



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA



**OTIMIZAÇÃO DA SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA PARA
INCORPORAÇÃO EM GEL ANTIMICROBIANO**

DIB MADY DINIZ GOMES

MANAUS – AM

2019



DIB MADY DINIZ GOMES

**OTIMIZAÇÃO DA SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA PARA
INCORPORAÇÃO EM GEL ANTIMICROBIANO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas em cumprimento às exigências para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof^ª. Doutora. Maria Francisca Simas Teixeira

Co-orientadora: Prof^ª. Doutora Taciana de Amorim Silva

MANAUS – AM

2019

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

G633o Gomes, Dib Mady Diniz
Otimização da síntese verde de nanopartículas de prata para
incorporação em gel antimicrobiano / Dib Mady Diniz Gomes. 2019
88 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Maria Francisca Simas Teixeira
Coorientadora: Taciana de Amorim Silva
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal
do Amazonas.

1. Aspergillus. 2. atividade antimicrobiana. 3. micossíntese. 4.
nanocompósito. I. Teixeira, Maria Francisca Simas II. Universidade
Federal do Amazonas III. Título

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Amazonas – UFAM pelo apoio financeiro e estrutural que possibilitaram a execução deste projeto.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnologia – CNPq pela concessão de bolsa por esses dois anos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM pelo suporte financeiro via Edital n ° 002/2018 – Universal Amazonas, tornando possível a realização desse estudo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – PPGBiotec pela oportunidade de aprendizado com seu corpo docente e discente. Um agradecimento especial ao coordenador de pós-graduação, Edmar de Vaz Andrade, e vice-coordenador, Adolfo José da Mota, por serem acessíveis e compreensíveis com as necessidades do corpo discente.

À minha orientadora, Maria Francisca Simas Teixeira, pelo acolhimento em seu laboratório de pesquisa, competência, dedicação, ensinamentos preciosos, incentivo, paciência e profissionalismo. Agradeço por toda a orientação desde os tempos de graduação até os momentos finais do mestrado.

À minha co-orientadora, Taciana de Amorim Silva, por compartilhar seu aprendizado na área da Nanotecnologia desde a minha graduação, por toda a paciência com minhas inúmeras dúvidas e por todo seu profissionalismo.

Aos professores Nelson Durán e Amedea Barozzi Seabra da Universidade Federal do ABC – UFABC, campus Santo André que permitiram a realização das análises de caracterização físico-química das nanopartículas de prata. Um agradecimento especial a Alessandro, Joana, Milena, Nély e Wallace por terem me acompanhado e compartilhado aprendizado quanto à manipulação de equipamentos durante a breve estadia.

À toda a minha família por todo o amor, carinho, compreensão e educação que tornaram possível toda essa trajetória, especialmente à minha mãe Shirley e ao meu pai Sebastião por todas as palavras de apoio e incentivo.

Ao Paulo Lucas da Silva Anjos que sempre esteve ao meu lado em momentos bons e ruins, sendo um grande amigo e companheiro.

À Larissa de Paiva Silva que inúmeras vezes me ajudou e me acompanhou em atividades laboratoriais, além de todo o apoio e as conversas enriquecedoras que tivemos. Sempre estarei torcendo pelo seu sucesso, muitíssimo obrigado!

Aos amigos da Coleção de Culturas DPUA, Adrya Dourado, Alessandra Magalhães, Ana Rita, Elliza Perrone, Fabiano Prado, Felipe Romano, Karoline Araújo, Kelly Dias, Larissa Svetlana, Mircella Alecrim, Raimundo Felipe, Salomão Martim, Socorro Lima, Suelen Dias e Tainara Branches, por todo o apoio, conversas, favores de laboratório e momentos descontraídos compartilhados, tornando a experiência do mestrado mais leve e divertida.

Aos meus amigos extralaboratoriais, Ageu Filizola, Ana Beatriz, Eliza Sena, Frederico del Fiume, Jéssica Tavares, João Paulo Martins, Kemberlly Lopes, Maria Elisa, Paulo Amaral, Paulo Rodrigo, Raquel Tinoco, Samanta Gabriela e Tarcila Araújo, pelo apoio, compreensão em momentos de ausência, conversas e momentos descontraídos, importantíssimos para aliviar a pressão da vida de um mestrando.

Um agradecimento especial às amigas Alana Lopes e Layla Tabosa, amizades feitas no primeiro período da graduação e que continuam até hoje, obrigado pelo apoio e incentivo.

E a todos, que de alguma forma ou de outra, me ajudaram nessa jornada. Muito obrigado!

RESUMO

Nanopartículas de prata (AgNPs) têm ganhado destaque em virtude da aplicação em fármacos, tecidos e produtos de higiene. As AgNPs são sintetizadas por métodos físicos e químicos, sendo processos de alto custo e com potencial poluidor. Em contrapartida, surge a síntese verde ou biossíntese como alternativa, empregando sistemas biológicos como intermediadores da síntese. Este estudo teve como objetivo avaliar as melhores condições de síntese verde de AgNPs intermediada por *Aspergillus flavo-furcatis* DPUA 1540, para o desenvolvimento de um gel polimérico com propriedades antimicrobianas. Um experimento fatorial 2³ foi realizado para avaliar condições de pH, temperatura e concentração de nitrato de prata (AgNO₃) na síntese de AgNPs intermediada por *A. flavo-furcatis*. A atividade antimicrobiana das AgNPs foi avaliada pelos métodos de difusão em ágar por poço e microdiluição em caldo, para determinar a concentração mínima inibitória (CMI) frente à *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*. A caracterização das AgNPs com menores valores de CMI foi realizada por espectroscopia UV-Vis, espalhamento dinâmico de luz (DLS), análise de rastreamento de nanopartículas (NTA), microscopia de força atômica (AFM), espectroscopia por energia dispersiva (EDS), espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), difração de raios-X (DRX) e espectrometria de massa por plasma acoplado indutivamente (ICP-MS). Um gel foi preparado com as AgNPs sintetizadas e Carbopol® 940, sendo avaliado o aspecto visual e o pH. A incorporação das AgNPs ao gel foi confirmada em AFM, e sua atividade antimicrobiana foi avaliada pelo método de difusão em ágar por poço contra *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans*. O pH e a concentração de AgNO₃ tiveram efeitos significativos na síntese de AgNPs nas condições experimentais. As AgNPs sintetizadas em pH 9,0 e concentração de AgNO₃ de 1,5 mM demonstraram maior eficácia contra *S. aureus* (3,17 µg/mL), *E. coli* (6,35 µg/mL) e *C. albicans* (0,79 µg/mL). As AgNPs apresentaram-se esféricas (diâmetro médio de 58 nm), com potencial Zeta de -32,5 mV, apresentando exclusivamente prata na sua estrutura cristalina e a presença de resíduos de proteínas como possíveis estabilizadores. O gel com AgNPs inibiu o crescimento *in vitro* de *S. aureus* (15,7 ± 0,6 mm), *E. coli* (13,7 ± 0,3 mm) e *C. albicans* (12,3 ± 0,4 mm). Os dados mostraram que a síntese de AgNPs por *A. flavo-furcatis* é influenciada pelo pH e concentração de AgNO₃, sendo estáveis em soluções coloidais e demonstrando potencial no desenvolvimento de nanocompósitos para o controle de microrganismos patogênicos e oportunistas.

Palavras-chave: *Aspergillus*, atividade antimicrobiana, micossíntese, nanocompósito.

ABSTRACT

Silver nanoparticles (AgNPs) have gained prominence due to application in pharmaceuticals, textiles and hygiene products. The AgNPs are synthesized by chemical and physical methods, however these processes have high costs and generate pollutants. On another hand, the green synthesis or biosynthesis emerges as an alternative route, using biological systems to intermediate the synthesis of AgNPs. The aim of this study was to investigate the effect of pH, temperature and silver nitrate (AgNO₃) concentration on the silver nanoparticles (SNP) synthesis by *Aspergillus flavo-furcatis* to develop a polymeric gel with antimicrobial properties. A full-factorial experiment 2³ was performed to assess the effect of physicochemical conditions on AgNP synthesis. The antimicrobial activity of synthesized AgNPs were performed using well-agar diffusion and broth microdilution methods, to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*. The characterization of AgNPs that showed lower MIC values were performed by UV-Vis spectroscopy, dynamic light scattering (DLS), nanoparticle tracking analysis (NTA), atomic force microscopy (AFM), energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS), Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), X-ray diffraction (XRD) and inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). A polymeric gel was developed using the synthesized AgNPs and Carbopol 940 as gelificant, with evaluation of visual aspect and pH. The incorporation of AgNPs into the gel matrix was confirmed by AFM. The nanocomposite was tested against *S. aureus*, *E. coli* and *C. albicans* using agar well diffusion method. The pH and AgNO₃ concentration had significant effects on the AgNPs synthesis in the experimental conditions. The AgNPs synthesized at pH 9,0 and 1,5 mM AgNO₃ were more effective against *S. aureus* (3,17 µg/mL), *E. coli* (6,35 µg/mL) e *C. albicans* (0,79 µg/mL). The AgNPs showed a spherical form (average size of 58 nm), Zeta potential of -32,5 mV and showing exclusively silver in microcrystalline structure with the presence of protein residues as possible capping agents. The nanocomposite inhibited the growth of *S. aureus* (15,7 ± 0,6 mm), *E. coli* (13,7 ± 0,3 mm) e *C. albicans* (12,3 ± 0,4 mm). These data support that AgNP synthesis by *A. flavo-furcatis* is influenced by pH and AgNO₃ concentration, and the synthesized AgNPs are stable in colloidal solutions, demonstrating a potential in the development of nanocomposites for the control of opportunistic and pathogenic microorganisms.

Keywords: *Aspergillus*, antimicrobial activity, mycosynthesis, nanocomposite.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Conidióforo de <i>Aspergillus</i> . (A) Desenho esquemático mostrando as estruturas que compõe um conidióforo. (B) Imagem de <i>Aspergillus ochraceus</i> obtida por microscopia óptica, escala de 7 μm	13
Figura 2. Comparação de tamanhos usando nanômetros (nm) como unidade de comprimento, com destaque para o campo de estudo da nanociência e nanotecnologia (em vermelho).....	14
Figura 3. Mecanismos de ação envolvidos na atividade antimicrobiana de nanopartículas de prata	18
Figura 4. Abordagens utilizadas na síntese de nanopartículas metálicas, inclusive AgNPs	19
Figura 5. Síntese química de AgNPs pelo uso de agentes redutores	20
Figura 6. Mecanismo de síntese extracelular de nanopartículas de prata por fungos filamentosos.....	23
Figura 7. Desenho esquemático da técnica de microdiluição em caldo utilizando microplacas de 96 poços para determinação da CMI	28

CAPÍTULO I

Figura 1. Autenticação das características morfológicas de <i>Aspergillus flavo-furcatis</i> DPUA 1540. (A) Características macroscópicas de cultivos ágar CZ, MEA e CYA mantidos a 28 °C após sete dias, respectivamente. (B) Célula-pé e (C) estrutura de reprodução assexuada	41
Figura 2. Mudança de coloração observada nos ensaios positivos para síntese biogênica de nanopartículas de prata por <i>Aspergillus flavo-furcatis</i> DPUA 1540.....	42
Figura 3. Absorção UV-Vis dos ensaios realizados para verificar o efeito do pH, temperatura e concentração de AgNO_3 na síntese de AgNPs intermediada por <i>A. flavo-furcatis</i> DPUA 1540	43
Figura 4. Análise de variância (ANOVA) do efeito do pH, temperatura e concentração de AgNO_3 sobre a variável resposta absorvância a 420 nm. (A) Gráfico de Pareto identificando os fatores e interações significativos na síntese de nanopartículas de prata. (B) Gráfico de contorno mostrando as melhores condições de pH e concentração de AgNO_3 para síntese de AgNPs por <i>Aspergillus flavo-furcatis</i> DPUA 1540 ($p < 0,05$).....	44

CAPÍTULO II

Figura 1. Caracterização em NTA das AgNPs de <i>A. flavo-furcatis</i> sintetizadas nas condições de pH 9,0, temperatura de 35 °C e concentração de AgNO_3 1,5 mM. (A) Distribuição do tamanho hidrodinâmico das AgNPs. (B) Imagem capturada pelo equipamento Nanosight	61
--	----

Figura 2. Caracterização morfológicas em AFM das AgNPs sintetizadas por <i>A. flavo-furcatis</i> DPUA 1540. (A) Topografia bidimensional (área scaneada 1,0 x 1,0 µm), (B) topografia tridimensional (área scaneada 1,0 x 1,0 µm) e (C) histograma representando a distribuição do tamanho das AgNPs	62
Figura 3. Caracterização química e estrutural das nanopartículas de prata sintetizadas por <i>A. flavo-furcatis</i> DPUA 1540. (A) Espectro resultante da análise por EDS, evidenciando os elementos presentes na amostra. (B) Espectro resultante da análise por FTIR. (C) Difratoograma resultante das análises em DRX.....	64
Figura 4. Aspecto visual do gel elaborado com AgNPs sintetizadas por <i>A. flavo-furcatis</i> . (A) gel sem adição de AgNPs; (B) gel com adição de AgNPs	65
Figura 5. Microscopia de Força Atômica (AFM) dos géis: (A) o gel sem adição de AgNPs, e (B) o nanocompósito desenvolvido, evidenciando as nanopartículas de prata	66
Figura 6. Atividade antimicrobiana dos géis elaborados: (A) com adição de AgNPs, (B) sem adição de AgNPs e (C) controle positivo, contra três microrganismos testes.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Aplicações da nanociência e nanotecnologia nos setores da indústria.	15
Tabela 2. Produtos comercializados com nanopartículas de prata na sua composição.....	17
Tabela 3. Organismos relatados para síntese biológica de nanopartículas de prata.	21
Tabela 4. Registros de fungos filamentosos envolvidos na síntese de AgNPs	22
Tabela 5. Delineamento experimental do tipo fatorial 2 ³ completo, com três pontos centrais, para verificação da influência do pH, temperatura e concentração de nitrato de prata na síntese de AgNPs por <i>A. flavo-furcatis</i> DPUA 1540.....	26
Tabela 6. Formulação do gel polimérico contendo AgNPs biogênicas.....	32

CAPÍTULO I

Tabela 1. Níveis das variáveis utilizadas no experimento fatorial completo 2 ³ para avaliar a influência do pH, temperatura e concentração de AgNO ₃ na síntese de AgNPs por <i>A. flavo-furcatis</i> DPUA 1540.	39
Tabela 2. Influência das condições físico-químicas (pH, temperatura e concentração de AgNO ₃) na síntese de AgNPs intermediada por <i>A. flavo-furcatis</i>	42
Tabela 3. Concentração total de prata nas soluções coloidais de AgNPs obtidas em diferentes condições de síntese intermediada por <i>A. flavo-furcatis</i>	45
Tabela 4. Diâmetro médio (mm) dos halos de inibição microbiana por ação das nanopartículas de prata obtidas por intermédio de <i>A. flavo-furcatis</i> DPUA 1540.....	46
Tabela 5. Valores de concentração mínima inibitória das AgNPs sintetizadas por <i>Aspergillus flavo-furcatis</i> DPUA 1540 sobre diferentes microrganismos teste	46

CAPÍTULO II

Tabela 1. Formulação do gel polimérico contendo AgNPs biogênicas.....	60
---	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1. <i>Aspergillus</i> e aplicações biotecnológicas.....	13
2.2. Nanociência e Nanotecnologia (N&N).....	14
2.3. Nanopartículas de prata e suas propriedades.....	16
2.4. Atividade antimicrobiana de nanopartículas de prata.....	17
2.5. Síntese de nanopartículas de prata.....	19
2.6. Miconanotecnologia.....	22
3. OBJETIVOS.....	24
3.1. Objetivo Geral.....	24
3.2. Objetivos Específicos.....	24
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1. Microrganismo.....	25
4.2. Reativação do microrganismo.....	25
4.3. Determinação da viabilidade de <i>Aspergillus flavo-furcatis</i>	25
4.4. Preparo do inóculo.....	25
4.5. Produção de biomassa em cultivo submerso.....	25
4.6. Recuperação da biomassa e extração das biomoléculas.....	26
4.7. Delineamento experimental para otimização da síntese de AgNPs.....	26
4.8. Biossíntese de nanopartículas de prata.....	26
4.9. Determinação da atividade antimicrobiana em meio sólido.....	27
4.10. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI).....	27
4.11. Caracterização físico-química das nanopartículas de prata.....	28
4.11.1. Aspecto visual.....	28
4.11.2. Espectroscopia de ultravioleta-luz visível (UV-Vis).....	29
4.11.3. Espectrometria de massa por plasma acoplado indutivamente.....	29
4.11.4. Espalhamento dinâmico de luz (DLS): mensuração do potencial Zeta índice de polidispersividade e tamanho hidrodinâmico das AgNPs.....	29
4.11.5. Análise de rastreamento de nanopartículas (NTA).....	30
4.11.6. Microscopia de força atômica (AFM).....	30
4.11.7. Espectroscopia de raios-X por dispersão de energia (EDS).....	31

4.11.8. Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	31
4.11.9. Difração de raios-X (DRX).....	31
4.12. Desenvolvimento de um gel polimérico com propriedades antimicrobianas	32
4.12.1. Incorporação das AgNPs biogênicas à matriz do gel.....	32
4.12.2. Atividade antimicrobiana do gel contendo AgNPs biogênicas.....	33
4.13. Análise estatística	33
CAPÍTULO I.....	34
Síntese verde de nanopartículas de prata intermediada por fungo anamórfico e eficácia antibacteriana e antifúngica.....	35
CAPÍTULO II.....	53
Nanopartículas de prata sintetizadas por <i>Aspergillus flavo-furcatis</i> : caracterização e aplicação em gel polimérico com propriedades antimicrobianas	54
5. CONCLUSÕES GERAIS	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
ANEXOS	88

1. INTRODUÇÃO

O mercado global de nanomateriais encontra-se em expansão, com projeções de movimentação em torno de 125 bilhões de dólares até 2024 (Research and Markets, 2018). Dentre os nanomateriais, as nanopartículas metálicas (NMs) se destacam em virtude de suas propriedades físicas, químicas e biológicas únicas, sendo empregadas na indústria farmacêutica, eletrônica, têxtil, de energia, de cosméticos, de embalagens e desenvolvimento de *kits* diagnóstico (Marcone, 2015; Hoseinzadeh et al., 2017).

A síntese de nanopartículas metálicas é classicamente obtida por métodos físicos e químicos, com altos custos operacionais e geração de poluentes; como alternativa aos métodos clássicos, surge a síntese verde ou nanobiotecnologia, que emprega sistemas biológicos para intermediar a síntese das NMs, com baixo impacto ambiental e de uso sustentável (Syafiuddin et al., 2017; Abdelghany et al., 2018).

Uma das principais vias de investigação da nanobiotecnologia tem sido o uso de enzimas de fungos filamentosos como catalisadores da síntese de NMs, especialmente do gênero *Aspergillus*. Espécies de *Aspergillus* são de grande importância para processos biotecnológicos por possuírem alta produtividade de biocompostos, fácil manipulação genética e rápida adaptação às condições laboratoriais (Koblitz, 2010; Zhao et al., 2017).

Dentre as nanopartículas metálicas, se destacam as nanopartículas de prata (AgNPs), devido à comprovada atividade anti-inflamatória e atividade antimicrobiana (Kasithevar et al., 2017; Abdelghany et al., 2018). Em virtude dessas propriedades, as nanopartículas de prata são amplamente comercializadas, tendo registros de 378 produtos contendo AgNPs disponíveis no mercado, principalmente na área de higiene e saúde (Hansen et al., 2016; The Nanodatabase, 2018).

A atividade antimicrobiana das AgNPs é dependente do tamanho e forma da nanopartícula (Helmlingher et al., 2016). Ademais, condições no momento da síntese, como pH e temperatura, podem vir a influenciar nas características morfológicas das AgNPs, alterando suas propriedades antimicrobianas (Kumari et al., 2017).

Diante desse contexto, é necessária a realização de estudos detalhados acerca das condições da síntese verde de nanopartículas de prata para um melhor controle do tamanho e forma desses nanomateriais, em virtude da influência desses fatores na propriedade antimicrobiana das AgNPs. Além disso, há uma escassez de informação no desenvolvimento de produtos de higiene e saúde contendo AgNPs de origem biogênica.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Aspergillus* e aplicações biotecnológicas

O gênero *Aspergillus* é amplamente investigado pela comunidade científica, em vista de sua grande prevalência na natureza, fácil cultivo em condições laboratoriais e alta produtividade de compostos de importância industrial (Abdel-Azeem et al., 2016; Park et al., 2017). Contudo, algumas espécies são responsáveis por sérias patologias em seres humanos e animais (Moreno-González et al., 2016; Tamborini et al., 2016), assim como na deterioração e contaminação de alimentos por micotoxinas (Arapcheska et al., 2015).

Este gênero é constituído por 339 espécies descritas, estando divididas em 22 grupos/seções (Samson et al., 2014; Kocsubé et al., 2016). A identificação taxonômica deste gênero comumente emprega a avaliação de características morfológicas; no entanto, a taxonomia polifásica tem ganhado notoriedade, pois emprega dados moleculares e perfis de metabólitos secundários somados aos dados morfológicos (Samson et al., 2014; Frisvad e Larsen, 2015). A taxonomia clássica constitui na observação de características macro e microscópicas, como cor, crescimento e textura da colônia, temperatura de crescimento e a estrutura do conidióforo, sendo esta a característica típica do gênero (Figura 1) (Samson et al., 2014).

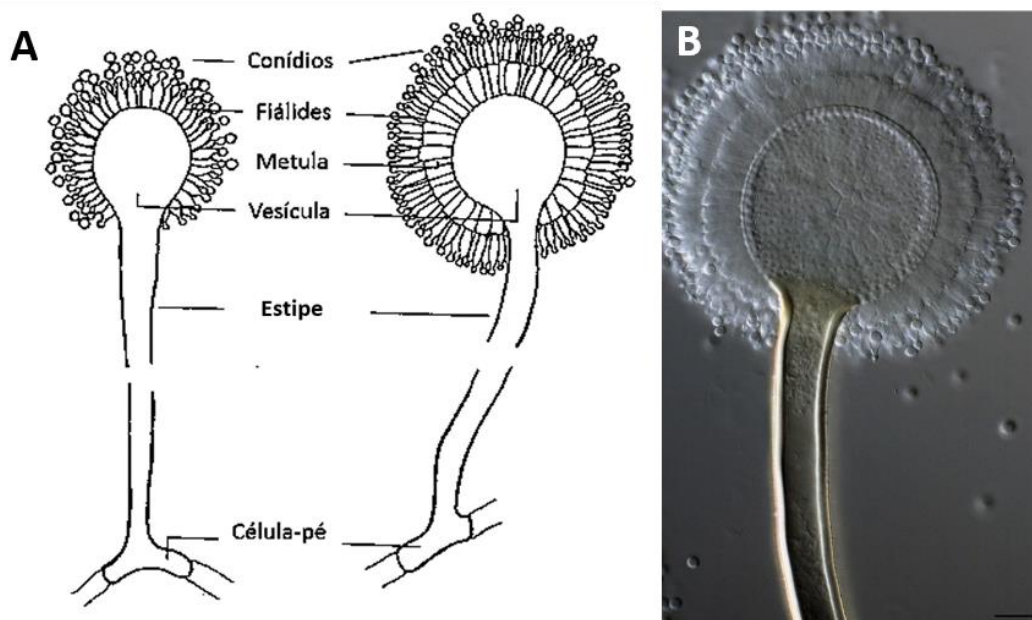


Figura 1. Conidióforo de *Aspergillus*. (A) Desenho esquemático mostrando as estruturas que compõem um conidióforo (Fonte: Klich e Pitt, 1977). (B) Imagem de *Aspergillus ochraceus* obtida por microscopia óptica, escala de 7 µm. (Fonte: Samson et al., 2014).

O conidióforo de *Aspergillus* (Figura 1) apresenta na sua base células bifurcadas (forma de “T” ou “L”) denominadas de células-pé. Dessa estrutura surgem estipes alongados e não septados, cuja extremidade se abaula e origina a vesícula e as fiáldes, onde ocorre a produção de conídios. Toda essa estrutura reprodutiva assemelha-se ao aspersor de água benta utilizado em celebrações cristãs-católicas, o *aspergillum*, denominação que batiza o gênero (Bennett, 2010; Samson et al., 2014).

Devido à sua capacidade de colonizar diversos substratos, representantes de *Aspergillus* são conhecidos por secretarem uma alta variedade de metabólitos, com 1984 compostos já registrados (Frisvad e Larsen, 2015). Somados à pouca exigência nutricional e fácil manuseio em condições laboratoriais, este gênero tem destaque em processos biotecnológicos, sendo empregados na indústria alimentícia (Paiva et al., 2015), farmacêutica (Hasan et al., 2019), na produção de etanol (Fischer et al., 2015), na síntese de ácidos orgânicos (Yang et al., 2017), e mais recentemente na indústria nanotecnológica (Hassan et al., 2015; Kalyani et al., 2018; Chengzheng et al., 2018).

2.2. Nanociência e Nanotecnologia (N&N)

Por conceito, a nanociência é a ciência que estuda os materiais cuja quaisquer de suas dimensões se encontrem na escala nanométrica, ou seja, entre 1 a 100 nm (Figura 2). Os conhecimentos da nanociência podem ser empregados na produção, manipulação, caracterização e desenvolvimento de novos produtos contendo nanomateriais, dando origem à nanotecnologia. Ressalta-se que a nanociência e nanotecnologia constituem uma área multidisciplinar, integrando conhecimentos de áreas como a Biologia, Engenharia, Física e Química (Sousa et al., 2018).

