fig. 4C).

Hydrogen peroxide, enzymatic and non-enzymatic antioxidants

The previous results showed that AgNO₃ was more harmful relative to AgNP in many aspects of plant physiology and metabolism. Thus, it is essential to know if these harmful effects of AgNO₃ were related to the production of reactive oxygen species (ROS). The data show that the H₂O₂ content was significantly increased in plants exposed to 500 μM and 1000 μM of AgNP and AgNO₃, with higher concentrations of H₂O₂ in plants exposed to the highest concentration of AgNO₃ (Fig. 5A).

The catalase (CAT) activity, an important enzyme that scavenges the H₂O₂, was significantly increased in plants exposed to AgNP compared with control (Fig. 5B). In contrast, CAT activity did not change in plants exposed to increasing concentration of AgNO₃ relative to control (Fig. 5B). The ascorbate peroxidase (APX) activity did not change in plants exposed to 500 μM AgNP, and it was increased under the exposure of 1000 μM AgNP (Fig. 5C). In contrast, APX activity decreased in plants exposed to both treatments of AgNO₃. The superoxide dismutase (SOD) increased in all treatments than control (Fig. 5D), showing that this enzyme has a possible important role in scavenging ROS in plants exposed to both AgNP and AgNO₃.

In plants exposed to AgNP and AgNO₃, the total glutathione, a non-enzymatic antioxidant, and its oxidized form (GSSG) were increased with the highest values in plants exposed to 1000 μM of AgNP (Fig. 6). In contrast, the reduced form of glutathione (GSH) was decreased in plants exposed to both AgNP and AgNO₃ (Fig. 6).

Table 1 Relative water content, electrolyte leakage, pigment contents, total soluble proteins, and lipid peroxidation (TBARS) in *Sorghum* leaves exposed to increasing concentrations of AgNP and AgNO₃. Values represent the means $\pm$ SD of five replicates and when labeled with different letters are significantly different. Uppercase letters represent

differences between AgNP and AgNO₃ at the same concentration. Lowercase letters represent significant differences between different concentrations of the same treatment (Two-way ANOVA, Tukey's test; $P < 0.05$)

	AgNP			AgNO ₃	
	Control	500 μM	1000 μM	500 μM	1000 μM
Relative water content (%)	87.8aA	90.8aA	90.7aA	80.4bB	82.9bB
Electrolyte leakage (%)	35.6bB	34.7bB	73.0aB	49.6bA	81.8aA
Chl a (mg g ⁻¹ FM)	0.22a	0.16aB	0.13bA	0.19aA	0.11bB
Chl b (mg g ⁻¹ FM)	0.14aB	0.17aA	0.18aA	0.12aB	0.13aB
Carotenoids (mg g ⁻¹ FM)	41.2aB	56.8aA	58.5aA	25.4aB	12.2bB
Total soluble protein (mg g ⁻¹ FM)	2.62aA	2.23aA	1.80bA	1.62aB	1.40bB
TBARS (nmol MDA- TBA g ⁻¹ FM)	27.1cC	38.4bB	40.9aA	42.5bB	57.6aA

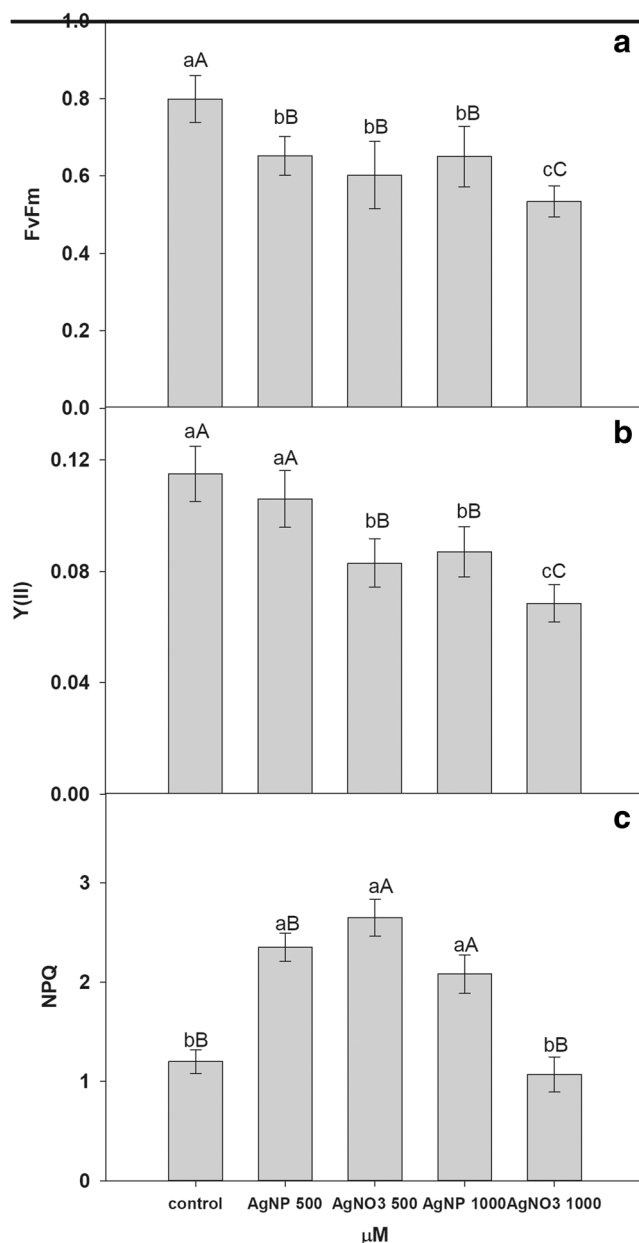


Fig. 4 The potential quantum yield of PSII (Fv/Fm) (A), the effective quantum yield of PSII [Y(II)] and non-photochemical quenching in leaves of sorghum plants exposed to increasing concentrations of AgNP and AgNO₃. Values represent the means $\pm$ SD of five replicates and, when labeled with different letters, they are significantly different. Uppercase letters represent differences between AgNP and AgNO₃ at the same concentration. Lowercase letters represent significant differences between different concentrations of the same treatment (two-way ANOVA, Tukey's test; $P < 0.05$)

AgNP and AgNO₃ alter the topology and connectivity of correlation-based networks

Correlation-based networks demonstrate that the exposure of 1000 μ M of AgNP and AgNO₃ changed substantially the topology and the connectivity of the networks (Fig. S2). The network of control plants changed from highly integrated and connected network to less connected and fragmented network

in presence of AgNP and AgNO₃ (Fig. S2). This is evidenced by the lower network density, and the lower average number of links displayed by the networks of sorghum exposed to AgNP and AgNO₃ compared with control (Table S1). AgNP and AgNO₃ networks were 6% and 18% less connected than networks from control (Table S1, Fig S2).

The network heterogeneity was 55% and 51% lower in AgNP and AgNO₃ networks, respectively (Table S1). A high heterogeneity of a network reflects the tendency of a network to have few nodes highly connected, indicating that in sorghum exposed to AgNP and AgNO₃ few nodes have high degree of connections compared with control. Furthermore, AgNP and AgNO₃ networks displayed a lower clustering coefficient compared with control, and AgNP presented a higher network centralization compared with control. In contrast, AgNO₃ network displayed the highest value of network centralization among all treatments.

Discussion

Nowadays, biological AgNP are considered a good option for solving problems related to global food security and sustainable resources. In this scenario, understanding the interactions between AgNP and plants are fundamental as plants are the basis of food chains and essential in all ecosystems. In plants, AgNP have been used to induce seed germination, increase crop yield and promote growth. Also, nanoparticles characterization by different methods (e.g., UV-Vis, FTIR, XRD, EDX, TEM and DLS, P ζ and PDI) are crucial to determine the morphological characteristics, application and, in case of biological AgNP their biocompatibility (Ottoni et al. 2017). AgNP have crucial antimicrobial action and, nowadays, their applications are in several fields, including agricultural practices. This vast AgNP application increases the risk of releasing these materials into the environment and raises the potential for transfer into plants and, subsequently, the human body (Noori et al., 2020). Moreover, it is a consensus that AgNP and Ag⁺ are toxic at different levels depending on the concentration and organisms tested. Pradas del Real et al. (2017) highlighted the effect that plant growth and development are intrinsically associated with the AgNP structure and morphology.

Some previous studies have reported the impacts of commercial AgNP in plants. In contrast, few of them were investigated using biogenic AgNP. The impact of micogenic AgNP from the fungus *A. Tubingensis* on rice seeds (*Oryza sativa*) was previously investigated by our group (Ottoni et al., 2020). Accordingly, the spherical AgNP with an average size of 35 ± 10 nm, presented a dose-dependent inhibitory effect. Similar results were recently described by Verma et al. (2020). Spherical and oval AgNP synthesized by a nanogreen method using *Annona* improved the yield components such as seeds

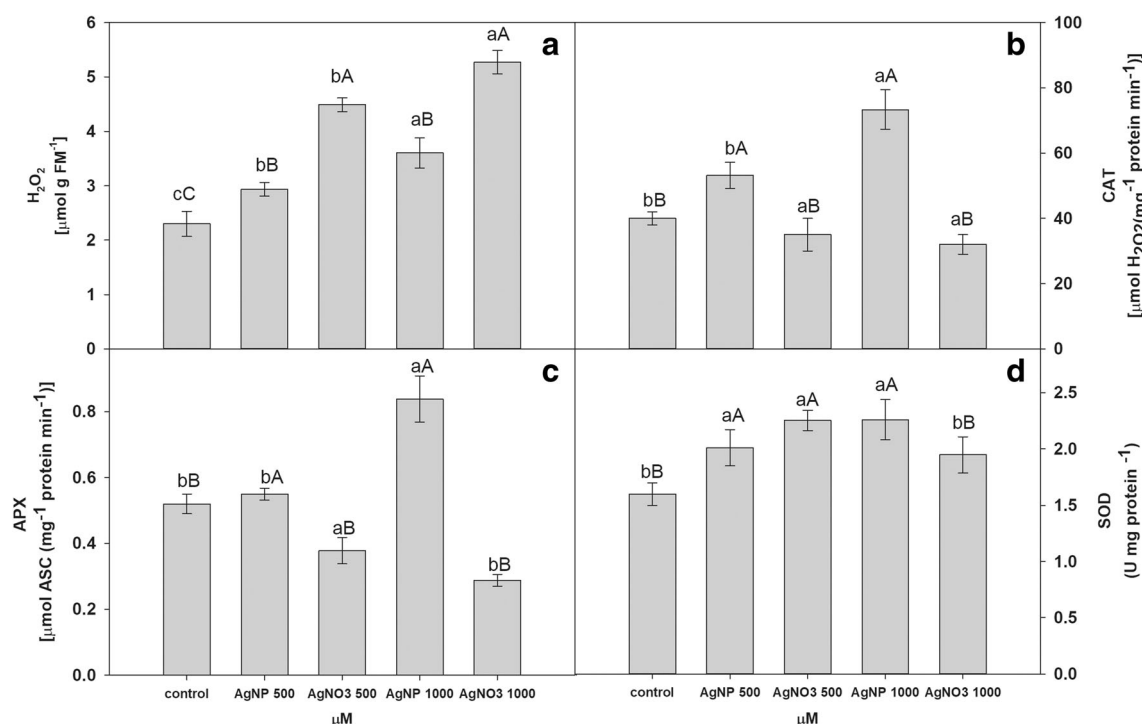


Fig. 5 Hydrogen peroxide content (A), catalase activity (B), ascorbate peroxidase activity (C), and superoxide dismutase activity (D) in leaves of *Sorghum* plants exposed to increasing concentrations of AgNP and AgNO₃. Values represent the means $\pm$ SD of five replicates and, when labeled with different letters, they are significantly different. Uppercase

letters represent differences between AgNP and AgNO₃ at the same concentration. Lowercase letters represent significant differences between different concentrations of the same treatment (two-way ANOVA, Tukey's test; $P < 0.05$)

weight, size, and shape compared to the control plant in *Phaseolus vulgaris*. The most effective treatment was the exposure of 60 mg L⁻¹ of AgNP.

Li et al. (2020) described that growth inhibition was Ag species-independent and dose-nonspecific, despite a decreasing trend of biomass with exposure dose and more biomass

loss in the exposure of dissolved Ag⁺ groups. The authors described that for the biomass of lettuce seedlings, polyvinylpyrrolidone-coated silver nanoparticles (particle size 16.5 ± 0.3 nm) were more deleterious when applied to roots than leaves. Additionally, they reinforce that biomass, ultra-structural damages, H₂O₂, and malondialdehyde are the primary endpoints, corroborating our results. Noori et al. (2020) reported for tomato (*Lycopersicon esculentum*) the reduction in plant growth by 30, 75, and 90%, compared to the control, for plants exposed to 20 mg/L bulk metal (Ag), polyvinylpyrrolidone-coated AgNP (20 nm), and AgNO₃, respectively for 7 days.

Our data clearly show that higher concentrations of AgNO₃ impaired sorghum's seed germination. However, at the same concentration, the biogenic AgNP promoted only a delay in germination. This delay could be related to the osmotic strength of the solution of AgNO₃ relative to AgNP, hindering the seeds in absorbing water (Fig. 1). Sorghum germination was not severely affected by the exposure to AgNP and AgNO₃ in both concentrations applied. Previous work had evidenced partial inhibitory effects of aqueous suspensions of synthetic AgNP (1–20 nm) at 10 mg L⁻¹ in seed germination with a considered reduction in shoot growth, a more sensitive endpoint than seed germination percentage (El-Temsah and Joner 2012). In contrast, 0.1 mM of biological AgNP (25 nm) increased seed germination in barley, and for higher

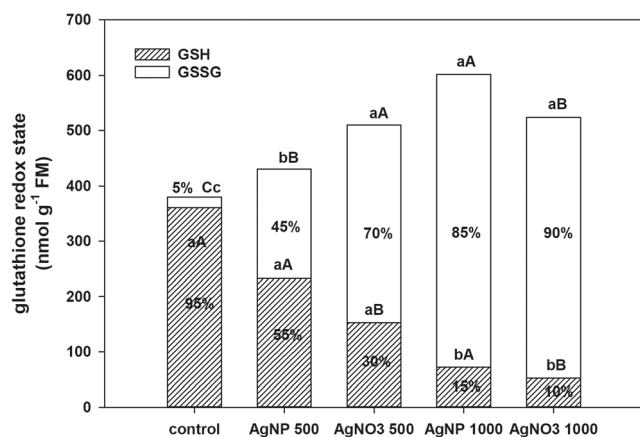


Fig. 6 Total glutathione, reduced (GSH) and oxidized (GSSG) of glutathione *Sorghum* leaves exposed to increasing concentrations of biogenic AgNP and AgNO₃. Values represent the means $\pm$ SD of five replicates and when labeled with different letters are significantly different. Uppercase letters represent differences between AgNP and AgNO₃ at the same concentration. Lowercase letters represent significant differences between different concentrations of the same treatment (two-way ANOVA, Tukey's test; $P < 0.05$)

concentrations (0.5 and 1 mM), seed germination was decreased, and a substantial reduction in root length was shown (Fayez et al. 2017).

Supporting our hypothesis, the silver content in sorghum plants was strongly increased in plants exposed to AgNO₃ relative to AgNP (Fig. 2), showing that AgNP is less efficient in dissociating Ag⁺ ions compared with the same concentration of AgNO₃. The exposure of AgNP and AgNO₃ disrupted the average growth and biomass partition in sorghum. However, AgNO₃ had a more significant impact on these parameters than the same concentrations of AgNP (Fig. 3). Interesting to note that 10 µM AgNP increased root length compared with control (Fig. 3). It was previously reported that the exposure of biological AgNP (47 nm) promoted a 326% increase in root length and 133% in the vigor index in *B. juncea* (Vishwakarma et al. 2017).

In contrast, there is a report of synthetic AgNP (10 nm) dose-dependent inhibition of wheat growth (Dimkpa et al. 2013). Also, no significant effect on the seedling growth of an aquatic plant water hyacinth *Eichhornia crassipes* was reported for biogenic AgNP (Rani et al. 2016). In this previous report, and probably in the AgNP of this study, the biomolecules (proteins) found around the nanoparticles contribute for lesser dissolution due to surface coating similar to polyvinylpyrrolidone and other coatings that bind to the surface of the nanoparticles and consequently, displaying a less toxic effect (Nallanthighal et al. 2017).

The morpho-anatomical comparison between the treatments with AgNP and AgNO₃ clearly showed that the AgNP caused less structural damage than AgNO₃ in equivalent concentrations. Seedlings exposed to AgNO₃ showed more severe damages in the vascular system, i.e., in the vascular bundles and the fibers (Fig. S1). Similar cell arrangement in the fundamental tissue, and in the parenchymatous cells close to the vascular elements, were also recorded in rice seedlings exposed to silver nanoparticles (Thuesombat et al. 2014). Although the mechanism allowing the AgNP to penetrate in plant tissues is still unclear, these particles may go through the cell membrane or diffuse by the lipid bilayer (Thuesombat et al. 2014). In contrast, the AgNO₃, besides promoting four-fold more silver accumulation in the tissue, it was able to induce more systemic damages, provoking cellular injuries in the vascular system.

The relative water content (RWC) was slightly increased and significantly decreased in plants exposed to AgNP and AgNO₃, respectively (Table 1). The decrease in the RWC content in AgNO₃ exposed plants was probably related to the osmotic strength of the salt's dissociated solution, decreasing the water potential. The membrane damage was higher in AgNO₃ exposed plants relative to plants exposed to AgNP, corroborating our previous results that AgNO₃ is more toxic than the biogenic AgNP (Table 1). The exposure of 500 µM AgNP triggered a decrease in chlorophyll *a* content and a

concomitant increase in chlorophyll *b* and carotenoids, compared with control. This pattern could be an acclimation response of sorghum plants to avoid the excess energy from light-harvesting, avoiding ROS production (Ogbaga et al. 2014). In contrast, the exposure of AgNO₃ decreased the contents of the pigments (Table 1).

The lipid peroxidation (TBARS) was increased in both AgNP and AgNO₃ treatment (Table 1). However, AgNO₃ exposure had a higher accumulation of TBARS than the same concentrations of AgNP, showing that the effects on membrane damage were related to ROS production (Table 1). Recent research in *Arabidopsis* showed that a synthetic AgNP induced ROS accumulation and decreased photosynthesis (Zhang et al. 2019). The hydrogen peroxide content was higher in plants exposed to AgNO₃ compared with AgNP (Fig. 5A), corroborating our previous results of membrane damage and lipid peroxidation. Altogether, our data clearly show that AgNO₃ has more toxic effects relative to AgNP in the concentrations studied. Also, these harmful effects of AgNO₃ were related to increases in ROS and their effects on plant metabolism and cell integrity.

In order to understand the antioxidant metabolism in sorghum exposed to AgNO₃ and AgNP, the activities of important enzymatic and non-enzymatic antioxidants were measured. The exposure of AgNP increased the activities of CAT, a critical enzyme scavenging H₂O₂ (Fig. 5B). In contrast, when plants were exposure of AgNO₃, the activity of this critical enzyme did not change compared with control. This inactivation of CAT activity was probably related to the higher content of H₂O₂ in plants exposed to AgNO₃ (Fig. 5A). It was previously shown that catalase activity is lost at high H₂O₂ concentration (Lardinois et al. 1996). It was previously shown that free Ag⁺ is more toxic to CAT activity than Hg, Cu, or Cd (Inamine and Baker 1989).

The ascorbate peroxidase (APX) is another essential enzyme scavenging H₂O₂ in plant cells (Nakano and Asada 1981b). APX has a very high affinity for H₂O₂ (µM range), whereas CAT has a relatively low affinity (mM range) (Wu et al. 2018). Thus, the effective removal of H₂O₂ by CAT is best achieved when its concentration and activity are high, and this enzyme is also characterized by higher turnover compared with APX (Schrader and Fahimi 2006). Consequently, CAT is very efficient in removing H₂O₂ at high concentrations, but they are less suitable than APX and other peroxidases for finely tuned H₂O₂ signaling mechanisms (Rizhsky et al. 2004). The APX activity was inhibited in plants exposed to AgNO₃, probably by the toxic effects of free Ag⁺ (Fig. 5C). In addition, superoxide dismutase (SOD), responsible for superoxide disproportion to H₂O₂, was increased in all treatments (Fig. 5D). Due to that, it is plausible to argue that SOD is an essential indicator of the harmful effects of AgNP and AgNO₃ in sorghum plants. *E. crassipes* exposed to increasing concentrations of synthetic AgNP (70 nm) displayed increases in

SOD activity and decreases in CAT and POD activities compared with control (Rani et al. 2016), which is in accordance with our results.

The total glutathione was increased in sorghum plants exposed to AgNP and AgNO₃ (Fig. 6). However, a large fraction of this glutathione was oxidized. Consequently, due to the reduced glutathione consumption, additional glutathione synthesis was triggered because GSH (reduced form) is a feedback inhibitor of glutathione biosynthesis. Based on a previous report (Goh et al. 2011), it is possible to hypothesize that the changes described above may have resulted from the induction of the ascorbate-glutathione cycle in plants exposed to the toxic effects of AgNP and AgNO₃. A recent study, with *Pennisetum glaucum* L. seedlings exposed to AgNP, showed a reduction in CAT, APX, GPX, and POD activities compared with the control. Also, the authors have shown a comparatively lower reduction was noted by comparison with AgNO₃; this might indicate that AgNP has a strong interaction with proteins found in the lipid bilayer and cytosol, thus altering its configuration and negatively influencing the antioxidant defense systems (Khan et al. 2019).

The antioxidant metabolism's significant induction maintained the photosynthetic electron transport regulation, displaying low photoinhibition (Fig. 4A). It was clearly shown that the activation of the non-photochemical quenching in plants exposed to AgNP was essential to maintain the quantum efficiency (YII) of the photosystem II (PSII) (Fig. 4B–C). In contrast, plants exposed to 100 mM AgNO₃ decreased NPQ, Y(II), and Fv/Fm, corroborating the harmful effects of ROS increase leading to photoinhibition (Fig. 4).

Altogether, in an integrated view of our data, by comparing the parameters of the network analysis, the exposure of AgNP was less harmful to the topology and connectance of the networks compared with AgNO₃ (Fig. S2, Table S1). Plants exposed to AgNO₃ displayed a less connected network, with lower strengths among links compared with AgNP and control. Elements strongly connected (networks with high connectance) could promote a higher ability of the network to implement adjustments quickly and accurately because the responses would propagate faster through the network (Bertolli et al. 2013). It is important to note that the maintenance of homeostasis on biological systems is based on a series of internal adjustments that allow the system to keep functioning within its own dynamic equilibrium. Small differences in network parameters could imply that the system under analysis was able to maintain its homeostasis in face of the stress, modulating many steps on its metabolism (Sheth and Thaker 2014). Thus, the network analyses corroborate our previous results, providing evidence on the presence of patterns of sorghum metabolism in response to a biogenic AgNP and AgNO₃.

Conclusions

The results show that both AgNP and AgNO₃ in high concentrations compromise sorghum germination, growth, and biomass partition. However, in our study, AgNO₃ promoted more harmful effects compared with the biogenic AgNP. These effects were possibly related to the higher concentration of Ag⁺ in plants exposed to AgNO₃, causing an imbalance in the plant cell's redox homeostasis. To cope with the toxicity of AgNP, sorghum plants triggered antioxidant responses such as increasing the activities of SOD, APX, and CAT, and by increasing the concentration of glutathione. In contrast, only the SOD activity was increased in plants exposed to AgNO₃, probably due to the toxic effects of the high concentration of dissociated Ag⁺ in CAT and APX. Corroborating our data, in an integrative and systemic view, by comparing the networks in different treatments, AgNO₃ was more harmful to sorghum than AgNP, promoting topology and connectivity changes in their networks. Further research on the antioxidant metabolism and acclimation responses to the phytotoxic effects of biogenic AgNP can lead to novel approaches to these nanomaterials' use and production. Nevertheless, it is important to be cautious on the extrapolation of our data to the reality of plant growth in its natural environment since important interactions among the nanoparticles, the soil solution, the microbiota, and the plant system could change plant responses and metabolism. In fact, our data contribute to the general knowledge of plant-NP interactions not taken into account the interactive effects of environmental constraints. Therefore, this work reinforces the importance of studying the phytotoxic effects of biogenic AgNP in plant metabolism under field conditions.

Abbreviations AgNP, Silver nanoparticle; AgNO₃, Silver nitrate; APX, Ascorbate peroxidase; ASC, Ascorbate; CAT, Catalase; *chl*, Chlorophyll; ROS, Reactive oxygen species; PPFD, Photosynthetic photon flux density; rcf, Relative centrifuge force; RWC, Relative water content; TBARS, Thiobarbituric acid-reactive substances

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s11356-021-13069-4>.

Author contribution ABSZ: conducting the experiments, analysis and interpretation of the data. CAO: conception and design, drafting the manuscript, provision of materials. CNC: analysis and data interpretation, technical support, collection and assembly data. OJGA: drafting of the article, data analysis and interpretation of morpho-anatomical analysis. AOS: critical revision of the article, obtaining of funding, provision of study materials. MCLN: conception and design, analysis and interpretation, obtaining funding, provision of materials, writing-reviewing, and editing. All authors approved the manuscript.

Funding This work was supported by grant #2018/0458-6 and #2010/50186-5, São Paulo Research Foundation (FAPESP) and grant #404707/

2018-1 National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and also for the scholarship granted to ABSZ by CAPES.

Data availability The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Declarations

Ethics approval and consent to participate Not applicable

Consent for publication Not applicable

Competing interests The authors declare that they have no competing interests.

References

- Agbedahin AV (2019) Sustainable development, Education for Sustainable Development, and the 2030 Agenda for Sustainable Development: Emergence, efficacy, eminence, and future. *Sustainable Development* 27(4):669–680
- Anjum NA, Gill SS, Duarte AC, Pereira E, Ahmad I (2013) Silver nanoparticles in soil-plant systems. *Journal of Nanoparticle Research* 15. <https://doi.org/10.1007/s11051-013-1896-7>
- Assenov Y, Ramirez F, Schelhorn SESE, Lengauer T, Albrecht M (2008) Computing topological parameters of biological networks. *Bioinformatics* 24:282–284. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm554>
- Basu S, Duren W, Evans CR, Burant CF, Michailidis G, Karnovsky A (2017) Sparse network modeling and metscape-based visualization methods for the analysis of large-scale metabolomics data. *Bioinformatics* 33:1545–1553. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx012>
- Benn TM, Westerhoff P (2008) Nanoparticle Silver Released into Water from Commercially Available Sock Fabrics. *Environmental Science & Technology* 42:4133–4139. <https://doi.org/10.1021/es7032718>
- Bertolli SC, Vitolo HF, Souza GM (2013) Network connectance analysis as a tool to understand homeostasis of plants under environmental changes. *Plants* 2:473–488. <https://doi.org/10.3390/plants2030473>
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Cakmak I, Horst WJ (1991) Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiologia Plantarum* 83:463–468. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1991.tb00121.x>
- Courtois P, Rorat A, Lemièrre S, Guyoneaud R, Attard E, Levard C, Vandenbulcke F (2019) Ecotoxicology of silver nanoparticles and their derivatives introduced in soil with or without sewage sludge: A review of effects on microorganisms, plants and animals. *Environmental Pollution* 253:578–598. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.07.053>
- Cvijetko, P., Milosic, A., Domijan, A.M., Vinkovic Vreck, I., Tolic, S., Peharec S?tefanic P, Letofsky-Papst I, Tkalec M, Balen B 2017. Toxicity of silver ions and differently coated silver nanoparticles in *Allium cepa* roots. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 137, 18–28. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.11.009>
- Dewez D, Goltsev V, Kalaji HM, Oukarroum A (2018) Inhibitory effects of silver nanoparticles on photosystem II performance in *Lemna gibba* probed by chlorophyll fluorescence. *Current Plant Biology* 16:15–21. <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2018.11.006>
- Dietz KJ, Herth S (2011) Plant nanotoxicology. *Trends in Plant Science* 16:582–589. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.08.003>
- Dimkpa CO, McLean JE, Martineau N, Britt DW, Haverkamp R, Anderson AJ (2013) Silver Nanoparticles Disrupt Wheat (*Triticum aestivum* L.) Growth in a Sand Matrix. *Environmental Science & Technology* 47:1082–1090. <https://doi.org/10.1021/es302973y>
- El-Temsah YS, Joner EJ (2012) Impact of Fe and Ag nanoparticles on seed germination and differences in bioavailability during exposure in aqueous suspension and soil. *Environmental Toxicology* 27:42–49. <https://doi.org/10.1002/tox.20610>
- Fayez KA, El-Deeb BA, Mostafa NY (2017) Toxicity of biosynthetic silver nanoparticles on the growth, cell ultrastructure and physiological activities of barley plant. *Acta Physiologiae Plantarum* 39. <https://doi.org/10.1007/s11738-017-2452-3>
- Geranio L, Heuberger M, Nowack B (2009) The Behavior of Silver Nanotextiles during Washing. *Environmental Science & Technology* 43:8113–8118. <https://doi.org/10.1021/es9018332>
- Giannopolitis CN, Ries SK (1977) Superoxide dismutases: Occurrence in higher plants. *Plant Physiology* 59:309–314
- Goh C-H, Ko S-M, Koh S, Kim Y-J, Bae H-J (2011) Photosynthesis and Environments: Photoinhibition and Repair Mechanisms in Plants. *Journal of Plant Biology* 55:93–101. <https://doi.org/10.1007/s12374-011-9195-2>
- Griffith OW (1980) Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Analytical Biochemistry* 106:207–212. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(80\)90139-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(80)90139-6)
- Havir EA, McHale NA (1987) Biochemical and Developmental Characterization of Multiple Forms of Catalase in Tobacco Leaves. *PLANT PHYSIOLOGY* 84:450–455. <https://doi.org/10.1104/pp.84.2.450>
- Inamine G, Baker J (1989) A catalase from tomato fruit. *Phytochemistry* 28:345–348
- Jiang HS, Li M, Chang FY, Li W, Yin LY (2012) Physiological analysis of silver nanoparticles and AgNO₃ toxicity to *Spirodela polyrhiza*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 31:1880–1886. <https://doi.org/10.1002/etc.1899>
- Jiang HS, Yin LY, Ren NN, Zhao ST, Li Z, Zhi Y, Shao H, Li W, Gontoro B (2017) Silver nanoparticles induced reactive oxygen species via photosynthetic energy transport imbalance in an aquatic plant. *Nanotoxicology* 11:157–167. <https://doi.org/10.1080/17435390.2017.1278802>
- Johansen DA (1940) *Plant Microtechnique*. McGraw-Hill, New York, NY
- Khan I, Raza MA, Khalid MHB, Awan SA, Raja NI, Zhang X, Min S, Wu BC, Hassan MJ, Huang L (2019) Physiological and Biochemical Responses of Pearl Millet (*Pennisetum glaucum* L.) Seedlings Exposed to Silver Nitrate (AgNO₃) and Silver Nanoparticles (AgNPs). *International journal of environmental research and public health* 16:1–17. <https://doi.org/10.3390/ijerph16132261>
- Lardinois OM, Mestdagh MM, Rouxhet PG (1996) Reversible inhibition and irreversible inactivation of catalase in presence of hydrogen peroxide. *Biochimica et biophysica acta* 1295:222–238
- Larue C, Castillo-Michel H, Sobanska S, Cécillon L, Bureau S, Barthès V, Ouerdane L, Carrière M, Sarret G (2014) Foliar exposure of the crop *Lactuca sativa* to silver nanoparticles: Evidence for internalization and changes in Ag speciation. *Journal of Hazardous Materials* 264:98–106. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.10.053>
- Li W-Q, Qing T, Li C-C, Li F, Ge F, Fei J-J, Peijnenburg WJGM (2020) Integration of subcellular partitioning and chemical forms to understand silver nanoparticles toxicity to lettuce (*Lactuca sativa* L.) under different exposure pathways. *Chemosphere* 258:127349. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127349>
- Lichtenthaler H, Wellburn A, Lichtenthaler HK, Wellburn AR (1983) Determination of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf

- extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions* 11: 591–592. <https://doi.org/10.1042/bst0110591>
- Lima Neto MC, Silveira JAG, Cerqueira JVA, Cunha JR (2017) Regulation of the photosynthetic electron transport and specific photoprotective mechanisms in *Ricinus communis* under drought and recovery. *Acta Physiologiae Plantarum* 39:183. <https://doi.org/10.1007/s11738-017-2483-9>
- Lin D, Xing B (2007) Phytotoxicity of nanoparticles: Inhibition of seed germination and root growth. *Environmental Pollution* 150:243–250. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.01.016>
- Liu J, Hurt RH (2010) Ion Release Kinetics and Particle Persistence in Aqueous Nano-Silver Colloids. *Environmental Science & Technology* 44:2169–2175. <https://doi.org/10.1021/es9035557>
- Maxwell K, Johnson GN (2000) Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *Journal of experimental botany* 51:659–668
- Mueller NC, Nowack B (2008) Exposure Modeling of Engineered Nanoparticles in the Environment. *Environmental Science & Technology* 42:4447–4453. <https://doi.org/10.1021/es7029637>
- Nakano Y, Asada K (1981a) Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts. *Plant and Cell Physiology* 22:867–880. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232>
- Nakano Y, Asada K (1981b) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol* 22:867–880
- Nallanthighal S, Chan C, Bharali DJ, Mousa SA, Vásquez E, Reliene R (2017) Particle coatings but not silver ions mediate genotoxicity of ingested silver nanoparticles in a mouse model. *NanoImpact* 5:92–100. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2017.01.003>
- Noori A, Donnelly T, Colbert J, Cai W, Newman LA, White JC (2020) Exposure of tomato (*Lycopersicon esculentum*) to silver nanoparticles and silver nitrate: physiological and molecular response. *International Journal of Phytoremediation* 22:40–51. <https://doi.org/10.1080/15226514.2019.1634000>
- Ogbaga CC, Stepien P, Johnson GN (2014) Sorghum (*Sorghum bicolor*) varieties adopt strongly contrasting strategies in response to drought. *Physiologia Plantarum* 152:389–401. <https://doi.org/10.1111/ppl.12196>
- Otoni CA, Simões MF, Fernandes S, dos Santos JG, Silva ES, de Souza RFB, Maiorano AE (2017) Screening of filamentous fungi for antimicrobial silver nanoparticles synthesis. *AMB Express* 7:31. <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0332-2>
- Otoni CA, Lima Neto MC, Léo P, Ortolan BD, Barbieri E, De Souza AO (2020) Environmental impact of biogenic silver nanoparticles in soil and aquatic organisms. *Chemosphere* 239:124698. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124698>
- Paterson AH, Bowers JE, Bruggmann R, Dubchak I, Grimwood J, Gundlach H, Haberer G, Hellsten U, Mitros T, Poliakov A, Schmutz J, Spannagl M, Tang H, Wang X, Wicker T, Bharti AK, Chapman J, Feltus FA, Gowik U, Grigoriev IV, Lyons E, Maher CA, Martis M, Narechania A, Otillar RP, Penning BW, Salamov AA, Wang Y, Zhang L, Carpita NC, Freeling M, Gingle AR, Hash CT, Keller B, Klein P, Kresovich S, McCann MC, Ming R, Peterson DG, Mehboob-ur-Rahman WD, Westhoff P, Mayer KFX, Messing J, Rokhsar DS (2009) The *Sorghum bicolor* genome and the diversification of grasses. *Nature* 457:551–556. <https://doi.org/10.1038/nature07723>
- Pereira SPP, Jesus F, Aguiar S, de Oliveira R, Fernandes M, Ranville J, Nogueira AJA (2018) Phytotoxicity of silver nanoparticles to *Lemna minor*: Surface coating and exposure period-related effects. *Science of The Total Environment* 618:1389–1399. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.275>
- Pradas del Real AE, Vidal V, Carrière M, Castillo-Michel H, Levard C, Chaurand P, Sarret G (2017) Silver Nanoparticles and Wheat Roots: A Complex Interplay. *Environmental Science & Technology* 51: 5774–5782. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b00422>
- Rani PU, Yasur J, Loke KS, Dutta D (2016) Effect of synthetic and biosynthesized silver nanoparticles on growth, physiology and oxidative stress of water hyacinth: *Eichhornia crassipes* (Mart) Solms. *Acta Physiologiae Plantarum* 38:1–9. <https://doi.org/10.1007/s11738-016-2074-1>
- Rastogi, Anshu, Zivcak, M., Tripathi, D.K., 2019a. Phytotoxic effect of silver nanoparticles in *Triticum aestivum* : Improper regulation of photosystem I activity as the reason for oxidative damage in the chloroplast Phytotoxic effect of silver nanoparticles in *Triticum aestivum* : Improper regulation of ph. <https://doi.org/10.32615/ps.2019.019>
- Rastogi, A., Zivcak, M., Tripathi, D.K., Yadav, S., Kalaji, H.M., 2019b. Phytotoxic effect of silver nanoparticles in *Triticum aestivum*: Improper regulation of photosystem I activity as the reason for oxidative damage in the chloroplast. *Photosynthetica* 57, 209–216. 10.32615/ps.2019.019
- Rizhsky, L., Liang, H., Shuman, J., Shulaev, V., Davletova, S., Mittler, R., 2004. When Defense Pathways Collide . The Response of Arabidopsis to a Combination of Drought and Heat Stress I [w]. *Stress: The International Journal on the Biology of Stress* 134, 1683–1696. <https://doi.org/10.1104/pp.103.033431.1>
- Rodrigues AG, Ping LY, Marcato PD, Alves OL, Silva MCP, Ruiz RC, Melo IS, Tasic L, De Souza AO (2013) Biogenic antimicrobial silver nanoparticles produced by fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97:775–782. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4209-7>
- Roy A, Bulut O, Some S, Mandal AK, Yilmaz MD (2019) Green synthesis of silver nanoparticles: biomolecule-nanoparticle organizations targeting antimicrobial activity. *RSC Adv* 9:2673–2702. <https://doi.org/10.1039/C8RA08982E>
- Salem SS, Fouda A (2020) Green synthesis of metallic nanoparticles and their prospective biotechnological applications: An overview. *Biol Trace Elem Res* 199:344–370. <https://doi.org/10.1007/s12011-020-02138-3>
- Schrader M, Fahimi HD (2006) Peroxisomes and oxidative stress. *Biochimica et biophysica acta* 1763:1755–1766. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.09.006>
- Simões MF, Otoni CA, Antunes A (2020) Biogenic Metal Nanoparticles: A New Approach to Detect Life on Mars? *Life* 10(3):28. <https://doi.org/10.3390/life10030028>
- Sheth BP, Thaker VS (2014) Plant systems biology: Insights, advances and challenges. *Planta* 240:33–54. <https://doi.org/10.1007/s00425-014-2059-5>
- Thuesombat P, Hannongbua S, Akasit S, Chadchawan S (2014) Effect of silver nanoparticles on rice (*Oryza sativa* L. cv. KDML 105) seed germination and seedling growth. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.03.022>
- Tripathi, A., Liu, S., Singh, P.K., Kumar, N., Pandey, A.C., Tripathi, D.K., Chauhan, D.K., Sahi, S., 2017. Differential phytotoxic responses of silver nitrate (AgNO₃) and silver nanoparticle (AgNps) in *Cucumis sativus* L. *Plant Gene* 0–1. <https://doi.org/10.1016/j.plgene.2017.07.005>, 11, 255
- Verma DK, Patel S, Kushwah KS (2020) Green biosynthesis of silver nanoparticles and impact on growth, chlorophyll, yield and phytotoxicity of *Phaseolus vulgaris* L. *Vegetos*. 33:648–657. <https://doi.org/10.1007/s42535-020-00150-5>
- Vishwakarma K, Shweta, Upadhyay N, Singh J, Liu S, Singh VP, Prasad SM, Chauhan DK, Tripathi DK, Sharma S (2017) Differential Phytotoxic Impact of Plant Mediated Silver Nanoparticles (AgNPs) and Silver Nitrate (AgNO₃) in *Brassica* sp. *Frontiers in Plant Science* 8:1501. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01501>
- Wu B, Li L, Qiu T, Zhang X, Cui S (2018) Cytosolic APX2 is a pleiotropic protein involved in H₂O₂ homeostasis, chloroplast protection, plant architecture and fertility maintenance. *Plant Cell Reports* 37: 833–848. <https://doi.org/10.1007/s00299-018-2272-y>

- Yan A, Chen Z (2019) Impacts of silver nanoparticles on plants: A focus on the phytotoxicity and underlying mechanism. *International Journal of Molecular Sciences* 20:23–25. <https://doi.org/10.3390/ijms20051003>
- Zhang CL, Jiang HS, Gu SP, Zhou XH, Lu ZW, Kang XH, Yin L, Huang J (2019) Combination analysis of the physiology and transcriptome provides insights into the mechanism of silver nanoparticles phytotoxicity. *Environmental Pollution* 252:1539–1549. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.06.032>
- Zhang L, Wei Y, Wang H, Wu F, Zhao Y, Liu X, Wu H, Wang L, Su H (2020) Green synthesis of silver nanoparticles using mushroom *Flammulina velutipes* extract and their antibacterial activity against aquatic pathogens. *Food Bioprocess Technol* 13:1908–1917. <https://doi.org/10.1007/s11947-020-02533-7>
- Zhou M, Diwu Z, Panchuk-Voloshina N, Haugland RP (1997) A Stable Nonfluorescent Derivative of Resorufin for the Fluorometric Determination of Trace Hydrogen Peroxide: Applications in Detecting the Activity of Phagocyte NADPH Oxidase and Other Oxidases. *Analytical Biochemistry* 253:162–168. <https://doi.org/10.1006/abio.1997.2391>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Capítulo 3:

Nanopartículas de prata biogênicas e sintéticas geram alterações metabólicas distintas em plantas de *Sorghum bicolor*

Este capítulo trata de uma investigação experimental acerca dos padrões de desenvolvimento, metabolismo antioxidativo e fotossintético de plantas de sorgo expostas a concentrações brandas (10 e 100 μM) e severas (500 e 1000 μM) de AgNP biogênica (AgNP-b), AgNP sintética (AgNP-s) e nitrato de prata (AgNO_3). Nesta seção, por fim, elucidaremos que as plantas de sorgo promovem ajustes metabólicos distintos quando são expostas a AgNP de origem produtiva diferentes. E que a eficiência destes ajustes metabólicos na manutenção da homeostase redox e da fotossíntese das plantas está intimamente relacionada com a força osmótica e a capacidade dissociativa dos íons de Ag^+ apresentada por cada tratamento. O capítulo será submetido em forma de artigo nas normas da revista: 'Environmental and Experimental Botany'.