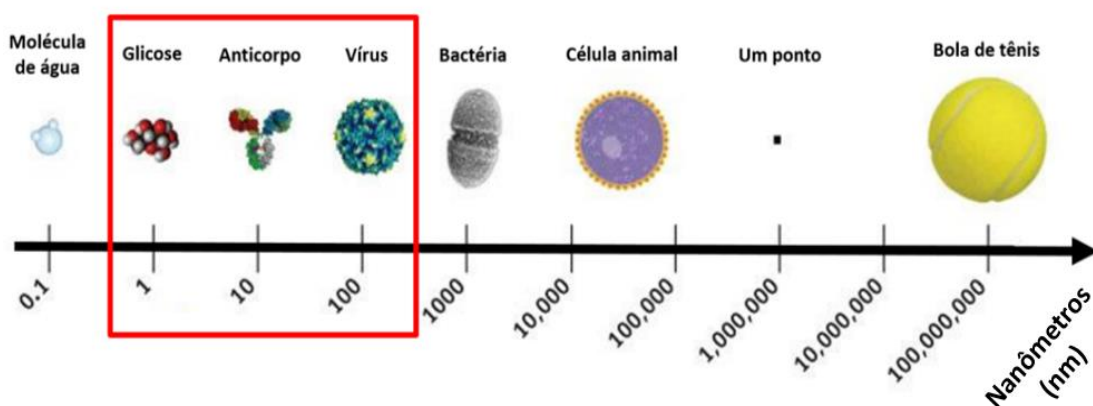


Figura 2. Comparação de tamanhos usando nanômetros (nm) como unidade de comprimento, com destaque para o campo de estudo da nanociência e nanotecnologia (em vermelho). (Fonte: <https://www.cancer.gov/sites/nano/cancer-nanotechnology>).

Os termos “nanociência” e “nanotecnologia” têm suas origens na década de 60, com a palestra “*There’s plenty of room at the bottom*” (“Há mais espaço lá embaixo”), ministrada pelo físico americano Richard Feynman, que abordou a ideia de manipular átomos para o desenvolvimento de novos materiais (Disner e Cestari, 2016). Apesar dos termos “nanociência” e “nanotecnologia” serem recentes, registros arqueológicos apontam que civilizações antigas já se utilizavam de conhecimentos nanotecnológicos na confecção de cerâmicas e artefatos (Schaming e Remita, 2015).

O tamanho nanométrico dessas partículas acarreta em uma alta razão entre superfície e volume, resultando em propriedades biológicas, físicas e químicas distintas se comparado aos materiais convencionais (Disner e Cestari, 2016). Em vista disso, esses nanomateriais despertaram o interesse de diversos setores industriais para o desenvolvimento de novos produtos usando a nanotecnologia (Tabela 1). Dado esse contexto, há projeções de que o mercado global da nanotecnologia tenha lucros de até 125 bilhões de dólares até 2024 (Research and Markets, 2018).

Tabela 1. Aplicações da nanociência e nanotecnologia nos setores da indústria.

Setor	Aplicações
Alimentos	Desenvolvimento de embalagens inteligentes para alimentos: detecção da presença de patógenos em alimentos; filmes para alimentos perecíveis com propriedades antimicrobianas.
Ambiente	Captura e conversão de CO ₂ atmosférico; remoção de poluentes orgânicos e inorgânicos de solos e águas contaminados; desenvolvimento de catalisadores para conversores de escapamento de automóveis.
Construção civil	Incorporação de nanomateriais ao cimento para aumentar sua resistência e durabilidade; construção de <i>smart buildings</i> com revestimentos autolimpantes; desenvolvimento de sistemas de isolamento térmico e acústico de alta eficiência,
Cosméticos	Desenvolvimento de novas fórmulas para protetores solares; maquiagens contendo cores estruturais; produtos para tratamento estético da pele.
Eletrônicos	Circuitos de grande capacidade de processamento e armazenamento em escalas menores (<i>nanochips</i>); produção de semicondutores; melhoramento de transmissão de dados por feixes de luz.
Energia	Sistemas fotovoltaicos de alto desempenho; produção de energia a partir de pequenos movimentos (locomoção de humanos e animais); baterias autossuficientes; pás para geradores eólicos.
Esportes	Equipamentos de esportes mais leves e resistentes; desenvolvimento de roupas esportivas com propriedades antitranspirantes e antimicrobianas.
Medicina	Novas terapias anticâncer; novas formas de administração de fármacos (<i>drug-delivery</i>); pomadas para tratamento de queimaduras; elaboração de <i>kits</i> diagnóstico de alta sensibilidade.
Tecidos	Desenvolvimento de tecidos à prova de manchas e hidrofóbicos; tecidos com propriedades antimicrobianas; confecção de tecidos e uniformes de alta visibilidade (trajes de segurança).

Fonte: ABDI, 2010; Assis, 2013; Papadaki et al., 2018.

No cenário global da nanociência e nanotecnologia, o Brasil possui baixa representatividade, estando em 17^a posição no depósito de patentes nessa área (Sant'Anna et al., 2013). Entretanto, as publicações nesta área apresentaram constante crescimento desde 2000, graças aos incentivos de programas do governo: Plano Brasil Maior (PBM), Política de Desenvolvimento Produtivo (PDP), criação de redes e institutos de pesquisas do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Política Industrial, Tecnológica e de Comércio Exterior (PITCE) (Alencar et al., 2017).

2.3. Nanopartículas de prata e suas propriedades

Dentre os nanomateriais, as nanopartículas metálicas (NMs) se sobressaem por serem versáteis, sendo empregadas no desenvolvimento de *nanochips*, fármacos, cosméticos, *kits* diagnóstico e biossensores (Thakkar et al. 2010; Schröfel et al., 2014). Contudo, das NMs, as nanopartículas de prata (AgNPs) se destacam graças às suas propriedades antimicrobiana e anti-inflamatória.

A prata e seus compostos são utilizados para fins medicinais por séculos, desde o uso de moedas de prata para desinfecção de água pelos guerreiros romanos (Barillo e Marx, 2014), assim como o extinto uso de nitrato de prata para prevenir conjuntivite gonocócica em recém-nascidos (Passo et al., 2011). Porém, em altas concentrações, a prata é tóxica ao organismo, acumulando-se e prejudicando o funcionamento de órgãos vitais, como cérebro, coração e fígado (Hadrup e Lam, 2014).

Em contrapartida, as nanopartículas de prata apresentam toxicidade reduzida, podendo ser empregadas em menores quantidades para alcançar os mesmos efeitos terapêuticos que os compostos de prata convencionais, em virtude da alta razão superfície/volume das AgNPs (Prahbu e Poulouse, 2012; Yamada et al., 2014).

Somados aos extensos relatos da atividade antimicrobiana de AgNPs, outros estudos também demonstraram que esses nanomateriais apresentam também atividade anti-inflamatória sobre queimaduras (Valcheva-Traykova et al., 2018), atividade antimalárica (Murugan et al., 2015), atividade leishmanicida (Fanti et al., 2018), atividade antitumoral (Patra et al., 2015), e atividade antirretroviral (Kumar et al., 2017). Em vista dessas propriedades, as nanopartículas de prata têm sido empregadas no desenvolvimento de produtos, especialmente voltados para a área médica e de higiene (Tabela 2).

Tabela 2. Produtos comercializados com nanopartículas de prata na sua composição.

Nome	Empresa	Descrição
Acticoat™	Smith and Nephew	Bandagem impregnada com nanopartículas de prata que previne infecções bacterianas e promove uma cicatrização mais rápida em úlceras, ferimentos e queimaduras.
Nano-b Silver Toothbrush®	Nano-b	Escova de dentes impregnada com nanopartículas de prata, inibindo o crescimento de bactérias que provocam mau hálito.
PurifiCup® Portable Natural Water Purifier	PurifiCup®	Sistema de purificação de água portátil contendo membrana impregnada de nanopartículas de prata, eliminando patógenos presentes na água.
SilvaSorb®	Medline Industries	Hidrogel contendo nanopartículas de prata para uso tópico, promovendo a hidratação gradual e controle de microrganismos nocivos em úlceras, queimaduras e ferimentos.
Silver Seal™ Keyboard	Seal Shield	Teclado lavável com revestimento de nanopartículas de prata, impedindo o crescimento de microrganismos patogênicos em itens de computação presentes de ambientes hospitalares.
SilverLine®	Spiegelberg	Cateter ventricular de poliuretano impregnado com nanopartículas de prata, utilizando no tratamento de hidrocefalia, reduzindo riscos de infecções e inflamações.
SilverNano Pacifier	BabyDream	Chupeta impregnada com nanopartículas de prata, evitando o crescimento de microrganismos e o aparecimento de maus odores. Evita esterilizações por fervura sucessivas do material.

Fonte: Chaloupka et al., 2010; DTU Environment, 2016.

2.4. Atividade antimicrobiana de nanopartículas de prata

O surgimento de cepas de microrganismos multirresistentes aos antibióticos (*superbugs*) comumente empregados despertou o interesse da comunidade científica na busca de novos compostos com atividade antimicrobiana, como as AgNPs. Dados da literatura mostram que esses nanomateriais são eficientes no controle de *superbugs*, além de que microrganismos possuem baixa possibilidade de adquirirem resistência a compostos de prata (Pelgrift e Friedman, 2013; Kohsari et al., 2019).

Apesar da atividade antimicrobiana das AgNPs ser extensamente comprovada, os mecanismos de ação desses materiais sobre bactérias e fungos não estão totalmente elucidados. Diversos estudos sugerem que a atividade antibacteriana de AgNPs se deve pela geração de espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species* – ROS), que acarretam modificações na estrutura de proteínas e ácidos nucleicos, e na permeabilidade da parede celular, culminando na lise da célula bacteriana (Figura 3) (Radzig et al., 2013; Agnihotri et al., 2014; Flores-López et al., 2018).

Quanto ao mecanismo de ação de AgNPs frente a fungos, os registros na literatura são mais escassos. No entanto, Rai et al. (2014) demonstraram que o mecanismo de ação descrito anteriormente continua válido para leveduras e fungos filamentosos. No estudo realizado por Ogar et al. (2015), também foi demonstrado que AgNPs agem negativamente sobre a germinação de conídios de fungos filamentosos, assim como modificações na produção de pigmentos e estruturas de resistências, como clamidósporos.

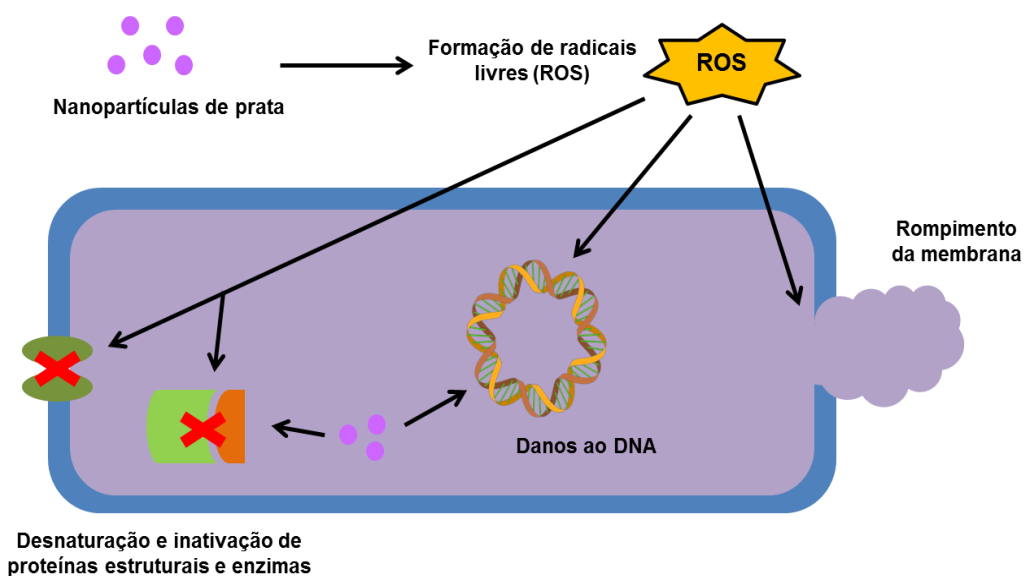


Figura 3. Mecanismos de ação envolvidos na atividade antimicrobiana de nanopartículas de prata. (Fonte: Abbasi et al., 2014).

Outros estudos também demonstraram o papel das AgNPs na geração de espécies reativas de oxigênio, ocasionando uma situação de *stress* oxidativo no interior do microrganismo (Quinteros et al., 2016; Das et al., 2017). Esta hipótese sobre o mecanismo de ação de AgNPs é fortalecido pelo estudo de Xu et al. (2012) onde foi verificada que a atividade antimicrobiana é fortemente influenciada pela presença de oxigênio, elemento vital na formação de ROS.

Apesar do principal mecanismo de ação das AgNPs ser a geração de radicais livres, nanopartículas de prata com tamanho reduzido (menor que 10 nm) são capazes de interagir diretamente com grupos tióis (–SH) de certas proteínas, assim como grupos fosfato encontrados na molécula de DNA e RNA (Durán et al., 2016). As principais consequências dessas interações são desemparelhamento de bases do DNA e consequente inibição da replicação (Manna et al., 2015), desnaturação de enzimas e proteínas estruturais (Yuan et al., 2013), e inibição de sinais de tradução (Vyshnava et al., 2016).

Ainda que o uso de AgNPs para fins antimicrobianos seja promissor, dados da literatura mostram que a atividade antimicrobiana desses nanomateriais é influenciada por suas características morfológicas, como tamanho e forma (Helmlinger et al., 2016), assim como condições físico-químicas no momento da síntese, como pH, temperatura, e exposição à luz (Zhou et al., 2016). Portanto, ressalta-se a importância de avaliar esses fatores nos estudos que envolvam a síntese de AgNPs para fins antimicrobianos.

2.5. Síntese de nanopartículas de prata

Para a obtenção de nanopartículas metálicas, inclusive as AgNPs, são empregadas duas abordagens: os métodos *top-down* e *bottom-up* (Figura 4). O método *top-down* consiste na quebra sucessiva do metal no seu tamanho convencional até atingir tamanho nanométrico, enquanto o método *bottom-up* consiste na construção de nanomateriais pelo agrupamento de átomos e partículas subatômicas (Mukherji et al., 2018; Handoko et al., 2019; Lee e Jun, 2019). A síntese de AgNPs comumente emprega técnicas físicas e químicas, contudo pesquisas sobre a síntese biológica ou biossíntese tem ganhado notoriedade (Beyene et al., 2017).

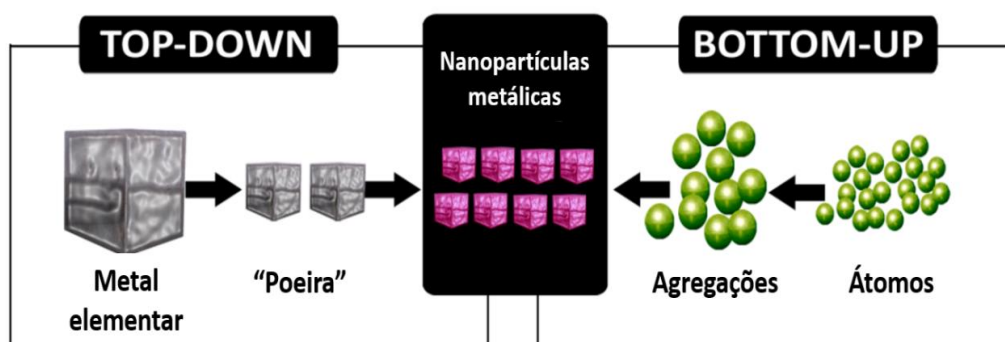


Figura 4. Abordagens utilizadas na síntese de nanopartículas metálicas, inclusive de AgNPs. (Fonte: <https://nanotechnologyjd.weebly.com>)

Das técnicas físicas empregadas na síntese de AgNPs, destacam-se as que utilizam processos de evaporação/condensação e ablação por *laser*. Os processos de evaporação/condensação são baseados na formação de vapores de prata e consequente resfriamento, contudo esta técnica necessita de grandes gastos energéticos para manter o sistema de aquecimento estável e acima de 1.000 °C (Harra et al., 2015). Já o método de ablação por *laser* consiste em “cortar” a prata no seu tamanho convencional com feixes de *laser* nanometricamente calculados (Zhang et al., 2017). Ambas técnicas necessitam de equipamentos de alto custo e manutenção, tornando a síntese por vias químicas e por vias biológicas mais viáveis do ponto de vista econômico.

Se comparadas às técnicas físicas, a síntese de AgNPs por vias químicas possui uma maior variedade de técnicas e menores custos envolvidos, sendo as principais técnicas: redução química, microemulsão, fotorredução, síntese eletroquímica e irradiação por micro-ondas (Iravani et al., 2014).

Dentre as técnicas mencionadas, a de emprego mais largo é a redução química (Figura 5), que consiste em utilizar agentes químicos (boroidrato de sódio, citrato de sódio e ácido ascórbico) para reduzir íons de prata (Ag^+) à prata reduzida (Ag^0), com consequente aglomeração e formação de AgNPs (Zain et al., 2014; Praveena et al., 2016). Contudo, as AgNPs sintetizadas por esse método apresentam alta instabilidade e alta probabilidade de agregação, sendo necessário o uso de agentes surfactantes (aminas, ácidos, álcoois e tióis) para garantir estabilidade e prevenir a sedimentação das AgNPs (Toh et al., 2015).

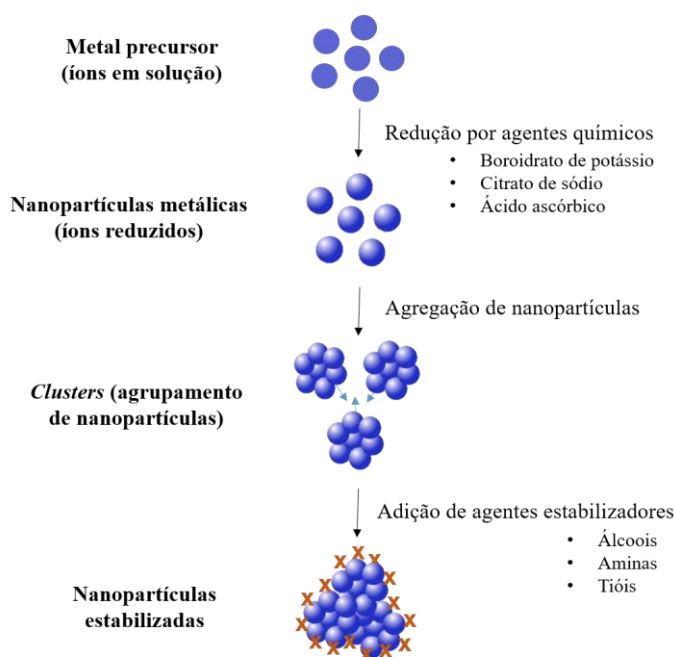


Figura 5. Síntese química de AgNPs pelo uso de agentes redutores. (Fonte: Polte, 2015)

Como alternativa ao método clássico de síntese química de AgNPs, outras técnicas foram desenvolvidas, ainda utilizando agentes redutores, contudo numa menor escala de tempo e com maior controle das características das AgNPs, como irradiação por micro-ondas e ultravioleta (Adhikari et al., 2018), emprego de *lasers* (Verma et al., 2017) e aplicação de campos elétricos (Surudžić et al., 2017).

No entanto, os métodos físicos e químicos necessitam de equipamentos de altos custos operacionais, emprego de reagentes químicos de alta toxicidade e geração de subprodutos com potencial poluidor (Bilal et al., 2017). Diante desses pontos negativos, o uso de organismos e seus biocompostos surgem como alternativa para a síntese de nanopartículas de prata, processo conhecido como biossíntese, nanobiotecnologia ou síntese verde (Ebrahiminezhad et al., 2018).

A síntese biológica de nanopartículas de prata emprega biomoléculas de origem diversa (Tabela 3), especialmente as oriundas de bactérias, leveduras, fungos filamentosos, cogumelos e plantas (Keat et al., 2015). Neste tipo de síntese, a abordagem utilizada é do tipo *bottom-up*, onde ocorre a redução dos íons de prata (provenientes de uma solução aquosa de nitrato de prata) a AgNPs pela ação de enzimas e fitoquímicos (Abdelghany et al., 2018; Siddiqi et al., 2018). Além de atuarem na redução da prata, esses biocompostos também agem na estabilização de AgNPs, diminuindo a possibilidade de agregação e mantendo a atividade biológica desses nanomateriais (Zewde et al., 2016).

Tabela 3. Organismos relatados para síntese biológica de nanopartículas de prata.

Tipo de organismo	Espécie	Publicação
Bactéria	<i>Bacillus brevis</i>	Saravanan et al. (2018)
	<i>Nostoc</i> sp.	Sonker et al. (2017)
	<i>Streptomyces exfoliatus</i>	Iniyan et al. (2017)
Levedura	<i>Candida lusitaniae</i>	Eugenio et al. (2016)
	<i>Cryptococcus laurentii</i>	Fernández et al. (2016)
	<i>Pichia fermentans</i>	Chauhan et al. (2015)
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Korbekandi et al. (2016)
Fungo filamentoso	<i>Aspergillus flavus</i>	Manimozhi e Anitha (2014)
	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	Abdel-Hafez et al. (2016)
	<i>Fusarium solani</i>	Vijayan et al. (2016)
	<i>Penicillium nalgiovense</i>	Maliszewska et al. (2014)
	<i>Phoma sorghina</i>	Sonar et al. (2017)

Cogumelo	<i>Ganoderma aplanatum</i>	Mohanta et al. (2016)
	<i>Lactarius piperatus</i>	Vamanu (2018)
	<i>Lentinus edodes</i>	Lateef e Adeeyo (2015)
	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Al-Bahrani et al. (2017)
Planta	<i>Aloe vera</i>	Tippayawat et al. (2016)
	<i>Cassia auriculata</i>	Nawaz et al. (2019)
	<i>Morinda citrifolia</i>	Suman et al. (2013)
	<i>Tagetes erecta</i>	Padalia et al. (2014)
	<i>Vitis vinifera</i>	Gnanajobitha et al. (2013)

2.6. Miconanotecnologia

A síntese biológica de AgNPs tem sido extensivamente estudada por ser um processo ecologicamente viável e ter baixos custos envolvidos. Dentre os organismos empregados na biossíntese, os fungos filamentosos se destacam pela alta secreção de proteínas responsáveis pela síntese e estabilização de AgNPs, além do seu fácil manuseio e a resistência da célula fúngica às condições adversas em biorreatores, ao contrário de plantas e outros microrganismos (Zhao et al., 2017).

Essas características tornam os fungos filamentosos ótimos candidatos para a síntese biológica de AgNPs, sendo numerosos os dados da literatura desses microrganismos como intermediadores desse processo (Tabela 4) e originando uma nova área resultante da interação em Micologia e Nanotecnologia: a Miconanotecnologia (Lateef e Adeeyo, 2015; Rai et al., 2009).

Tabela 4. Registros de fungos filamentosos envolvidos na síntese de AgNPs.

Espécie	Tamanho	Publicação
<i>Aspergillus clavatus</i>	25 – 145 nm	Zomorodian et al. (2016)
<i>Aspergillus flavus</i>	5 – 19 nm	Hassan et al. (2015)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1 – 20 nm	Kalyani et al. (2018)
<i>Aspergillus niger</i>	20 – 25 nm	Chengzheng et al. (2018)
<i>Aspergillus tamaritii</i>	1 – 15 nm	Devi et al. (2015)
<i>Aspergillus terreus</i>	8 – 20 nm	Balakumaran et al. (2016)
<i>Aspergillus wentii</i>	15 – 45 nm	Biswas e Bafunbiandi (2016)
<i>Chaetomium globosum</i>	11 – 14 nm	Madbouly et al. (2017)
<i>Cunninghamella echinulata</i>	20 – 50 nm	Anbazhagan et al. (2017)
<i>Fusarium oxysporum</i>	19 – 50 nm	Vijayan et al. (2016)
<i>Fusarium semitectum</i>	12 – 20 nm	Husseiny et al. (2015)

<i>Guignardia mangiferae</i>	5 – 30 nm	Balakumaran et al. (2015)
<i>Penicillium decumbens</i>	30 – 60 nm	Majeed et al. (2016)
<i>Penicillium polonicum</i>	10 – 15 nm	Neethu et al. (2018)
<i>Rhizopus stolonifer</i>	10 – 60 nm	Abdel-Rahim et al. (2017)
<i>Trichoderma harzianum</i>	20 – 30 nm	Guilger et al. (2017)
<i>Trichoderma viride</i>	1 – 50 nm	Elgorban et al. (2016)

Os mecanismos envolvidos na síntese de AgNPs por intermédio de fungos filamentosos não é totalmente compreendido. Investigações sugerem que a enzima nitrato redutase assume papel principal na redução de íons de prata e na consequente formação de AgNPs (Gholami-Shabani et al., 2014; Hulikere e Joshi, 2019). Além da nitrato redutase, outros estudos também ressaltam a importância de proteínas extracelulares secretadas por fungos na estabilização de nanopartículas de prata (Korbekandi et al., 2013; Zhao et al., 2017), conforme demonstrado na Figura 6.

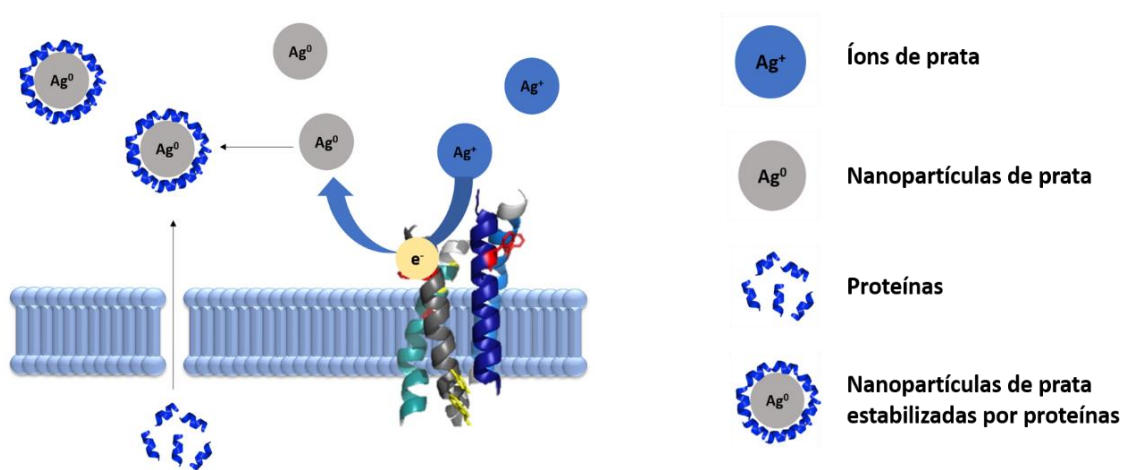


Figura 6. Mecanismo de síntese extracelular de nanopartículas de prata por fungos filamentosos. (Fonte: Kashyap et al., 2013)

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo avaliar as melhores condições de síntese verde de nanopartículas de prata intermediada por *Aspergillus flavo-furcatis* DPUA 1540, para o desenvolvimento de um gel polimérico com propriedades antimicrobianas.

3.2. Objetivos Específicos

1. Determinar a viabilidade de *Aspergillus flavo-furcatis* DPUA 1540, preservado em óleo mineral, cedido pela Coleção de Culturas DPUA;
2. Determinar as melhores condições de pH do extrato micelial, concentração do nitrato de prata e temperatura para síntese biogênica de nanopartículas de prata;
3. Avaliar a atividade antimicrobiana das nanopartículas de prata sintetizadas contra microrganismos patogênicos e oportunistas;
4. Determinar a concentração mínima inibitória (CMI) das nanopartículas de prata;
5. Realizar a caracterização físico-química das nanopartículas de prata que apresentarem menor concentração mínima inibitória;
6. Desenvolver uma formulação de gel incorporando a suspensão de nanopartículas de prata sintetizada e avaliar suas características físico-químicas;
7. Avaliar a atividade antimicrobiana do gel desenvolvido contendo nanopartículas de prata contra microrganismos patogênicos e oportunistas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Microrganismo

A espécie selecionada foi *Aspergillus flavo-furcatis* DPUA 1540 cedidos pela Coleção de Culturas do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal do Amazonas (DPUA). De acordo com Silva (2017), a linhagem selecionada mostrou potencial para intermediar a síntese de nanopartículas de prata.

4.2. Reativação do microrganismo

Fragments da colônia preservada em óleo mineral foram transferidos para tubos contendo caldo glicosado 2% (p/v) e incubados a 25 °C por um período de 7 a 15 dias para reativação da linhagem em estudo. Após o crescimento em caldo, fragmentos da cultura foram transferidos para tubos contendo ágar Czapek-Dox + extrato de levedura 0,5% (p/v) e incubados por um período de sete dias a 25 °C, prosseguindo aos testes para confirmar a viabilidade da linhagem.

4.3. Determinação da viabilidade de *Aspergillus flavo-furcatis*

Para determinar a viabilidade da espécie, *Aspergillus flavo-furcatis* DPUA 1540 foi cultivado em ágar CZ (Czapek-Dox), ágar MEA (extrato de malte) e ágar CYA (Czapek-Dox + extrato de levedura), para observação das características macro e micromorfológicas típicas da espécie (Raper e Fennell, 1965; Klich e Pitt, 1988). Os cultivos foram incubados a 25 °C por sete dias.

4.4. Preparo do inóculo

Para obtenção do inóculo foram adicionados 10 mL de água destilada esterilizada ao cultivo em meio CYA (vertido em tubo de ensaio) de *A. flavo-furcatis*, resultando, após leve raspagem para desagregar esporos, numa suspensão celular 10^{-1} . A suspensão foi homogeneizada em agitador *vortex* e 100 µL desta suspensão foram inoculados em ágar CYA e distribuídos por toda a superfície com auxílio de um *swab* esterilizado. As culturas foram incubadas a 28 °C por sete dias.

4.5. Produção de biomassa em cultivo submerso

Para produção de biomassa, *A. flavo-furcatis* foi cultivado em caldo MGYB [extrato de malte 0,3 % (p/v), glicose 1 % (p/v), extrato de levedura 0,3 % [p/v] e

peptona 0,5 % (p/v)]. O pH do meio foi aferido para 7,0 usando ácido clorídrico (HCl) 1 M e hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 M (Manimozhi e Anitha, 2014). Os meios de cultivo foram autoclavados a 121 °C por 15 minutos. Como inóculo, foram utilizados cinco discos miceliais dos cultivos ($\varnothing = 8$ mm) obtidos no item 4.4 e adicionados a 250 mL de meio (razão 1:5). Após a adição do inóculo, os frascos foram incubados a 28 °C, a 180 rpm por 96 horas (Silva et al., 2017).

4.6. Recuperação da biomassa e extração das biomoléculas

A biomassa foi recuperada com auxílio de um crivo de alumínio e uma espátula. Para a remoção de quaisquer resquícios do meio de cultivo, a biomassa foi lavada com água deionizada ultrapura esterilizada (água Milli-Q®). Da biomassa úmida, 25 g foram utilizadas para extração aquosa das biomoléculas com água Milli-Q (proporção de 1:10, p/v). O processo foi conduzido a 25 °C, a 180 rpm, por 72 h.

Após esse período, o extrato aquoso foi recuperado por filtrações a vácuo em papel de filtro Whatman n° 01, membrana nitrocelulósica de 0,45 e 0,22 μm , respectivamente. O extrato aquoso recuperado foi armazenado em frascos de vidro esterilizados, protegidos da luz e mantidos a 4 °C para posterior uso na síntese de nanopartículas de prata.

4.7. Delineamento experimental para otimização da síntese de AgNPs

Um delineamento experimental do tipo fatorial 2^3 com três pontos centrais foi elaborado para avaliar as melhores condições (pH, temperatura e concentração de nitrato de prata) de síntese de nanopartículas de prata (Tabela 5). O delineamento experimental foi realizado utilizando o *software* estatístico Minitab® versão 17.0.

Tabela 5. Delineamento experimental do tipo fatorial 2^3 completo, com três pontos centrais, para verificação da influência do pH, temperatura e concentração de nitrato de prata na síntese de AgNPs por *A. flavo-furcatis* DPUA 1540.

Nível	pH	Temperatura (°C)	Concentração de AgNO_3 (mM)
-1	5,0	25	0,5
0	7,0	30	1,0
+1	9,0	35	1,5

4.8. Biossíntese de nanopartículas de prata

Para a síntese de AgNPs, foi adicionada uma solução de nitrato de prata (AgNO_3) 1 M a 50 mL do extrato micelial obtido no item 4.7 até atingir as

concentrações citadas na Tabela 6 (Durán et al., 2007). O pH foi aferido com soluções de NaOH e HCl 1 M (Manimozhi e Anitha, 2014). Os ensaios foram incubados na ausência total de luz, a 180 rpm, por 96 horas. As condições de temperatura foram ajustadas conforme Tabela 5.

4.9. Determinação da atividade antimicrobiana em meio sólido

As AgNPs obtidas foram avaliadas frente à três microrganismos testes: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* CBAM 001 e *Candida albicans* DPUA 1706. Para as análises, as bactérias foram cultivadas em ágar Mueller-Hinton (MHA) e *C. albicans* em ágar Sabouraud (SAB) a 37 °C, por 24 h. Desses cultivos foram retirados inóculos com uma alça de platina calibrada ($\varnothing = 4$ mm) e transferidos para 5 mL de água destilada esterilizada em tubos de ensaios. As suspensões celulares foram homogeneizadas em agitador de tubos e padronizadas em espectrofotômetro UV-Vis nas faixas de 0,08-0,1 a 540 nm para bactérias, e 0,12-0,15 a 625 nm para leveduras, correspondendo às concentrações de 10^8 UFC/mL e 10^5 UFC/mL, respectivamente. Das suspensões celulares, 100 μ L foram transferidos para a superfície de MHA e SAB e semeadas com auxílio de uma alça de Drigalski. Em cada poço ($\varnothing = 8$ mm) foram adicionados 100 μ L do controle positivo (soluções de Estreptomicina 50 μ g/mL para bactérias e de Itraconazol 50 μ g/mL) e a solução coloidal de AgNPs (teste). As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h. A atividade antimicrobiana foi expressa em milímetros, medindo-se o diâmetro do halo de inibição (Prado et al., 2017).

4.10. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI)

As nanopartículas de prata que expressaram atividade antimicrobiana significativa em meio sólido (item 4.9) foram selecionadas para os testes de concentração mínima inibitória pelo método da microdiluição em caldo, conforme os documentos M07-A09 e M27-A02 para bactérias e leveduras, respectivamente (CLSI, 2002; CLSI, 2012).

A avaliação foi realizada em microplacas de 96 poços (Figura 7), onde foram adicionados 200 μ L de meio de cultivo (caldo Mueller-Hinton para bactérias ou RPMI-1640 para leveduras). As soluções coloidais de AgNPs foram testadas nas diluições de 1:2 a 1:1024 (v/v). Em cada poço foram adicionados os microrganismos testes citados no item 4.9, cuja concentração final de microrganismos foi de 5×10^5 UFC/mL para bactérias e 2×10^3 UFC/mL para *C. albicans*; os microrganismos não foram

adicionados na linha A (controle de esterilização do meio) nem na coluna 1 (controle de esterilização da solução coloidal de AgNPs).

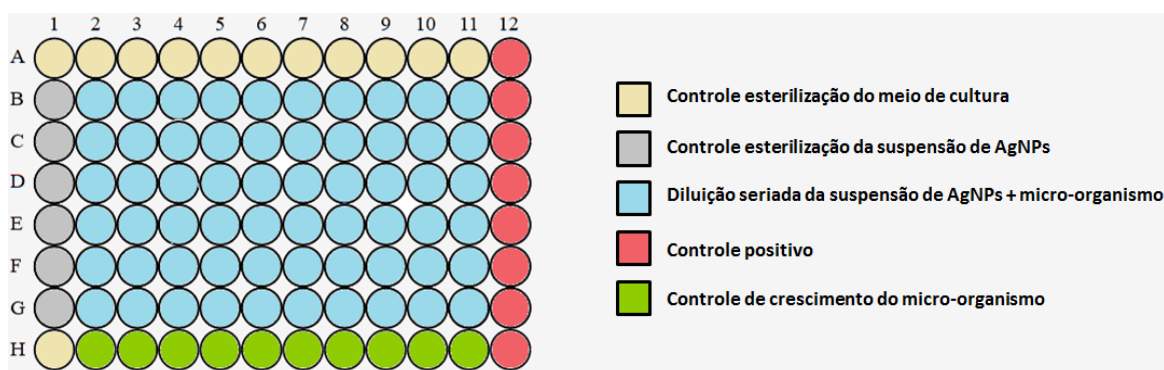


Figura 7. Desenho esquemático da técnica de microdiluição em caldo utilizando microplacas de 96 poços para determinação da CMI. (Fonte: próprio autor)

Na coluna 12, foram realizados os testes com o controle positivo, sendo utilizadas soluções de Estreptomicina (200 µg/mL) para bactérias e de Itraconazol (200 µg/mL) para leveduras. O controle negativo para verificar o crescimento do microrganismo foi realizado na linha H. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h e 36 h para bactérias e leveduras, respectivamente. Após esse período, em cada poço foram adicionados 10 µL de resazurina (100 µg/mL) e incubados a 37 °C por 2 h. Em seguida, foi observada a coloração da reação: cor rosa indicando o crescimento e a cor azul, a inibição do crescimento do microrganismo teste (Prado et al., 2017).

4.11. Caracterização físico-química das nanopartículas de prata

4.11.1. Aspecto visual

As soluções coloidais de NPs apresentam intensa coloração devido às propriedades ópticas magnificadas pelo tamanho e geometria de AgNPs. A cor observada nas soluções coloidais desses nanomateriais se deve à oscilação dos elétrons da superfície na mesma frequência da luz incidente, dando origem ao fenômeno conhecido como ressonância do plásmon de superfície (RPS) (Melo Jr. et al., 2012; Siddiqi e Husen, 2016).

A reação de síntese de AgNPs foi acompanhada diariamente para monitoramento de mudanças na coloração da mistura reacional, especialmente para faixas de amarelo, vermelho e marrom (Zaynitdinova et al., 2017). Contudo, a mudança de coloração é somente um indicativo preliminar da síntese de AgNPs, sendo

necessárias outras técnicas de caracterização para confirmação efetiva, como a espectroscopia de ultravioleta-luz visível (UV-Vis) e difração por raios-X (DRX).

4.11.2. Espectroscopia de ultravioleta-luz visível (UV-Vis)

Os dados do espectro de absorção das soluções coloidais confirmam a síntese de AgNPs, apresentando comumente a formação de picos de absorvância nas faixas de comprimento entre 400 a 530 nm (Abbasi et al., 2016). Contudo, características morfológicas, como tamanho e forma das AgNPs podem deslocar a formação desses picos para faixas de até 740 nm (Mlalila et al., 2017).

Neste estudo, as medidas dos espectros de absorvância das AgNPs sintetizadas foram realizadas em espectrofotômetro de duplo feixe Cary 60 (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, EUA), com resolução de 0,1 nm, na faixa de comprimento de 200 a 800 nm. As amostras foram diluídas em água deionizada (1:5, v/v) para realização das leituras.

4.11.3. Espectrometria de massa por plasma acoplado indutivamente (ICP-MS)

A análise por ICP-MS permite a quantificação de prata total (Ag) presentes nas soluções de AgNPs sintetizadas no delineamento experimental, sendo realizada em espectrofotômetro ICP-MS 7900 (Agilent Technologies Inc., Hachioji, Japão), situado no Centro de Ciências Naturais e Humanas, da Universidade Federal do ABC – UFABC, campus Santo André. Para a análise, 1 mL das amostras de soluções coloidais de AgNPs foram digeridas a 90 °C por quatro horas, em ácido nítrico 98 % (v/v) (Rolim et al., 2018). As análises foram realizadas em triplicata.

4.11.4. Espalhamento dinâmico de luz (DLS): mensuração do potencial Zeta, índice de polidispersividade e tamanho hidrodinâmico das AgNPs

A mensuração do potencial Zeta proporciona informações sobre o potencial elétrico da superfície de nanopartículas, sendo importante em estudos de estabilidade de soluções coloidais desses nanomateriais. Uma solução coloidal de AgNPs apresenta-se estável quando seu potencial Zeta apresenta valores maiores que +30 mV ou menores que -30 mV, reduzindo a possibilidade de agregação e sedimentação de AgNPs (Clogston e Patri, 2010; Albernaz, 2014). Além do potencial Zeta, o índice de polidispersividade (PDI) e o tamanho hidrodinâmico das NPs em soluções coloidais

constituem importantes fatores de análise da homogeneidade desses sistemas. Soluções com PDI abaixo de 0,3 são preferíveis por apresentarem NPs de tamanho homogêneo (Danaei et al., 2018).

Essas medidas foram realizadas no Centro de Ciências Naturais e Humanas, da Universidade Federal do ABC – UFABC, campus Santo André, utilizando o equipamento ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltda., Worcestershire, Reino Unido), a 25 °C com ângulo de espalhamento fixado em 173 °. As amostras foram diluídas em água deionizada (1:5, v/v) para análise. Todas as análises foram realizadas em sextuplicatas.

4.11.5. Análise de rastreamento de nanopartículas (NTA)

Como complemento às análises por espalhamento dinâmico de luz (DLS), as soluções coloidais de AgNPs sintetizadas foram submetidas à análise por NTA para obtenção de dados acerca do tamanho hidrodinâmico e concentração de partículas/mL. Esta técnica é constituída pela detecção de dispersão de um feixe de *laser* sobre uma solução de AgNPs, sendo captada por um microscópio óptico e gerando um filme de curta duração (entre 30 a 60 segundos). Este tipo de caracterização apresenta vantagens se comparados ao DLS por permitir a análise de soluções coloidais contendo partículas grandes ou agregadas (Hole et al., 2013).

As análises em NTA foram realizadas no Centro de Ciências Naturais e Humanas, da Universidade Federal do ABC – UFABC, campus Santo André, utilizando o equipamento NanoSight LM10 (NanoSight, Amesbury, Reino Unido), com feixe de laser de 45 mW a 405 nm. Um vídeo de 90 segundos foi gerado e o movimento Browniano de cada nanopartícula foi analisado *frame por frame* usando o *software* NTA (NanoSight Ltda., Amesbury, Reino Unido). As soluções coloidais de AgNPs foram diluídas com água deionizada (1:5, v/v) para as análises, que foram realizadas em triplicata.

4.11.6. Microscopia de força atômica (AFM)

A análise em microscopia de força atômica permite a obtenção de dados sobre a morfologia das AgNPs, como o tamanho e forma, sendo mais precisas que as análises realizadas por DLS e NTA (Bhattacharjee, 2016). Esta análise foi realizada na Central Experimental Multiusuário, da Universidade Federal do ABC – UFABC, campus Santo André, utilizando o equipamento AFM/SPM 5500 Dynamics (Agilent Technologies,

Santa Clara, EUA, 320 kHz, 42 N/m). 10 µL da solução coloidal de AgNPs foram adicionadas a um *cantilever* comercial de sílica e seca por evaporação a 25 °C para realização das análises. As imagens obtidas foram tratadas usando o *software* WSxM v. 5.0 (Horcas e Fernández, 2007).

4.11.7. Espectroscopia de raios-X por dispersão de energia (EDS)

A caracterização por EDS permite a obtenção de dados relativos à presença de elementos químicos na amostra. Esta análise foi realizada na Central Experimental Multiusuário, da Universidade Federal do ABC – UFABC, campus Santo André, utilizando um microscópio eletrônico de varredura compacto JSM-6010LA (JEOL, Akishima, Japão), com 12 kV de tensão de aceleração de elétron, acoplado a um espectrofotômetro de raios-X por dispersão de energia. Para a análise, 10 µL da solução coloidal de AgNPs foram adicionadas a um suporte de carbono e secas a 25 °C.

4.11.8. Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A análise em espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) permite a obtenção de dados referentes aos grupos químicos responsáveis pela síntese e estabilização das nanopartículas, visto que, cada grupo químico possui um espectro com picos definidos quando irradiados com raios infravermelhos (Berté, 2013).

Este método de caracterização foi realizado na Central Experimental Multiusuário, da Universidade Federal do ABC – UFABC, campus Santo André, utilizando o espectrofotômetro Cary 630 (Agilent Technologies, Santa Clara, EUA), na faixa de comprimento entre 700 a 4000 cm⁻¹, com resolução de 7 cm⁻¹. Para a análise, as AgNPs liofilizadas foram homogeneizadas com brometo de potássio (KBr) e compactadas com prensa hidráulica até obtenção de uma pastilha.

4.11.9. Difração de raios-X (DRX)

A caracterização por DRX proporciona informações acerca da estrutura microcristalina de nanopartículas, além de permitir a confirmação efetiva da formação de AgNPs (Srikar et al., 2016). Esta análise foi realizada no Centro de Ciências Naturais e Humanas, da Universidade Federal do ABC – UFABC, campus Santo André, utilizando o difratômetro STADI-P (Stoe & Cie GmbH, Darmstadt, Alemanha) com

anôdo de molibdênio ($\text{MoK}_{\alpha 1}$, $\lambda = 0,7093 \text{ \AA}$). A análise foi realizada a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, sob corrente 40 mA e tensão de 50 kV. Os fótons de raios-X foram capturados por um detector Mythen 1K (Dectris Ltd., Baden-Daettwil, Suíça). Os dados das amostras liofilizadas foram obtidas por varredura 2θ de 5 a 60° , e velocidade de varredura de $0,471^\circ \cdot \text{min}^{-1}$.

4.12. Desenvolvimento de um gel polimérico com propriedades antimicrobianas

4.12.1. Incorporação das AgNPs biogênicas à matriz do gel

As nanopartículas de prata que apresentaram a menor concentração mínima inibitória (item 4.10) foram empregadas no desenvolvimento de um nanocompósito, composto por uma matriz em gel de ácido poliacrílico (Carbopol® 940), cuja formulação se encontra na Tabela 6 (Capucho, 2007).

Tabela 6. Formulação do gel polimérico contendo AgNPs biogênicas.

Componentes	Formulação
Água deionizada ultrapura (MilliQ®)	q. s. p. 100%
Ácido poliacrílico (Carbopol® 940)	0,6 (%)
Trietanolamina	q. s. pH = 5,0 a 5,5
Solução coloidal de AgNPs biogênicas	12,5 (%)

Para o preparo do gel, o ácido poliacrílico foi adicionado aos poucos à uma solução coloidal de AgNPs diluída em água deionizada (1:8, v/v) até total dispersão, a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, sob agitação constante de 2.900 rpm. Em seguida, o pH do gel foi ajustado com trietanolamina para a faixa de 5,0 a 5,5, neutralizando os grupos carboxila do agente gelatinizante e promovendo a polimerização do gel. Como controle, foi preparada uma formulação em gel somente com água deionizada, sem adição de AgNPs. Os géis foram acondicionados em frascos de politereftalato de etileno (PET) esterilizados e mantidos a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ para estabilização do sistema. Após 48 h, foram avaliados o aspecto visual e o pH dos géis produzidos.

Para confirmar a incorporação das AgNPs produzidas por *A. flavo-furcatis* DPUA 1540 à matriz do gel, o nanocompósito foi submetido à caracterização por microscopia de força atômica. Esta análise foi realizada na Central Experimental Multiusuário, da Universidade Federal do ABC – UFABC, campus Santo André, utilizando o microscópio AFM/SPM 5500 Dynamics (Agilent Technologies, Santa Clara, EUA), com frequência de ressonância da ponta de 320 kHz e força constante de 42 N/m. Para a análise, foram adicionados 10 μL dos géis com e sem adição de AgNPs

a um *cantilever* comercial de sílica e secos por evaporação a 25 °C. O tratamento das imagens obtidas foi realizado com auxílio do *software* WSxM v. 5.0 (Horcas e Fernández, 2007).

4.12.2. Atividade antimicrobiana do gel contendo AgNPs biogênicas

A atividade antimicrobiana dos géis desenvolvidos foi realizada pelo método de difusão em ágar por poço contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* CBAM 001 e *Candida albicans* DPUA 1706, seguindo os mesmos procedimentos descritos no item 4.9. Como controle positivo foram utilizadas soluções de Streptomicina (50 µg/mL) e Itraconazol (50 µg/mL) contra bactérias e leveduras, respectivamente. Como controle negativo foi utilizado a formulação de gel sem adição de AgNPs.

4.13. Análise estatística

Todos os resultados foram analisados por meio da análise de variância (ANOVA) ao nível de 95 % de significância utilizando o *software* Minitab v. 17.0. Os gráficos foram confeccionados com auxílio do programa computacional Origin v. 8.0.

CAPÍTULO I

**Síntese verde de nanopartículas de prata intermediada por fungo anamórfico e
eficácia antibacteriana e antifúngica**

**Green synthesis of silver nanoparticles mediated by anamorphic fungi and
antibacterial and antifungal efficacy**

Dib Mady Diniz Gomes¹; Nelson Durán²; Amedea Barozzi Seabra²;
Larissa de Paiva Silva¹; Fabiano Brito Prado¹; Taciana de Amorim Silva¹; Maria
Francisca Simas Teixeira¹

¹ Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus,
Amazonas, Brasil. Av. General Rodrigo Otávio Jordão Ramos, 6200 – Coroado I.
Manaus, AM, Brasil. CEP 69080-900; ² Centro de Ciências Naturais e Humanas,
Universidade Federal do ABC, Santo André, São Paulo, Brasil.

Submetido para **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi:**
Ciências Naturais no dia 25 de janeiro de 2019 (Anexo 1).

**Síntese verde de nanopartículas de prata intermediada por fungo anamórfico e
eficácia antibacteriana e antifúngica**

**Green synthesis of silver nanoparticles mediated by anamorphic fungi and
antibacterial and antifungal efficacy**

RESUMO

O objetivo deste estudo foi investigar o efeito do pH, temperatura e concentração de nitrato de prata (AgNO_3) na síntese de nanopartículas de prata (AgNPs) por *Aspergillus flavo-furcatis* e avaliar o respectivo potencial antimicrobiano. Um experimento fatorial 2^3 foi realizado para avaliar o efeito das condições físico-químicas na síntese de AgNPs. A caracterização das AgNPs foi realizada em espectroscopia UV-Vis e ICP-MS. A atividade antimicrobiana foi avaliada por difusão em ágar por poço e microdiluição em caldo. O pH e a concentração de AgNO_3 tiveram efeitos significativos na síntese de AgNPs nas condições experimentais. As AgNPs sintetizadas em pH 9,0 e concentração de AgNO_3 de 1,5 mM apresentaram maior eficácia contra *Staphylococcus aureus* (3,17 $\mu\text{g/mL}$), *Escherichia coli* (6,35 $\mu\text{g/mL}$) e *Candida albicans* (0,79 $\mu\text{g/mL}$). Os dados mostraram que a síntese de AgNPs por *A. flavo-furcatis* é influenciada pelo pH e concentração de AgNO_3 e as AgNPs sintetizadas possuem atividade antimicrobiana contra *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans*.

Palavras-chave: Amazônia, *Aspergillus*, atividade antimicrobiana, micossíntese.

ABSTRACT

The aim of the present study was to investigate the effect of pH, temperature and silver nitrate (AgNO_3) concentration on the silver nanoparticles (SNP) synthesis by *Aspergillus flavo-furcatis* and evaluate its antimicrobial activity. A full-factorial experiment 2^3 was performed to assess the effect of physicochemical conditions on SNP synthesis. The characterization of AgNPs were performed by UV-Vis and ICP-MS spectroscopy. The antimicrobial activity was assessed by well-agar diffusion and broth micro dilution. The pH and AgNO_3 concentration had significant effects on the SNP synthesis in the experimental conditions. The SNPs synthesized at pH 9,0 and 1,5 mM AgNO_3 were more effective against *Staphylococcus aureus* (3,17 $\mu\text{g/mL}$), *Escherichia coli* (6,35 $\mu\text{g/mL}$) e *Candida albicans* (0,79 $\mu\text{g/mL}$). These data support that SNP synthesis by *A. flavo-furcatis* is influenced by pH and AgNO_3 concentration and SNPs have antimicrobial activity against *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans*.

Keywords: Amazon, antimicrobial activity, *Aspergillus*, mycosynthesis.

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a síntese ou nanotecnologia verde, que associa procedimentos biológicos com físicos e químicos, tem sido explorada para obtenção de novos materiais antimicrobianos, como as nanopartículas de prata (AgNPs). Entre as rotas empregadas para síntese verde de AgNPs estão o uso de biomoléculas oriundas de plantas e microrganismos (Roy *et al.*, 2013; Syafiuddin *et al.*, 2017). Essa nanotecnologia de segunda geração está voltada para o desenvolvimento de processos limpos que utilizam produtos não tóxicos e ambientalmente benignos, condições que reduzem os possíveis riscos ao meio ambiente e à saúde humana (Mallmann *et al.*, 2015; Abdelghany *et al.*, 2018).