Nanopartículas de prata biogênicas e sintéticas geram alterações metabólicas distintas em plantas de *Sorghum bicolor*

Ana Beatriz Sicchieri Ziotti^{1,2}, Cristiane Angélica Ottoni^{1,3}, Ana Olivia de Souza⁴, Milton Costa Lima Neto^{1,2}

¹Institute of Biosciences, São Paulo State University (UNESP), São Vicente, SP, Brazil

²Institute of Biosciences, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, SP, Brazil

³Institute for Advanced Studies of the Sea (IEAMar), São Paulo State University (UNESP), São Vicente, SP, Brazil

⁴Innovation and Development Laboratory, Institute Butantan, São Paulo, SP, Brazil

ana.b.ziotti@unesp.br, cristiane.ottoni@unesp.br, ana.souza@butantan.gov.br, milton.lima-neto@unesp.br

[Ana Beatriz S. Ziotti: ORCID 0000-0002-7811-8100](#), [Cristiane Angélica Ottoni: ORCID 0000-0003-4069-509X](#), [Ana Olivia de Souza: ORCID 0000-0001-6025-7500](#), [Milton Costa Lima Neto: ORCID 0000-0002-8867-7301](#)

Resumo

As AgNP apresentam características físico-químicas que tornam sua utilização diversa e amplamente difundida no mundo moderno. As plantas representam a primeira e principal via de entrada das AgNP na cadeia trófica e muitos trabalhos relatam prejuízos no desenvolvimento, metabolismo e fotossíntese das plantas expostas a estes nanoproductos. O objetivo do presente trabalho foi avaliar e comparar os efeitos fisiológicos e metabólicos sofridos por plantas de *Sorghum bicolor* (L.) Moench expostas a diferentes concentrações de AgNP de origem sintética (AgNP-s), de origem biogênica (AgNP-b) e nitrato de prata (AgNO₃). As AgNP-b foram sintetizadas por fungos marinhos e as AgNP-s por redução química de sais. As plantas de sorgo foram expostas a 0, 100, 500 e 1000 µM de AgNO₃, AgNP-b e AgNP-s. Foram mensurados: germinação, crescimento, alocação de biomassa, conteúdo de pigmentos, conteúdo relativo de água, dano de membrana, TBARS, atividades de SOD, APX e CAT, bem como, o conteúdo de H₂O₂, trocas gasosas e fluorescência de clorofila a. Foram feitas análises estatística e análises de redes correlação. Os resultados revelaram que as diferentes AgNP causam resposta metabólicas diferentes nas plantas de sorgo. Tanto as AgNP como o AgNO₃ induzem o estresse oxidativo nas plantas associado ao desbalanço fotossintético. Estes prejuízos são mais evidentes nas plantas tratadas com AgNO₃ e AgNP-b. As pesquisas nanotecnológicas contribuem massivamente no desenvolvimento de métodos alternativos e mais ambientalmente amigáveis na produção de AgNP. Contudo, nossos resultados ressaltam a importância de se tentar compreender o tema a fundo em busca de construir alicerces para aplicações nanotecnológicas mais seguras e eficientes, principalmente no setor agrícola.

Palavras chave: biologia de sistemas, fotossíntese, nanotecnologia, ROS, sorgo

Abstract

AgNPs have physicochemical characteristics that make their use diverse and widespread in the modern world. Plants represent the first and main route of entry of AgNP in the trophic chain and many works report losses in the development, metabolism and photosynthesis of plants exposed to these nanoproducts. The objective of the present work was to evaluate and compare the physiological and metabolic effects suffered by *Sorghum bicolor* (L.) Moench plants exposed to different concentrations of AgNP of synthetic origin (AgNP-s), of biogenic origin (AgNP-b) and nitrate silver (AgNO₃). AgNP-b were synthesized by marine fungi and AgNP-s by chemical reduction of salts. Sorghum plants were exposed to 0, 100, 500 and 1000 µM of AgNO₃, AgNP-b and AgNP-s. Germination, growth, biomass allocation, pigment content, relative water content, membrane damage, TBARS, SOD, APX and CAT activities, as well as H₂O₂ content, gas exchange and chlorophyll a fluorescence were measured. Statistical analysis and correlation network analysis were performed. The results revealed that different AgNPs cause different metabolic responses in sorghum plants. Both AgNP and AgNO₃ induce oxidative stress in plants associated with photosynthetic imbalance. These losses are more evident in plants treated with AgNO₃ and AgNP-b. Nanotechnological research contributes massively to the development of alternative and more environmentally friendly methodologies in the production of AgNP. However, our results highlight the importance of trying to understand the subject in depth in order to build foundations for safer and more efficient nanotechnology applications, especially in the agricultural sector.

Keywords

Nanotechnology, photosynthesis, ROS, sorghum, systems biology

Introdução

As nanopartículas metálicas são usadas em quase todas as áreas da ciência e tecnologia, entretanto as nanopartículas de prata (AgNP) vem atraindo cada vez mais atenção do que qualquer outra nanopartícula metálica (He et al., 2019; Siddiqi & Husen, 2021; Ziotti et al., 2021). As AgNP exibem maior superfície em relação ao volume, o que as tornam mais bioquimicamente ativas em relação a sua matriz em macro escala (Khan & Rizvi, 2014). As AgNP trazem as propriedades antimicrobianas da prata, bem como a boa condutividade elétrica e térmica associadas a elevada área superficial e ao ativo efeito catalítico da que a escala nanométrica imprime às nanopartículas (Antunes et al., 2013). De maneira aplicável as AgNP podem ser usadas na indústria médica e biológica, atuando na redução de processos infecciosos e na prevenção de colonizações bacterianas em materiais (Luo et al., 2015). Ademais, a utilização destas nanopartículas também é descrita no tratamento de água (Patanjali et al., 2019; Werkneh and Rene, 2019) e nas indústrias de cosméticos, têxteis, biossensores, eletrônicos (Yaqoob et al., 2020). Na última década as AgNP também tem sido bastante exploradas no setor agrícola, se mostrando eficiente na proteção de plantas contra doenças, oferecendo uma grande promessa no manejo de insetos e patógenos (Kim et al., 2012; Chowdappa & Gowda, 2013; Khan & Rizvi, 2014; Gupta et al., 2018b; Fortunati et al., 2019). Neste setor, as AgNP também tem sido testadas como fertilizantes e estimuladores de crescimento de plantas (Khodakovskaya et al., 2012).

As AgNP podem ser produzidas por processos sintéticos (químicos e físicos) ou biogênicos (fungos, algas e plantas) e são abundantes os métodos para sua síntese. Um dos métodos mais convencionais para a produção dessas nanopartículas é por redução química de sais, como o caso do nitrato de prata (AgNO_3), matriz produtiva das AgNP (Simões et al., 2020). Os métodos sintéticos são os mais amplamente utilizados para a produção de AgNP em larga escala e diversos trabalhos descrevem estes processos (Peng et al., 2014; Shao et al., 2015; Golinelli et al., 2017; Gupta et al., 2018a). Muito embora os métodos químicos sejam os mais descritos, estes utilizam agentes estabilizantes e redutores que por muitas vezes são tóxicos e dependem de processos mais trabalhosos e custosos (Xue et al., 2016). Visando essas desvantagens, nos últimos anos alguns estudos têm utilizado uma abordagem biogênica para a obtenção de AgNP (Al-Bahrani et al., 2017; Zhao et al., 2018; Simões et al., 2020; Zhang et al., 2020; Salem & Fouda, 2021). Certos organismos como plantas, algas, bactérias, leveduras e

fungos possuem moléculas bioativas que reduzem os sais de prata (Ag^+) para prata metálica (Ag^0) (Roy et al., 2019), diferente dos métodos sintéticos que utilizam-se de agentes químicos para efetuar tal redução (Shao et al., 2015). Após a formação das AgNP elas podem ser revestidas por materiais orgânicos, como por exemplo o polivinilpirrolidona (PVP) e a goma arábica (Yin et al., 2012), o que as tornam muitas quimicamente estáveis.

Ao serem liberadas no meio ambiente, as AgNP podem persistir por muito tempo sem serem degradadas (Rani et al., 2016). As plantas podem absorver as AgNP através do sistema radicular (Dietz & Herth, 2011; Anjum et al., 2013) e da absorção foliar cutânea ou por meio dos estômatos (Larue et al., 2014). As AgNP podem ser absorvidas pelas lavouras e rapidamente entram na cadeia alimentar, impactando a produção e a qualidade dos alimentos (Yan & Chen, 2019). A interação destes nanoproductos com as plantas pode ser entendida por duas principais perspectivas distintas: I- as AgNP atingem o meio ambiente através do seu descarte e as plantas são a porta de entrada para a incorporação destas nanopartículas nos sistemas vivos; II- as AgNP são planejadamente expostas as plantas de cultivo como alternativas agrícolas.

As AgNP podem lixiviar íons de prata (Ag^+), que são persistentes, bioacumuláveis e altamente tóxicos para os organismos vivos (Cvjetko et al., 2017). Fatos estes que são evidentes em diferentes estudos os quais demonstraram efeitos diversos, e, muitas vezes nocivos das AgNP às plantas (Lin & Xing, 2007; Yin et al., 2012; Jiang et al., 2017; Ottoni et al., 2020). Os prejuízos metabólicos sofridos pelas plantas expostas as AgNP variam desde distúrbios no desenvolvimento, até desbalanços energéticos da fotossíntese e subsequente estresse oxidativo (Jiang et al., 2017; Tomacheski et al., 2017; Tripathi et al., 2017; Rastogi et al., 2019).

Em plantas de *Cucumis sativus* L. expostas as AgNP sintéticas com tamanho entre 20-80 nm, houve a diminuição do crescimento, do desempenho fotossintético, da clorofila total, dos carotenoides e do teor de proteína total das plantas (Tripathi et al., 2017). No trabalho de Rastogi et al. (2019), cultivares de *Triticum aestivum* sofreram desregulação no fotossistema II (PSII) resultando no acúmulo excessivo de espécies reativas de oxigênio (ROS) o que consequentemente provocou danos oxidativos às plantas expostas a 1 mM de AgNP sintéticas menores que 100 nm. No trabalho de Jiang et al. (2017), AgNP sintéticas de 20 nm, envelopadas com PVP a uma concentração de 1 mM inibiram a capacidade fotoprotetora do PSII, induzindo a explosão de ROS nos cloroplastos em plantas de *Spirodela polyrhiza*. Em contrapartida, uma baixa concentração de AgNP sintéticas maiores que 200 nm adsorvidas a sílica promoveram

uma melhora significativa na germinação e no crescimento de cultivares de *Raphanus sativus* e *Avena sativa* (Tomacheski et al., 2017). AgNP biogênicas de aproximadamente 10 nm sem encapsulamento à uma concentração de 1 mM se mostraram altamente tóxicas ao desenvolvimento e metabolismo de *Arabidopsis thaliana*, diminuindo a taxa germinativa, aumentando a produção de ROS e inibindo a fotossíntese das plantas (Qian et al., 2013). Entretanto, no trabalho de Mohamed et al. (2017) a exposição de cultivares de *Triticum aestivum* a até 2 mM de AgNP biogênicas de aproximadamente 29 nm sem envelopamento, ajudaram as plantas a lidar com estresse salino perante a seca, reiterando o quão promissora a utilização correta das AgNP pode ser para o setor agrícola.

Com a avaliação desta série de resultados se torna perceptível o fato de que o tamanho, a concentração e o envelopamento das AgNP influenciam os efeitos causados ao desenvolvimento e ao metabolismo das plantas expostas aos nanoproductos. Apesar desta prerrogativa traçar um caminho importante para compreender os mecanismos da interação AgNP-plantas, ainda é uma questão a ser debatida na ciência se o método produtivo das AgNP também faz parte da modulação dos divergentes resultados obtidos. E neste sentido, as abordagens estatísticas clássicas se tornam insuficientes para dar conta da complexidade dos padrões fisiológicos que fundamentam a manutenção da homeostase de plantas em diferentes estágios fenológicos e sob diferentes ambientes estímulos (Bertolli et al., 2013). No âmbito destas dificuldades, a literatura carece ainda de um trabalho que trace uma análise integrada dos resultados, afim de melhor compreender os padrões metabólicos das plantas expostas as diferentes AgNP por uma perspectiva sistêmica e holística do organismo como um todo. Com intuito de preencher esta lacuna, o objetivo do presente estudo foi avaliar e comparar os efeitos fisiológicos e metabólicos sofridos por plantas de *Sorghum bicolor* (L.) Moench expostas a AgNP de origem sintética (AgNP-s), de origem biogênica (AgNP-b) e AgNO₃ através mensurações experimentais e análises sistêmicas por redes complexas.

Materiais e métodos

Obtenção e caracterização de nanopartículas de prata biogênica (AgNP-b) e nanopartículas de prata sintética (AgNP-s)

O fungo filamentososo (IB-CLP20) de origem marinha proveniente da Coleção de Cultura do Instituto de Biociências-Campus do Litoral Paulista foi utilizado para a síntese biogênica da

AgNP usando AgNO_3 como matriz, conforme relatado anteriormente (Rodrigues et al., 2013; Ottoni et al., 2020). Resumidamente, a linhagem do fungo mencionado foi incubada por um período de 120 horas à temperatura de 30 °C e agitação de 200 rpm. Após este período, a biomassa foi filtrada e lavada com água deionizada, agora, permanecendo à temperatura de 30 °C e agitação de 150 rpm por um período de 72 horas. Após este período, a biomassa foi filtrada em um filtro nº 1 (Millipore) e tratada com solução de nitrato de prata (AgNO_3) (1 mM), seguida de incubação no escuro. A Detecção das AgNP biogênicas (AgNP-b) foi realizada através do um espectrofotômetro (U-2000 Hitachi) no intervalo de comprimento de onda de 200-800 nm. Sua caracterização, incluindo a distribuição de tamanho das nanopartículas (DLS), índice de polidispersão (PDI) e potencial Zeta foram obtidas utilizando o equipamento Dynamic Light Scattering (Zetasizer Nano, ZS90). Os valores determinados foram: DLS = 80.5, PDI = 38.56, Potencial Zeta = 0.215 e TEM = 96.4, apresentando um tamanho de 80 ± 10 nm. As AgNP biogênicas foram doadas pelo Laboratório de Micologia e Aplicações Biotecnológicas e Nanotecnológicas (MICOBIO-NANOTEC) da UNESP IB CLP coordenado pela Prof. Dra. Cristiane Angélica Ottoni.

As AgNP sintéticas (AgNP-s) de aproximadamente 12 ± 2 nm foram sintetizadas utilizando os suportes carbono Vulcan XC72 (C) e o sal nitrato de prata (AgNO_3) do fabricante Sigma-Aldrich. A carga metálica utilizada foi fixada em 20% em massa a partir do sal precursor, de modo que todas as caracterizações foram realizadas pelo laboratório CCCH (Centro de células a combustível e hidrogênio) no IPEN (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares), no Instituto Butantã, São Paulo, SP. As AgNP sintéticas foram doadas pelo IPEN sob responsabilidade da Prof. Dra. Cristiane Angélica Ottoni.

Material vegetal

O modelo experimental utilizado neste trabalho foi o cultivar BRS-658 da espécie *Sorghum bicolor* (L.) Moench (Moench 1794), doados pela Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) ao nosso laboratório.

Ensaio de germinação

Dez sementes de sorgo, cultivar BRS-658, foram dispostas sobre discos de papel para germinação (Germitest) e cobertos com outro disco de papel e acondicionados em placas de Petri com tampa. Diferentes concentrações de AgNP biogênicas, sintéticas e AgNO_3 (0; 10;

100; 500 e 1000 μM) foram adicionadas às diferentes placas de Petri. O volume usado para cada placa foi de aproximadamente seis vezes a massa dos discos de papel usada para o ensaio. A partir de ensaios anteriores, observamos por curva de embebição, que essa proporção seria a mais adequada para a maior taxa de germinação de sementes de sorgo. As placas foram acondicionadas em câmara de crescimento sob condições controladas (27°C; 75% UR, 625 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de irradiância e 12 h fotoperíodo). A taxa de germinação foi monitorada diariamente por três dias (100% germinação do controle). A germinação foi avaliada quando a radícula tinha pelo menos 5 mm de comprimento. O ensaio foi realizado com cinco repetições por tratamento, sendo uma unidade experimental composta de uma placa de Petri contendo 10 sementes.

Crescimento e alocação de biomassa

Dez sementes de sorgo foram semeadas em rolos de papel de germinação (Germitest) com aproximadamente seis vezes a massa do papel com diferentes concentrações de AgNP biogênicas, sintéticas e AgNO_3 (0; 10; 100; 500 e 1000 μM). Os rolos foram recobertos com plásticos transparentes para a manutenção da umidade e acondicionadas em câmara de crescimento como descrito nos ensaios de germinação. Diariamente o crescimento das raízes e das partes aéreas foram mensurados através de fotografias, com análise digital através do software ImageJ (Schneider et al., 2012). Logo após a coleta, o material foi separado em parte aérea e raízes e pesado para a obtenção da biomassa fresca. Com base nesses dados, foi calculada a alocação de biomassa nas plantas submetidas aos diferentes tratamentos. O material remanescente foi acondicionado em freezer -80°C para as análises futuras. O ensaio foi realizado com cinco repetições por tratamento, sendo uma unidade experimental composta de um rolo de papel de germinação contendo 10 sementes.