Dados da literatura têm revelado a forte atividade de AgNPs contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo cepas multirresistentes. Além disso, também são consideradas como potenciais agentes antifúngicos biocompatíveis e econômicos. O efeito antimicrobiano de AgNPs e seus nanomateriais está em evidência, essencialmente devido à crescente resistência microbiana aos antibióticos, além da eficácia na profilaxia da colonização bacteriana de próteses e cateteres (Panáček *et al.*, 2009; Roy *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2017; Silva-Vinhote *et al.*, 2017).

Entre os microrganismos e outros recursos biológicos disponíveis, os fungos são mais adequados para síntese de AgNPs, visto que apresentam fácil manuseio e sintetizam grande quantidade de biocompostos, como proteínas que contribuem para alta produtividade e estabilidade de nanopartículas. Além disso, se comparados às plantas e outros microrganismos, a biomassa resiste a ambientes severos. Consequentemente, são alternativas eficazes à síntese química, ganhando considerável popularidade para a síntese verde de AgNPs (Keat *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2017).

Diferentes fungos são citados na síntese de nanopartículas, como *Aspergillus niger* Tiegh 1867 (Chengzheng *et al.*, 2018), *Cladosporium sphaerospermum* Penzig 1882 (Abdel-Hafez *et al.*, 2016), *Fusarium oxysporum* Schlechtendal 1824 (Husseiny *et al.*, 2015), *Penicillium nalgoviense* Laxa 1932 (Maliszewska *et al.*, 2014) e *Trichoderma harzianum* Rifai 1969 (Ahluwalia *et al.*, 2014).

Com base na ação das AgNPs e eficiência dos fungos, esta pesquisa teve como objetivo investigar a influência de fatores físico-químicos na síntese de nanopartículas de prata utilizando *Aspergillus flavo-furcatis* Batista & H. Maia 1955, uma linhagem do ecossistema amazônico, e a respectiva atividade antimicrobiana desses nanomateriais.

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismo

Neste estudo, a espécie selecionada foi *Aspergillus flavo-furcatis* DPUA 1540, cedido pela Coleção de Culturas DPUA, da Universidade Federal do Amazonas – UFAM. Para obtenção de subcultivo, da cultura preservada em óleo mineral, foram retirados fragmentos da colônia e transferidos para caldo glicosado 2% (p/v), em tubos de ensaio. Os cultivos foram mantidos a 25 °C. Após sete dias, fragmentos desses cultivos foram transferidos para ágar Czapek-Dox + extrato de levedura 0,5% (p/v) (CYA) em tubos de ensaio.

Autenticação da espécie com bases nas características morfológicas

Para autenticação, com bases nas características morfológicas, *A. flavo-furcatis* foi cultivado em ágar Czapek-Dox (CZ), ágar Extrato de Malte (MEA) e ágar CYA (Raper & Fennell, 1977; Klich & Pitt, 1988) e mantido a 25 °C por sete dias.

Produção de biomassa

Cinco discos miceliais de um cultivo de *A. flavo-furcatis* em CYA mantido a 28 °C por sete dias foram inoculados para 250 mL de meio MGYP [extrato de malte 0,3 % (p/v), glicose 1% (p/v), extrato de levedura 0,3% (p/v) e peptona 0,5 % (p/v)], pH 7,0, em frascos de Erlenmeyer de 500 mL. A fermentação foi conduzida a 28 °C, a 180 rpm por 96 horas. A biomassa recuperada foi lavada três vezes com água ultrapura, esterilizada (Milli-Q®) e pesada. Aproximadamente 25 g da biomassa foi adicionada em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 250 mL de água deionizada ultrapura esterilizada e mantido a 25 °C, 180 rpm, por 72 h. O extrato aquoso foi recuperado por filtração em papel de filtro Whatman n° 01 e membrana nitrocelulósica 0,22 µm (Silva *et al.*, 2017).

Otimização da biossíntese de AgNPs

Um delineamento experimental do tipo fatorial completo 2³ com três pontos centrais foi elaborado no *software* estatístico Minitab® versão 17.0 para avaliar o efeito do pH, temperatura e concentração de nitrato de prata (AgNO₃) na síntese de nanopartículas de prata por *A. flavo-furcatis* (Tabela 1). Para a síntese de AgNPs, foi

transferido 50 mL do extrato aquoso para frascos Erlenmeyer de 125 mL. Em seguida, foi adicionada solução de AgNO₃ 1 M até atingir as concentrações de 0,5, 1,0 e 1,5 mM. O pH foi aferido para 5,0, 7,0 e 9,0 com NaOH ou HCl 1 M. Os ensaios foram mantidos a 180 rpm por 96 horas, em ausência de luz, em diferentes temperaturas (Tabela 1) (Durán *et al.*, 2007; Manizhomi & Anitha, 2014).

Tabela 1. Níveis das variáveis utilizadas no experimento fatorial completo 2³ para avaliar a influência do pH, temperatura e concentração de AgNO₃ na síntese de AgNPs por *A. flavo-furcatis* DPUA 1540.

Nível	pH	Temperatura (°C)	Concentração de AgNO ₃ (mM)
-1	5,0	25	0,5
0	7,0	30	1,0
+1	9,0	35	1,5

Caracterização físico-química das nanopartículas de prata

Espectroscopia UV-Vis

Alíquotas de 1 mL dos ensaios foram diluídas em água deionizada (proporção 1:5, v/v) e analisadas em espectrofotômetro de duplo feixe (Agilent Technologies® Cary 60) na faixa de 200 a 800 nm, com resolução de 1 nm. Os ensaios que apresentaram picos de absorvância entre 400 a 530 nm foram considerados positivos para síntese de AgNPs (Abbasi *et al.*, 2016).

Quantificação de prata total por ICP-MS

A prata total foi quantificada em espectrofotômetro de massa por plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) (Agilent Technologies® 7900, Hachioji, Japan), utilizando 1 mL das amostras positivas para AgNPs, previamente digeridas a 90 °C por quatro horas, em ácido nítrico 98 % (v/v) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) (Rolim *et al.*, 2018).

Atividade antimicrobiana

Difusão em ágar por poço

A atividade antimicrobiana das nanopartículas de prata sintetizadas foi determinada pelo método de difusão em ágar por poço contra *Candida albicans* DPUA 1706, *Escherichia coli* CBAM 001 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Inóculos de culturas bacterianas (10⁸ UFC/mL) e de levedura (10⁶ UFC/mL) foram adicionados na superfície de ágar Mueller-Hinton (MHA) e Sabouraud (SAB), respectivamente. Em cada placa foram transferidos 100 µL da solução de AgNPs sintetizadas para poços de 8

mm feitos na superfície do ágar. Como controle positivo, foram utilizadas soluções de estreptomicina e itraconazol (50 µg/mL) para bactérias e leveduras, respectivamente. Os experimentos foram realizados em triplicata e mantidos a 37 °C por 24 h e então verificada a formação de halos de inibição, expressos em milímetros (Silva *et al.*, 2017).

Microdiluição em caldo

As AgNPs com atividade antimicrobiana significativa em meio sólido foram selecionadas para a determinação da concentração mínima inibitória (CMI), pelo método de microdiluição em caldo. Em microplacas de 96 poços, as bactérias (5×10^5 UFC/mL) e a levedura (2×10^3 UFC/mL) foram expostos às nanopartículas diluídas [(1:2 até 1:1024, v/v)]. Como controle positivo foram utilizadas soluções de itraconazol e estreptomicina (200 µg/mL). Para o crescimento das bactérias e da levedura, as placas foram mantidas a 37 °C, durante 24h e 36 h, respectivamente. Após esse período, foi adicionado 10 µL de resazurina (200 µg/mL) em cada poço e mantido a 37 °C por duas horas para evidenciar o crescimento dos microrganismos. A alteração de cor do revelador para rosa ou azul indica o crescimento e inibição do microrganismo, respectivamente. A CMI foi definida como a menor concentração em µg/mL do agente onde foi observada a inibição do microrganismo. Os ensaios foram realizados em triplicata (Prado *et al.*, 2017).

Análise estatística

Os resultados foram analisados através da análise de variância (ANOVA) ao nível de 95% de significância. A análise estatística e os gráficos foram realizados utilizando-se os programas computacionais Minitab versão 17.0 e Origin versão 8.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Autenticação da espécie com bases nas características morfológicas

Aspergillus flavo-furcatis DPUA 1540 apresentou as características morfológicas típicas do gênero e espécie (Figura 1) sem alterações fisiológicas após preservação por dez anos em óleo mineral, característica que sugere tratar-se de uma linhagem viável para ensaios biotecnológicos (Raper & Fennell, 1977).

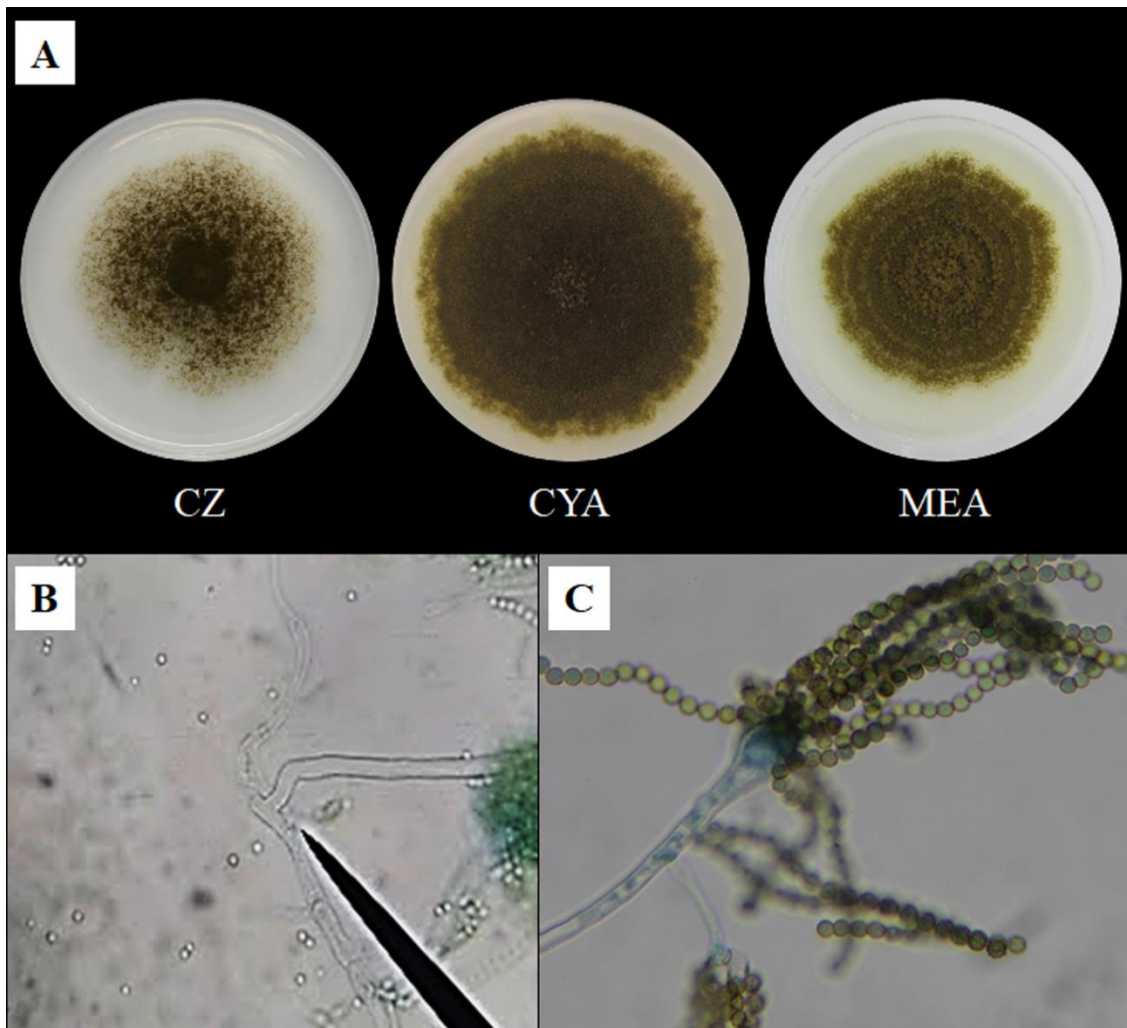


Figura 1. Autenticação das características morfológicas de *Aspergillus flavo-furcatis* DPUA 1540. (A) Características macroscópicas de cultivos ágar CZ, MEA e CYA mantidos a 28 °C após sete dias, respectivamente. (B) Célula-pé e (C) estrutura de reprodução assexuada.

Otimização da síntese de nanopartículas de prata

A biossíntese de AgNPs por *A. flavo-furcatis* foi indicada pela mudança de coloração do extrato aquoso de incolor para tons de marrom e cinza (Figura 2), após adição de AgNO_3 . A Tabela 2 mostra os resultados dos 11 ensaios, entre os quais somente três foram positivos para mudança de coloração, característica que revela a redução total dos íons de prata a nanopartículas e consequente formação de uma banda de ressonância de plasmon de superfície (RPS), resultante da interação dos elétrons da superfície da nanopartícula com a luz incidente (Wei *et al.*, 2015; Biswas & Mulaba-Bafubiandi, 2016). Registros na literatura também demonstraram que a solução de AgNPs obtidas por intermédio de *Aspergillus* apresentam coloração variando de marrom escuro a cinza (Phanjom e Ahmed, 2015; Wilson et al., 2016).

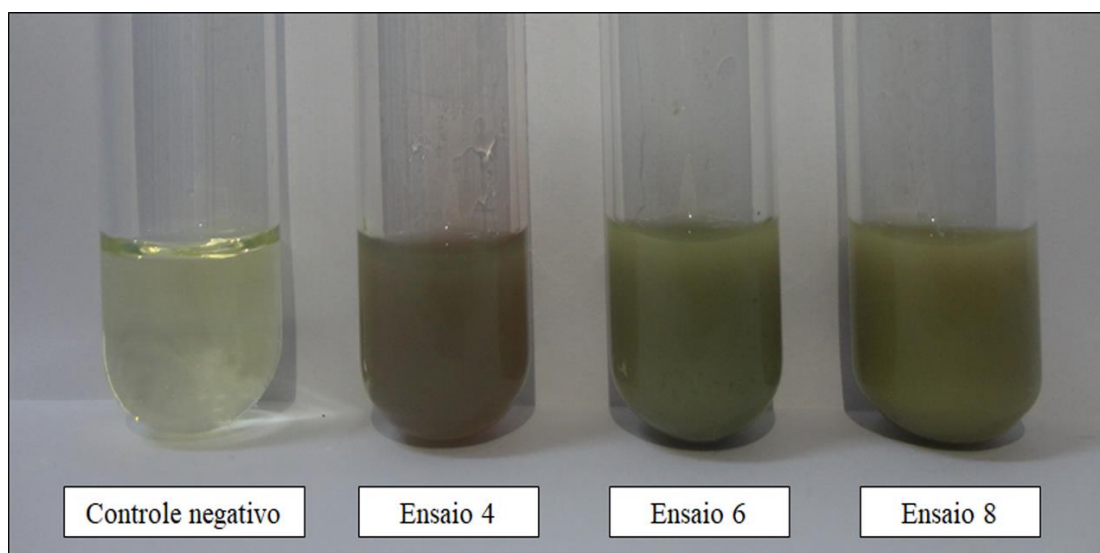


Figura 2. Mudança de coloração observada nos ensaios positivos para síntese biogênica de nanopartículas de prata por *Aspergillus flavo-furcatis* DPUA 1540.

Tabela 2. Influência das condições físico-químicas (pH, temperatura e concentração de AgNO_3) na síntese de AgNPs intermediada por *A. flavo-furcatis*.

Ensaio	pH	Temperatura (°C)	Concentração de AgNO_3 (mM)	Mudança de coloração
1	5,0	25	0,5	-
2	9,0	25	0,5	-
3	5,0	35	0,5	-
4	9,0	35	0,5	+ (marrom/cinza)
5	5,0	25	1,5	-
6	9,0	25	1,5	+ (cinza escuro)
7	5,0	35	1,5	-
8	9,0	35	1,5	+ (cinza escuro)
P.C.	7,0	30	1,0	-
P.C.	7,0	30	1,0	-
P.C.	7,0	30	1,0	-

(+) Positivo e (-) Negativo

Na análise por espectroscopia UV-Vis foram observados picos de absorvância referentes à banda de RPS das AgNPs (Figura 3), na faixa típica para nanopartículas de prata (400 a 530 nm) (Abbasi *et al.*, 2016). Estes dados confirmam a síntese de AgNPs nos mesmos ensaios onde foi observada a mudança de coloração, ensaios 4, 6 e 8, cujos picos de absorvância foram de 455, 505 e 520 nm. Resultados semelhantes foram citados por Biswas & Mulaba-Bafubiandi (2016) em estudo realizado com *Aspergillus wentii* Wehmer 1896 que produziu AgNPs com picos máximos de absorvância a 455 nm. Contudo, registros na literatura mostram que a síntese de AgNPs intermediada por espécies de *Aspergillus*, comumente apresentam absorvância máxima entre 410 a 446 nm (Wilson *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2017; Solanki *et al.*, 2017; Nanda *et al.*, 2018). Na investigação de Mlalila *et al.* (2016) foi observada que AgNPs de maior tamanho apresentam um deslocamento da banda de RPS para comprimentos de onda acima de

500 nm, indicando que as AgNPs sintetizadas por *A. flavo-furcatis* apresentam maior tamanho quando comparadas a outras espécies de *Aspergillus*.

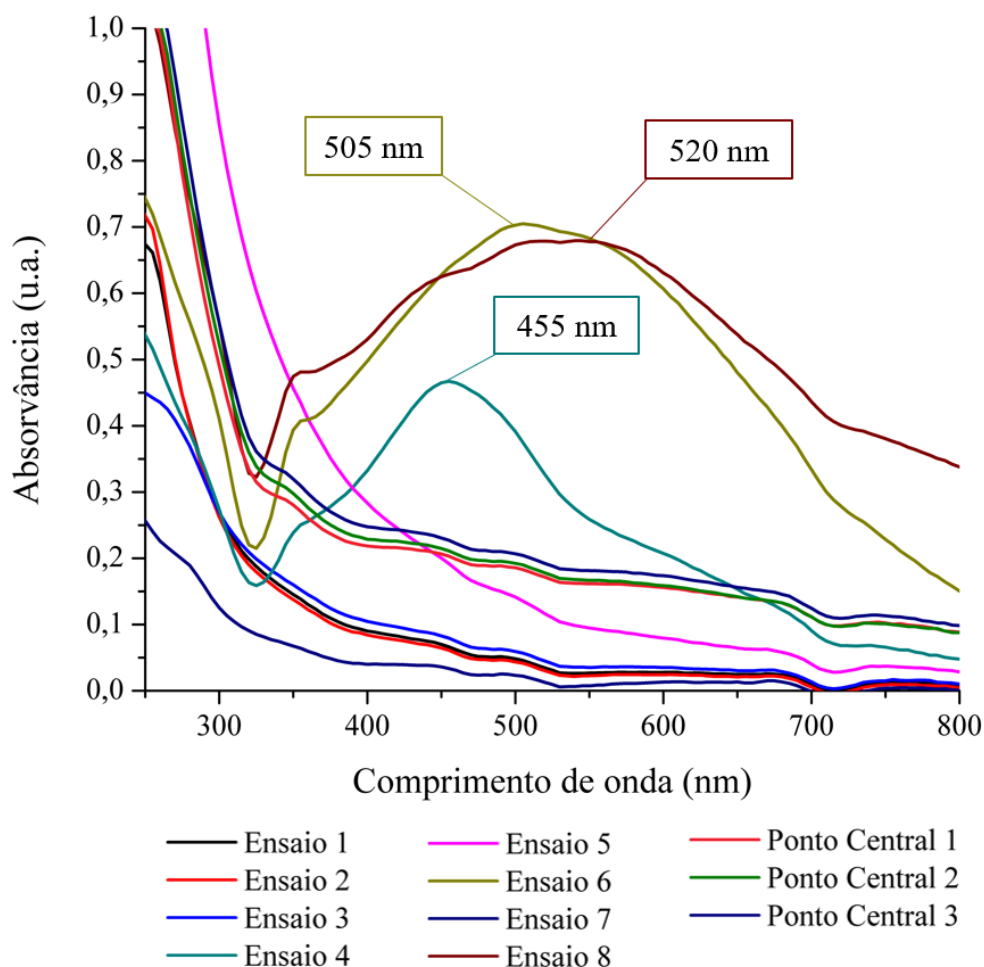


Figura 3. Absorção UV-Vis dos ensaios realizados para verificar o efeito do pH, temperatura e concentração de AgNO_3 na síntese de AgNPs intermediada por *A. flavo-furcatis* DPUA 1540.

O gráfico de Pareto (Figura 4A) mostra as variáveis avaliadas e as respectivas interações que influenciaram na síntese de nanopartículas de prata intermediada por *A. flavo-furcatis* DPUA 1540. Somente o pH e a concentração de AgNO_3 apresentaram efeitos significativos, assim como as interações destas variáveis com a temperatura ($p < 0,05$). O gráfico de contorno mostra as condições ótimas para síntese de nanopartículas de prata por *A. flavo-furcatis* (Figura 4B).

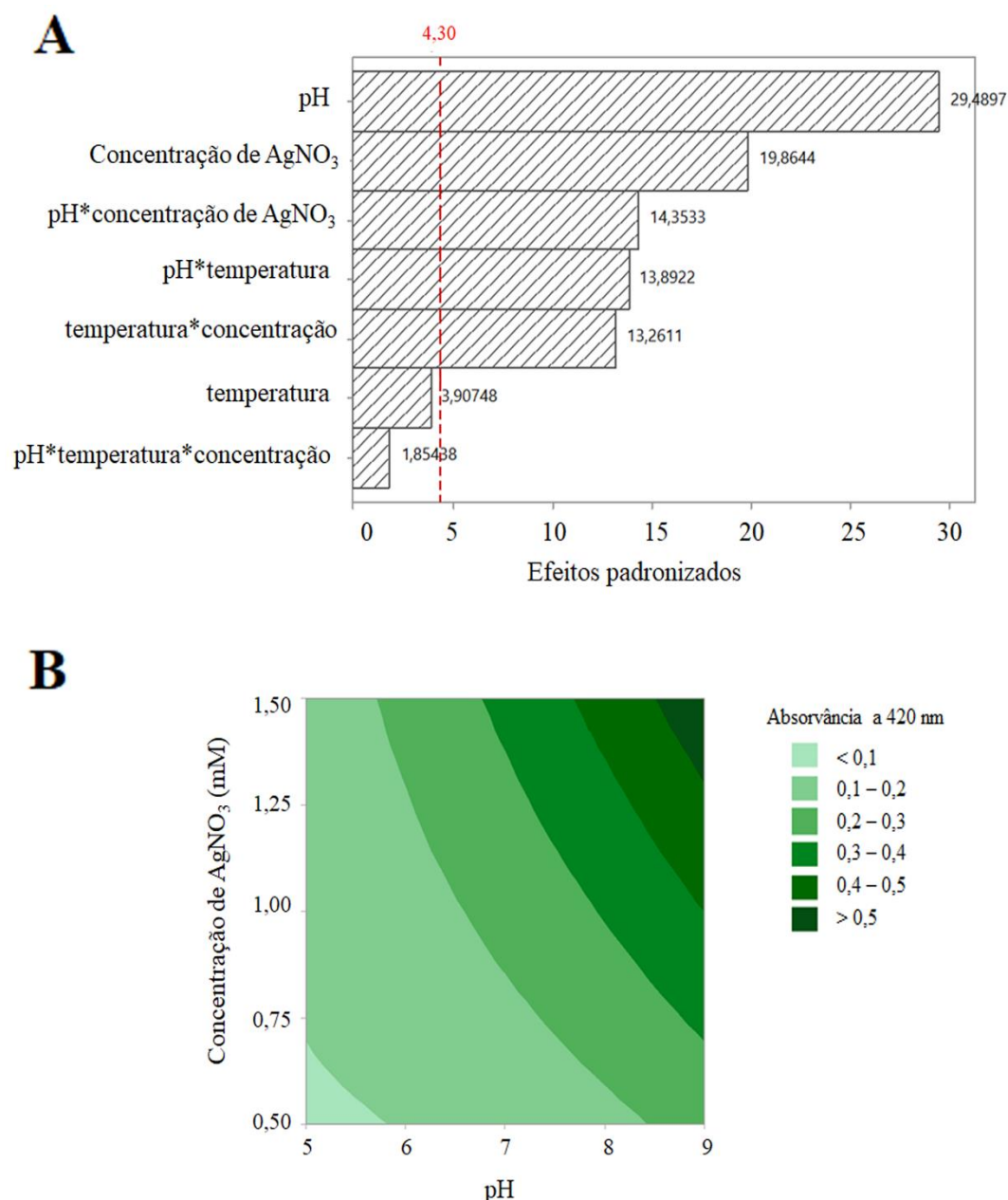


Figura 4. Análise de variância (ANOVA) do efeito do pH, temperatura e concentração de AgNO₃ sobre a variável resposta absorvância a 420 nm. (A) Gráfico de Pareto identificando os fatores e interações significativos na síntese de nanopartículas de prata. (B) Gráfico de contorno mostrando as melhores condições de pH e concentração de AgNO₃ para síntese de AgNPs por *Aspergillus flavofurcatis* DPUA 1540 ($p < 0,05$).

Nas condições experimentais, a síntese máxima de AgNPs foi verificada em pH 9,0. Esses dados corroboram com citações da literatura, que mostram que o pH ótimo de síntese de AgNPs por outras espécies de *Aspergillus* está na faixa entre 9,0 e 10,0 (Manizhomi & Anitha, 2014; Roy & Das, 2014; Marwa & Ewan, 2015; Al-Hamadani & Kareem, 2017). Em pH alcalino há maior concentração de íons hidroxila (OH⁻) que agem como doadores de elétrons para enzima responsável pela síntese, agilizando o processo de redução de Ag⁺ a Ag⁰ (Phanjom & Ahmed, 2017).

Além do pH, outra variável de influência significativa foi a concentração de AgNO₃, cuja condição ótima foi de 1,5 mM. Esses dados estão condizentes com registros na literatura para *Aspergillus*, onde a síntese de AgNPs é proporcional à concentração de AgNO₃, com faixa ótima entre 1,5 a 2,0 mM (El-Sayed *et al.*, 2018; Omran *et al.*, 2018). Contudo, em altas concentrações (acima de 2 mM) ocorre o esgotamento de sítios ativos das enzimas envolvidas, promovendo redução na taxa e na eficiência da síntese de AgNPs (Balakumaran *et al.*, 2016; Khan *et al.*, 2016).

A Tabela 3 mostra a quantidade total de prata (Ag⁰) nos ensaios positivos para síntese de AgNPs quando examinados por ICP-MS. Todas as amostras apresentaram prata na sua composição, confirmando a redução da prata iônica (Ag⁺), oriundas do nitrato de prata, em AgNPs (Ag⁰) pelas biocompostos de *A. flavo-furcatis*. Os dados referentes à quantidade total de prata foram essenciais na determinação da concentração mínima inibitória (CMI).

Tabela 3. Concentração total de prata nas soluções coloidais de AgNPs obtidas em diferentes condições de síntese intermediada por *A. flavo-furcatis*.

Amostra	pH	Temperatura (°C)	Concentração de AgNO ₃ (mM)	Concentração total de prata (g.mL ⁻¹)
Ensaio 4	9,0	35	0,5	55,1051 ± 0,004
Ensaio 6	9,0	25	1,5	118,8430 ± 0,003
Ensaio 8	9,0	35	1,5	101,5378 ± 0,002

Atividade antimicrobiana

As nanopartículas de prata obtidas por intermédio de *Aspergillus flavo-furcatis* apresentaram atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar por poço contra *Candida albicans*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, com halos de inibição variando de 12,0 a 19,8 mm (Tabela 4). Estes resultados estão em concordância com registros na literatura. No estudo de Hassan *et al.* (2015) foi demonstrado que as AgNPs sintetizadas por *Aspergillus flavus* Link 1809 inibiram o crescimento de *C. albicans*, *E. coli* e *S. aureus*. Além disso, a investigação de Rani *et al.* (2017) também evidenciou que as AgNPs de *Aspergillus terreus* Thom 1918 inibiram *E. coli* e *S. aureus*.

Tabela 4. Diâmetro médio (mm) dos halos de inibição microbiana por ação das nanopartículas de prata obtidas por intermédio de *A. flavo-furcatis* DPUA 1540.

Microrganismo	Diâmetro do halo de inibição (mm)		
	Média ± desvio-padrão		
	Ensaio 4	Ensaio 6	Ensaio 8
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	19,8 ± 0,37	18,8 ± 0,69	18,5 ± 0,76
<i>Escherichia coli</i> CBAM 001	13,0 ± 0,58	12,7 ± 0,74	12,0 ± 0,81
<i>Candida albicans</i> DPUA 1706	19,0 ± 0,82	18,0 ± 1,15	18,5 ± 1,25

Ensaio 4: pH 9,0, [AgNO₃] de 0,5 mM, 35 °C; Ensaio 6: pH 9,0, [AgNO₃] de 1,5 mM, 25 °C; Ensaio 8: pH 9,0, [AgNO₃] de 1,5 mM, 35 °C.

A concentração mínima inibitória (CMI) é definida como a menor concentração do agente antimicrobiano que inibe o crescimento do microrganismo em condições padronizadas (Prado *et al.*, 2017). Os dados referentes à concentração mínima inibitória das soluções coloidais de AgNPs se encontram na Tabela 5. A solução coloidal de AgNPs obtida nas condições do ensaio 8 (pH 9,0, concentração de AgNO₃ de 1,5 mM e 35 °C) apresentou a menor CMI para *C. albicans*, *E. coli* e *S. aureus*, com valores de 0,79, 6,35 e 3,17 µg/mL, respectivamente.

Tabela 5. Valores de concentração mínima inibitória das AgNPs sintetizadas por *Aspergillus flavo-furcatis* DPUA 1540 sobre diferentes microrganismos teste.

Microrganismo	Concentração mínima inibitória (µg.mL ⁻¹)		
	Ensaio 4	Ensaio 6	Ensaio 8
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	6,89	3,71	3,17
<i>Escherichia coli</i> CBAM 001	13,78	7,43	6,35
<i>Candida albicans</i> DPUA 1706	1,72	0,93	0,79

Ensaio 4: pH 9,0, [AgNO₃] de 0,5 mM, 35 °C; Ensaio 6: pH 9,0, [AgNO₃] de 1,5 mM, 25 °C; Ensaio 8: pH 9,0, [AgNO₃] de 1,5 mM, 35 °C.

Os resultados da atividade antimicrobiana das AgNPs de *A. flavo-furcatis* estão em concordância com os dados de Balakumaran *et al.* (2016). Estes autores observaram que as AgNPs de *A. terreus* foram mais eficientes no controle de *S. aureus* e *C. albicans* (CMI de 3,125 µg/mL) do que para *E. coli* (CMI de 12,5 µg/mL). A atividade antimicrobiana de AgNPs é amplamente relatada e atribuída à interação desses nanomateriais com compostos da membrana de microrganismos, culminando em mudanças na permeabilidade e consequente lise celular (Radzig *et al.*, 2013; Agnihotri *et al.*, 2014; Rai *et al.*, 2014; Durán *et al.*, 2016). Contudo, esse mecanismo de ação é influenciado pela composição da membrana celular dos microrganismos (Panáček *et al.*, 2009; Ottoni *et al.*, 2017), propriedade que esclarece a ação diferenciada das AgNPs avaliadas neste estudo.

Em outra investigação feita por Phanjom & Ahmed (2017) avaliando também a síntese de AgNPs por *Aspergillus oryzae* (Ahlburg) Cohn 1884 foram observados efeitos antimicrobianos distintos entre AgNPs sintetizadas entre diferentes condições de síntese, dados similares aos obtidos neste estudo com *A. flavo-furcatis*. As condições de síntese afetam diretamente a morfologia das nanopartículas e conseqüentemente a atividade antimicrobiana foi outro relato citado por esses autores.

CONCLUSÕES

Os resultados desta pesquisa realizada com *Aspergillus flavo-furcatis* DPUA 1540 contribuíram para as seguintes conclusões:

1. A espécie mostrou viabilidade e eficiência para síntese verde extracelular de nanopartículas de prata;
2. Nas condições experimentais, a síntese de nanopartículas de prata foi significativamente influenciada pelo pH e concentração de nitrato de prata, e a interação entre estes parâmetros com a temperatura;
3. A antibiose das nanopartículas de prata sintetizadas em meio alcalino foi evidenciada frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*;
4. A CMI das AgNPs sintetizada nas condições de pH alcalino e maior concentração de nitrato de prata expressaram maior ação antibacteriana e antifúngica.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBiotec) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) pelo apoio técnico, científico e financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASI, E., M. MILANI, S. F. AVAL, M. KOUHI, A. AKBARZADEH, H. T. NASRABADI, P. NIKASA, S. W. JOO, Y. HANIFEHPOUR, K. NEJATI-KOSHKI & M. SAMIEI, 2016. Silver nanoparticles: synthesis methods, bio-applications and properties. **Critical Reviews in Microbiology** 42(2): 173-180. DOI: <https://doi.org/10.3109/1040841X.2014.912200>.

ABDELGHANY, T. M., A. M. H. AL-RAHJI, M. A. AL-ABBOUD, M. M. ALAWLAQI, A. G. MAGDAH, E. A. M. HELMY & A. S. MABROUK, 2018. Recent advances in green synthesis of silver nanoparticles and their applications: about future

directions, a review. **BioNanoScience** 8(1): 5-16. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12668-017-0413-3>.

ABDEL-HAFEZ, S. I. I., N. A. NAFADY, I. R. ABDEL-RAHIM, A. M. SHALTOUT & M. A. MOHAMED, 2016. Biogenesis and optimization of silver nanoparticles by the endophytic fungus *Cladosporium sphaerospermum*. **International Journal of Nanomaterials and Chemistry** 2(1): 11-19.

AGNIHOTRI, S., S. MUKHERJI & S. MUKHERJI, 2014. Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5–100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. **Royal Society of Chemistry Advances** 4(1): 3974-3983. DOI: <https://doi.org/10.1039/c3ra44507k>.

AL-HAMADANI, A. H. U. & A. A. KAREEM, 2017. Optimization of silver nanoparticle biosynthesis process using cell-free filtrate of *Aspergillus niger*. **Al-Qadisiyah Medical Journal** 13(23): 208-222.

AHLUWALIA, V., J. KUMAR, R. SISODIA, N. A. SHAKIL & S. WALIA, 2014. Green synthesis of silver nanoparticles by *Trichoderma harzianum* and their bio-efficacy evaluation against *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae*. **Industrial Crops and Products** 55(1): 202-206. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.01.026>

BALAKUMARAN, M. D., R. RAMACHADRAN, P. BALASHANMUGAM, D. J. MUKESHKUMAR & P. T. KALAICHELVAN, 2016. **Microbiological Research** 182(1): 8-20. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.09.009>.

BISWAS, S. & A. F. MULABA-BAFUBIANDI, 2016. Optimization of process variables for the biosynthesis of silver nanoparticles by *Aspergillus wentii* using statistical experimental design. **Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology** 7(4) 10pp. DOI: <https://doi.org/10.1088/2043-6262/7/4/045005>.

CHENGZHENG, W., W. JIAZHI, C. SHUANGJIANG, M. K. SWAMY, U. R. SINNIAH, S. MOHD & A. UMAR, 2018. Biogenic synthesis, and characterization and evaluation of silver nanoparticles from *Aspergillus niger* JX556221 against human colon cancer cell line HT-29. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology** 18(5): 3673-3681. DOI: <https://doi.org/10.1166/jnn.2018.15364>.

DURÁN, N., P. D. MARCATO, G. I. H. DE SOUZA, O. L. ALVES & E. ESPOLITO, 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. DOI: <https://doi.org/10.1166/jbn.2007.022>.

DURÁN, N., M. DURÁN, M. B. JESUS, A. B. SEABRA, W. J. FÁVARO & G. NAKAZATO, 2016. Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine** 12(3): 789-799. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.11.016>.

EL-SAYED, A. S. A. & D. ALI, 2018. Biosynthesis and comparative bactericidal activity of silver nanoparticles synthesized by *Aspergillus flavus* and *Penicillium crustosum* against the multidrug-resistant bacteria. **Journal of Microbiology and Biotechnology** 28(1). DOI: <https://doi.org/10.4014/jmb.1806.05089>.

HASSAN, M. H. A., A. M. MOHARRAM, M. A. ISMAIL & A.M. SHOREIT, 2015. Biogenic silver nanoparticles of resistant *Aspergillus flavus* AUMC 9834 against some pathogenic microorganisms and its synergistic effect with the antifungal fluconazole. **Journal of Basic and Applied Mycology** 6(1): 1-7.

HUSSEINY, S. M., T. A. SALAH & H. A. ANTER, 2015. Biosynthesis of size controlled silver nanoparticles by *Fusarium oxysporum*, their antibacterial and antitumor activities. Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences 4(3): 225-231. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bjbas.2015.07.004>.

KEAT, C. L., A. AZIZ, A. M. EID & N. A. ELMARZUGI, 2015. Biosynthesis of nanoparticles and silver nanoparticles. **Bioresources and Bioprocessing** 2(1): 47-58. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40643-015-0076-2>.

KHAN, N. T., N. JAMEEL & REHMAN, S. U. A., 2016. Optimizing Physioculture Conditions for the Synthesis of Silver Nanoparticles from *Aspergillus niger*. **Journal of Nanomedicine and Nanotechnology** 7(5). DOI: <https://doi.org/10.4172/2157-7439.1000402>.

KLICH, M. A. & J. I. PITT, 1988. **A laboratory guide to the common Aspergillus species and their teleomorphs**: 1-115. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Division of Food Processing, Australia.

MALISZEWSKA, I., A. JURASZEK & K. BIELSKA, 2014. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using Ascomycota fungi *Penicillium nalgiovense* AJ12. **Journal of Cluster Science** 25(4): 989-1004. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10876-013-0683-z>.

MALMANN, E. J. J., F. A. CUNHA, B. N. M. F. CASTRO, A. M. MACIEL, E. A. MENEZES & P. B. A. FECHINE, 2015. Antifungal activity of silver nanoparticles obtained by green synthesis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** 57(2): 165-167. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652015000200011>.

MANIMOZHI, R. & R. ANITHA, 2014. Mycosynthesis of silver nanoparticles using aqueous extract of *Aspergillus flavus* mycelium and its characterization. **International Journal of Pharmaceutics and Drug Analysis** 2(9): 734-739.

MARWA, S. S. & S. A. EMAN, 2015. A Comparative Nano Biotechnological Study: pH Dependent Biosynthesized Silver Nanoparticles by *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* and *Streptomyces fradiae*. **International Journal of Science and Research** 5(12): 2112-2119. DOI: <http://dx.doi.org/10.21275/25121601>.

MLALILA, N. G., H. S. SWAI, A. HILONGA & D. M. KADAM, 2016. Antimicrobial dependence of silver nanoparticles on surface plasmon resonance bands against

Escherichia coli. **Nanotechnology Science and Application** 10: 1-9. DOI: <http://dx.doi.org/10.2147/NSA.S123681>.

NANDA, A., B. K. NAYAK & M. KRISHNAMOORTY, 2018. Antimicrobial properties of biogenic silver nanoparticles synthesized from phylloplane fungus, *Aspergillus tamarii*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology** 16(1): 225-228. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.08.002>.

OMRAN, B. A., H. N. NASSAR, N. A. FATTHALLAH, A. HAMDY, E. H. EL-SHATOURY & N. S. EL-GHENDY, 2018. Characterization and antimicrobial activity of silver nanoparticles mycosynthesized by *Aspergillus brasiliensis*. **Journal of Applied Microbiology** 125(2): 370-382. DOI: <https://doi.org/10.1111/jam.13776>.

OTTONI, C. A., M. F. SIMÕES, S. FERNANDES, J. G. SANTOS, E. S. SILVA, R. F. B. SOUZA & A. E. MAIORANO, 2017. Screening of filamentous fungi for antimicrobial silver nanoparticles synthesis. **AMB Express** 7(1): 31. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0332-2>.

PANÁČEK, A., M. KOLÁŘ, R. VEČEŘOVA, R. PRUCEK, J. SOUKUPOVÁ, V. KRYŠTOF, P. HAMAL, R. ZBOŘIL & L. KVÍTEK, 2009. Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp. **Biomaterials** 30(1): 6333-6340.

PHANJOM, P. & G. AHMED, 2015. Biosynthesis of Silver Nanoparticles by *Aspergillus oryzae* (MTCC No. 1846) and Its Characterizations. **Nanoscience and Nanotechnology** 5(1): 14-21. DOI: <https://doi.org/10.5923/j.nn.20150501.03>.

PHANJOM, P. & G. AHMED, 2017. Effect of different physicochemical conditions on the synthesis of silver nanoparticles using fungal cell filtrate of *Aspergillus oryzae* (MTCC No. 1846) and their antibacterial effect. **Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology** 8(1): 13 pp. DOI: <https://doi.org/10.1088/2043-6254/aa92bc>.

PRADO, F. B., W. C. ROCHA, S. R. MARTIM, M. M. ALECRIM, L. P. SILVA, L. S. C. SILVA, T. A. SILVA & M. F. S. TEIXEIRA, 2017. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi: Ciências Naturais** 12(1): 37-47.

RADZIG, M. A., V. A. NADTOCHENKO, O. A. KOKSHAROVA, J. KIWI, V. A. LIPASOVA & I. A. KHMEL, 2013. Antibacterial effects of silver nanoparticles on Gram-negative bacteria: influence on the growth and biofilms formation, mechanisms of action. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** 102(1): 300-306. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.07.039>.

RAI, M., K. KON, A. INGLE, N. DURÁN, S. GALDIERO & M. GALDIERO, 2014. Broad-spectrum bioactivities of silver nanoparticles: the emerging trends and future prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology** 98(5): 1951-1961. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5473-x>.

RANI, R., D. SHARMA, M. CHATURVEDI & J. P. YADAV, 2017. Green Synthesis, Characterization and Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles of Endophytic Fungi

Aspergillus terreus. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology** 8(4): 8 pp. DOI: <https://doi.org/10.4172/2157-7439.1000457>

RAPER, K. B. & D.I. FENNEL, 1977. **The genus *Aspergillus***: 1-686. Robert E. Krieger Co., Huntington.

ROLIM, W. R., M. T. PELEGRINO, B. A. LIMA, L. S. FERRAZ, F. N. COSTA, J. S. BERNARDES, T. RODRIGUES, M. BROCCHI & A. B. SEABRA, 2019. Green tea extract mediated biogenic synthesis of silver nanoparticles: characterization, cytotoxicity evaluation and antibacterial activity. **Applied Surface Science** 463(1): 66-74. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2018.08.203>.

ROY, S. & K. T. DAS, 2014. Biosynthesis of Silver Nanoparticles by *Aspergillus foetidus*: Optimization of Physicochemical Parameters. **Nanoscience and Nanotechnology Letters** 6(3): 181-189. DOI: <https://doi.org/10.1166/nnl.2014.1749>.

ROY, S., T. MUKHERJEE, S. CHAKRABORTY & T. K. DAS, 2013. Biosynthesis, characterisation & antifungal activity of silver nanoparticles synthesized by the fungus *Aspergillus foetidus* MTCC8876. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures** 8(1): 197-205.

SILVA, T.A., P. F. ANDRADE, K. SEGALA, L. S. C. SILVA, L. P. SILVA, S. V. G. NISTA, L. H. I. MEI, N. DURÁN & M. F. S. TEIXEIRA, 2017. Silver nanoparticles biosynthesis and impregnation in cellulose acetate membrane for anti-yeast therapy. **African Journal of Biotechnology** 16(27): 1490-1500. DOI: <https://doi.org/10.5897/AJB2017.16024>.

SILVA-VINHOTE, N. M., N. DURÁN, T. A. SILVA, P. V. QUELEMES, A. R. ARAÚJO, A. C. M. MORAES, A. L. S. CÂMARA, J. P. F. LONGO, R. B. AZEVEDO, D. A. SILVA, J. R. S. A. LEITE & M. F. S. TEIXEIRA, 2017. Extracellular biogenic synthesis of silver nanoparticles by actinomycetes from amazonic biome and its antimicrobial efficiency. **African Journal of Biotechnology** 16(43): 2072-2082. DOI: <https://doi.org/10.5897/AJB2017.16148>.

SOLANKI, B.D., S. M. DODIA, H. R. RAMANI & D. V. PARMAR, 2017. Anti-bacterial and biogenic silver nanoparticles synthesized using fungus *Aspergillus niger*. **Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences** 6(6): 14-22.

SYAFIYUDDIN, A., M. R. SALIM, A. B. H. KUEH, T. HADIBARATA & H. NUR, 2017. A review of silver nanoparticles: research trends, global consumption, synthesis, properties, and future challenges. **Journal of the Chinese Chemical Society** 64(7): 732-756. DOI: <https://doi.org/10.1002/jccs.201700067>.

WEI, L. J. LU, A. PATEL, Z. S. CHEN & G. CHEN, 2015. Silver nanoparticles: synthesis, properties, and therapeutic applications. **Drug Discovery Today** 20(5): 595-601. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.11.014>.

WILSON, A., S. PRABUKUMAR, G. SATHISHKUMAR, S. SIVARAMAKRISHNAN, 2016. *Aspergillus flavus* mediated silver nanoparticles synthesis and evaluation of its antimicrobial activity against different human pathogens.

International Journal of Applied Pharmaceutics 8(4): 43-46. DOI:
<http://dx.doi.org/10.22159/ijap.2016v8i4.13930>.

ZHAO, X., L. ZHOU, M. S. R. RAJOKA, L. YAN, C. JIANG, D. SHAO, J. ZHU, J. SHI, Q. HUANG, H. YANG & M. JIN, 2017. Fungal silver nanoparticles: synthesis, application and challenges. **Critical Reviews on Biotechnology** 38(6): 817-835. DOI:
<https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1414141>.

CAPÍTULO II

Nanopartículas de prata sintetizadas por *Aspergillus flavo-furcatis*: caracterização e aplicação em gel polimérico com propriedades antimicrobianas
Silver nanoparticles synthesized by *Aspergillus flavo-furcatis*: characterization and application on a polymeric gel with antimicrobial properties

Dib Mady Diniz Gomes¹; Joana Claudio Pieretti²; Wallace Rosado Rolim²;
Alessandro Lamarca Urzedo²; Milena Trevisan Pelegrino²; Nelson Durán²; Amedea Barozzi Seabra²; Larissa Svetlana Cavalcante Silva¹; Nély Mara Silva Vinhote¹;
Taciana de Amorim Silva¹; Maria Francisca Simas Teixeira¹

¹Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brasil. Av. General Rodrigo Otávio Jordão Ramos, 6200 – Coroado I. Manaus, AM, Brasil. CEP 69080-900;

²Centro de Ciências Naturais e Humanas, Universidade Federal do ABC, Santo André, São Paulo, Brasil.

Nanopartículas de prata sintetizadas por *Aspergillus flavo-furcatis*: caracterização e aplicação em gel polimérico com propriedades antimicrobianas

Silver nanoparticles synthesized by *Aspergillus flavo-furcatis*: characterization and application on a polymeric gel with antimicrobial properties

RESUMO

O objetivo deste estudo foi realizar a caracterização físico-química de nanopartículas de prata (AgNPs) sintetizadas por *Aspergillus flavo-furcatis* para desenvolver um nanocompósito com propriedades antimicrobianas. A caracterização das AgNPs foi realizada por espalhamento dinâmico de luz, análise de rastreamento de partículas, microscopia de força atômica, espectroscopia por energia dispersiva, espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier e difração de raios-X. O gel foi desenvolvido a partir da solução coloidal de AgNPs sintetizadas e Carbopol® 940 como agente gelatinizante, com avaliação do aspecto visual e pH. A incorporação das AgNPs à matriz do gel foi confirmada por análise em microscopia de força atômica. O nanocompósito foi testado contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans* pelo método de difusão em ágar por poço. As AgNPs apresentaram-se esféricas, com diâmetro médio de 58 nm e potencial Zeta de -32,5 mV, apresentando exclusivamente prata na sua estrutura cristalina, e a presença de resíduos de proteínas como possíveis agentes estabilizadores. O nanocompósito inibiu o crescimento de *S. aureus* ($15,7 \pm 0,6$ mm), *E. coli* ($13,7 \pm 0,3$ mm) e *C. albicans* ($12,3 \pm 0,4$ mm). Este estudo demonstrou que as AgNPs sintetizadas por *A. flavo-furcatis* são estáveis em soluções coloidais e apresentam potencial no desenvolvimento de nanocompósitos para o controle de microrganismos oportunistas e patogênicos.

Palavras-chave: micossíntese, nanocompósito, atividade antimicrobiana.

Nanopartículas de prata sintetizadas por *Aspergillus flavo-furcatis*: caracterização e aplicação em gel polimérico com propriedades antimicrobianas

Silver nanoparticles synthesized by *Aspergillus flavo-furcatis*: characterization and application on a polymeric gel with antimicrobial properties

ABSTRACT

The aim of this study was to perform the physicochemical characterization of silver nanoparticles (AgNPs) synthesized by *Aspergillus flavo-furcatis* to develop a nanocomposite with antimicrobial properties. The characterization of AgNPs was achieved using dynamic light scattering (DLS), nanoparticle tracking analysis (NTA), atomic force microscopy (AFM), energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and X-ray diffraction (XRD). The gel was developed using the AgNPs colloidal solution and Carbopol 940 as gelatinizing agent, with evaluation of visual aspect and pH. The incorporation of AgNPs into the gel matrix was confirmed using AFM. The nanocomposite was tested against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans* using agar well diffusion method. The AgNPs synthesized by *Aspergillus flavo-furcatis* showed a spherical form with average size of 58 nm and Zeta potential of -32,5 mV, and showing exclusively silver in microcrystalline structure with the presence of protein residues as possible capping agents. The nanocomposite inhibited the growth of *S. aureus* ($15,7 \pm 0,6$ mm), *E. coli* ($13,7 \pm 0,3$ mm) e *C. albicans* ($12,3 \pm 0,4$ mm). This study demonstrated that AgNPs synthesized by *Aspergillus flavo-furcatis* are stable in colloidal solutions and show potential for the development of nanocomposites for the control of opportunistic and pathogenic microorganisms.

Keywords: mycosynthesis, nanocomposite, antimicrobial activity.

INTRODUÇÃO

A nanotecnologia envolve a manipulação e criação de novos materiais com dimensões abaixo de 100 nm (Sousa et al., 2018). Nanomateriais (NMs) têm propriedades biológicas, físicas e químicas distintas de materiais de tamanho convencional, despertando o interesse de diversos setores, como a indústria farmacêutica, eletrônica, têxtil, alimentícia e de cosméticos (Laux et al., 2018). Pesquisas apontam que o mercado global da nanotecnologia poderá lucrar aproximadamente 125 bilhões de dólares até 2024 (Research and Markets, 2018).

Dos nanomateriais estudados, as nanopartículas de prata (AgNPs) apresentam papel de destaque, em virtude de suas propriedades biológicas, como atividade antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória e antiviral (Zhao et al., 2017). Diversos métodos de síntese desses NMs são empregados, contudo, a síntese por via biológica ou biossíntese tem despertado interesse por ser um método barato, eficiente e limpo, utilizando biocatalisadores, oriundos de bactérias, algas, fungos filamentosos e plantas, como intermediadores da síntese de nanopartículas de prata (Abdelghany et al., 2018).

Os fungos são os mediadores preferidos para a síntese de AgNPs porque são fáceis de manusear, requerem nutrientes simples e secretam significativa quantidade de proteínas que resulta numa maior produtividade de AgNPs (Lateef e Adeeyo, 2015). O gênero *Aspergillus* tem sido relatado como um eficiente mediador da síntese biogênica de nanopartículas, cujas proteínas secretadas agem na redução e na estabilidade de AgNPs nas reações com nitrato de prata (Bocate et al., 2019; Shahzad et al., 2019).

Dentre as propriedades das AgNPs, a atividade antimicrobiana tem destaque, visto o seu amplo espectro de ação contra bactérias e fungos e a baixa possibilidade desses microrganismos adquirirem resistência à compostos de prata (Pelgrift e Friedman, 2013). Além disso, AgNPs apresentam efeitos terapêuticos mesmo quando em baixas concentrações e sem efeitos citotóxicos (Panáček et al., 2016).