Conteúdo relativo de água, dano de membrana e conteúdo de pigmentos

Amostras de parte aérea e raízes das plantas obtidas nos ensaios de crescimento foram armazenadas em tubos de ensaio com água deionizada a 7°C no escuro e depois pesadas para determinação da massa túrgida (MT). As amostras foram secas em estufa com circulação de ar forçado a 70 ° C até a estabilização do peso para determinação da massa seca (MS). O conteúdo relativo de água (CRA) foi calculado como: $\text{CRA} = [(\text{MF} - \text{MS}) / (\text{MT} - \text{MS}) \times 100]$ segundo a metodologia utilizada por Lima Neto et al., (2017). O vazamento de eletrólitos foi medido com

aproximadamente 200 mg de segmentos de folhas ou raízes em tubos de ensaio contendo água deionizada. Os tubos foram incubados em banho de agitação a 25 ° C por 12 h. A condutividade elétrica do meio (L1) foi medida. Os segmentos foram fervidos a 95 ° C por 60 min em tubos de ensaio fechados e então resfriados a 25 ° C. A condutividade elétrica (L2) foi medida. Os danos às membranas foram estimados por $DM = L1 / L2 \times 100$ segundo a metodologia utilizada por Lima Neto et al., (2017). As clorofilas e os carotenóides totais foram determinados após extração de amostras de folhas em acetona fria 80% no escuro, por 12 h. O extrato foi medido por espectrofotômetro (VERSAMAX, Molecular Devices, EUA) a 665, 649 e 470 nm e calculado de acordo com método descrito por Lichtenthaler & Wellburn, (1983).

Peroxidação lipídica e teor de peróxido de hidrogênio

Nas folhas das plantas obtidas nos ensaios de crescimento foram mensuradas a peroxidação lipídica através da avaliação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Cakmak & Horst, 1991). A concentração de TBARS foi calculada pelo coeficiente de absorção 155 mM cm^{-1} , e os resultados expressos em $\text{nmol MDA-TBA g}^{-1} \text{ FM}$. O conteúdo de H_2O_2 foi medido pelo método de oxidação Amplex Red em segmentos foliares (Zhou et al., 1997). Os segmentos de folhas foram triturados com tampão K-fosfato 100 mM pH 7,5. O extrato foi centrifugado a 4 °C e o sobrenadante foi utilizado. O sobrenadante foi suplementado com Amplex-Red 10 mM (Sigma-Aldrich). A produção de resofurina foi medida em 560 nm, e os dados foram expressos em $\mu\text{mol g}^{-1} \text{ FM}$.

Preparação de extrato bruto e proteínas solúveis totais

Amostras de folhas frescas de sorgo obtidas, como descrito no ensaio de crescimento, foram moídas em N_2 líquido, tampão K-fosfato 100 mM (pH 7,5) contendo EDTA 1 mM e ascorbato 1 mM (ASC). Toda a extração foi realizada a 4°C. O teor de proteína solúvel total foi medido usando uma curva padrão de BSA (Bradford, 1976).

Antioxidantes enzimáticos

Nas folhas das plantas de sorgo obtidas como descrito nos ensaios de crescimento foram mensuradas: A atividade da catalase (CAT E.C 1.11.1.6), a qual foi medida após a oxidação de H_2O_2 à 240 nm. A atividade CAT foi determinada com o extrato bruto na presença de tampão K-fosfato 50 mM (pH 7,0) e H_2O_2 20 mM a 30°C. A absorbância foi monitorada a 240 nm ao

longo de 300 s, e a atividade calculada pelo coeficiente de extinção de H_2O_2 ($36\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) e expressa como $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2\text{ mg}^{-1}$ de proteína por min^{-1} (Havir and McHale 1987). A atividade da peroxidase do ascorbato (APX) (EC. 1.11.1.11) foi medida após a oxidação do ascorbato conforme diminuições na absorvância a 290 nm. A atividade foi avaliada com o extrato enzimático em tampão K-fosfato (100 mM, pH 7,0, ascorbato 0,5 μM , EDTA 0,1 mM.) A atividade enzimática foi medida a 25°C durante 300 e expressa como μM ascorbato mg^{-1} de proteína por min^{-1} (Nakano & Asada, 2018). A atividade da superóxido dismutase (SOD) (EC 1.15.1.1) foi determinada a partir da inibição da produção de azul de formazano pela fotorredução de nitroblue cloreto de tetrazólio (NBT) (Gutteridge, 1983).

Trocas gasosas

As trocas gasosas foram medidas das 8h às 10h usando um sistema de fotossíntese portátil LI 6400 com um analisador de radiação infravermelha para CO_2 e vapor de água [Infrared Gas Analyzer (IRGA); Li Cor Inc., Nebraska, EUA] com as duas folhas completamente expandidas das plântulas obtidas em ensaios semelhantes ao de crescimento. Durante as medições, as condições dentro da câmara foram controladas para PAR de $625\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$, pressão parcial de CO_2 do ar de 38 Pa, déficit de pressão de vapor do ar de $3,1 \pm 2,5$ kPa e temperatura do ar de 27 °C. Foram realizadas cinco leituras para cada tratamento, uma por unidade experimental (10 plântulas por leitura). A média das leituras foi utilizada para avaliar as trocas gasosas nessas plantas. Os parâmetros avaliados foram: a taxa de assimilação de CO_2 (A, $\mu\text{mol CO}_2\text{ m}^{-2}\text{ s}^{-1}$), a condutância estomática (gS, $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{ s}^{-1}$), a taxa de transpiração (E, $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{ s}^{-1}$) e a concentração interna de CO_2 na câmara subestomática (C_i , Pa).

Fluorescência de clorofila a

As mensurações foram realizadas utilizando o JRPAMII (WALZ) nas plantas obtidas em ensaios iguais aos descritos para o crescimento. As medições de fluorescência foram tomadas usando o método de pulso de saturação (Klughammer and Schreiber 2008). As folhas foram adaptadas ao escuro (30 min) para avaliar F_o e F_m . Em seguida, as folhas foram expostas a luz actínica ($625\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$) por 30 minutos em um processo de indução fotossintética até atingir o estado estacionário da fotossíntese. A intensidade e duração do pulso de saturação foi de $8000\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ e 0,7 s. Os seguintes parâmetros foram avaliados: eficiência quântica

máxima do PSII [$F_v / F_m = (F_m - F_o) / F_m$]; a eficiência quântica efetiva do PSII [$Y_{II} = (F_m' - F_s) / F_m'$], o *quenching* não fotoquímico [$NPQ = (F_m - F_m') / F_m'$]. F_m e F_o são a fluorescência máxima e mínima de folhas adaptadas ao escuro, respectivamente; F_m' e F_s são a fluorescência máxima e de estado estacionário nas amostras adaptadas à luz (Maxwell & Johnson, 2000).

Análise multivariada de componente principal (PCA)

A análise de componente principal (PCA) foi realizada para avaliar as tendências e padrões de variância dos dados como descrito por (Lever et al. 2017). Os cálculos foram feitos utilizando um software de análises estatísticas livre (Past) para estatísticas multivariadas dos dados obtidos comparando diferentes tratamentos na concentração mais alta [$1000 \mu\text{M}$]. Foram utilizados todos os dados obtidos para desenvolvimento, indicadores de estresse, balanço fotossintético e trocas gasosas.

Redes de correlação

Foram elaboradas redes indiretas de escala livre baseadas na correlação de Pearson utilizando todos os dados obtidos nas mensurações de desenvolvimento, indicadores de estresse, balanço fotossintético e trocas gasosas de todos os tratamentos na concentração de [$1000 \mu\text{M}$]. As correlações de Pearson foram calculadas pelo software livre *Correlation Calculator*. As correlações foram utilizadas para elaboração das redes no programa Cytoscape v.3. 8, com o plug-in MetScape. Os parâmetros das redes foram mensurados utilizando o plug-in *Network Analyzer* também no Cytoscape v.3. 8, conforme descrito em trabalhos anteriores de (Assenov et al., 2008). O coeficiente de correlação (r) utilizado foi $-0,3 \leq r \leq 0,3$ ($n = 5$).

Delineamento experimental

A análise de crescimento e estabelecimento das plântulas foi realizada em rolo de papel para germinação com 10 sementes para cada tratamento, com três repetições por tratamento. Os experimentos foram organizados em um delineamento inteiramente casual. A análise da germinação foi realizada em placa de Petri contendo 10 sementes, com três repetições independentes. Os dados foram analisados por *two-way* ANOVA (tratamento e concentração), as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) ou pelo teste-t ($P > 0,05$) no caso dos parâmetros de fluorescência da clorofila a.

Resultados

Ensaio de germinação

A porcentagem de germinação diária das sementes de sorgo expostas as crescentes concentrações de AgNO_3 , AgNP-b e AgNP-s foram mensuradas. Para as sementes tratadas com AgNO_3 foi possível observar um atraso na germinação em todas as concentrações (10, 100, 500 e 1000 μM) em relação ao controle no primeiro dia (Fig. 1A). Enquanto a taxa germinativa das sementes de sorgo do grupo controle foi de 90% no primeiro dia, a das plantas submetidas a 1000 μM de AgNO_3 foi de apenas 70% (Fig. 1A). Contudo, este atraso foi liquidado ao decorrer do tempo chegando ao terceiro dia (final do experimento) com uma taxa germinativa de aproximadamente 100%, semelhantemente ao controle (Fig. 1A). Da mesma maneira, o atraso inicial na germinação das sementes ocorreu para o tratamento com AgNP-b (Fig. 1B). Porém, nas concentrações mais elevadas (500 e 1000 μM) este atraso se perdurou até o final do experimento, resultando numa taxa germinativa final de 86% nas sementes tratadas com 500 μM , 14% menor do que o observado para o grupo controle (Fig. 1B). Agora, para as AgNP-s esse atraso inicial no primeiro dia foi ainda maior em comparação aos outros tratamentos, revelando uma taxa de germinação total menor, de aproximadamente 53% na maioria das concentrações. Porém, notou-se a tendência de normalização com o passar dos dias até o final do experimento chegando a uma taxa germinativa final semelhante à do controle e ao AgNO_3 (Fig. 1C).

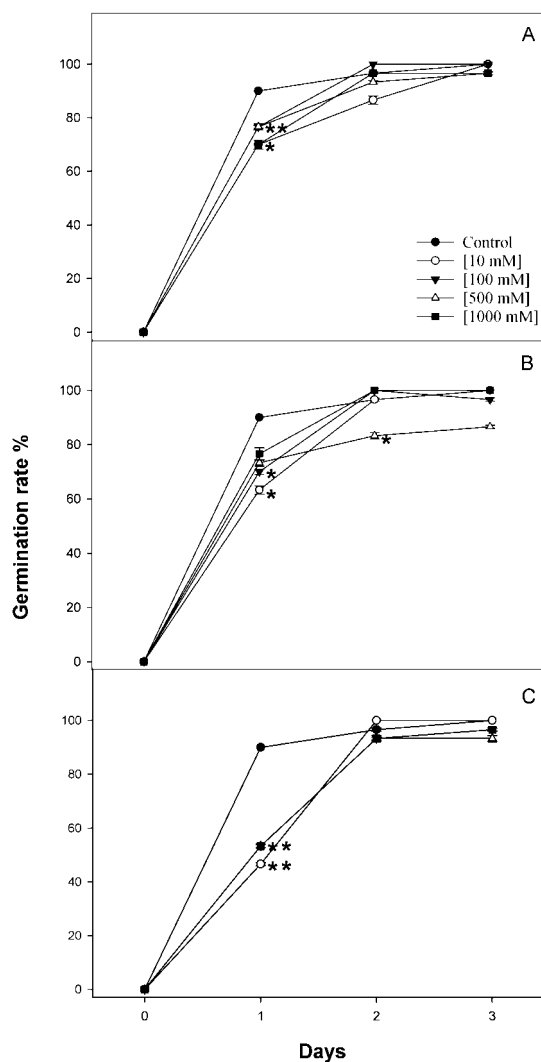


Figura 1 Germinação de sementes de sorgo expostas ao aumento de concentrações de (A) AgNO₃, (B) AgNP-b e (C) AgNP-s. Os dados representam a média $\pm$ SD de 30 sementes. * representa diferenças significativas entre cada tratamento por dia em relação ao controle (two-way ANOVA, Teste de Tukey; $P < 0.05$).

Estabelecimento de plântulas

O estabelecimento das plântulas foi avaliado através de medidas do crescimento da parte aérea e das raízes das plântulas de sorgo expostas as crescentes concentrações de AgNO_3 , AgNP-b e AgNP-s . A diferença do crescimento de parte aérea e raízes das plantas de sorgo tratadas com AgNO_3 em relação ao controle se mostrou significativamente menor a partir da concentração de $100 \mu\text{M}$ (Fig. 2A). Apesar das plantas desenvolvidas sob as concentrações de 100 , 500 e $1000 \mu\text{M}$ de AgNO_3 não apresentarem diferenças estatísticas entre si, houve um decréscimo de aproximadamente 27% do comprimento da parte aérea e de 15% do comprimento das plantas submetidas a $1000 \mu\text{M}$ de AgNO_3 em relação ao controle (Fig. 2A). Para as plantas submetidas as crescentes concentrações de AgNP-b , a diferença significativa para com o grupo controle pode ser observada no decréscimo do comprimento de parte aérea e raiz apenas nas plantas expostas as concentrações mais elevadas (500 e $1000 \mu\text{M}$) (Fig. 2B). O tamanho da parte aérea das plantas submetidas a tais concentrações variou estatisticamente entre as concentrações do tratamento (Fig. 2B). A parte aérea e as raízes de plantas expostas a maior concentração ($1000 \mu\text{M}$) do tratamento chegam a ser 43% menores do que as do controle (Fig. 2B). Em relação aos grupos submetidos a AgNP-s o que se nota é que apenas as raízes sofrem diminuição relevante em seu comprimento nas maiores concentrações (Fig. 2C).

Foi mensurado a partição de biomassa das plantas de sorgo expostas as crescentes concentrações de AgNO_3 , AgNP-b e AgNP-s . Nas plantas submetidas ao tratamento com AgNO_3 houve um decréscimo significativo do acúmulo de biomassa para as partes aérea das plantas já nas concentrações mais brandas em relação ao controle (Fig. 2D). Essa diminuição significativa do acúmulo de biomassa na maior concentração ($1000 \mu\text{M}$) do tratamento com AgNO_3 representa um decréscimo de 33,4 % na parte aérea e 40 % na raiz em relação ao grupo controle (Fig. 2D). Para o tratamento com AgNP-b esse decréscimo no acúmulo na parte aérea das plantas também é notado, porém a partir de $500 \mu\text{M}$ (Fig. 2E). Os dados para as plantas tratadas com aumento da concentração de AgNP-s diferem bastante dos outros tratamentos, já que o que se nota é um acréscimo no acúmulo de biomassa nas raízes a partir da concentração mais baixa até as mais severas que chega a ser aproximadamente 13% maior em comparação ao controle na concentração de maior contraste ($100 \mu\text{M}$) (Fig. 2F). No entanto, a exposição de AgNP-s não alterou a massa da parte aérea das plantas de sorgo (Fig. 2F).

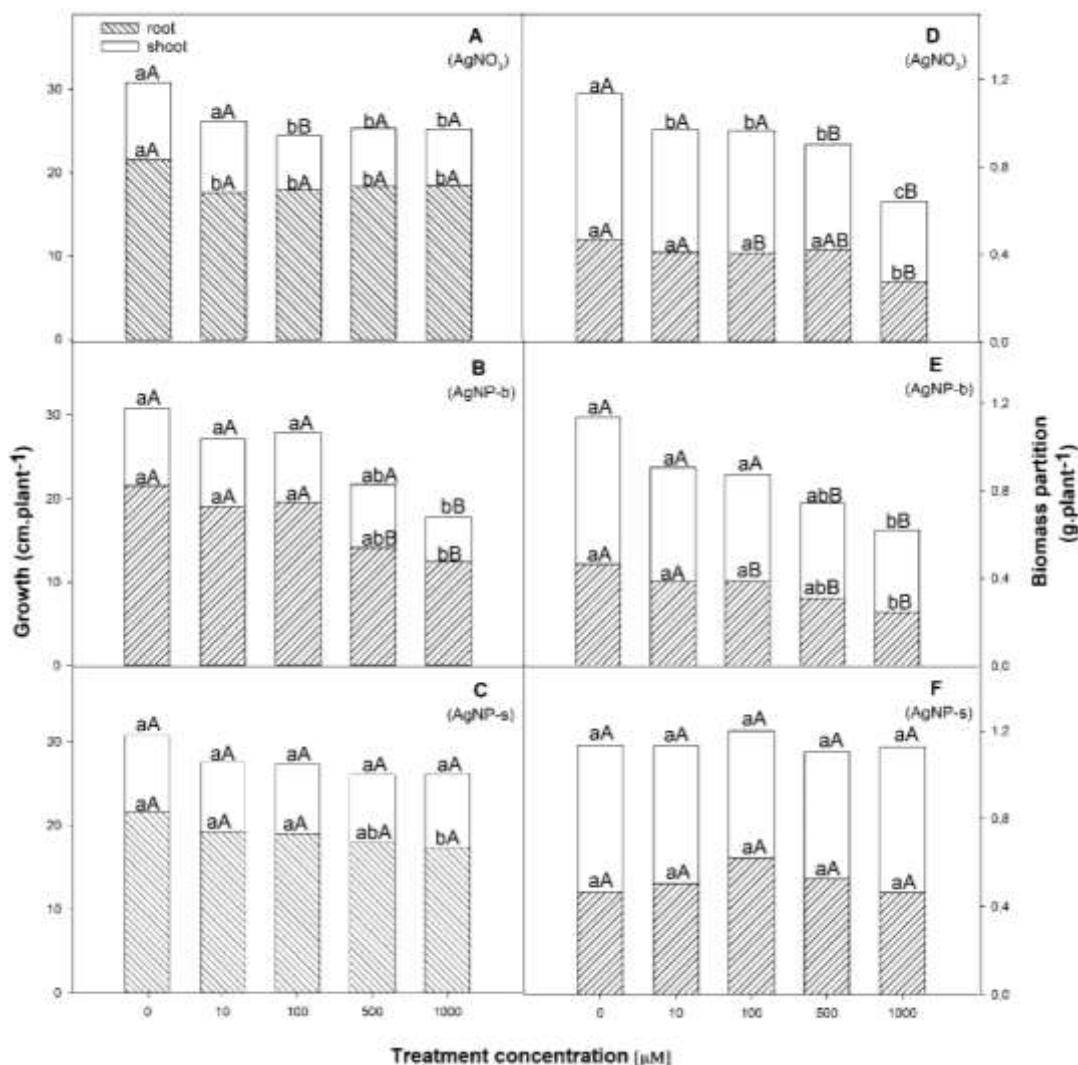


Figura 2 Crescimento (A, B e C) e partição de biomassa (D, E e F) de raízes e parte aérea de plantas de sorgo expostas a concentrações crescentes de AgNO₃, AgNP-b e AgNP-s. Os valores representam as médias $\pm$ DP de trinta repetições e são significativamente diferentes quando rotulados com letras diferentes. Letras maiúsculas representam diferenças entre AgNO₃, AgNP-b e AgNP-s na mesma concentração e letras minúsculas representam diferenças significativas entre as diferentes concentrações do mesmo tratamento. Em ambos os casos também há comparação com grupo controle. (two-way ANOVA, Teste de Tukey; $P < 0.05$).

Indicadores de estresse

O conteúdo relativo de água (CRA), um indicador do estado da água da planta, foi significativamente reduzido nas plantas expostas a AgNO_3 em relação ao controle, a partir da concentração de 500 μM , sendo mais expressivo ainda com o aumento das concentrações. O decréscimo mais significativo é de 13% na maior concentração (1000 μM) (Tabela 1). Para as plantas expostas a AgNP-b o CRA mostrou-se levemente aumentado nas concentrações mais severas (500 e 1000 μM), esse aumento representou um acréscimo de aproximadamente 6 % em relação ao controle nas ditas concentrações, as quais também não variaram estatisticamente entre si (Tabela 1). Para as plantas expostas a AgNP-s não houve variação significativa do CRA em relação ao controle, o qual também não se mostrou variar de maneira dependente do aumento das concentrações (Tabela 1).

O vazamento de eletrólitos, um indicador fisiológico de danos à membrana, aumentou progressivamente nas plantas tratadas com AgNO_3 , conforme o aumento da concentração do tratamento (Tabela 1). Para AgNP-b e AgNP-s na concentração mais elevada (1000 μM) o vazamento de eletrólitos apresenta um acréscimo de 30% e de 22%, respectivamente, em relação ao controle, sem apresentarem variação estatística entre si (Tabela 1). Contudo, os danos as membranas das plantas submetidas a 1000 μM de AgNO_3 são indiscutivelmente os mais expressivos entre todos os tratamentos, já que o vazamento de eletrólitos chega a ser 50% maior do que o controle, 29% maior do que AgNP-b e 37% maior do que AgNP-s na dita concentração (Tabela 1).