Considerando a importância das AgNPs e seu efeito antimicrobiano, esses NMs são investigados para o desenvolvimento de nanocompósitos de uso hospitalar, como cateteres, próteses, e formulações de géis e pomadas para tratamento de úlceras e queimaduras (Burduşel et al., 2018). Numerosos estudos demonstraram resultados positivos empregando nanocompósitos constituídos por géis contendo AgNPs biogênicas no controle de microrganismos patogênicos e na cicatrização de ferimentos e queimaduras (Nagaich et al., 2016; Mekkawy et al., 2017; Ovais et al., 2018).

Neste estudo está demonstrada a caracterização físico-química das nanopartículas de prata sintetizadas por *Aspergillus flavo-furcatis* Batista & H. Maia 1955 nas condições otimizadas e o desenvolvimento de um nanocompósito para o controle de microrganismos patogênicos e oportunistas.

MATERIAL E MÉTODOS

Material biogênico

As nanopartículas de prata utilizadas nas análises de caracterização e para o desenvolvimento do nanocompósito de propriedades antimicrobianas foram produzidas por *Aspergillus flavo-furcatis* DPUA 1540 nas condições de pH 9,0, temperatura de 35 °C e concentração de nitrato de prata de 1,5 mM, apresentando pico de absorvância máximo a 520 nm, conforme investigação realizada por Gomes et al. (2019).

Caracterização físico-química das nanopartículas de prata

Espalhamento dinâmico de luz (DLS)

A solução coloidal de nanopartículas de prata foi diluída em água deionizada ultrapura (proporção 1:5, v/v) e analisada no equipamento ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK) para determinação do tamanho hidrodinâmico, potencial Zeta e índice de polidispersividade (PDI). A análise foi realizada em meio aquoso a 25 °C e ângulo de espalhamento fixo a 173 °.

Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA)

A solução coloidal foi diluída em água deionizada ultrapura (1:20) e injetadas no equipamento NanoSight LM10 (NanoSight, Amesbury, Reino Unido), utilizando laser de 45 mW a 405 nm. Um vídeo de 90 segundos foi gerado e o movimento Browniano de cada nanopartícula foi analisado *frame* por *frame* usando o *software* NTA (NanoSight Ltda., Amesbury, Reino Unido). Esta análise permite obter informações sobre tamanho hidrodinâmico e concentração de partículas por mL da solução coloidal.

Microscopia de força atômica (AFM)

A morfologia e a distribuição do tamanho das AgNPs em estado sólido foram analisadas no equipamento AFM/SPM 5500 Dynamics (Agilent Technologies, Santa Clara, EUA), com frequência de ressonância da ponta de 320 kHz e força constante de

42 N/m. 10 μ L da solução coloidal de nanopartículas de prata foram adicionadas a um *cantilever* comercial de sílica e seca por evaporação a 25 °C. O tratamento das imagens obtidas foi realizada pelo programa computacional WSxM 5.0.

Espectroscopia de raios-X por dispersão de energia (EDS)

10 μ L da solução coloidal de AgNPs foram adicionadas a um suporte de carbono e secas por evaporação a 25 °C. A amostra foi examinada em microscópio eletrônico de varredura compacto JSM-6010LA (JEOL, Akishima, Japão), com 12 kV de tensão de aceleração de elétron, acoplado a um espectrofotômetro de raios-X por dispersão de energia (EDS). Esta análise permitiu a confirmação de prata elementar e de outros elementos químicos envolvidos na síntese de AgNPs presentes na amostra.

Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

As nanopartículas de prata liofilizadas foram homogeneizadas com brometo de potássio (KBr) e compactadas com uma prensa hidráulica até obtenção de uma pastilha para análise em espectrofotômetro Cary 630 (Agilent Technologies, Santa Clara, EUA), na faixa de comprimento entre 700 a 4000 cm^{-1} , com resolução de 7 cm^{-1} .

Difração de raios-X (DRX)

A estrutura microcristalina das AgNPs foram examinadas em difratômetro de raios-X STADI-P (Stoe & Cie GmbH, Darmstadt, Alemanha) com anodo de molibdênio ($\text{MoK}_{\alpha 1}$, $\lambda = 0,7093 \text{ \AA}$). A análise foi realizada a 25 °C, sob corrente 40 mA e tensão de 50 kV. Os fótons de raios-X foram capturados por um detector Mythen 1K (Dectris Ltd., Baden-Daettwil, Suíça). Os dados das amostras liofilizadas foram obtidas por varredura 2θ de 5 a 60 °, e velocidade de varredura de 0,471 ° . min^{-1} .

Desenvolvimento de um gel polimérico com propriedades antimicrobianas

Incorporação das nanopartículas de prata ao gel polimérico

As nanopartículas de prata sintetizadas por *A. flavo-furcatis* DPUA 1540 foram incorporadas a uma matriz de gel de ácido poliacrílico (Carbopol® 940), conforme Tabela 1 (Capucho, 2007). O carbômero foi adicionado à solução de AgNPs diluídas em água deionizada ultrapura (1:8, v/v) até total dispersão, a 25 °C e sob agitação constante de 2.900 rpm. Trietanolamina foi adicionada como agente neutralizante à dispersão e o

pH foi corrigido para faixa de 5,0 a 5,5. Como controle foi preparado um gel sem adição de AgNPs. Os géis foram acondicionados em frascos de politereftalato de etileno (PET) esterilizados e mantidos a 4 °C para garantir a estabilização do sistema. Após 48 h foram avaliadas o aspecto visual e o pH dos géis desenvolvidos.

Tabela 1. Formulação do gel polimérico contendo AgNPs biogênicas.

Componentes	Formulação
Água deionizada ultrapura (MilliQ®)	q. s. p. 100%
Ácido poliacrílico (Carbopol® 940)	0,6 (%)
Trietanolamina	q. s. pH = 5,0 a 5,5
Solução coloidal de AgNPs	12,5 (%)

Para confirmar a incorporação das AgNPs à matriz, 10 µL dos géis preparados com e sem adição de AgNPs foram adicionadas a um *cantilever* comercial de sílica e secas por evaporação a 25 °C. As amostras foram analisadas em microscópio de força atômica AFM/SPM 5500 Dynamics (Agilent Technologies, Santa Clara, EUA), com frequência de ressonância da ponta de 320 kHz e força constante de 42 N/m. As imagens obtidas foram tratadas utilizando o programa computacional WSxM 5.0.

Atividade antimicrobiana do gel contendo nanopartículas de prata

A atividade antimicrobiana do gel contendo nanopartículas de prata foi avaliada pelo método de difusão em ágar por poço contra *Candida albicans* DPUA 1706, *Escherichia coli* CBAM 001 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Nos cultivos em superfície de ágar Mueller-Hinton (MHA) e Sabouraud (SAB) foram utilizados como inóculos 10⁸ UFC/mL (bactérias) e 10⁶ UFC/mL (leveduras), respectivamente. Em cada poço (Ø = 8 mm) foram adicionados 200 µL do gel com adição de AgNPs. Como controle positivo foram utilizadas soluções de estreptomicina (bactéria) e itraconazol (levedura) na concentração de 50 µg/mL. Como controle negativo foi utilizado o gel sem adição de AgNPs. Os experimentos foram realizados em triplicata a 37 °C. Após 24 h foi verificada a formação de halos de inibição e a atividade antimicrobiana foi expressa em milímetros (Prado et al., 2017).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização físico-química das nanopartículas de prata

Espalhamento dinâmico de luz (DLS)

Os resultados por DLS demonstraram que a solução coloidal de AgNPs de *A. flavo-furcatis* DPUA 1540 apresentaram tamanho hidrodinâmico de 106,5 nm, com

potencial Zeta de -32,5 mV e índice de polidispersividade (PDI) de 0,142. Dados aproximados foram relatados na investigação realizada com *A. flavus* cujas AgNPs apresentaram tamanho hidrodinâmico de 103,9 nm, potencial Zeta de -19,9 mV e PDI de 0,224 (Baraprante et al., 2016). Resultados semelhantes também foram encontrados por Roy et al. (2013) para *A. foetidus*, onde as AgNPs sintetizadas exibiram tamanho hidrodinâmico de 104,9 nm, PDI de 0,240 e potencial Zeta de -19,3 mV.

Danaei et al. (2018) mostraram que sistemas coloidais de nanopartículas que apresentam PDI abaixo de 0,3 são considerados aceitáveis e com uma população homogênea de partículas. Além do PDI, o potencial Zeta é um importante fator na estabilidade de sistemas coloidais, onde valores acima de +30 mV ou abaixo de -30 mV indicam alta estabilidade (Clogston e Patri, 2010). Com base nesses dados, as AgNPs produzidas por *A. flavo-furcatis* são homogêneas e de alta estabilidade.

Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA)

A análise de rastreamento de nanopartículas mostram que as AgNPs sintetizadas por *A. flavo-furcatis* DPUA 1540 apresentaram distribuição de tamanho homogênea, possuindo formato esférico e tamanho médio de 121 nm, na concentração de $2,35 \times 10^8$ partículas/mL da solução coloidal (Figura 1). Resultados que corroboram, juntamente com os dados da análise por DLS, a existência de uma única população de AgNPs. Estudos anteriores também mostraram que a síntese de AgNPs intermediada por fungos filamentosos consiste numa técnica eficiente, vista a alta homogeneidade de partículas nas soluções coloidais (Lachmapure et al., 2017; Sonar et al., 2017).

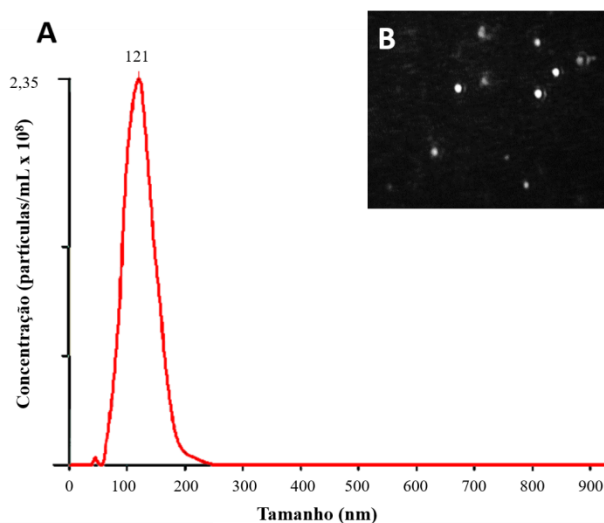


Figura 1. Caracterização em NTA das AgNPs de *A. flavo-furcatis* sintetizadas nas condições de pH 9,0, temperatura de 35 °C e concentração de AgNO₃ 1,5 mM. (A) Distribuição do tamanho hidrodinâmico das AgNPs. (B) Imagem capturada pelo equipamento Nanosight.

Microscopia de Força Atômica (AFM)

As análises em AFM confirmaram que as AgNPs de *A. flavo-furcatis* DPUA 1540 têm formato esférico, tamanho de 30 a 100 nm, com diâmetro médio de 58 nm (Figura 2). Silva et al. (2017) mostraram que as AgNPs sintetizadas por *A. oryzae* apresentaram também formato esférico e tamanho médio de 61 nm. Na investigação realizada por Fatima et al. (2016), a síntese de AgNPs por *A. flavus* resultou em partículas esféricas com tamanho médio de 50 nm.

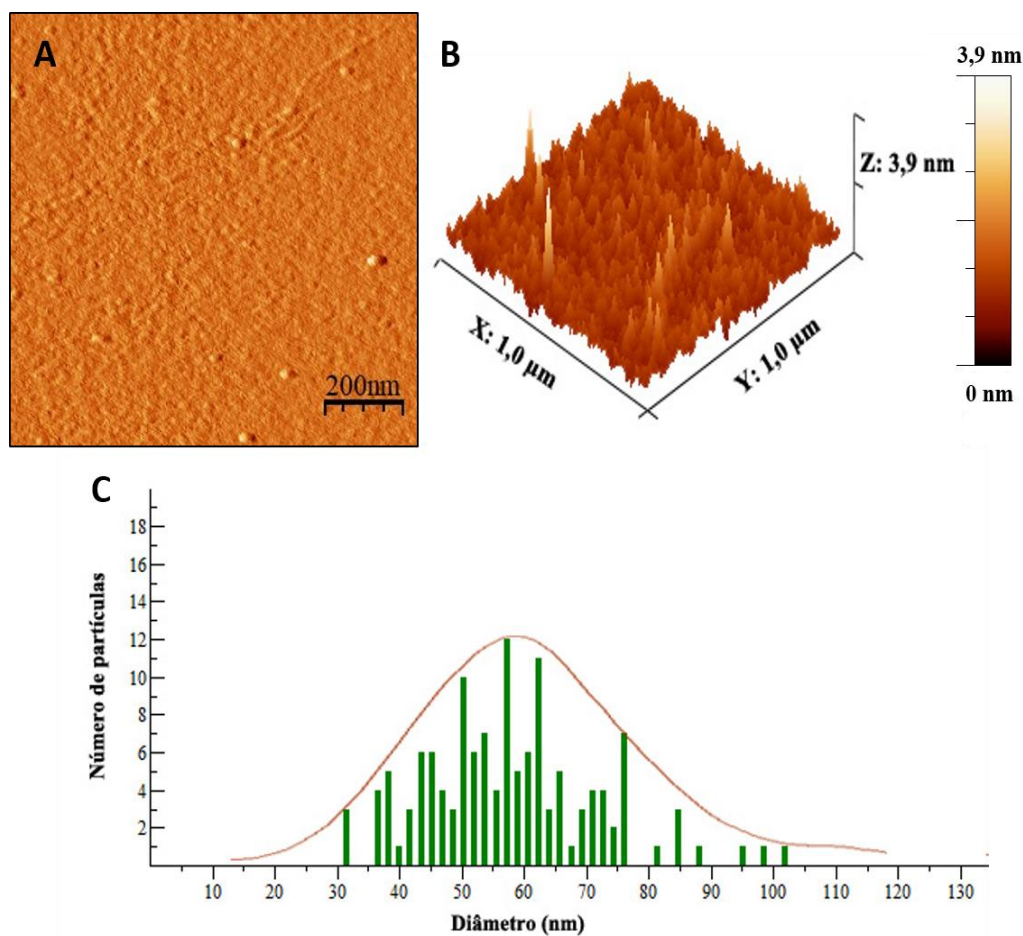


Figura 2. Caracterização morfológicas em AFM das AgNPs sintetizadas por *A. flavo-furcatis* DPUA 1540. (A) Topografia bidimensional (área scaneada 1,0 x 1,0 μm), (B) topografia tridimensional (área scaneada 1,0 x 1,0 μm) e (C) histograma representando a distribuição do tamanho das AgNPs.

O resultado da análise em AFM mostraram que AgNPs de *A. flavo-furcatis* DPUA 1540 apresentaram tamanho inferior aos revelados por DLS e NTA. De acordo com Bhattacharjee (2016) a presença de camada de solvatação em meio aquoso determina uma superestimação do tamanho de partículas analisadas por DLS e NTA. Considerando o tamanho e a forma das nanopartículas, as análises mais precisas são que utilizam técnicas de microscopia (AFM ou MET).

Espectroscopia de raios-X por dispersão de energia (EDS)

As análises por EDS revelaram picos próximos a 3 KeV (Figura 3A), correspondentes à energia de ligação da prata e seus isótopos, além de sinais correspondentes a carbono e oxigênio, elementos encontrados nas biomoléculas responsáveis pela síntese e estabilização das AgNPs sintetizadas (Rasulov et al., 2016; Hedaginati e Taranath, 2017). Outros estudos também mostraram que as AgNPs produzidas por espécies de *Aspergillus* possuem sinais próximos a 3 KeV quando analisadas por EDS, confirmando a presença de prata nas amostras (Baskar et al., 2015; Chengzheng et al., 2017; Omran et al., 2018).

Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

O espectro resultante da análise em FTIR da solução coloidal de AgNPs sintetizada por *A. flavo-furcatis* se encontra na Figura 3B, com picos pronunciados nas faixas espectrais de 3377, 1640, 1386 e 1110 cm^{-1} . Os sinais situados em 3377 e 1640 cm^{-1} correspondem às vibrações de estiramento da ligação N–H (amida) e C=O (carbonila), respectivamente; enquanto os picos localizados a 1386 e 1110 cm^{-1} correspondem respectivamente às vibrações de ligações de dobramento N–H (amida) e de estiramento de C–N. Esses resultados sugerem a presença de amidas e carboxilas, sendo grupos químicos encontrados na estrutura de proteínas (Silva et al., 2017; Hamad, 2019). A presença de proteínas em AgNPs biogênicas é amplamente descrita na literatura e de grande importância na estabilização desses nanomateriais (Abdelrahim et al., 2017; Omran et al., 2018; Thokala et al., 2018).

Difração de raios-X (DRX)

O difratograma mostrou a natureza cristalina da amostra e confirmaram a presença de prata elementar na amostra analisada. A Figura 3C mostra picos distintos em 17,30 °, 19,97 °, 28,49 ° e 33,53 °, que correspondem aos respectivos planos (111), (200), (220) e (311), revelando a estrutura cristalina cúbica de face centrada (CFC) das AgNPs deste estudo (Sarwar et al., 2018; Rolim et al., 2019). Ademais, o difratograma não apresentou sinais típicos para a presença de nanopartículas de cloreto de prata (AgCl) ou de óxido de prata (Ag₂O), indicando a pureza das AgNPs (Ag⁰) sintetizadas por intermédio de *A. flavo-furcatis* DPUA 1540 (Durán et al., 2016; Moafi et al., 2016).

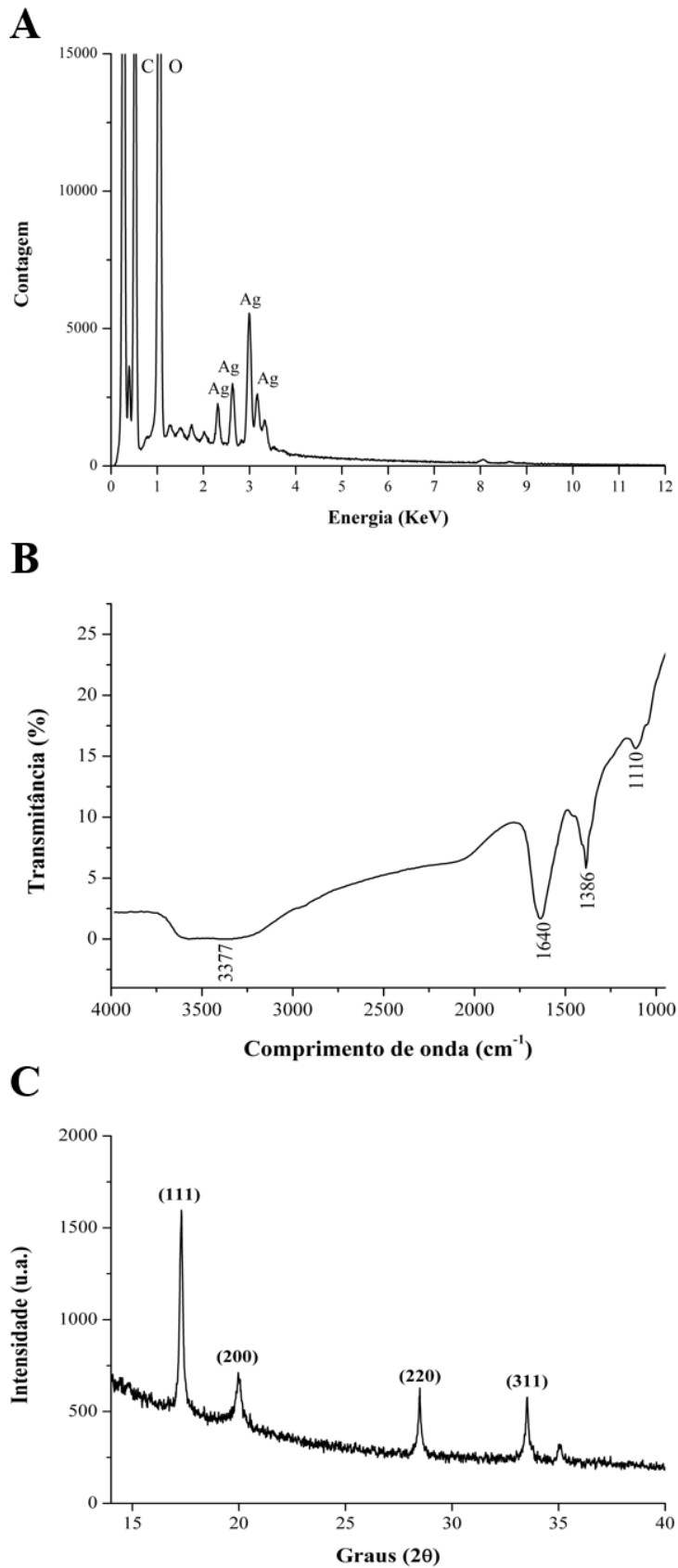


Figura 3. Caracterização química e estrutural das AgNPs sintetizadas por *A. flavo-furcatis* DPUA 1540. (A) Espectro resultante da análise por EDS, evidenciando os elementos presentes na amostra. (B) Espectro resultante da análise por FTIR. (C) Difratoograma resultante das análises em DRX.

Desenvolvimento de um gel polimérico com propriedades antimicrobianas

Incorporação de nanopartículas de prata ao gel polimérico

O gel desenvolvido com a solução coloidal de AgNPs de *A. flavo-furcatis* DPUA 1540 apresentou coloração cinzenta, diferentemente do aspecto incolor do gel sem adição de AgNPs (Figura 4). A cor observada no gel contendo AgNPs foi resultante das interações ressonantes da luz incidente com os elétrons presentes na superfície das nanopartículas de prata, fenômeno também conhecido como ressonância do plasmon de superfície (RPS) (Wei et al., 2015; Kristensen et al., 2017).

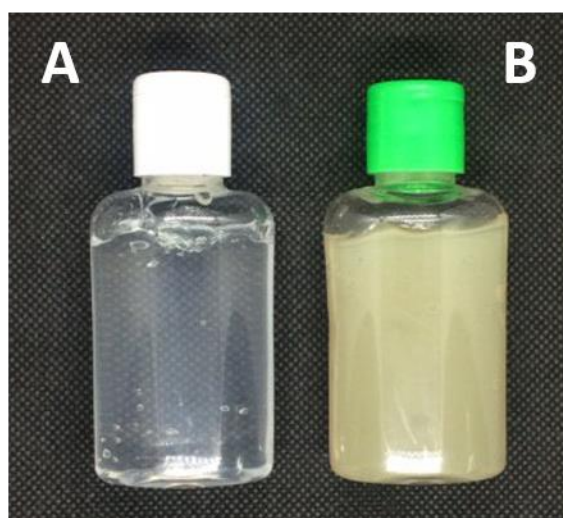


Figura 4. Aspecto visual do gel elaborado com AgNPs sintetizadas por *A. flavo-furcatis*. (A) gel sem adição de AgNPs; (B) gel com adição de AgNPs.

O gel contendo AgNPs demonstrou $\text{pH } 5,15 \pm 0,10$. A investigação realizada por Jadhav et al. (2016) também demonstrou que o gel à base de Carbopol 934 e de AgNPs biogênicas apresenta pH levemente ácido. Estes resultados mostram que o gel desenvolvido neste estudo tem viabilidade para aplicações tópicas por apresentar pH próximo ao da pele humana (faixa de 4,1 a 5,8), preservando a integridade da barreira física e química contra agentes patogênicos (Proksch, 2018).

As análises em AFM mostraram que as AgNPs biogênicas se encontram bem dispersas na matriz do gel desenvolvido e sem a ocorrência de agregações de nanopartículas de prata (Figura 5). Outros estudos também mostraram resultados positivos quanto ao uso conjugado do Carbopol e AgNPs de origem biológica no desenvolvimento de géis, onde as interações com os grupos hidroxila do carbômero garantem uma estabilidade adicional às AgNPs e previnem a formação de agregados de nanopartículas (Haddadine et al., 2017; Sood e Chopra, 2018; Arya et al., 2019).

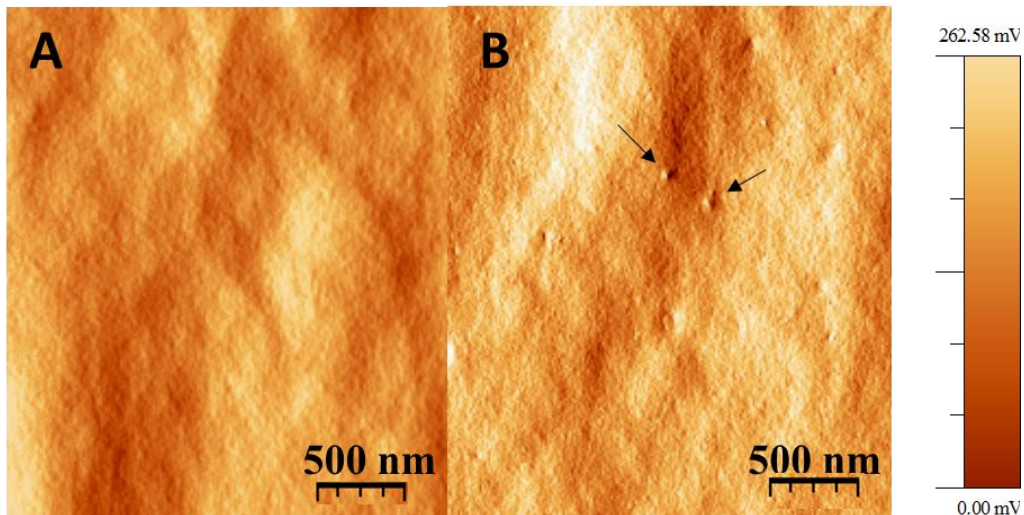


Figura 5. Microscopia de Força Atômica (AFM) dos géis: (A) o gel sem adição de AgNPs, e (B) o nanocompósito desenvolvido, evidenciando as nanopartículas de prata.

Atividade antimicrobiana do gel contendo nanopartículas de prata

O gel contendo AgNPs sintetizadas por *A. flavo-furcatis* DPUA 1540 apresentou atividade antimicrobiana contra todos os microrganismos testados pelo método de difusão em ágar por poço (Figura 6). A maior inibição foi observada contra *S. aureus* ($15,7 \pm 0,6$ mm), *E. coli* ($13,7 \pm 0,3$ mm) e *C. albicans* ($12,3 \pm 0,4$ mm), respectivamente. O gel sem adição de AgNPs não inibiu o crescimento de nenhum dos microrganismos testados, resultado que confirma a atividade antimicrobiana do gel se deve à ação das AgNPs incorporadas.

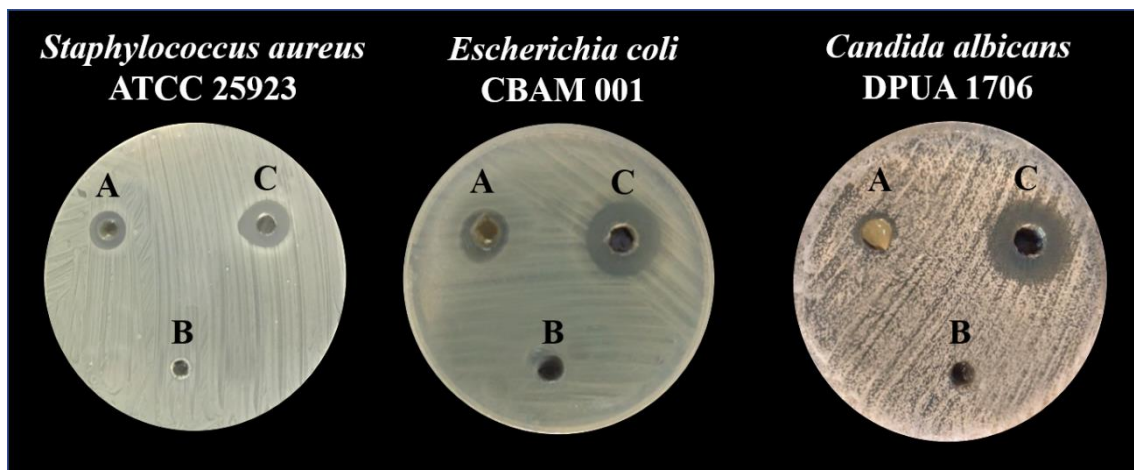


Figura 6. Atividade antimicrobiana dos géis elaborados: (A) com adição de AgNPs, (B) sem adição de AgNPs e (C) controle positivo, contra três microrganismos testes.

Paul e Londhe (2018) demonstraram que o gel desenvolvido com AgNPs de origem biológica também apresentou ação similar ao resultado deste estudo, onde foi observada a inibição do crescimento de *E. coli* e a maior vulnerabilidade de *S. aureus* à

ação do gel contendo AgNPs. Dados semelhantes também foram encontrados por Sood e Chopra (2018), que comprovaram a atividade antimicrobiana de um gel contendo AgNPs biogênicas contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*.

CONCLUSÕES

As nanopartículas de prata sintetizadas por *Aspergillus flavo-furcatis* DPUA 1540 são predominantemente esféricas, estáveis em soluções coloidais e apresentam resíduos de proteínas em sua composição. O gel desenvolvido a partir de AgNPs biogênicas apresentou estabilidade e foi eficaz na inibição *in vitro* do crescimento de *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans*, tornando-se uma alternativa promissora no controle de microrganismos patogênicos e oportunistas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASI, E., MILANI, S. F. AVAL, M. KOUHI, A. AKBARZADEH, H. T. NASRABADI, P. NIKASA, S. W. JOO, Y. HANIFEHPOUR, K. NEJATI-KOSHKI & M. SAMIEI, 2016. Silver nanoparticles: synthesis methods, bio-applications and properties. **Critical Reviews in Microbiology** 42(2): 173-180. DOI: <https://doi.org/10.3109/1040841X.2014.912200>.

ABDELGHANY, T. M., AL-RAJHI, A. M. H., AL-ABBOUD, M. A., ALAWLAQI, M. M., MAGDAH, A. G., HELMY, E. A. M. & MABROUK, A. S., 2018. Recent advances in green synthesis of silver nanoparticles and their applications: about future directions, a review. **BioNanoScience** 8(1): 5-16. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12668-017-0413-3>.

ABDELRAHIM, K., MAHMOUD, S. Y., ALI, A. M., ALMAARY, K. S., MUSTAFA, A. E. Z. M. A. & HUSSEINY, S. M., 2017. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using *Rhizopus stolonifer*. **Saudi Journal of Biological Sciences** 24(1): 208-2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.02.025>.

ARYA, G., KUMARI, R. M., SHARMA, N., GUPTA, N., KUMAR, A., CHATERJEE, S. & NIMESH, S., 2019. Catalytic, antibacterial and antibiofilm efficacy of biosynthesized silver nanoparticles using *Prosopis juliflora* leaf extract along with their wound healing potential. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology** 190: 50-58. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.11.005>.

BARAPATRE, A., AADIL, K. R. & JHA, H., 2016. Synergistic antibacterial and antibiofilm activity of silver nanoparticles biosynthesized by lignin-degrading fungus. **Bioresources and Bioprocessing** 3(8). DOI: <https://doi.org/10.1186/s40643-016-0083-y>.

BASKAR, G., CHANDHURU, J., FAHAD, K. S., PRAVEEN, A. S., BHARATI, R. & FYNA S., 2015. Mycological synthesis and characterization of silver nanoparticles by

Aspergillus species. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research** 7(7): 300-306.

BHATACHARJEE, S., 2016. DLS and zeta potential – what they are and what they are not?. **Journal of Controlled Release** 235 (1): 337-351. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>.

BOCATE, K. P., REIS, G. F., SOUZA, P. C., JUNIOR, A. G. O., DURÁN, N., NAKAZATO, G., FURLANETO, M. C., ALMEIDA, R. S. & PANAGIO, L. A., 2019. Antifungal activity of silver nanoparticles and simvastatin against toxigenic species of *Aspergillus*. **International Journal of Food Microbiology** 291(16): 79-86. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.11.012>.

BURDUŞEL, A. C., GHERASIM, O., GRUMEZESCU, A. M., MOGOANTĂ, L., FICAI, A. & ANDRONESCU, E., 2018. Biomedical applications of silver nanoparticles: an up-to-date overview. **Nanomaterials** 8(9): 681. DOI: <https://doi.org/10.3390/nano8090681>.

CAPUCHO, H.C. 2007. Desenvolvimento de formulações tópicas contendo papaína para o tratamento de feridas. **Dissertação (Mestrando em Ciências Farmacêuticas)** – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 102 p.

CHENGZHENG, W., JIAZHI, W., SHUANGJIANG, C., SWAMY, M. K., SINNIHAH, U. R., AKHTAR, M. S. & UMAR, A., 2018. Biogenic synthesis, characterization and evaluation of silver nanoparticles from *Aspergillus niger* JX556221 against human colon cancer cell line HT-29. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology** 18(5): 3673-3681. DOI: <https://doi.org/10.1166/jnn.2018.15364>.

CLOGSTON, J. D. & PATRI, A. K., 2010. Zeta potential measurements. In: McNeil S. (eds) Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery. **Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)**, vol 697. Humana Press. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-60327-198-1_6.

DANAEI, M., DEGHANKHOLD, M., ATAEI, S., DAVARANI, F. H., JAVANMARD, R., DOKHANI, A., KHORASANI, S. & MOZAFARI, M. R., 2018. Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. **Pharmaceutics** 10(2): 57-74. DOI: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020057>.

DURÁN, N., NAKAZATO, G. & SEABRA, A. B., 2016. Antimicrobial activity of biogenic silver nanoparticles and silver chloride nanoparticles: an overview and comments. **Applied Microbiology and Biotechnology** 100(15): 6555-6570. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7657-7>.

FATIMA, F., VERMA, S. R., PATHAK, N. & BAJPAI, P., 2016. Extracellular synthesis of silver nanoparticles and their microbicidal activity. **Journal of Global Antimicrobial Resistance** 7(1): 88-92. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2016.07.013>.

GOMES, D. M. D., DURÁN, N., SEABRA, A. B., SILVA, L. P., PRADO, F. B., SILVA, T.A. & TEIXEIRA, M. F. S, 2019. Síntese verde de nanopartículas de prata

intermediada por fungo anamórfico e eficácia antibacteriana e antifúngica. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi**. (no prelo)

HADDADINE, N., CHALAL, S., ABOUZEID, K., BOUSLAH, N., BENABOURA, A. & EL-SHALL, M. S., 2017. Preparation and characterization of carbopol-silver nanocomposites for efficient antimicrobial applications. **Polymers Advanced Technologies** 29(3): 1107-1116. DOI: <https://doi.org/10.1002/pat.4222>.

HAMAD, M. T., 2019. Biosynthesis of silver nanoparticles by fungi and their antibacterial activity. **International Journal of Environmental Science and Technology** 16: 1015-1024. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13762-018-1814-8>.

HEDAGINAI, S. R. & TARANATH, T. C., 2017. Characterization and antimicrobial activity of biogenic silver nano-particles using leaf extract of *Thunbergia alata* Bojer ex Sims. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research** 8(5): 2070-2081.

JADHAV, K., DHAMECHA, D., BHATTACHARYA, D. & PATIL, M., 2016. Green and ecofriendly synthesis of silver nanoparticles: characterization, biocompatibility studies and gel formulation for treatment of infections in burns. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology** 155: 109-115. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.01.002>.

KRISTENSEN, A., YANG, J. K. W., BOZHEVOLNYI, S. I., LINK, S., NORDLANDER, P., HALAS, N. J. & MORTENSEN, N. A., 2016. Plasmonic color generation. **Nature Review Materials** 2: 16088. DOI: <https://doi.org/10.1038/natrevmats.2016.88>.

LACHMAPURE, M., PARALIKAR, P., PALANISAMY, M., ALVES, M. & RAI, M., 2017. Efficacy of biogenic silver nanoparticles against clinical isolates of fungi causing mycotic keratitis in humans. **IET Nanobiotechnology** 11(7): 809-814. DOI: <https://doi.org/10.1049/iet-nbt.2017.0003>.

LATEEF, A. & ADEEYO, A. O., 2015. Green synthesis and antibacterial activities of silver nanoparticles using extracellular laccase of *Lentinus edodes*. **Notulae Scientia Biologicae** 7(4): 405-411. DOI: <https://doi.org/10.15835/nsb.7.4.9643>.

LAUX, P., TENTSCHERT, J., RIEBELING, C., BRAEUNING, A., CREUTZENBERG, O., EPP, A., FESSARD, V., HAAS, K. H., HAASE, A., HUNDRINKE, K., JAKUBOSWIKI, N., KEARNS, P., LAMPEN, A., RAUSCHER, H., SCHOONJANS, R., STÖRMER, A., THIELMANN, A., MÜHLE, U. & LUCH, A., 2018. Nanomaterials: certain aspects of application, risk assessment and risk communication. **Archives of Toxicology** 92(1): 121-141. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00204-017-2144-1>.

MEKKAWY, A. I., EL-MOKHTAR, M. A., NAFADY, N. A., YOUSEF, N., HAMAD, M. A., EL-SHANAWANY, S. M., IBRAHIM, E. H. & ELSABAHY, M., 2017. In vitro and in vivo evaluation of biologically synthesized silver nanoparticles for topical applications: effect of surface coating and loading into hydrogels. **International**

Journal of Nanomedicine 12: 759-777. DOI: <https://dx.doi.org/10.2147%2FJN.S124294>.

MOAFI, H. F., ANSARI, R. & OSTOVAR, F., 2016. Ag₂O/sawdust nanocomposite as an efficient adsorbent for removal of hexavalent chromium ions from aqueous solutions. **Journal of Materials and Environmental Science** 7(6): 2051-2068.

NAGAICH, U., GULATI, N. & CHAUHAN, S., 2016. Antioxidant and antibacterial potential of silver nanoparticles: biogenic synthesis utilizing apple extract. **Journal of Pharmaceutics** 2016: 7141523. DOI: <https://dx.doi.org/10.1155%2F2016%2F7141523>.

OMRAN, B. A., H. N. NASSAR, N. A. FATTHALLAH, A. HAMDY, E. H. EL-SHATOURY & N. S. EL-GHENDY, 2018. Characterization and antimicrobial activity of silver nanoparticles mycosynthesized by *Aspergillus brasiliensis*. **Journal of Applied Microbiology** 125(2): 370-382. DOI: <https://doi.org/10.1111/jam.13776>.

OVAIS, M., AHMAD, I., KHALIL, A. T., MUKHERJEE, S., JAVED, R., AYAZ, M., RAZA, A. & SHINWARI, Z. K., 2018. Wound healing applications of biogenic colloidal silver and gold nanoparticles: recent trends and future prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology** 102: 4305-4318. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8939-z>.

PANÁČEK, A., SMÉKALOVÁ, M., KILIANOVÁ, M., PRUCEK, R., BOGDANOVÁ, K., VEČEŘOVÁ, R., KOLÁŘ, M., HAVRDOVÁ, M., PĚLAZA, G. A., CHOJNIAK, J., ZBOŘIL, R. & KVÍTEK, L., 2016. Strong and nonspecific synergistic antibacterial efficiency of antibiotics combined with silver nanoparticles at very low concentrations showing no cytotoxic effects. **Molecules** 21(1): 26. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules21010026>.

PAUL, M. & LONDHE, V. Y., 2018. *Pongamia pinnata* seed extract-mediated green synthesis of silver nanoparticles: preparation, formulation and evaluation of bactericidal and wound healing potential. **Applied Organometallic Chemistry** 33(3): e4624. DOI: <https://doi.org/10.1002/aoc.4624>.

PELGRIFT, R. Y. & FRIEDMAN, A. J., 2013. Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance. **Advanced Drug Delivery Reviews** 65(13-14): 1803-1815. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.07.011>.

PRADO, F. B., W. C. ROCHA, S. R. MARTIM, M. M. ALECRIM, L. P. SILVA, L. S. C. SILVA, T. A. SILVA & M. F. S. TEIXEIRA, 2017. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi: Ciências Naturais** 12(1): 37-47.

PROKSCH, E., 2018. pH in nature, humans and skin. **The Journal of Dermatology** 45(9): 1044-1052. DOI: <https://doi.org/10.1111/1346-8138.14489>.

RASULOV, B. A., ROZI, P., PATTAEVA, M. A., YILI, A. & AISA, H. A., 2016. Exopolysaccharide-based bioflocculant matrix of *Azotobacter chroococcum* XU1 for synthesis of AgCl nanoparticles and its application as a novel biocidal nanobiomaterial. **Materials** 9(7): 528-539. DOI: <https://doi.org/10.3390/ma9070528>.

RESEARCH AND MARKETS, 2018. Global nanotechnology market (by component and applications), funding & investment, patent analysis and 27 companies profile & recent developments – forecast to 2024. **Relatório técnico**. Disponível em: <<https://www.researchandmarkets.com/research/zc7qgf>>. Acesso em: 14 de junho de 2018.

ROLIM, W. R., PIERETTI, J. C., RENÓ, D. L. S., LIMA, B. A., NASCIMENTO, M. H. M., AMBROSIO, F. N., LOMBELLO, C. B., BROCCHI, M., SOUZA, A. C. S., & SEABRA, A. B., 2019. Antimicrobial activity and cytotoxicity to tumor cells of nitric oxide donor and silver nanoparticles containing PVA/PEG films for topical applications. **ACS Applied Materials and Interfaces** 11(6): 6589-6604. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsami.8b19021>.

ROY, S., MUKHERJEE, T., CHAKRABORTY, S. & DAS, T. K., 2013. Biosynthesis, characterisation & antifungal activity of silver nanoparticles synthesized by the fungus *Aspergillus foetidus* MTCC 8876. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures** 8(1): 197-205.

SARWAR, M. S., NIAZI, M. B. K., JAHAN, Z., AHMAD, T. & HUSSAIN, A., 2018. Preparation and characterization of PVA/nanocellulose/Ag nanocomposites films for antimicrobial food packaging. **Carbohydrate Polymers** 184(1): 453-464. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.12.068>.

SHAHZAD, A., SAEED, H., IQTEDAR, M., HUSSAIN, S. Z., KALEEM, A., ABDULLAH, R., SHARIF, S., NAZ, S., SALEEM, F., AIHETASHAM, A. & CHAUDHARY, A., 2019. Size-controlled production of silver nanoparticles by *Aspergillus fumigatus* BTCB10: likely antibacterial and cytotoxic effects. **Journal of Nanomaterials** 516869: 14 p. DOI: <https://doi.org/10.1155/2019/5168698>

SILVA, T.A., P. F. ANDRADE, K. SEGALA, L. S. C. SILVA, L. P. SILVA, S. V. G. NISTA, L. H. I. MEI, N. DURÁN & M. F. S. TEIXEIRA, 2017. Silver nanoparticles biosynthesis and impregnation in cellulose acetate membrane for anti-yeast therapy. **African Journal of Biotechnology** 16(27): 1490-1500. DOI: <https://doi.org/10.5897/AJB2017.16024>.

SONAR, H., NAGAONKAR, D., INGLE, A. P. & RAI, M., 2017. Mycosynthesized silver nanoparticles as potent growth inhibitory agents against selected waterborne human pathogens. **CLEAN – Soil, Air, Water** 45(4). p.1600246. DOI: <https://doi.org/10.1002/clen.201600247>.

SOOD, R. & CHOPRA, D. S., 2018. Optimization of reaction conditions to fabricate *Ocimum sanctum* synthesized silver nanoparticles and its application to nano-gel systems for burn wounds. **Material Science and Engineering: C** 92: 572-589. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.06.070>.

SOUSA, C. R. S., HOLANDA, A. L., NUNES, A. B. A., ALVES, G. S. A. & SAMPAIO, M. C., 2018. Nanotecnologia e Nanociência: considerações histórica e interdisciplinar. **Hegemonia: Revista Eletrônica do Programa de Mestrado em Direitos Humanos, Cidadania e Violência/Ciência Política do Centro Universitário Unieuro** 25: 150-178.

THOKALA, P. D., KAMIL, D. & TOPPO, R. S., 2017. Silver nanoparticles production by *Aspergillus niger* and their antibacterial efficacy against *Xanthomonas citri* and *Ralstonia solanacearum*. **Journal of Environmental Biology** 39: 493-499. DOI: <http://doi.org/10.22438/jeb/39/4/MRN-489>.

WEI, L. J. LU, A. PATEL, Z. S. CHEN & G. CHEN, 2015. Silver nanoparticles: synthesis, properties, and therapeutic applications. **Drug Discovery Today** 20(5): 595-601. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.11.014>.

ZHAO, X., ZHOU, L., RAJOKA, M. S. R., YAN, L., JIANG, C., SHAO, D., ZHU, J., SHI, J., HUANG, Q., YANG, H. & JIN, M., 2017. Fungal silver nanoparticles: synthesis, application and challenges. **Critical Reviews in Biotechnology** 38(6): 817-835. DOI: <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1414141>.

5. CONCLUSÕES GERAIS

A espécie *Aspergillus flavo-furcatis* DPUA 1540 apresentou-se viável e eficiente para estudos envolvendo a síntese biogênica de nanopartículas de prata, sendo influenciada pelas condições de pH e concentração de nitrato de prata. As melhores condições para síntese extracelular de AgNPs foram obtidas em pH 9,0, temperatura de 35 °C e concentração de nitrato de prata a 1,5 mM.

As nanopartículas de prata sintetizadas por *A. flavo-furcatis* DPUA 1540 apresentaram atividade antimicrobiana *in vitro* contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*, sendo os menores valores de CMI observados para as AgNPs sintetizadas nas melhores condições de síntese (pH 9,0, temperatura de 35 °C e concentração de nitrato de prata a 1,5 mM).

Aspergillus flavo-furcatis DPUA 1540 proporcionou a síntese de AgNPs predominantemente esféricas, de tamanho homogêneo e estáveis em soluções coloidais, apresentando resíduos de proteínas em sua composição. O nanocompósito desenvolvido demonstrou estabilidade e eficácia no controle de *S. aureus*, *E. coli* e *S. aureus*, mostrando potencial no controle de microrganismos patogênicos e oportunistas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASI, E., MILANI, S. F. AVAL, M. KOUHI, A. AKBARZADEH, H. T. NASRABADI, P. NIKASA, S. W. JOO, Y. HANIFEHPOUR, K. NEJATI-KOSHKI & M. SAMIEI, 2016. Silver nanoparticles: synthesis methods, bio-applications and properties. *Critical Reviews in Microbiology* 42(2): 173-180. DOI: <https://doi.org/10.3109/1040841X.2014.912200>.

ABBASI, E., MILANI, M., AVAL, S. F., KOUHI, M., AKBARZADEH, A., NASRABADI, H. T., NIKASA, P., JOO, S. W., HANIFEPOUR, Y., NEJATI-KOSHKI, K. & SAMIEI, M., 2014. Silver nanoparticles: synthesis methods, bio-applications and properties. *Critical Reviews in Microbiology* 42(2): 173-180. DOI: <https://doi.org/10.3109/1040841X.2014.912200>.

ABDEL-AZEEM, A. M., SALEM, F. M., ABDEL-AZEEM, M. A., NAFADY, N. A., MOHESIEN, M. T. & SOLIMAN, E. A., 2016. Biodiversity of the genus *Aspergillus* in different habitats. *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Aspergillus system properties and applications*: 3-28. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63505-1.00001-4>.

ABDELGHANY, T. M., AL-RAJHI, A. M. H., AL-ABBOUD, M. A., ALAWLAQI, M. M., MAGDAH, A. G., HELMY, E. A. M. & MABROUK, A. S., 2018. Recent advances in green synthesis of silver nanoparticles and their applications: about future directions, a review. *BioNanoScience* 8(1): 5-16. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12668-017-0413-3>.

ABDEL-HAFEZ, S. I. I., NAFADY, N. A., ABDEL-RAHIM, I. R., SHALTOUT, A. M. & MOHAMED, M.A., 2016. Biogenesis and optimisation of silver nanoparticles by the endophytic fungus *Cladosporium sphaerospermum*. *International Journal of Nanomaterials and Chemistry* 2(1): 11-19. DOI: <http://dx.doi.org/10.18576/ijnc/020103>.

ABDEL-RAHIM, K., MAHMOUD, S. Y., ALI, A. M., ALMAARY, K. S., MUSTAFA, A. E. Z. M. A. & HUSSEINY, S. M., 2017. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using *Rhizopus stolonifer*. *Saudi Journal of Biological Sciences* 24(1): 208-216. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.02.025>.

ABDI – Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial, 2010. Cartilha sobre Nanotecnologia. 60 páginas. Disponível em: http://lqes.iqm.unicamp.br/images/publicacoes_teses_livros_resumo_cartilha_abdi.pdf. Acesso em 20 de julho de 2018.

ADHIKARI, L., LARM, N. E., BHAWAWET, N. & BAKER, G. A., 2018. Rapid microwave-assisted synthesis of silver nanoparticles in a halide-free deep eutectic solvent. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering* 6(5): 5725-5731. DOI: <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b00050>.

AGNIHOTRI, S., MUKHERJI, S. & MUKHERJI, S., 2014. Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5-100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. *RSC Advances* 4: 3974-3983. DOI: <https://doi.org/10.1039/C3RA44507K>.

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: 21–25. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2016.09.069>.

ALBERNAZ, V.L., 2014. Síntese verde de nanopartículas de prata com extrato aquoso de folhas de *Brosimum gaudichaudii*, caracterização físicoquímica, morfológica e suas aplicações no desenvolvimento de um nanobiossensor eletroquímico. Dissertação (Mestrado em Nanociência e Nanotecnologia) – Universidade de Brasília. 121 f.

ALENCAR, M. S. M., BOCHNER, R., DIAS, M. F. F. & ANTUNES, A. M. S., 2017. Análise da produção científica brasileira sobre nanotecnologia e saúde. *Revista Eletrônica de Comunicação, Informação e Inovação em Saúde* 11(1). 16 p. <http://dx.doi.org/10.29397/reciis.v11i1.1199>.

ANBAZHAGAN, S., AZEEZ, S., MORUKATTU, G., RAJAN, R., VENKATESAN, K. & THANGAVELU, K. P., 2017. Synthesis, characterization and biological applications of mycosynthesized silver nanoparticles. *3 Biotech* 7: 333. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0961-9>.

ARAPCHESKA, M., JOVANOSKA, V., JANKULOSKI, Z., HAJRUALI-MUSLIU, Z. & UZUNOV, R., 2016. Impact of aflatoxins on animal and human health. *International Journal of Innovative Science, Engineering and Technology* 2(2): 156-161.

ASSIS, O. B. G., 2013. A asa da borboleta e a nanotecnologia: cor estrutural. *Revista Brasileira de Ensino de Física* 35(2): 1-9. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1806-11172013000200001>.

BALAKUMARAN, M. D. RAMACHANDRAN, R. & KALAICHELVAN, P. T., 2015. Exploitation of endophytic fungus, *Guignardia mangiferae* for extracellular synthesis of silver nanoparticles and their in vitro biological activities. *Microbiological Research* 178: 9-17. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.05.009>.

BALAKUMARAN, M. D., R. RAMACHADRAN, P. BALASHANMUGAM, D. J. MUKESHKUMAR & P. T. KALAICHELVAN, 2016. *Microbiological Research* 182(1): 8-20. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.09.009>.

BARILLO, D. J. & MARX, D. E., 2014. Silver in medicine: a brief history BC 335 to present. *Burns* 40(1): S3-S8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.burns.2014.09.009>.

BENNETT, J. W., 2010. An overview of the genus *Aspergillus*. *Caiser Academic Press*, Portland, EUA: 1-17.

BERTÉ, R., 2013. Síntese e caracterização de nanopartículas de prata conjugadas com peptídeos antimicrobianos.. Dissertação (Mestrado em Física Aplicada) – Universidade de São Paulo. 102 f.

BEYENE, H. D., WERKNEH, A. A., BEZABH, H. K. & AMBAYE, T. G., 2017. Synthesis paradigm and applications of silver nanoparticles (AgNPs): a review. *Sustainable Materials and Technologies* 13: 18-23. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.susmat.2017.08.001>.

BHATACHARJEE, S., 2016. DLS and zeta potential – what they are and what they are not?. *Journal of Controlled Release* 235 (1): 337-351. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>.

BILAL, M., RASHEED, T., IQBAL, H. M. N., HU, H. & ZHANG, X., 2017. Silver nanoparticles: biosynthesis and antimicrobial potentialities. *International Journal of Pharmacology* 13(7): 832-845. DOI: <http://dx.doi.org/10.3923/ijp.2017.832.845>.

BISWAS, S. & BAFUBIANDI, A. F. M., 2016. Optimization of process variables for the biosynthesis of silver nanoparticles by *Aspergillus wentii* using statistical experimental design. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology* 7(4) 10pp. DOI: <https://doi.org/10.1088/2043-6262/7/4/045005>.