O conteúdo de pigmentos foi mensurado para as plantas expostas ao aumento das concentrações de AgNO_3 , AgNP-b e AgNP-s. Para as plantas submetidas ao AgNO_3 , houve diminuição significativa do teor de clorofilas e carotenoides em relação ao controle (Tabela 1). Este decréscimo no teor dos pigmentos se mostrou sensível ao aumento das concentrações, representando uma queda média de 50% nas plantas submetidas à 1000 μM de AgNO_3 , em relação ao controle (Tabela 1). A exposição a AgNP-b em ambas as concentrações também imprimiu o decréscimo do teor de clorofila a, entretanto, as plantas submetidas as concentrações mais elevadas (500 e 1000 μM) tiveram o teor de clorofila b e carotenoides aumentado 27% e 14%, respectivamente, em relação ao controle (Tabela 1). Para as plantas expostas a AgNP-s apesar de haver decréscimo estatisticamente significativo no teor de ambos os pigmentos em

relação ao controle, a partir da concentração de 100 μM , esta variação se mostrou a menor em relação aos demais tratamentos nas mesmas concentrações (Tabela 1).

Peroxidação lipídica (TBARS) também foi mensurada para as plantas expostas ao aumento das concentrações de AgNO_3 , AgNP-b e AgNP-s. O TBARS aumentou significativamente nas plantas expostas ao AgNO_3 , AgNP-b e AgNP-s nas maiores concentrações (500 e 1000 μM) (Tabela 1). Este efeito foi mais intenso para as plantas expostas a AgNO_3 em relação aos demais tratamentos, atingindo um aumento de 30% na concentração de 1000 μM , em relação ao controle (Tabela 1). Este acréscimo observado na maior concentração das AgNP-b e AgNP-s foi de 24% e 15%, respectivamente, em relação ao grupo controle (Tabela 1). Entre as nanopartículas, o aumento do TBARS se mostrou 10% maior para as biogênicas em relação as sintéticas, também na maior concentração (Tabela 1).

Tabela 1 Conteúdo relativo de água, vazamento de eletrólitos, conteúdo de clorofila a, clorofila b, carotenoides e peroxidação lipídica (TBARS) em folhas de sorgo expostas a concentrações crescentes de AgNO₃, AgNP-b e AgNP-s. Os valores representam as médias $\pm$ DP de cinco repetições e, quando rotulados com letras diferentes, são significativamente diferentes. Letras maiúsculas representam diferenças entre AgNO₃, AgNP-b e AgNP-s na mesma concentração e letras minúsculas representam diferenças significativas entre as diferentes concentrações do mesmo tratamento. Em ambos os casos há também a comparação com o grupo controle. (two-way ANOVA, Teste de Tukey; $P < 0.05$).

Concen- tration	Treat- ment	Relative water content (%)	Electrolyte leakage (%)	Chl a (mg g ⁻¹ FM)	Chl b (mg g ⁻¹ FM)	Carotenoids (mg g ⁻¹ FM)	TBARS (nmol MDA- TBA g ⁻¹ FM)
	Control	85,72 $\pm$ 1,45 aA	31,52 $\pm$ 0,36 cC	0,25 $\pm$ 0,05 aA	0,14 $\pm$ 0,01 aB	27,60 $\pm$ 1,4b B	42,82 $\pm$ 1,99 cC
10 μ M	AgNO ₃	83,61 $\pm$ 2,01 aA	36,25 $\pm$ 0,78 cA	0,18 $\pm$ 0,00 bC	0,15 $\pm$ 0,07 aB	24,97 $\pm$ 0,28 bB	45,76 $\pm$ 4,48 bBC
	AgNP-b	83,22 $\pm$ 2,27 bA	32,87 $\pm$ 0,18 cB	0,22 $\pm$ 0,04 aB	0,14 $\pm$ 0,02 cB	25,63 $\pm$ 2,19 bB	47,83 $\pm$ 6,19 bBC
	AgNP-s	84,62 $\pm$ 0,96 aA	34,86 $\pm$ 2,74 bB	0,24 $\pm$ 0,07 aA	0,13 $\pm$ 0,06 aB	26,94 $\pm$ 2,19 bB	42,64 $\pm$ 2,51 cC
100 μ M	AgNO ₃	82,39 $\pm$ 3,46 aA	37,94 $\pm$ 1,66 bA	0,17 $\pm$ 0,01 cC	0,11 $\pm$ 0,01 bC	22,72 $\pm$ 2,63 cB	47,43 $\pm$ 2,17 bB
	AgNP-b	82,88 $\pm$ 4,29 bA	35,96 $\pm$ 1,35 bA	0,20 $\pm$ 0,09 bB	0,13 $\pm$ 0,08 cB	27,43 $\pm$ 2,19 bB	46,31 $\pm$ 6,19 bAB
	AgNP-s	83,73 $\pm$ 1,91 aA	35,24 $\pm$ 3,74 bA	0,20 $\pm$ 0,02 cB	0,13 $\pm$ 0,04 aB	27,5 $\pm$ 1,5 bB	46,50 $\pm$ 3,01 bAB
500 μ M	AgNO ₃	79,28 $\pm$ 2,13 bB	43,97 $\pm$ 1,99 bA	0,15 $\pm$ 0,01 dD	0,10 $\pm$ 0,08 bC	11,59 $\pm$ 0,56 dC	57,88 $\pm$ 3,20 aA
	AgNP-b	91,06 $\pm$ 0,81 aA	37,01 $\pm$ 1,99 bB	0,20 $\pm$ 0,06 bC	0,17 $\pm$ 0,06 bA	30,22 $\pm$ 1,31 aA	48,71 $\pm$ 3,29 bB
	AgNP-s	86,17 $\pm$ 3,49 aAB	36,72 $\pm$ 0,61 bB	0,23 $\pm$ 0,02 bB	0,13 $\pm$ 0,05 aB	25,21 $\pm$ 1,71 bB	45,87 $\pm$ 3,01 bB
1000 μ M	AgNO ₃	75,17 $\pm$ 2,01 bB	62,82 $\pm$ 1,72 aA	0,10 $\pm$ 0,01 eD	0,08 $\pm$ 0,02 cC	11,54 $\pm$ 0,11 dD	60,96 $\pm$ 0,88 aA
	AgNP-b	91,01 $\pm$ 1,69 aA	44,90 $\pm$ 1,72 aB	0,12 $\pm$ 0,02 cC	0,19 $\pm$ 0,08 aA	31,82 $\pm$ 1,13 aA	55,83 $\pm$ 1,21 aB
	AgNP-s	88,96 $\pm$ 5,84 aA	40,04 $\pm$ 3,74 aB	0,18 $\pm$ 0,03 dB	0,12 $\pm$ 0,08 bB	17,87 $\pm$ 2,25 cC	50,37 $\pm$ 1,96 aC

Peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e antioxidantes enzimáticos

Os resultados anteriores mostraram que o $AgNO_3$ era mais prejudicial em relação ao AgNP-b e AgNP-s em muitos aspectos da fisiologia das plantas desde as concentrações mais brandas (10 e 100 μM). Entre as nanopartículas estes resultados são mais expressivos nas maiores concentrações (500 e 1000 μM) e parecem ser mais sensíveis ao aumento das concentrações para AgNP-b do que para AgNP-s. Assim, é fundamental saber se a diferença do impacto destes efeitos fisiológicos causados às plantas, pelos tratamentos mencionados, está relacionada à produção de espécies reativas de oxigênio (ROS).

Os dados mostram que o conteúdo de H_2O_2 foi significativamente aumentado em plantas expostas a concentrações superiores a 100 μM de $AgNO_3$ e AgNP-b, em relação ao grupo controle (Fig. 3A). Para AgNP-s esse aumento significativo só ocorreu na concentração mais elevada (1000 μM), todavia as maiores concentrações de H_2O_2 foram mensuradas nas plantas expostas à 1000 μM de $AgNO_3$ e AgNP-b, não havendo variação estatística entre os dois tratamentos (Fig. 3A).

A atividade da catalase (CAT), uma importante enzima que elimina o H_2O_2 , foi significativamente aumentada nas plantas expostas ao $AgNO_3$ e a AgNP-b desde as concentrações mais baixas (10 e 100 μM), em comparação com o grupo controle e com o tratamento de AgNP-s (Fig. 3D). Entretanto, as maiores taxas de atividade da CAT foram mensuradas nas plantas expostas à AgNP-b em comparação com $AgNO_3$ nas mesmas concentrações, havendo também diferença significativa entre os mesmos (Fig. 3D).

A atividade da ascorbato peroxidase (APX) não se alterou em plantas expostas as concentrações mais baixas (10 e 100 μM) de $AgNO_3$ (Fig. 3C). Contudo, nas concentrações mais altas (500 e 1000 μM) de $AgNO_3$ a atividade da enzima se mostrou significativamente maior em relação ao controle e aos tratamentos com AgNP (Fig. 3C). Em contraste, a atividade de APX aumentou em plantas expostas as concentrações mais baixas e diminuiu nas concentrações mais altas de AgNP-b, em relação ao controle (Fig. 3C). Para os tratamentos de AgNP-s a atividade de APX é aumentada apenas na concentração mais elevada, em relação ao controle, representando os menores valores significativos entre os demais tratamentos (Fig. 3C).

A atividade da superóxido dismutase (SOD) aumentou em todas as concentrações dos tratamentos com AgNO_3 e AgNP-b em relação ao controle, sendo este aumento mais expressivos com a exposição das plantas à 500 e 1000 μM (Fig. 3B). Contudo, nesse caso, o acréscimo da atividade da enzima foi mais relevante para os tratamentos de AgNP-b do que os de AgNO_3 , havendo variação estatística entre os mesmos nas ditas concentrações (Fig. 3B). Para as plantas expostas à AgNP-s a atividade de SOD não se mostrou sensível ao aumento das concentrações, sendo levemente maior do que o controle apenas em 1000 μM (Fig. 3B).

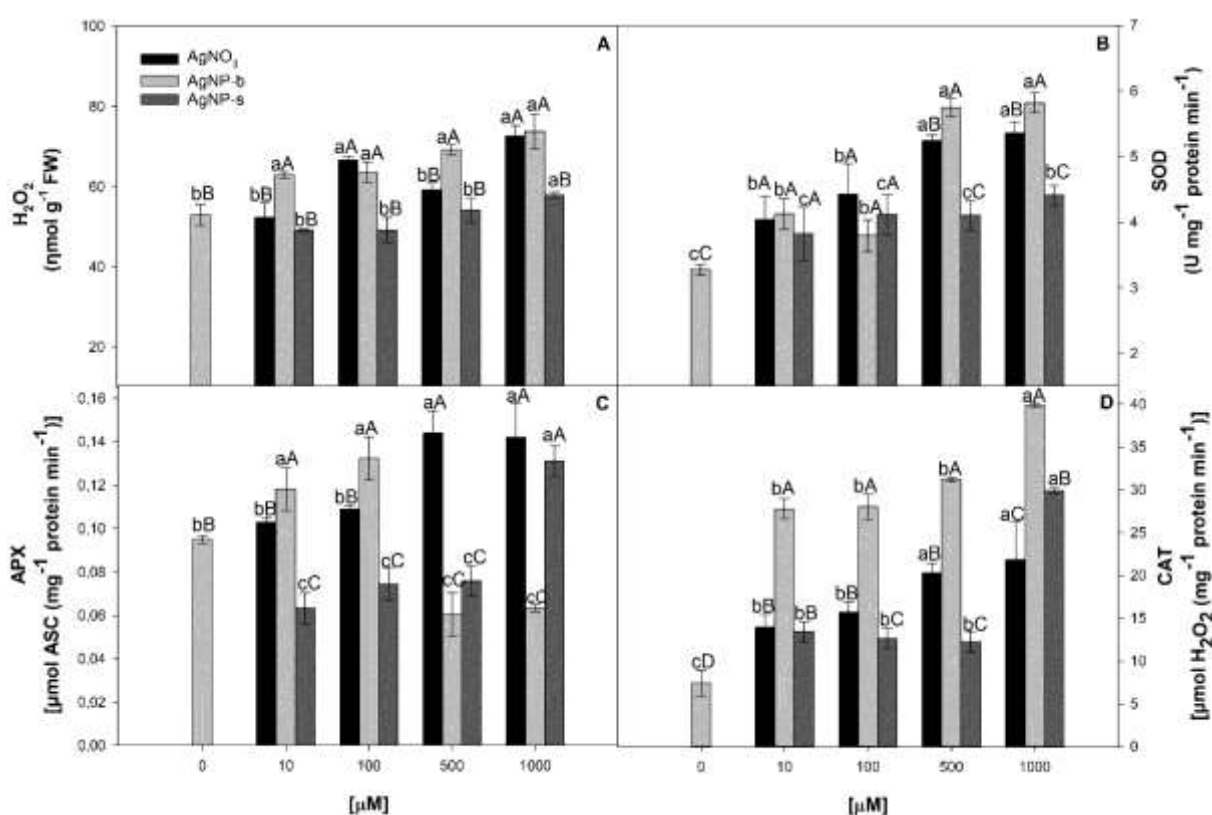


Figura 3 Conteúdo de peróxido de hidrogênio (A), atividade da superóxido dismutase (B), atividade da peroxidase do ascorbato (C) e atividade da catalase (D), em folhas de plantas de sorgo expostas a concentrações crescentes de AgNO_3 , AgNP-b e AgNP-s . Os valores representam as médias $\pm$ DP de cinco repetições e são significativamente diferentes quando rotulados com letras diferentes. Letras maiúsculas representam diferenças entre AgNO_3 , AgNP-b e AgNP-s na mesma concentração e letras minúsculas representam diferenças significativas entre diferentes concentrações do mesmo tratamento. Em ambos os casos há também a comparação com o grupo controle. (two-way ANOVA, Teste de Tukey; $P < 0.05$).

Trocas gasosas

foram mensurados os parâmetros referentes as trocas gasosas para as plantas expostas ao aumento das concentrações de AgNO_3 , AgNP-b e AgNP-s . A condutância estomática (g_s) mostrou-se reduzida em relação ao grupo controle nas folhas de sorgo submetidas aos tratamentos de AgNO_3 e AgNP-b nas concentrações mais elevadas (500 e 1000 μM) (Fig. 4A). Em reação ao grupo controle, a redução mais significativa foi de 60% no tratamento de 1000 μM de AgNO_3 (Fig. 4A). A taxa de transpiração (E) apresentou tendência semelhante à g_s , mostrando-se reduzida nas folhas de sorgo submetidas à 500 e 1000 μM de AgNO_3 e AgNP-b e foi mais evidente no tratamento mais severo com o nitrato de prata (Fig. 4B). As plantas tratadas com AgNP-s não apresentaram variações na condutância estomática e na taxa de transpiração em relação ao grupo controle (Fig. 4A e B).

A taxa de assimilação de dióxido de carbono (A) foi significativamente menor nas plantas expostas à 500 e 1000 μM de AgNO_3 e 1000 μM de AgNP-b , em relação ao grupo controle (Fig. 4C). As plantas submetidas ao tratamento com AgNP-s não apresentaram variação estatística em relação ao grupo controle nem entre as diferentes concentrações (Fig. 4C). A concentração de CO_2 intracelular (C_i) foi significativamente menor nas plantas submetidas à 500 e 1000 μM de AgNO_3 , representando uma redução de aproximadamente 50% em relação ao controle na concentração mais elevada (Fig. 4D). As plantas expostas à 1000 μM de AgNP-b apresentaram um aumento de 35% de C_i em relação ao grupo controle. A concentração de CO_2 intracelular não sofreu alterações nas plantas submetidas as diferentes concentrações de AgNP-s (Fig. 4D).

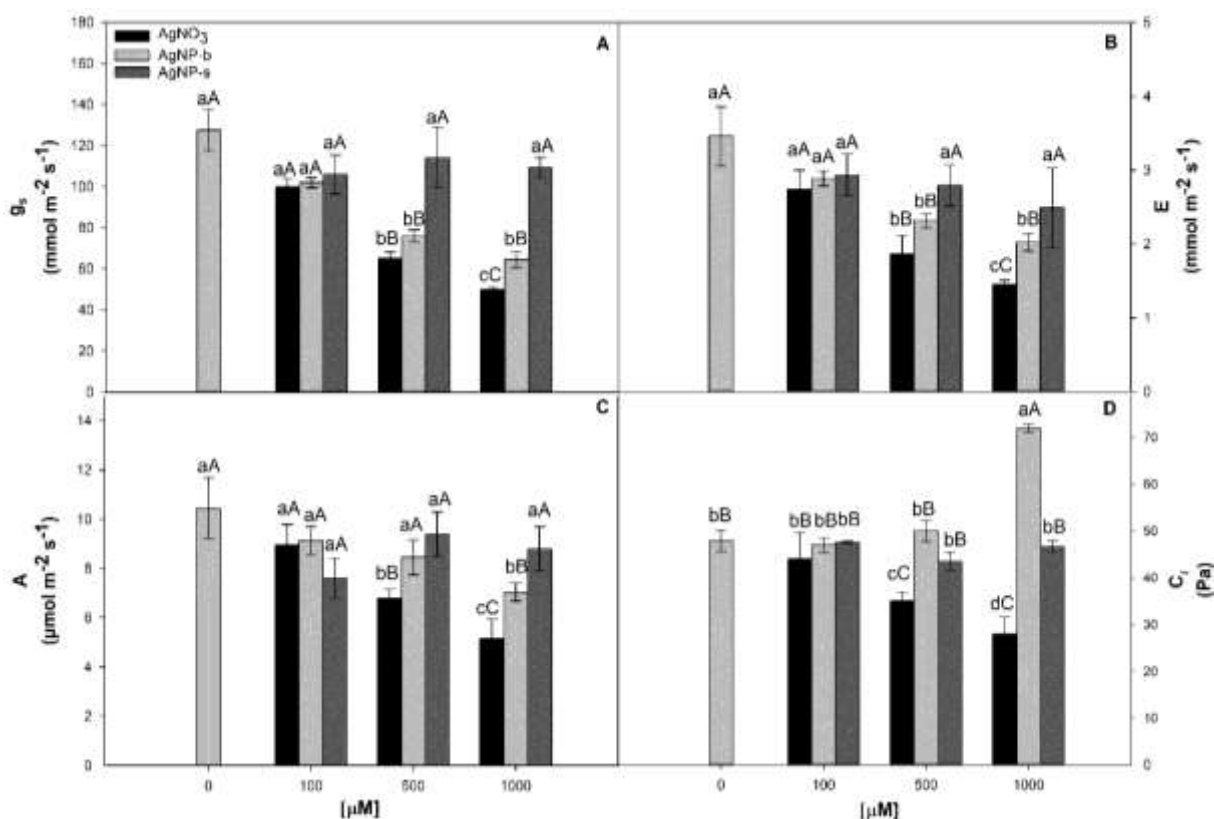


Figura 4 Condutância estomática (A), taxa de transpiração (B), taxa de assimilação de dióxido de carbono (C) e concentração de CO₂ intracelular (D), em folhas de plantas de sorgo expostas a concentrações crescentes de AgNO₃, AgNP-b e AgNP-s. Os valores representam as médias ± DP de cinco repetições e são significativamente diferentes quando rotulados com letras diferentes. Letras maiúsculas representam diferenças entre AgNO₃, AgNP-b e AgNP-s na mesma concentração e letras minúsculas representam diferenças significativas entre diferentes concentrações do mesmo tratamento. Em ambos os casos há também a comparação com o grupo controle. (two-way ANOVA, Teste de Tukey; P<0.05).

Fluorescência de clorofila a

O rendimento quântico potencial do PSII (Fv/Fm) não variou estatisticamente entre os tratamentos e o grupo controle (Fig. 5A). O rendimento quântico efetivo de PSII [Y (II)] não mudou em plantas expostas as menores concentrações (10 e 100 µM) de ambos os tratamentos, em comparação com grupo controle (Fig. 5B). A exposição às concentrações mais severas (500 e 1000 µM) de AgNO₃ e 1000 µM de AgNP-b diminuiu o Y (II) em aproximadamente 50% em comparação com o controle, (Fig. 5B). A exposição das plantas à AgNP-s promoveu diminuição significativa de Y (II) apenas na maior concentração (1000 µM), sendo esta queda a menos

expressiva entre as observadas nos demais tratamentos na concentração referida (Fig. 5B). O *quenching* não-fotoquímico (NPQ) foi fortemente aumentado em plantas expostas a 500 μM de AgNO_3 , em relação ao grupo controle e os demais tratamentos (Fig. 5C). A exposição a AgNP-s não variou os níveis de NPQ nas plantas (Fig. 5C).

A indução fotossintética de Y (II) foi mensurada para as plantas submetidas as crescentes concentrações de AgNO_3 , AgNP biogênica e AgNP sintética. As plantas expostas à 500 e 1000 μM de AgNO_3 e 1000 μM de AgNP-b levaram mais tempo para chegar ao seu máximo de eficiência fotossintética, em comparação com as do grupo controle (Fig. 6A e B). Nos tratamentos com AgNP-s, a indução fotossintética do Y (II) não variou estatisticamente do controle (Fig. 6C). A curva de luz do Y (II) também foi mensurada para as plantas submetidas as crescentes concentrações de AgNO_3 , AgNP-b e AgNP-s. O rendimento quântico efetivo é prejudicado pela exposição a ambos os tratamentos perante o aumento da intensidade luminosa (Fig. 6D, E e F). Entretanto, este prejuízo é mais expressivo para o tratamento com AgNP-b (Fig. 6E).

No último ponto da curva, o Y (II) do tratamento de 1000 μM de AgNP-b representa aproximadamente apenas 50% dos valores atingidos pelas plantas expostas a AgNO_3 e AgNP-s (Fig 6E). A exposição a AgNO_3 e AgNP-b nas maiores concentrações representa um esperado acréscimo nos níveis de NPQ (Fig. 7A e B). Estes fatos esclarecem a perda do rendimento quântico observado também por cinética de curva de luz em ambos os tratamentos (Fig. 6 D, E e F). Apesar do NPQ no tratamento de 1000 μM de AgNP-s também apresentar um valor menor do que o controle no último ponto, este decréscimo pareceu ser menos expressivo do que o observado na mesma concentração do tratamento de AgNP-b (Fig. 7C).

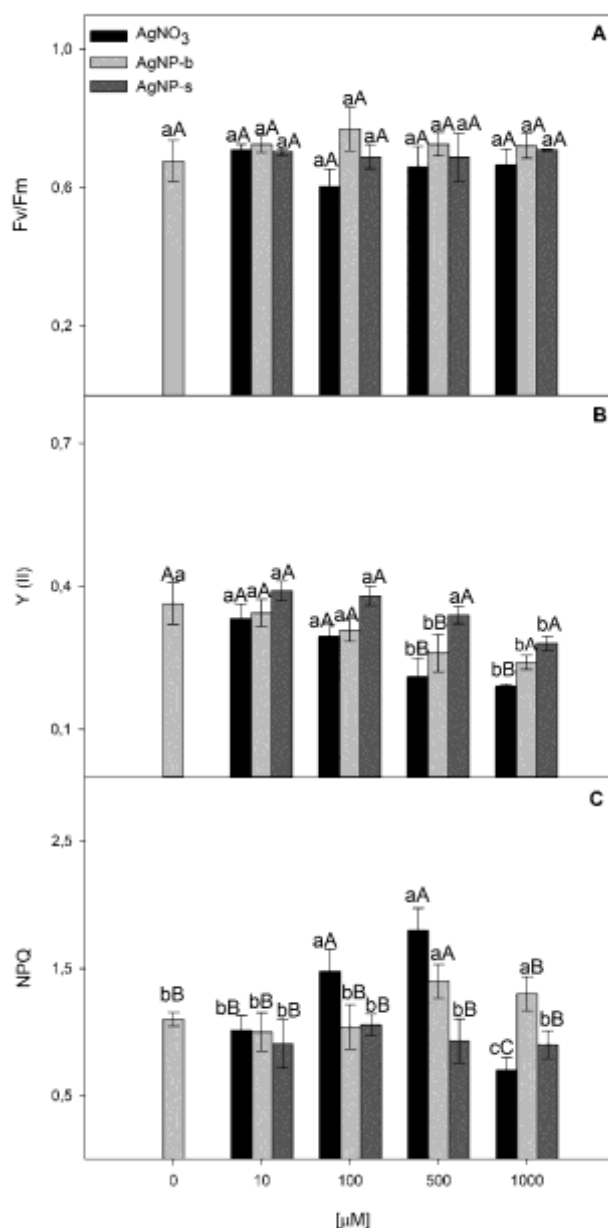


Figura 5 (A) Rendimento quântico máximo; (B) Rendimento quântico efetivo (C) *Quenching* não-fotoquímico de plantas de sorgo expostas à crescentes concentrações de AgNO₃, AgNP-b e AgNP-s após 20 s de exposição à 625 mM de photons m⁻²s⁻². Os valores representam as médias ± DP de cinco repetições e são significativamente diferentes quando rotulados com letras diferentes. Letras maiúsculas representam diferenças entre AgNO₃, AgNP-b e AgNP-s na mesma concentração e letras minúsculas representam diferenças significativas entre diferentes concentrações do mesmo tratamento. Em ambos os casos há também a comparação com o grupo controle. (two-way ANOVA, Teste de Tukey; P<0.05

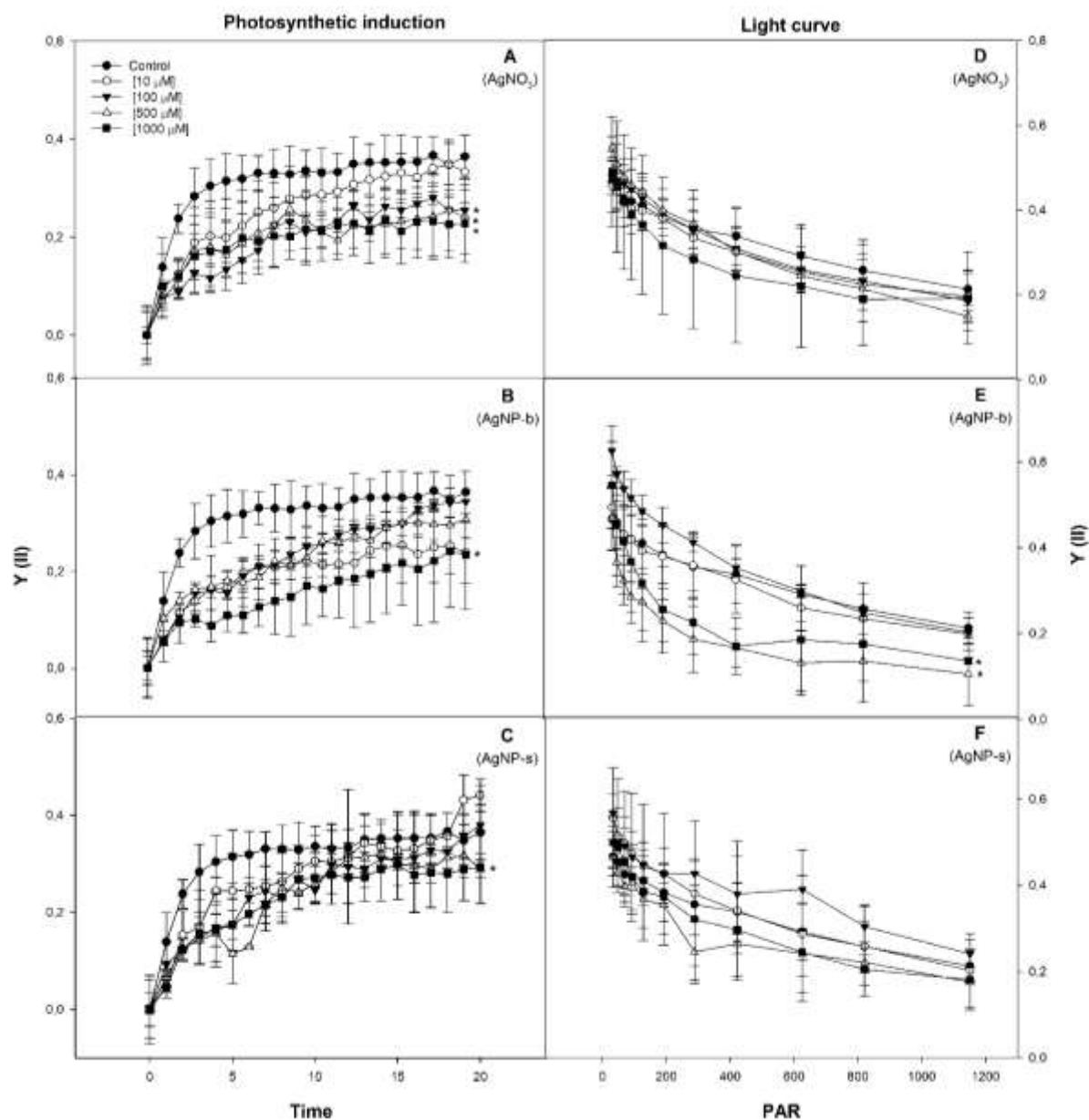


Figura 6 (A, B e C) Rendimento quântico efetivo de plantas de sorgo submetidas à crescentes concentrações de AgNO₃, AgNP-b e AgNP-s, respectivamente, ao decorrer de 20 s de exposição luminosa à 625 μM de photons m⁻²s⁻². (D, E e F) Rendimento quântica efetiva de plantas de sorgo expostas à crescentes concentrações de AgNO₃, AgNP-b e AgNP-s, respectivamente, perante o aumento da intensidade de luz em photons m⁻²s⁻². Os dados representam a média ± SD de cinco plantas.

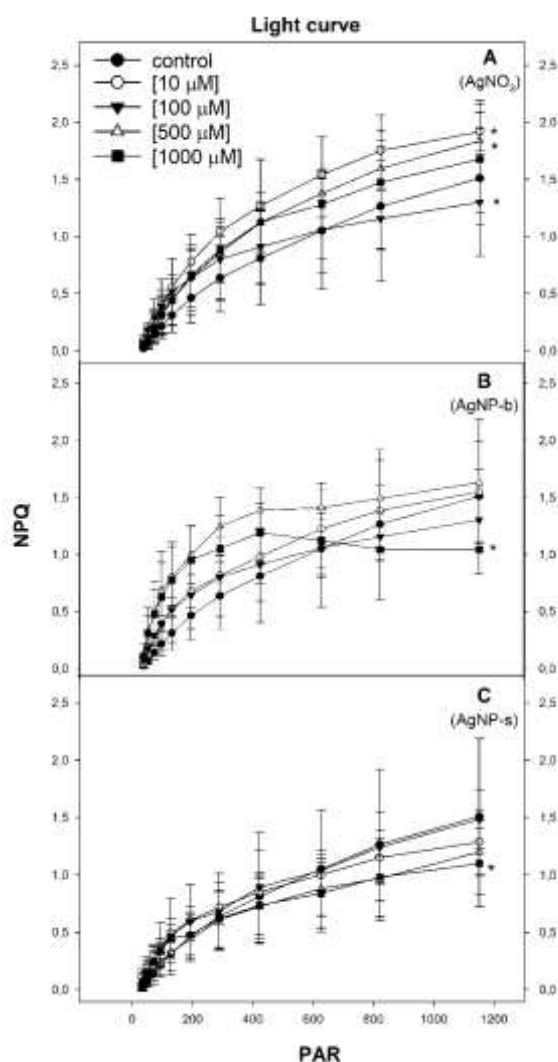


Figura 7 Quenching não-fotoquímico de plantas de sorgo submetidas à crescentes concentrações de (A) AgNO₃, (B) AgNP-b e (C) AgNP-s, respectivamente, perante o aumento da intensidade de photons m⁻²s⁻² de luz. Os dados representam a média $\pm$ SD de cinco plantas. Quando acompanhado de * o resultado variou estatisticamente do grupo controle pelo teste t ($P < 0.05$).

Análise multivariada de componentes principais (PCA)

No arranjo matemático de uma PCA, as variáveis são reduzidas em um menor número de variáveis chamados de componentes principais (PC). Dos dados obtidos neste trabalho referentes as mensurações de desenvolvimento, indicadores de estresse, trocas gasosas e balanço fotossintético mensurados para as plantas expostas a 1000 μM de AgNO_3 , AgNP-b e AgNP-s, 16 novos componentes foram gerados, os mais representativos foram PC1 e PC2, explicando 37% e 22% da variância dos resultados respectivamente (Fig. 8). A análise revelou correlações positivas de variância no PC1 entre o crescimento, o Y(II), a atividade de SOD e o conteúdo de carotenoides (Fig. 8). As variáveis relacionadas ao dano de membrana, TBARS, conteúdo de H_2O_2 e NPQ também exibem uma correção positiva de variância entre si no eixo x (Fig. 8).

Para o grupo controle as maiores plantas também foram as que apresentaram maior Y (II) associados correlacionados ainda a um maior teor de carotenoides (Fig. 8). Para AgNP-s, a variância do eixo x se explica como a do grupo controle, entretanto, associando também uma maior atividade de SOD (Fig. 8). Para AgNP-b, a variância do crescimento está negativamente relacionada com a do conteúdo de H_2O_2 e a do dano de membrana, em PC1 e PC2 (Fig. 8), indicando que provavelmente este prejuízo no desenvolvimento se dá devido ao aumento das ROS. Ao tratamento de AgNP-b no PC1, a variância do dano de membrana também se relacionou positivamente à variância de TBARS e H_2O_2 (Fig. 8). Para AgNO_3 , a correlação negativa da variância de Y (II) e NPQ tanto em PC1 como em PC2, (Fig. 8).

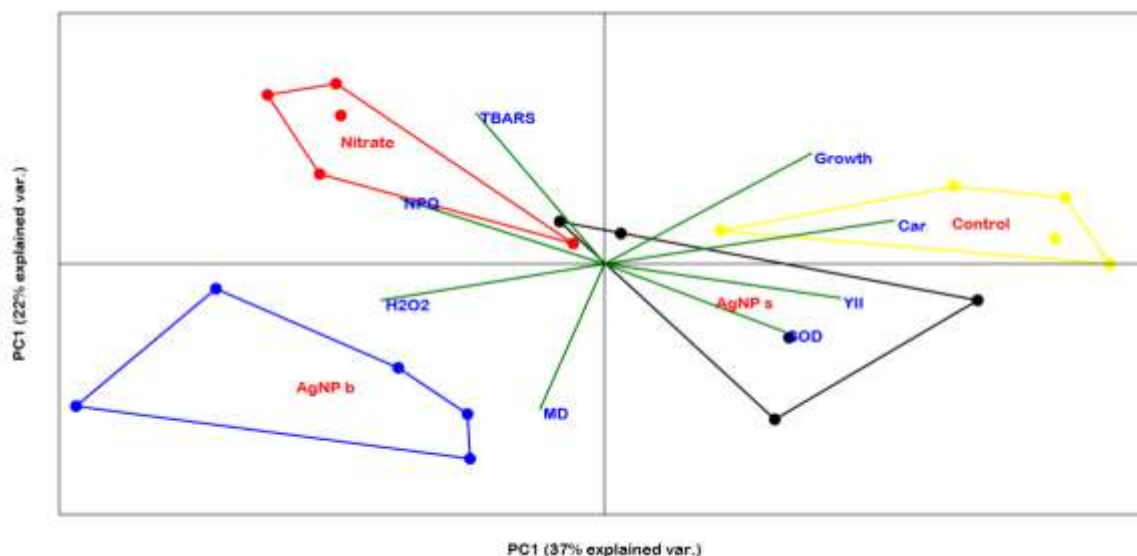


Figura 8 Análise de Componentes Principais (PCA). O eixo x representa o componente principal 1 (PC1) o qual é responsável por 37% da variância. O eixo Y representa o componente principal 2 (PC2) e é responsável por 22% da variância. Os vetores formados pelos traços verdes ilustram as relações entre as variáveis. Os caracteres amarelos representam o grupo controle, os vermelhos, azuis e pretos representam a análise de dados das plantas de sorgo expostas à 1000 μM de AgNO_3 , AgNP-b e AgNP-s, respectivamente.

Topologia e conectividade de redes baseadas na correlação de Pearson

As redes baseadas em correlação demonstram que a exposição à 1000 μM de AgNO_3 , AgNP-b e AgNP-s mudou significativamente a topologia e a conectividade das redes (Fig. 9). Nas plantas expostas aos diferentes tratamentos em sua maior concentração, as redes se mostraram mais fragmentadas e menos próximas do número máximo de conexões possíveis, em comparação ao grupo controle (Fig. 9 e Tabela 2). O tratamento com AgNO_3 foi o que ocasionou a maior discrepância dos parâmetros das redes em relação aos do grupo controle, em comparação com as AgNP. Entre as AgNP, as variações de correlação se mostraram mais expressivas para AgNP-b em comparação com AgNP-s (Fig 9 e Tabela 2). Isso é demonstrado pela menor densidade da rede e pelo menor número médio de links exibidos pelas redes expostas aos tratamentos (Tabela 2). As redes de AgNO_3 , AgNP-b e AgNP-s foram respectivamente, 14%, 5% e 2 % menos conectadas do que as redes de controle (Tabela 2).

A heterogeneidade das redes de AgNO₃, AgNP-b e AgNP-s foram respectivamente, 40%, 33% e 17% menor em relação ao controle (Tabela 2). As redes de ambos os tratamentos também exibiram um menor coeficiente de agrupamento e centralização em comparação ao grupo controle, seguindo a tendência de maior expressividade para AgNO₃ e AgNP-b, evidenciada nos demais resultados (Tabela 2). Estes parâmetros estão relacionados a estrutura das redes de correlação e implicam em redes menos centralizadas e com agrupamentos distintos nas plantas submetidas a maior concentração dos tratamentos em comparação ao controle (Fig. 9). As redes de ambos os tratamentos exibiram um menor coeficiente de agrupamento e centralização em comparação ao grupo controle, seguindo também as tendências de maior expressividade para AgNO₃ e AgNP-b, evidenciadas nos demais resultados (Tabela 2).

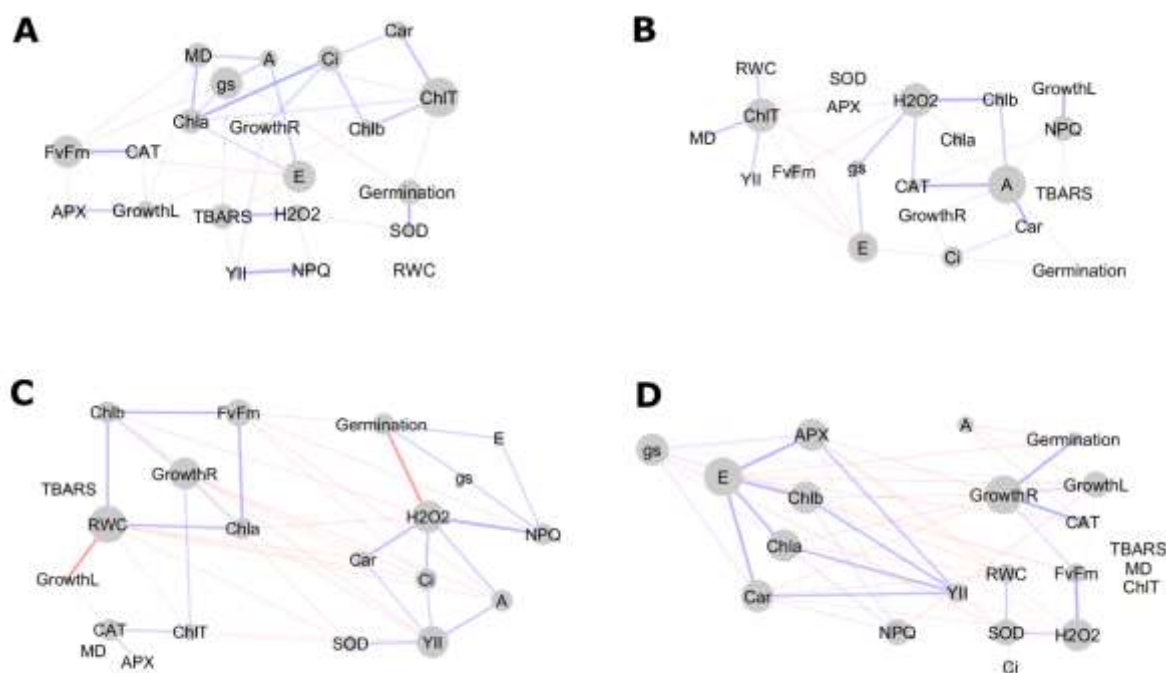


Figura 9 Redes de correlação de Pearson em plantas de sorgo expostas a 0 (A) ou 1000 μ M de (B) AgNO₃, (C) AgNP-b e (D) AgNP-s. Os links azuis representam uma correlação positiva e as linhas vermelhas representam uma correlação negativa. Links mais grossos indicam coeficiente de correlação (r) mais alto no módulo ($-0,3 \leq r \leq 0,3$). ($n = 5$).

Tabela 2 Parâmetros de rede baseados em correlação de Pearson em folhas de sorgo expostas a 0 ou 1000 μM de AgNO_3 , AgNP-b e AgNP-s. Os dados foram analisados usando o Cytoscape ($-0,3 \leq r \leq 0,3$). (n = 5)

	Control	AgNO_3	AgNP-b	AgNP-s
Average Number of links	10,58	9,15*	10,10*	10,40*
Clustering coefficient	0,56	0,47*	0,54*	0,50*
Network density	0,66	0,58*	0,60*	0,62*
Network heterogeneity	0,36	0,22*	0,28*	0,30*
Network centralization	0,24	0,13*	0,16*	0,20*

* Diminuição em relação ao controle

**Aumento em relação ao controle

Discussão

Efeitos da exposição de AgNO_3 , AgNP-b e AgNP-s no crescimento e desenvolvimento de plantas de sorgo

Os ensaios de germinação evidenciam que nas concentrações mais brandas (10 e 100 μM) nenhum dos tratamentos interfere significativamente na quebra de dormência das sementes, já em concentrações superiores a 500 μM , tanto a exposição ao AgNO_3 , como AgNP-b e AgNP-s causa atraso na germinação. Entretanto, 1000 μM de AgNP-b reduzem em 14% a taxa de germinação final de sementes de sorgo (Fig. 1). Possivelmente os íons de Ag^+ oriundos do AgNO_3 e das AgNP estejam prolongando o estado de dormência das sementes de sorgo expostas a eles. No trabalho de Soliman et al., (2020), AgNP-b fitossintetizadas de dimensões semelhantes às AgNP-b do presente estudo promoveram melhora da germinação de cultivares de milho. Fatos estes que podem indicar que a força osmótica das nossas AgNP-b provenientes de fungos marinhos seja muito mais expressiva do que a de AgNP-b fitossintetizadas e que isso esteja interferindo significativamente no processo de absorção de água pelas sementes de sorgo.

Da mesma forma, as plantas de sorgo não apresentaram danos evidentes em seu crescimento e acúmulo de biomassa atribuídos as concentrações mais brandas e sofrem prejuízos proeminentes quando estas concentrações chegam a 500 e 1000 μM nos tratamentos com

AgNO₃ e AgNP-b (Fig. 2), sendo estas perturbações mais relevantes para os tratamentos com AgNO₃. Resultados muito semelhantes foram mostrados no trabalho de Vishwakarma et al., (2017), cujo o tratamento com 1000 µM de AgNO₃ revelou a redução de 10,8 e 18,7% no comprimento da parte aérea e da raiz de mudas de *Brassica sp.*, enquanto para as AgNP-b fitossintetizadas, essa redução foi de apenas 5,3 e 10,9%, respectivamente. As AgNP-b utilizadas pelo grupo tinham aproximadamente 47 nm, muito semelhante ao padrão das usadas neste estudo. No presente trabalho, as plantas de sorgo submetidas à AgNP-s não apresentaram variação em seu crescimento, entretanto houve um evidente acúmulo de biomassa nas raízes em comparação ao grupo controle (Fig. 2). Para as plantas tratadas com AgNP-s esta diminuição de tamanho do corpo vegetal com simultâneo aumento de biomassa nas raízes pode estar relacionada com acúmulo de água como consequência osmótica à alta aderência das AgNP-s na superfície radicular. Esta características de adesão é também descrita também por Lin & Xing, (2007).

Dessa forma, o conjunto dos dados biométricos demonstra que as plantas tratadas com AgNP-b podem estar sofrendo um estresse mais expressivo em comparação com as tratadas com AgNP-s. Enquanto as plantas tratadas com AgNO₃ e AgNP-b expressam respostas fisiológicas dependentes do aumento de concentração, o tratamento com AgNP-s parece não imprimir respostas concentração-dependente no desenvolvimento das plantas de sorgo. Também é possível observar que o métodos produtivo das AgNP não só parece modular as respostas entre métodos sintéticos e biogênicos, mas também varia de acordo com os organismos que participam da síntese biológica das nanopartículas.

Indicadores de estresse em plantas de sorgo expostas à AgNO₃, AgNP-b e AgNP-s

O conteúdo relativo de água (CRA) aumentou ligeiramente e diminuiu significativamente nas plantas expostas a AgNP-b e AgNO₃, respectivamente, já no tratamento com AgNP-s não houve alterações estaticamente relevantes (Tabela 1). A diminuição no conteúdo do CRA em plantas expostas ao AgNO₃ provavelmente está relacionada à força osmótica da solução dissociada do sal, diminuindo o potencial de água, ao contrário do que parece acontecer para o tratamento com AgNP-b. A exposição a 1000 µM de AgNO₃ desencadeou uma diminuição generalizada no conteúdo de pigmentos (Tabela 1). Para o tratamento com AgNP-b houve uma modulação específica dos pigmentos a qual foi versada na

diminuição de clorofila a e aumento de clorofila b e carotenoides (Tabela 1). A clorofila a atua diretamente nos centros de reação, e a clorofila b, assim como os carotenoides são importantes dissipadores de excesso de energia no complexo antena (Xu et al., 2001). Dessa forma, estes resultados evidenciam uma possível resposta adaptativa das plantas de sorgo para diminuir a fotossíntese e o excesso de energia no cloroplasto, evitando assim a produção de ROS e aumentando a dissipação de energia pela complexo antena (Ogbaga et al., 2014). Por outro lado, as plantas expostas a AgNP-s sofreram apenas um leve decréscimo dos pigmentos na concentração mais severa (Tabela 1), indicando que estas plantas não foram tão fortemente impactadas em relação aos demais tratamentos, apesar de os resultados também indicarem estresse na concentração maior.

Os danos à membrana, aumentaram progressivamente nas plantas tratadas com AgNO_3 e foram os mais expressivos entre os tratamentos. Para os tratamentos com AgNP-b e AgNP-s isso só foi evidente na concentração mais severa, o qual foi mais expressivo na exposição de AgNP-b (Tabela 1). Apesar de as AgNP-s parecer imprimir menos prejuízos ao estabelecimento e desenvolvimento das plântulas, em concentrações superiores a $1000 \mu\text{M}$ também exerce fitotoxicidade. A peroxidação lipídica (TBARS) aumentou significativamente nas plantas expostas ao AgNO_3 , AgNP-b e AgNP-s nas concentrações mais severas (Tabela 1). Entretanto, este efeito foi mais intenso para as plantas expostas a AgNO_3 e AgNP-b, mostrando que os danos às membranas estão relacionados à produção de ROS e que provavelmente, entre as nanopartículas, as AgNP-b estejam imprimindo maior impacto sobre as plantas de sorgo. Esta associação entre os danos sofridos nas membranas das plantas com a super produção de ROS sendo promovidos pela oferta de íons de Ag^+ às plantas também é relatado nos trabalhos de Rastogi et al., (2017) e Zhang et al., (2019).

Aspectos do metabolismo antioxidante nas plantas expostas à AgNO_3 , AgNP-b e AgNP-s

Tanto as CAT como as APX são enzimas essenciais para a eliminação de H_2O_2 nas células vegetais (Mhamdi et al. 2012). Contudo, enquanto as enzimas APX tem uma afinidade muito alta para H_2O_2 (intervalo de mM), as enzimas CAT têm uma afinidade relativamente baixa (intervalo de μM) (Wu et al., 2018). Dessa forma, a CAT é muito eficiente na remoção de H_2O_2 em altas concentrações, mas são menos adequadas do que as APX para mecanismos de sinalização de H_2O_2 (Rizhsky et al., 2004). Para as AgNP, quando a atividade de CAT e

APX foram notoriamente maiores, houve também um acréscimo significativo no conteúdo de H_2O_2 (Fig. 3). Mostrando que as plantas expostas a AgNP-b e AgNP-s tiveram seu mecanismo antioxidante ativado perante o aumento da ROS, não só atuando na remoção massiva de H_2O_2 mas também trabalhando mais intensamente em processos de sinalização com ajuste mais fino. Contudo, enquanto no caso da exposição a AgNP-b estes fatos se sucedem em concentrações superiores a 500 μM , já para AgNP-s é necessário o dobro da concentração para imprimir um efeito semelhante, porém menos expressivo. A inibição de APX nas concentrações mais elevadas de $AgNO_3$ muito provavelmente está relacionada com a capacidade dissociativa de íons de Ag^+ do sal em taxas muito maiores do que observado pelas AgNP (de Souza et al., 2013).

A atividade da superóxido dismutase (SOD) aumentou em todas as concentrações dos tratamentos com $AgNO_3$ e AgNP-b (Fig. 3B). Para as plantas expostas à AgNP-s a atividade de SOD não se mostrou sensível ao aumento das concentrações, sendo levemente maior do que o controle apenas em 1000 μM (Fig. 3B). Dados estes que corroboram com a importância desta enzima na eliminação de ROS em plantas expostas tanto ao nitrato como as nanopartículas. Esta resposta enzimática exercida pelas plantas expostas as AgNP de origem variada também foi descrita por Rani et al. (2016), Jiang et al. (2017) e Rastogi et al. (2017).

Plantas de sorgo expostas à 1000 μM de $AgNO_3$ e AgNP-b apresentam indícios de restrição estomática e metabólica

Os menores valores de E, A e um expressivo aumento da $[CO_2]$ intracelular nas plantas de sorgo submetidas à 1000 μM de AgNP-b poderiam estar relacionados com o decaimento da condutância estomática (Fig. 4). Entretanto, o aumento de 35% da $[CO_2]$ intracelular associado a diminuição de aproximadamente 35% da assimilação de dióxido de carbono também fomentam indícios de restrição metabólica. Nas plantas submetidas à 500 e 1000 μM de $AgNO_3$, o decaimento progressivo das taxas de E, A e C_i possivelmente está relacionado com a restrição estomática observada no decaimento proporcional dos valores de g_s (Fig. 4). Neste ponto, nossos resultados corroboram com o que já se é sabido a mais de uma década acerca dos efeitos de metais pesados nas trocas gasosas em plantas (Romanowska, 2002). Um dos principais mecanismos de ação tóxica dos metais é a inibição da enzima Rubisco através da substituição

iônica ou da interação do íon metálico com o grupo cisteína (-SH) (Romanowska, 2002), o que pode consequentemente estar prejudicando os níveis de fixação do carbono intracelular.

Por outro lado, o fato das plantas de sorgo expostas as AgNP-s não terem suas características de trocas gasosas (g_s , E , A e C_i) alteradas conflita com alguns resultados disponíveis na literatura. No trabalho de Abbas et al., (2020) e Falco et al., (2020), concentrações superiores a 1000 μM de AgNP-s, com característica físico-químicas semelhantes as utilizadas em nosso estudo, provocaram a diminuição da assimilação de dióxido de carbono através de restrição estomática em plantas de *Zea mays* (milho) e *Vicia faba* (feijão-fava). Estes fatos dão indícios de que concentrações inferiores a 1000 μM de AgNP-s com estas características físico-químicas talvez sejam indiferentes a eventos de restrições estomática e metabólica em plantas de cultivo como o sorgo.

Plantas de sorgo expostas a AgNO_3 , AgNP-b e AgNP-s em concentrações superiores a 500 μM impactam negativamente o balanço fotossintético

Como já é apontado na literatura as AgNP podem reduzir a taxa de assimilação de CO_2 (Abbas et al., 2020; Falco et al., 2020; Štefanić et al., 2021), e consequentemente limitar a demanda por NADPH e ATP. Neste caso, o aumento da dissipação de energia através do NPQ e a regulação negativa do fluxo de elétrons podem estar protegendo o PSII das plantas de sorgo expostas à 1000 μM de AgNP-b contra superexcitação e danos (Joliot & Johnson, 2011).

As plantas expostas a 1000 μM de AgNO_3 tiveram sua atividade fotossintética altamente prejudicada. Além dos níveis reduzidos de NPQ, o teor de todos os pigmentos mensurados foi fortemente diminuído (Fig. 5C e tabela 1). A diminuição significativa no conteúdo total de clorofila reduz a eficiência da absorção de luz e a subsequente conversão da energia da luz em transporte de elétrons (Štefanić et al., 2021), o que pode diminuir a eficiência da fotossíntese e eliminar a necessidade de dissipação de energia. De maneira similar aos nossos resultados, a exposição ao AgNO_3 , também inibiu a capacidade fotoprotetora do PSII e diminuiu o conteúdo de carotenoides em plantas aquáticas *S. polyrhiza* (Jiang et al., 2017).

A ativação de NPQ não pareceu ser necessária para manutenção de YII nas plantas expostas as AgNP-s, embora quando esta concentração chegou a 1000 μM as plantas tiveram o rendimento quântico efetivo do PSII prejudicado (Fig 5B). Fatos estes que corroboram com os dados obtidos com os indicadores de estresse (Tabela 1) e o sistema enzimático antioxidante

(Fig. 3). As plantas expostas à 500 e 1000 μM de AgNO_3 ; 1000 μM de AgNP-b e de AgNP-s levaram mais tempo para chegar ao máximo de sua eficiência fotossintética. Adicionalmente, com o aumento da intensidade luminosa, os grupos mencionados também se mostram mais susceptíveis a sofrer prejuízos no YII do que o grupo tratado com AgNP-s (Fig. 6).

É importante ressaltar que as AgNP em soluções aquosas promovem a oxidação da Ag^0 e subsequentemente a dispersão de íons Ag^+ (Behra et al., 2013). Os íons de Ag^+ são facilmente translocados pelas plantas (Larue et al., 2014) e podem se ligar à plastocianina substituindo os íons Cu^+ (Jansson & Hansson, 2008), o que pode estar relacionado com a perturbação do transporte de elétrons fotossintéticos observados nas plantas de sorgo expostas as AgNP e ao AgNO_3 .

Análise multivariada de componente principal (PCA)

A análise de componente principal (PCA) simplifica a complexidade em dados de alta dimensão enquanto mantém tendências e padrões. Ele faz isso transformando os dados em menos dimensões, que atuam como resumos de recursos (Groth et al., 2013). O PCA reduz os dados projetando-os geometricamente em dimensões inferiores chamadas componentes principais (PCs), com o objetivo de encontrar o melhor resumo dos dados usando um número limitado de PCs (Lever et al., 2017). Neste sentido, em nosso trabalho, os dados que melhor explicaram a variância dos resultados até o presente momento foram: o crescimento (Growth), a peroxidação de lipídios (TBARS), o conteúdo de H_2O_2 , a atividade de SOD, o conteúdo carotenoides (Car), o dano de membrana (MD), o rendimento quântico efetivo do PSII (YII) e o *quenching* não fotoquímico (Fig. 8).

Nossas análises revelaram que as plantas expostas aos diferentes tratamentos a uma concentração abrupta de 1000 μM tiveram prejuízos em seu crescimento relacionados ao aumento das ROS, associados ainda a uma maior desregulação de YII (Fig 8). O fato da variância do dano de membrana se relacionar positivamente à variância de TBARS e H_2O_2 é um indicativo da influência da peroxidação de lipídios no dano causado as membranas celulares nestas plantas (Fig. 8). Entretanto, diferente dos demais, nos dados obtidos para as plantas tratadas com AgNP-s a maior atividade da enzima SOD pareceu ser necessária para o melhor crescimento nas plantas, mostrando uma atuação mais eficiente do sistema antioxidante enzimático em comparação com os demais tratamentos, já que neste tratamento os prejuízos

foram menos expressivos (Fig. 8). Semelhantemente, no trabalho de (Zhang et al., 2021) plantas de *Cucumis sativus* expostas à AgNP-s tiveram a superprodução de ROS também induzida e um aumento nos sistemas gerais de defesa antioxidante, enquanto às expostas a AgNP-b tiveram o conteúdo de proteína, de clorofila e a taxa de fotossíntese afetados.

Redes de correlação

Para uma explicação em nível de sistemas, é necessário saber a identidade dos constituintes, o comportamento dinâmico e as interações entre os constituintes do sistema biológico em estudo (Kitano, 2002). Essas informações podem eventualmente ser combinadas em um modelo, que não só é consistente com o conhecimento atual, mas também pode prever o comportamento do sistema sob novas perturbações inexploradas. O início desta modelagem se dá com a construção de redes biológicas a partir dos conjuntos de dados moleculares disponíveis (Sheth & Thaker, 2014).

Nossas análises de rede revelaram que a exposição das plantas de sorgo a maior concentração dos tratamentos alterou a topologia, conectância e heterogeneidade das redes (Fig. 9, Tabela 2). Entretanto, esta tendência é mais expressiva nos tratamentos com AgNO₃ e AgNP-b, os quais implicam em um maior impacto metabólico nas plantas (Fig. 9, Tabela 2). Apesar de a rede do tratamento com AgNP-s apresentar variações menos abruptas, as mesmas também se mostraram menos centralizadas e com agrupamentos distintos em relação ao controle, bem como as redes dos demais tratamentos na referida concentração (Fig. 9, Tabela 2).

A heterogeneidade de uma rede reflete a tendência de existirem *hubs* (nós altamente conectados), de maneira que quanto menor for esse valor maior será a possibilidade de existirem *hubs* (Coruzzi & Gutiérrez, 2009). A conectância de uma rede refere-se a força das conexões entre os elementos analisados (Souza et al., 2005), dessa maneira os elementos fortemente conectados entre si promovem uma maior capacidade de controle da rede, uma vez que as respostas se propagariam mais rapidamente através da rede (Bertolli et al., 2013). A alteração nestes padrões refletiu em uma topologia de rede distinta às plantas estressadas em nosso estudo, exibindo forte indício de tendências de modulações metabólicas específicas para cada tratamento no qual as plantas foram expostas.

Conclusão

Os resultados evidenciaram que em concentrações elevadas, tanto o AgNO_3 , como as AgNP-b e AgNP-s prejudicam o desenvolvimento de plantas de sorgo. Enquanto AgNO_3 e AgNP-b imprimiram estes efeitos de uma maneira dependente de concentração, as AgNP-s utilizadas no estudo só exerceram perturbações no desenvolvimento das plantas na concentração mais severa. Esta variação na intensidade dos prejuízos causados às plantas parece estar intimamente relacionada com a força osmótica e a capacidade dissociativas dos íons de Ag^+ que são mais intensas para o AgNO_3 e AgNP-b. A toxicidade dos tratamentos ativou o sistema antioxidante enzimático das plantas, gerando modulações características das enzimas SOD, APX e CAT para cada tratamento. Estes fatos se mostraram estar associados com perturbações na fotossíntese, o consequente aumento da produção de ROS. Os prejuízos metabólicos expressos pelas plantas expostas a AgNP não parecem só variar apenas entre métodos sintéticos e biogênicos, mas também variam quanto ao tipo de organismo envolvido na síntese biogênica do nanoproducto e em seu envelopamento.

Referências bibliográficas

- Abbas, Q., Yousaf, B., Ullah, H., Ali, M. U., Zia-ur-Rehman, M., Rizwan, M., & Rinklebe, J. (2020). Biochar-induced immobilization and transformation of silver-nanoparticles affect growth, intracellular-radicles generation and nutrients assimilation by reducing oxidative stress in maize. *Journal of Hazardous Materials*, 390. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121976>
- Al-Bahrani R, Raman J, Lakshmanan H, et al (2017) Green synthesis of silver nanoparticles using tree oyster mushroom *Pleurotus ostreatus* and its inhibitory activity against pathogenic bacteria. *Materials Letters* 186:21–25. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2016.09.069>
- Amzallag GN (2001) Data analysis in plant physiology: Are we missing the reality? *Plant, Cell and Environment* 24:881–890. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2001.00742.x>
- Anjum NA, Gill SS, Duarte AC, et al (2013) Silver nanoparticles in soil-plant systems. *Journal of Nanoparticle Research* 15:. <https://doi.org/10.1007/s11051-013-1896-7>
- Antunes F, Dal'Acqua N, Bergmann C, Giovanela M (2013) Síntese, caracterização e aplicação de nanopartículas de prata como agentes antimicrobianos. *Estudos Tecnológicos em Engenharia* 9:20–26. <https://doi.org/10.4013/ete.2013.91.03>
- Assenov Y, Ramírez F, Schelhorn SESE, et al (2008) Computing topological parameters of biological networks. *Bioinformatics* 24:282–284. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm554>
- Basu S, Duren W, Evans CR, et al (2017) Sparse network modeling and metscape-based visualization methods for the analysis of large-scale metabolomics data. *Bioinformatics* 33:1545–1553. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx012>
- Behra, R., Sigg, L., Clift, M. J., Herzog, F., Minghetti, M., Johnston, B., ... & Rothen-Rutishauser, B. (2013). Bioavailability of silver nanoparticles and ions: from a chemical and biochemical perspective. *Journal of the Royal Society Interface*, 10(87), 20130396.
- Bertolli SC, Vítolo HF, Souza GM (2013) Network connectance analysis as a tool to understand homeostasis of plants under environmental changes. *Plants* 2:473–488.

<https://doi.org/10.3390/plants2030473>

- Cakmak I, Horst WJ (1991) Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiologia Plantarum* 83:463–468. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1991.tb00121.x>
- Chowdappa P, Gowda S (2013) Nano Bac Khang Nám Xoài.Pdf. 19:131–151
- Cvjetko P, Milošić A, Domijan AM, et al (2017) Toxicity of silver ions and differently coated silver nanoparticles in *Allium cepa* roots. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 137:18–28. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.11.009>
- de Souza GD, Rodrigues MA, Silva PP, Guerra W (2013) Silver: Brief history, properties and applications. *Educacion Quimica* 24:14–16. [https://doi.org/10.1016/s0187-893x\(13\)73189-6](https://doi.org/10.1016/s0187-893x(13)73189-6)
- Dietz KJ, Herth S (2011) Plant nanotoxicology. *Trends in Plant Science* 16:582–589. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.08.003>
- Falco, W. F., Scherer, M. D., Oliveira, S. L., Wender, H., Colbeck, I., Lawson, T., & Caires, A. R. L. (2020). Phytotoxicity of silver nanoparticles on *Vicia faba*: Evaluation of particle size effects on photosynthetic performance and leaf gas exchange. *Science of the Total Environment*, 701. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134816>
- Fortunati E, Mazzaglia A, Balestra GM (2019) Sustainable control strategies for plant protection and food packaging sectors by natural substances and novel nanotechnological approaches. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 99:986–1000. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9341>
- Golinelli DLC, Machado SAS, Cesarino I (2017) Synthesis of Silver Nanoparticle-Graphene Composites for Electroanalysis Applications using Chemical and Electrochemical Methods. *Electroanalysis* 29:1014–1021. <https://doi.org/10.1002/elan.201600669>
- Groth D, Hartmann S, Klie S, Selbig J (2013) Principal components analysis. *Methods in Molecular Biology* 930:527–547. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-059-5_22
- Gupta N, Pant P, Gupta C, et al (2018a) Engineered magnetic nanoparticles as efficient sorbents

- p>for wastewater treatment: a review.
- Materials Research Innovations*
- 22:434–450.
-
- <https://doi.org/10.1080/14328917.2017.1334846>
- Gupta N, Upadhyaya CP, Singh A, et al (2018b) Applications of Silver Nanoparticles in Plant Protection. *Nanotechnology in the Life Sciences* 247–265. https://doi.org/10.1007/978-3-319-91161-8_9
- Gutteridge JMC (1983) Superoxide dismutases. *International Journal of Radiation Biology* 44:316–317. <https://doi.org/10.1080/09553008314551231>
- Havir EA, McHale NA (1987) Biochemical and Developmental Characterization of Multiple Forms of Catalase in Tobacco Leaves. *Plant Physiology* 84:450–455.
<https://doi.org/10.1104/pp.84.2.450>
- He X, Deng H, Hwang H min (2019) The current application of nanotechnology in food and agriculture. *Journal of Food and Drug Analysis* 27:1–21.
<https://doi.org/10.1016/j.jfda.2018.12.002>
- Jiang HS, Yin LY, Ren NN, et al (2017) Silver nanoparticles induced reactive oxygen species via photosynthetic energy transport imbalance in an aquatic plant. *Nanotoxicology* 11:157–167. <https://doi.org/10.1080/17435390.2017.1278802>
- Joliot P, Johnson GN (2011) Regulation of cyclic and linear electron flow in higher Plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:13317–13322. <https://doi.org/10.1073/pnas.1110189108>
- Khan MR, Rizvi TF (2014) Nanotechnology: Scope and Application in Plant Disease Management. *Plant Pathology Journal* 13:214–231.
<https://doi.org/10.3923/ppj.2014.214.231>
- Khodakovskaya M V., De Silva K, Biris AS, et al (2012) Carbon nanotubes induce growth enhancement of tobacco cells. *ACS Nano* 6:2128–2135.
<https://doi.org/10.1021/nn204643g>
- Kim SW, Jung JH, Lamsal K, et al (2012) Antifungal effects of silver nanoparticles (AgNPs) against various plant pathogenic fungi. *Mycobiology* 40:53–58.
<https://doi.org/10.5941/MYCO.2012.40.1.053>

- Kitano H (2002) Systems biology: A brief overview. *Science* 295:1662–1664. <https://doi.org/10.1126/science.1069492>
- Klughammer C, Schreiber U (2008) Saturation Pulse method for assessment of energy conversion in PS I. *PAM Application Notes* 11–14
- Larue C, Castillo-Michel H, Sobanska S, et al (2014) Foliar exposure of the crop *Lactuca sativa* to silver nanoparticles: Evidence for internalization and changes in Ag speciation. *Journal of Hazardous Materials* 264:98–106. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.10.053>
- Lever J, Krzywinski M, Altman N (2017) Points of Significance: Principal component analysis. *Nature Methods* 14:641–642. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4346>
- LICHTENTHALER HK, WELLBURN AR (1983) Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions* 11:591–592. <https://doi.org/10.1042/bst0110591>
- Lima Neto MC, Silveira JAG, Cerqueira JVA, Cunha JR (2017) Regulation of the photosynthetic electron transport and specific photoprotective mechanisms in *Ricinus communis* under drought and recovery. *Acta Physiologiae Plantarum* 39:1–12. <https://doi.org/10.1007/s11738-017-2483-9>
- Lin D, Xing B (2007) Phytotoxicity of nanoparticles: Inhibition of seed germination and root growth. *Environmental Pollution* 150:243–250. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.01.016>
- Luo YH, Chang LW, Lin P (2015) Metal-Based Nanoparticles and the Immune System: Activation, Inflammation, and Potential Applications. *BioMed Research International* 2015:. <https://doi.org/10.1155/2015/143720>
- Mhamdi A, Noctor G, Baker A (2012) Plant catalases: Peroxisomal redox guardians. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 525:181–194. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2012.04.015>
- Moench, C. (1794) *Methodus plantas horti botanici et agri marburgensis, a staminum situ describendi*. In *officina nova libraria academiae, Marburgi Cattorum* [Marburg], 780 pp. <http://doi.org/10.5962/bhl.title.304>

- Mohamed AKSH, Qayyum MF, Abdel-Hadi AM, et al (2017) Interactive effect of salinity and silver nanoparticles on photosynthetic and biochemical parameters of wheat. *Archives of Agronomy and Soil Science* 63:1736–1747. <https://doi.org/10.1080/03650340.2017.1300256>
- Nakano Y, Asada K (2018) APX Nakano & Asada 1981.pdf. *Plant & Cell Physiology* 22:867–880
- Ogbaga CC, Stepien P, Johnson GN (2014) Sorghum (*Sorghum bicolor*) varieties adopt strongly contrasting strategies in response to drought. *Physiologia Plantarum* 152:389–401. <https://doi.org/10.1111/ppl.12196>
- Otoni CA, Lima Neto MC, Léo P, et al (2020) Environmental impact of biogenic silver nanoparticles in soil and aquatic organisms. *Chemosphere* 239:. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124698>
- Otoni CA, Simões MF, Fernandes S, et al (2017) Screening of filamentous fungi for antimicrobial silver nanoparticles synthesis. *AMB Express* 7:. <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0332-2>
- Patanjali P, Singh R, Kumar A, Chaudhary P (2019) *Nanotechnology for water treatment: A green approach*. Elsevier Inc.
- Peng X, Tan F, Wang W, et al (2014) Conductivity improvement of silver flakes filled electrical conductive adhesives via introducing silver-graphene nanocomposites. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics* 25:1149–1155. <https://doi.org/10.1007/s10854-013-1671-7>
- Qian H, Peng X, Han X, et al (2013) Comparison of the toxicity of silver nanoparticles and silver ions on the growth of terrestrial plant model *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Environmental Sciences (China)* 25:1947–1956. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(12\)60301-5](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(12)60301-5)
- Rani PU, Yasur J, Loke KS, Dutta D (2016) Effect of synthetic and biosynthesized silver nanoparticles on growth, physiology and oxidative stress of water hyacinth: *Eichhornia crassipes* (Mart) Solms. *Acta Physiologiae Plantarum* 38:1–9.

<https://doi.org/10.1007/s11738-016-2074-1>

- Rastogi A, Zivcak M, Sytar O, et al (2017) Impact of metal and metal oxide nanoparticles on plant: A critical review. *Frontiers in Chemistry* 5:1–16. <https://doi.org/10.3389/fchem.2017.00078>
- Rastogi A, Zivcak M, Tripathi DK, et al (2019) Phytotoxic effect of silver nanoparticles in triticum aestivum: Improper regulation of photosystem I activity as the reason for oxidative damage in the chloroplast. *Photosynthetica* 57:209–216. <https://doi.org/10.32615/ps.2019.019>
- Rizhsky L, Liang H, Shuman J, et al (2004) When defense pathways collide. The response of arabidopsis to a combination of drought and heat stress 1[w]. *Plant Physiology* 134:1683–1696. <https://doi.org/10.1104/pp.103.033431>
- Rodrigues AG, Ping LY, Marcato PD, et al (2013) Biogenic antimicrobial silver nanoparticles produced by fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97:775–782. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4209-7>
- Romanowska, E. (2002). Gas exchange functions in heavy metal stressed plants. In *Physiology and biochemistry of metal toxicity and tolerance in plants* (pp. 257-285). Springer, Dordrecht.
- Roy A, Bulut O, Some S, et al (2019) Green synthesis of silver nanoparticles: Biomolecule-nanoparticle organizations targeting antimicrobial activity. *RSC Advances* 9:2673–2702. <https://doi.org/10.1039/c8ra08982e>
- Salem SS, Fouda A (2021) Green Synthesis of Metallic Nanoparticles and Their Prospective Biotechnological Applications: an Overview. *Biological Trace Element Research* 199:344–370. <https://doi.org/10.1007/s12011-020-02138-3>
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* 9:671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Schröfel A, Kratošová G, Šafařík I, et al (2014) Applications of biosynthesized metallic nanoparticles - A review. *Acta Biomaterialia* 10:4023–4042. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.05.022>

- Shao W, Liu X, Min H, et al (2015) Preparation, characterization, and antibacterial activity of silver nanoparticle-decorated graphene oxide nanocomposite. *ACS Applied Materials and Interfaces* 7:6966–6973. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b00937>
- Sharma VK, Sayes CM, Guo B, et al (2019) Interactions between silver nanoparticles and other metal nanoparticles under environmentally relevant conditions: A review. *Science of the Total Environment* 653:1042–1051. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.411>
- Sheth BP, Thaker VS (2014) Plant systems biology: Insights, advances and challenges. *Planta* 240:33–54. <https://doi.org/10.1007/s00425-014-2059-5>
- Siddiqi KS, Husen A (2021) Plant response to silver nanoparticles: a critical review. *Critical Reviews in Biotechnology* 0:1–18. <https://doi.org/10.1080/07388551.2021.1975091>
- Simões MF, Ottoni CA, Antunes A (2020) Biogenic metal nanoparticles: A new approach to detect life on mars? *Life* 10:1–15. <https://doi.org/10.3390/life10030028>
- Singh R, Shedbalkar UU, Wadhwani SA, Chopade BA (2015) Bacteriogenic silver nanoparticles: synthesis, mechanism, and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99:4579–4593. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6622-1>
- Soliman M, Qari SH, Abu-Elsaoud A, et al (2020) Rapid green synthesis of silver nanoparticles from blue gum augment growth and performance of maize, fenugreek, and onion by modulating plants cellular antioxidant machinery and genes expression. *Acta Physiologiae Plantarum* 42:1–16. <https://doi.org/10.1007/s11738-020-03131-y>
- Souza GM, Ribeiro R V, Oliveira RF de, Machado EC (2005) Network connectance and autonomy analyses of the photosynthetic apparatus in tropical tree species from different successional groups under contrasting irradiance conditions. *Revista Brasileira de Botânica* 28:47–59. <https://doi.org/10.1590/s0100-84042005000100005>
- Tomacheski D, Pittol M, Simões DN, et al (2017) Impact of silver ions and silver nanoparticles on the plant growth and soil microorganisms. *Global Journal of Environmental Science and Management* 3:341–350. <https://doi.org/10.22034/gjesm.2017.03.04.001>
- Tripathi A, Liu S, Singh PK, et al (2017) Differential phytotoxic responses of silver nitrate (AgNO₃) and silver nanoparticle (AgNps) in *Cucumis sativus* L. *Plant Gene* 11:255–264.

<https://doi.org/10.1016/j.plgene.2017.07.005>

- Vishwakarma K, Shweta, Upadhyay N, et al (2017) Differential phytotoxic impact of plant mediated silver nanoparticles (AgNPs) and silver nitrate (AgNO₃) on Brassica sp. *Frontiers in Plant Science* 8:1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01501>
- Werkneh AA, Rene ER (2019) Applications of Nanotechnology and Biotechnology for Sustainable Water and Wastewater Treatment. *Energy, Environment, and Sustainability* 405–430. https://doi.org/10.1007/978-981-13-3259-3_19
- Wu B, Li L, Qiu T, et al (2018) Cytosolic APX2 is a pleiotropic protein involved in H₂O₂ homeostasis, chloroplast protection, plant architecture and fertility maintenance. *Plant Cell Reports* 37:833–848. <https://doi.org/10.1007/s00299-018-2272-y>
- Xu H, Vavilin D, Vermaas W (2001) Chlorophyll b can serve as the major pigment in functional photosystem II complexes of cyanobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:14168–14173. <https://doi.org/10.1073/pnas.251530298>
- Xue B, He D, Gao S, et al (2016) Biosynthesis of silver nanoparticles by the fungus *Arthroderma fulvum* and its antifungal activity against genera of *Candida*, *Aspergillus* and *Fusarium*. *International Journal of Nanomedicine* 11:1899–1906. <https://doi.org/10.2147/IJN.S98339>
- Yan A, Chen Z (2019) Impacts of silver nanoparticles on plants: A focus on the phytotoxicity and underlying mechanism. *International Journal of Molecular Sciences* 20:23–25. <https://doi.org/10.3390/ijms20051003>
- Yaqoob AA, Umar K, Ibrahim MNM (2020) Silver nanoparticles: various methods of synthesis, size affecting factors and their potential applications—a review. *Applied Nanoscience (Switzerland)* 10:1369–1378. <https://doi.org/10.1007/s13204-020-01318-w>
- Yin L, Colman BP, McGill BM, et al (2012) Effects of Silver Nanoparticle Exposure on Germination and Early Growth of Eleven Wetland Plants. *PLoS ONE* 7:. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047674>
- Zhang CL, Jiang HS, Gu SP, et al (2019) Combination analysis of the physiology and

- transcriptome provides insights into the mechanism of silver nanoparticles phytotoxicity. *Environmental Pollution* 252:1539–1549. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.06.032>
- Zhang H, Chen S, Jia X, et al (2021) Comparation of the phytotoxicity between chemically and green synthesized silver nanoparticles. *Science of the Total Environment* 752:142264. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142264>
- Zhang L, Wei Y, Wang H, et al (2020) Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Mushroom *Flammulina velutipes* Extract and Their Antibacterial Activity Against Aquatic Pathogens. *Food and Bioprocess Technology* 13:1908–1917. <https://doi.org/10.1007/s11947-020-02533-7>
- Zhao X, Zhou L, Riaz Rajoka MS, et al (2018) Fungal silver nanoparticles: synthesis, application and challenges. *Critical Reviews in Biotechnology* 38:817–835. <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1414141>
- Zhou M, Diwu Z, Panchuk-Voloshina N, Haugland RP (1997) A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: Applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases. *Analytical Biochemistry* 253:162–168. <https://doi.org/10.1006/abio.1997.2391>
- Ziotti ABS, Ottoni CA, Correa CN, et al (2021) Differential physiological responses of a biogenic silver nanoparticle and its production matrix silver nitrate in *Sorghum bicolor*. *Environmental Science and Pollution Research*. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-13069-4>

Considerações finais

As AgNP de origem biogênica, sintética e o AgNO_3 incitam respostas fisiológicas diferentes às plantas de sorgo submetidas a sua respectiva exposição. Em concentrações mais brandas, inferiores a $100 \mu\text{M}$, estes compostos não apresentam indícios claros de prejuízos ao metabolismo das plantas analisadas. Entretanto, quando em concentrações severas, entre 500 e $1000 \mu\text{M}$, todos os tratamentos imprimem algum grau de alteração fisiológica aos organismos. A exposição ao AgNO_3 se mostrou a mais prejudicial, pois quando as plantas são submetidas a este tratamento, observa-se: déficit germinativo, diminuição do crescimento, da biomassa, da fotossíntese líquida e da eficiência quântica efetiva do PSII, mais expressivamente do que para os organismos submetidos aos demais tratamentos. Perante a exposição de concentrações severas de AgNO_3 também há indícios de fotoinibição, associados a um acúmulo excessivo de ROS e consequentes prejuízos no sistema antioxidativo enzimático. Estes perjúrios mais intensos perante a exposição do AgNO_3 , em comparação com as AgNP, certamente estão associados a capacidade mais expressiva do sal de prata em dissociar íons de Ag^+ .

A modulação dos efeitos da exposição de AgNP-b às plantas parece ser dependente da concentração, enquanto para AgNP-s não. As AgNP-b produzidas por fungos marinhos imprimem perjúrios moderados ao estabelecimento e desenvolvimento das plântulas, enquanto as AgNP-s não parecem interferir significativamente nestes parâmetros biométricos. Entretanto, os indicadores de estresse revelam que as AgNP-s em uma concentração superior a $1000 \mu\text{M}$ imprimem prejuízos fisiológicos, por outro lado, as AgNP-b a exibem tais efeitos a uma concentração superior a $500 \mu\text{M}$. Estes fatos associados a atuação do sistema antioxidativo enzimático, indicam que possivelmente as plantas expostas a AgNP-s consigam manter uma melhor eficiência das enzimas SOD, APX e CAT em relação aos tratamentos com AgNP-b. De maneira semelhante, os parâmetros de trocas gasosas e fluorescência de clorofila a ilustram prejuízos na fotossíntese das plantas expostas as diferentes AgNP.

As pesquisas nanotecnologias recentes contribuem massivamente no desenvolvimento de métodos alternativos e mais ambientalmente compatíveis na produção de AgNP. Entretanto, em nosso trabalho fica evidente que isso não é o suficiente, uma vez que as AgNP de origem biogênica também podem ser prejudiciais as plantas. Os prejuízos metabólicos expressos pelas plantas expostas a AgNP não parecem só variar apenas entre métodos sintéticos e biogênicos,

mas também variam quanto ao tipo de organismo envolvido na síntese biogênica do nanoproduto e em seu envelopamento. Ressaltando a importância de tentar compreender o tema a fundo em busca de construir alicerces para aplicações nanotecnológicas mais seguras e eficientes, principalmente no setor agrícola.