CAPUCHO, H. C., 2007. Desenvolvimento de formulações tópicas contendo papaína para o tratamento de feridas. Dissertação (Mestrando em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 102 p.

CHALOUPKA, MALAM, Y. & SEIFALIAN, A. M., 2010. Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications. *Trends in Biotechnology* 28(11): 580-588. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.07.006>.

CHAUHAN, R., REDDY, A. & ABRAHAM, J., 2015. Biosynthesis of silver and zinc oxide nanoparticles using *Pichia fermentans* JA2 and their antimicrobial property. *Applied Nanoscience* 5: 63-71. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13204-014-0292-7>.

CHENGZHENG, W., W. JIAZHI, C. SHUANGJIANG, M. K. SWAMY, U. R. SINNIAH, S. MOHD & A. UMAR, 2018. Biogenic synthesis, and characterization and evaluation of silver nanoparticles from *Aspergillus niger* JX556221 against human colon cancer cell line HT-29. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 18(5): 3673-3681. DOI: <https://doi.org/10.1166/jnn.2018.15364>.

CLOGSTON, J. D. & PATRI, A. K., 2010. Zeta potential measurements. In: *Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery* (MCNEIL, S. E.): 63-70. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-60327-198-1_6.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute, 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard. 2 ed. CLSI Document M27-A02. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard. 9 ed. CLSI Document M07-A09. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

DANAEI, M., DEGHANKHOLD, M., ATAIEI, S., DAVARANI, F. H., JAVANMARD, R., DOKHANI, A., KHORASANI, S. & MOZAFARI, M. R., 2018. Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. *Pharmaceutics* 10(2): 57-74. DOI: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020057>.

DAS, B., DASH, S. K., MANDAL, D., GHOSH, T., CHATTOPADHYAY, S., TRIPATHY, S., DAS, S., DEY, S. K., DAS, D. & ROY, S., 2017. Green synthesized silver nanoparticles destroy multidrug resistant bacteria via reactive oxygen species mediated membrane damage. *Arabian Journal of Chemistry* 10(6): 862-876. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2015.08.008>.

DEVI, L. S. & JOSHI, S. R., 2015. Ultrastructures of silver nanoparticles biosynthesized using endophytic fungi. *Journal of Microscopy and Ultrastructure* 3(1): 29-37. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jmau.2014.10.004>.

DISNER, G. R. & CESTARI, M. M., 2016. Nanociência & Nanotecnologia. *Revista Eletrônica Evidência* 16(1): 71-76.

DTU Environment, 2016. The Nanodatabase Project. Disponível em: <<<http://nanodb.dk/en/>>>. Acesso em 15 de agosto de 2018.

DURÁN, N., DURÁN, M., JESUS, M. B., SEABRA, A. B., FÁVARO, W. J. & NAKAZATO, G., 2016. Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 12(3): 789-799. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.11.016>.

DURÁN, N., P. D. MARCATO, G. I. H. DE SOUZA, O. L. ALVES & E. ESPOLITO, 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. DOI: <https://doi.org/10.1166/jbn.2007.022>.

EBRAHIMINEZHAD, A., ZARE-HOSEINABADI, A., SARMAH, A. K., TAGHIZADEH, S., GHASEMI, Y. & BERENJIAN, A., 2018. Plant-mediated synthesis and applications of iron nanoparticles. *Molecular Biotechnology* 60(2): 154-168. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12033-017-0053-4>.

ELGORBAN, A. M., AL-RAHMAH, A. N., SAYED, S. R., HIRAD, A., MOSTAFA, A. A. F., BAHKALI, A. H., 2016. Antimicrobial activity and green synthesis of silver nanoparticles using *Trichoderma viride*. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 30(2), 299–304. DOI: <https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1133255>.

EUGENIO, M., MÜLLER, N., FRASÉS, S., ALMEIDA-PAES, R., LIMA, L. M. T. R., LEMGRUBER, L., FARINA, M., SOUZA, W. & SANT'ANNA, C., 2016. Yeast-derived biosynthesis of silver/silver chloride nanoparticles and their antiproliferative activity against bacteria. *RSC Advances* 6: 9893-9904. DOI: <https://doi.org/10.1039/C5RA22727E>.

FANTI, J. R., PELLISIER-TOMIOTTO, F., MIRANDA-SAPLA, M. M. M., CATANEO, A. H. D., ANDRADE, C. G. T. J., PANIS, C., RODRIGUES, J. H. S., WOWK, P. F., KUCZERA, D., COSTA, I. N., NAKAMURA, C. V., NAKAZATO, G., DURÁN, N., PAVANELLI, W. R. & CONCHON-COSTA, I., 2018. Biogenic silver nanoparticles inducing *Leishmania amazonensis* promastigote and amastigote death *in vitro*. *Acta Tropica* 178: 46-54. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.10.027>.

FERNÁNDEZ, J. G., FERNÁNDEZ-BALDO, M. A., BERNI, E., CAMÍ, G., DURÁN, N., RABA, J. & SANZ, M. I., 2016. Production of silver nanoparticles using yeasts and

evaluation of their antifungal activity against phytopathogenic fungi. *Process Biochemistry* 51(9): 1306-1313. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.05.021>.

FISCHER, J., LOPES, V. S., SANTOS, E. F. Q., GUIDINI, C. Z., RAMADAN, L., FILHO, U. C. & CARDOSO, V. L., 2015. Purificação de complexo celulolítico de *Aspergillus niger* usando sistema aquoso de duas fases com PEG-citrato. *Blucher Chemical Engineering Proceedings* 1: 532-539. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/chemeng-cobeq2014-0375-25781-164660>.

FLORES-LÓPEZ, L. Z., ESPINOZA-GOMÉZ, H. & SOMANATHAN, R., 2018. Silver nanoparticles: electron transfer, reactive oxygen species, oxidative stress, beneficial and toxicological effects – a mini review. *Journal of Applied Toxicology* 39(1): 16-26. DOI: <https://doi.org/10.1002/jat.3654>.

FRISVAD, J. C. & LARSEN, T. O., 2015. Chemodiversity in the genus *Aspergillus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99(19): 7859-7877. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6839-z>.

GHOLAMI-SHABANI, M., AKBARZADEH, A., NOROUZIAN, D., AMINI, A., GHOLAMI-SHABANI, Z., IMANI, A., CHIANI, M., RIAZI, G., SHAMS-GHAHFAROKHI, M. & RAZZAGHI-ABYANEH, M., 2014. Antimicrobial activity and physical characterization of silver nanoparticles green synthesized using nitrate reductase from *Fusarium oxysporum*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 172(8): 4084-4098. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12010-014-0809-2>.

GNANAJOBITHA, G., PAULKUMAR, K., VANAJA, M., RAJESHKUMAR, S., MALARKODI, C., ANNADURAI, G. & KANNAN, C., 2013. Fruit-mediated synthesis of silver nanoparticles using *Vitis vinifera* and evaluation of their antimicrobial efficacy. *Journal of Nanostructure in Chemistry* 6: 67. DOI: <https://doi.org/10.1186/2193-8865-3-67>.

GUILGER, M., PASQUOTO-STIGLIANI, T., BILESKY-JOSE, N., GRILLO, R., ABHILASH, P. C., FRACETO, L. F. & LIMA, R., 2017. Biogenic silver nanoparticles based on trichoderma harzianum: synthesis, characterization, toxicity evaluation and biological activity. *Nature Scientific Reports* 7: 44421. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep44421>.

HADRUP, N. & LAM, H. R., 2014. Oral toxicity of silver ions, silver nanoparticles and colloidal silver – a review. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 68(1): 1-7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2013.11.002>.

HANDOKO, C. T., HUDA, A. & GULO, F., 2019. Synthesis Pathway and Powerful Antimicrobial Properties of Silver Nanoparticle: A Critical Review. *Asian Journal of Scientific Research* 12(1): 1-17. DOI: <http://dx.doi.org/10.3923/ajs.2019.1.17>.

HARRA, J., JUUTI, P., HAAPANEN, J., SORVALI, M., ROUMELI, E. HONKANEN, M., VIPPOLA, M., YLI-OJANPERA, J. & MAKELA, J. M., 2015. Coating of silica and titania aerosol nanoparticles by silver vapor condensation. *Aerosol Science and Technology* 49(9): 767-776. DOI: <https://doi.org/10.1080/02786826.2015.1072263>.

HASAN, H., RAHIM, M. H. A., CAMPBELL, L., CARTER, D., ABBAS, A. & MONTOYA, A., 2019. Improved lovastatin production by inhibiting (+)-geodin biosynthesis in *Aspergillus terreus*. *New Biotechnology* 52(25): 19-24. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2019.04.003>.

HASSAN, M. H. A., MOHARRAM, A. M., ISMAIL, M. A. & SHOREIT, A. M., 2015. Biogenic silver nanoparticles of resistant *Aspergillus flavus* AUMC 9834 against some pathogenic microorganisms and its synergetic effect with the antifungal fluconazole. *Journal of Basic and Applied Mycology (Egypt)* 6: 1-7.

HEMLINGER, J., SENGSTOCK, C., GROB-HEITFELD, C., MAYER, C., SCHILDHAUER, T. A., KÖLLER, M. & EPPL, M., 2016. Silver nanoparticles with different size and shape: equal cytotoxicity, but different antibacterial effects. *RSC Advances* 6: 18490-18501. DOI: <https://doi.org/10.1039/C5RA27836H>.

HOLE, P., SILLENCE, K., HANNELL, C., MAGUIRE, C. M., ROESSLEIN, M., SUAREZ, G., CAPRACOTTA, S., MAGDOLENOVA, Z., HOREV-AZARIA, L., DYBOWSKA, A., COOKE, L., HAASE, A., CONTAL, S., MANØ, S., VENNEMANN, A., SAUVAIN, J. J., STAUNTON, K. C., ANGUISSOLA, S., LUCH, A., DUSINSKA, M., KORENSTEIN, R., GUTLEB, A. C., WIEMANN, M., PRINAMELLO, A., RIEDIKER, M. & WICK, P., 2013. Interlaboratory comparison of size measurements on nanoparticles using nanoparticle tracking analysis (NTA). *Journal of Nanoparticle Research* 15: 2101. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11051-013-2101-8>.

HORCAS, I. & FERNÁNDEZ, R., 2007. WSXM: A software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology. *Review of Scientific Instruments* 78: 013705. DOI: <https://doi.org/10.1063/1.2432410>.

HULIKERE, M. M. & JOSHI, C. G., 2019. Characterization, antioxidant and antimicrobial activity of silver nanoparticles synthesized using marine endophytic fungus *Cladosporium cladosporioides*. *Process Biochemistry*. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.04.011> (no prelo).

HUSSEINY, S. M., SALAH, T. A. & ANTER, H. A., (2015). Biosynthesis of size controlled silver nanoparticles by *Fusarium oxysporum*, their antibacterial and antitumor activities. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Science* 4(3): 225–231. <http://doi.org/10.1016/j.bjbas.2015.07.004>.

INIYAN, A. M., KANNAN, R. R., JOSEPH, F. J. R. S., MARY, T. R. J., RAJASEKAR, M., SUMY, P. C., RABEL, A. M., RAMACHANDRAN, D. & VINCENT, S. G. P., 2017. In vivo safety evaluation of antibacterial silver chloride nanoparticles from *Streptomyces exfoliatus* ICN25 in zebrafish embryos. *Microbial Pathogenesis* 112: 76-82. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.07.054>.

IRAVANI, S., KORBKANDI, H., MIRMOHAMMADI, S. V. & ZOLFAGHARI, B., 2014. Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods. *Research in Pharmaceutical Sciences* 9(6): 385-406.

KALYANI, P., LAKSHIMI, B. K. M., DINESH-REDDY, G. & HEMALATHA, K. P. J., 2018. Green synthesis of silver nanoparticles by using *Aspergillus fumigatus* and

their antibacterial activity. *International Journal of Current Research in Life Sciences* 7(1): 788-791.

KALYANI, P., LAKSHMI, B. K. M., DINESH-REDDY, G. & HEMALATHA, K. P. J., 2018. Green synthesis of silver nanoparticles by using *Aspergillus fumigatus* and their antibacterial activity. *International Journal of Current Research in Life Sciences* 7(1): 788-791.

KASHYAP, P. L., KUMAR, S., SRIVASTAVA, A. K. & SHARMA, A. K., 2013. Myconanotechnology in agriculture: a perspective. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 29(2): 191–207. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1171-6>.

KEAT, C. L., AZIZ, A., EID, A. M. & ELMARZUGI, N. A., 2015. Biosynthesis of nanoparticles and silver nanoparticles. *Bioresources and Bioprocessing* 2(47): 11 p. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40643-015-0076-2>.

KLICH, M.A. & PITT, I., 1988. A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs. New South Wales, Australia: CSIRO, North Ryde. 116 p.

KOCSUBÉ, S., PERRONE, G., MAGISTÀ, D., HOUBRAKEN, J., VARGA, J., SZIGETI, G., HUBKA, V., HONG, S. B., FRISVAD, J. C. & SAMSON, R. A., 2016. *Aspergillus* is monophyletic: evidence from multiple gene phylogenies and extrolites profiles. *Studies in Mycology* 85: 199-213. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2016.11.006>.

KOHSARI, I., MOHAMMAD-ZADEH, M., MINAEIAN, S., REZAEI, M., BARZEGARI, A., SHARIATINIA, Z., KOUDEHI, M. F., MIRSADEGHI S. & POURMORTAZAVI, S. M., 2019. In vitro antibacterial property assessment of silver nanoparticles synthesized by *Falcaria vulgaris* aqueous extract against MDR bacteria. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*: 1-10. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10971-019-04961-0>.

KORBKANDI, H., ASHARI, Z., IRAVANI, S. & ABBASI, S., 2013. Optimization of biological synthesis of silver nanoparticles using *Fusarium oxysporum*. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 12(3): 289–298.

KORBKANDI, H., MOHSENI, S., JOUNEGHANI, R. M., POURHOSSEIN, M. & IRAVANI, S., 2014. Biosynthesis of silver nanoparticles using *Saccharomyces cerevisiae*. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* 44: 235-239. DOI: <https://doi.org/10.3109/21691401.2014.937870>.

KUMAR, S. D., SINGARAVELU, G., AJITHKUMAR, S., MURUGAN, K., NICOLETTI, M. & BENELLI, G., 2017. Mangrove-mediated green synthesis of silver nanoparticles with high HIV-1 reverse transcriptase inhibitory potential. *Journal of Cluster Science* 28(1): 359-367. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10876-016-1100-1>.

LATEEF, A. & ADEEYO, A. O., 2015. Green synthesis and antibacterial activities of silver nanoparticles using extracellular laccase of *Lentinus edodes*. *Notulae Scientia Biologicae*, 7(4), 405–411. DOI: <http://dx.doi.org/10.15835/nsb749643>.

LEE, S. H. & JUN, B. H., 2019. Silver Nanoparticles: Synthesis and Application for Nanomedicine. *International Journal of Molecular Sciences* 20(4): 865-889. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms20040865>.

MADBOULY, A. K., ABDEL-AZIZ, M. S. & ABDEL-WAHHAB, M. A., 2017. Biosynthesis of nanosilver using *Chaetomium globosum* and its application to control *Fusarium* wilt of tomato in the greenhouse. *IET Nanobiotechnology* 11(6): 702-708. DOI: <https://doi.org/10.1049/iet-nbt.2016.0213>.

MAJEED, S., ABDULLAH, M. S., DASH, G. K., ANSARI, M. T. & NANDA, A., 2016. Biochemical synthesis of silver nanoparticles using filamentous fungi *Penicillium decumbens* (MTCC-2494) and its efficacy against A-549 lung cancer cell line. *Chinese Journal of Natural Medicines* 14(8): 615-620. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(16\)30072-3](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(16)30072-3).

MALISZEWSKA, I., JURASZEK, A. & BIELSKA, K., 2014. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using Ascomycota fungi *Penicillium nalgiovense* AJ12. *Journal of Cluster Science*, 25(4), 989–1004. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10876-013-0683-z>.

MANIMOZHI, R. & R. ANITHA, 2014. Mycosynthesis of silver nanoparticles using aqueous extract of *Aspergillus flavus* mycelium and its characterization. *International Journal of Pharmaceutics and Drug Analysis* 2(9): 734-739.

MANNA, D. K., MANDAL, A. K., SEN, I. K., MAJI, P. K., CHAKRABOTI, S., CHAKRABORTY, R. & ISLAM, S. S., 2015. Antibacterial and DNA degradation potential of silver nanoparticles synthesized via green route. *International Journal of Biological Macromolecules* 80: 455-459. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.07.028>.

MELO JR., M. A., SANTOS, L. S. S., GONÇALVES, M. C. & NOGUEIRA, A. F., 2012. Preparação de nanopartículas de prata e ouro: um método simples para a introdução de nanociência em laboratórios de ensino. *Química Nova* 35(9): 1872-1878. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422012000900030>.

MLALILA, N. G., H. S. SWAI, A. HILONGA & D. M. KADAM, 2016. Antimicrobial dependence of silver nanoparticles on surface plasmon resonance bands against *Escherichia coli*. *Nanotechnology Science and Application* 10: 1-9. DOI: <http://dx.doi.org/10.2147/NSA.S123681>.

MOHANTA, Y. K., SINGDEVSACHAN, S. K., PARIDA, U. K., PANDA, S. K., MOHANTA, T. K. & BAE, H., 2016. Green synthesis and antimicrobial activity of silver nanoparticles using wild medicinal mushroom *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. from Similipal Biosphere Reserve, Odisha, India. *IET Nanobiotechnology* 10(4): 184-189. DOI: <https://doi.org/10.1049/iet-nbt.2015.0059>.

MORENO-GONZÁLEZ, G., MESONES, A. R., TAZI-MEZALEK, R., MARRON-MOYA, M. T., ROSELL, A. & MAÑEZ, R., 2016. Invasive pulmonary aspergillosis with disseminated infection in immunocompetent patient. *Canadian Respiratory Journal* 7984032: 5 pp. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2016/7984032>.

MUKHERJI, S., BHARTI, S., SHUKLA, G. & MUKHERJI, S., 2018. Synthesis and characterization of size- and shape-controlled silver nanoparticles. *Physical Sciences Reviews* 4(1): 20170082. DOI: <https://doi.org/10.1515/psr-2017-0082>.

MURUGAN, K., SAMIDOSS, C. M., PANEERSELVAM, C., HIGUCHI, A., RONI, M., SURESH, U., CHANDRAMOHAN, B., SUBRAMANIAM, J., MADHIYAZHAGAN, P., DINESH, D., RAJAGANESH, R., ALARFAJ, A. A., NICOLETTI, M., KUMAR, S., WEI, H., CANALE, A., MEHLHORN, H. & BENELLI, G., 2015. Seaweed-synthesized silver nanoparticles: an eco-friendly tool in the fight against *Plasmodium falciparum* and its vector *Anopheles stephensi*?. *Parasitology Research* 114(1): 4087-4097. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4638-1>.

NAWAZ, M. P., MOHAMED, S. R., PALANIVELU, M., RAFI, M. & AYESHAMARIAM, A., 2019. Studies on synthesis and characterization of Silver nanoparticles from *Cassia auriculata* and their effect on biological applications. *Journal of Nanoscience Nanoengineering and Applications* 9: 35-48.

NEETHU, S., MIDHUN, S. J., RADHAKRISHNAN, E. K. & JYOTHIS, M., 2018. Green synthesized silver nanoparticles by marine endophytic fungus *Penicillium polonicum* and its antibacterial efficacy against biofilm forming, multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Microbial Pathogenesis* 116: 263-272. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.01.033>.

OGAR, A., TYLKO, G. & TURNAU, K., 2015. Antifungal properties of silver nanoparticles against indoor mould growth. *Science of The Total Environment* 521-522: 305-314. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.03.101>.

PADALIA, H., MOTERIYA, P. & CHANDA, S. (2014). Green synthesis of silver nanoparticles from marigold flower and its synergistic antimicrobial potential. *Arabian Journal of Chemistry* 8(5): 732-741. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.11.015>.

PAIVA, F. C., ALECRIM, M. M., TEIXEIRA, M. F. S., KIRSCH, L. S. & JESUS, R. S., 2015. Produção de hidrolisado proteico de piracucu utilizando-se protease de *Aspergillus flavo-furcatis* e pancreatina. *Pesquisa Agropecuária Tropical* 45(1): 89-96. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1983-40632015v4529838>.

PAPADAKI, D., KIRIAKIDIS, G. & TSOUTSOS, T., 2018. Applications of nanotechnology in construction industry. In: *Fundamentals of Nanoparticles: classifications, synthesis methods, properties and characterization* (BARHOUM, A. & MAKHLOUF, A. S. H.): 343-370. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-51255-8.00011-2>.

PARK, H. S., JUN, S. C., HAN, K. H., HONG, S. B. & YU, J. H., 2017. Diversity, application, and synthetic biology of industrially important *Aspergillus* fungi. *Advances in Applied Microbiology* 100: 161-202. DOI: <https://doi.org/10.1016/bs.aams.2017.03.001>.

PASSOS, A. F. & AGOSTINI, F. S., 2011. Conjuntivite neonatal com ênfase na sua prevenção. *Revista Brasileira de Oftalmologia* 70(1): 57-67.

PATRA, S., MUKHERJEE, S., BARUI, A. K., GANGULY, A., SREEDHAR, B. & PATRA, C. R., 2015. Green synthesis characterization of gold and silver nanoparticles and their potential application for cancer therapeutics. *Materials Science and Engineering: C* 53(1): 298-309. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.04.048>.

PELGRIFT, R. Y. & FRIEDMAN, A. J., 2013. Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance. *Advanced Drug Delivery Reviews* 65(13-14): 1803-1815. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.07.011>.

POLTE, J., 2015. Fundamental growth principles of colloidal metal nanoparticles – a new perspective. *CrystEngComm* 17: 6809-6830. DOI: <https://doi.org/10.1039/C5CE01014D>.

PRADO, F. B., W. C. ROCHA, S. R. MARTIM, M. M. ALECRIM, L. P. SILVA, L. S. C. SILVA, T. A. SILVA & M. F. S. TEIXEIRA, 2017. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi: Ciências Naturais* 12(1): 37-47.

PRAHBU, S. & POULOSE, E. K., 2012. Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. *International Nano Letters* 2(32): 10 p. DOI: <https://doi.org/10.1186/2228-5326-2-32>.

PRAVEENA, S. M., HAN, L. S., THAN, L. T. L. & ARIS, A. Z., 2015. Preparation and characterisation of silver nanoparticle coated on cellulose paper: evaluation of their potential as antibacterial water filter. *Journal of Experimental Nanoscience* 11(17): 1307-1319. DOI: <https://www.doi.org/10.1080/17458080.2016.1209790>.

QUINTEROS, M. A., ARISTIZÁBAL, V. C., DALMASSO, P. R., PARAJE, M. G. & PÁEZ, P. L., 2016. Oxidative stress generation of silver nanoparticles in three bacterial genera and its relationship with the antimicrobial activity. *Toxicology in Vitro* 36: 216-223. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.08.007>.

RADZIG, M. A., NADTOCHENKO, V. A., KOKSHAROVA, O. A., KIWI, J., LIPASOVA, V. A. & KHMEL, I. A., 2013. Antibacterial effects of silver nanoparticles on gram-negative bacteria: influence on the growth and biofilms formation and mechanisms of action. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 102: 300-306. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.07.039>.

RAI, M., KON, K., INGLE, A., DURÁN, N., GALDIERO, S. & GALDIERO, M., 2014. Broad-spectrum bioactivities of silver nanoparticles: the emerging trends and future prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98(5): 1951-1961. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5473-x>.

RAI, M., YADAV, A. & GADE, A., 2009. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances* 27: 76-83. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.09.002>.

RAPER, K. B. & D.I. FENNEL, 1977. *The genus Aspergillus*. Robert E. Krieger Publishing Co. Huntington, New York. 686 p.

RESEARCH AND MARKETS, 2018. Global nanotechnology market (by component and applications), funding and investment, patent analysis and 27 companies profile & recent development: forecast to 2024. Relatório técnico. Disponível em: <<https://www.researchandmarkets.com/research/zc7qgf>>. Acesso em 14 de julho de 2018.

ROLIM, W. R., M. T. PELEGRINO, B. A. LIMA, L. S. FERRAZ, F. N. COSTA, J. S. BERNARDES, T. RODRIGUES, M. BROCCCHI & A. B. SEABRA, 2018. Green tea extract mediated biogenic synthesis of silver nanoparticles: characterization, cytotoxicity evaluation and antibacterial activity. *Applied Surface Science* 463(1): 66-74. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2018.08.203>.

SAMSON, R. A., VISAGIE, C. M., HOUBRAKEN, J., HONG, S. B., HUBKA, V., KLAASSEN, C. H. W., PERRONE, G., SEIFERT, K. A., SUSCA, A., TANNEY, J. B., VARGA, J., KOCSUBÉ, S., SZIGETI, G., YAGUCHI, T. & FRISVAD, J. C., 2014. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology* 78: 141-173. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.07.004>.

SANT'ANNA, L. S., ALENCAR, M. S. M. & FERREIRA, A. P., 2013. Patenteamento em nanotecnologia no Brasil: desenvolvimento, potencialidades e reflexões para o meio ambiente e a saúde humana. *Química Nova* 36(2): 348-353. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422013000200024>.

SARAVANAN, M., BARIK, S. K., MUBARAK-ALI, D., PRAKASH, P. & PUGAZHENDHI, A., 2018. Synthesis of silver nanoparticles from *Bacillus brevis* (NCIM 2533) and their antibacterial activity against pathogenic bacteria. *Microbial Pathogenesis* 116: 221-226. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.01.038>.

SCHAMING, D. & REMITA, H., 2015. Nanotechnology: from ancient time to nowadays. *Foundations of Chemistry* 17(3): 187-205. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10698-015-9235-y>.

SCHRÖFEL, A., KRATOŠOVÁČ, G., ŠAFAŘÍKA, I., ŠAFAŘÍKOVÁ, M., RAŠKAE, I. & SHOR, L. M., 2016. Applications of biosynthesized metallic nanoparticles – a review. *Acta Biomaterialia* 10(10): 4023-4042. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.05.022>.

SIDDIQI, K. S. & HUSEN, A., 2016. Fabrication of metal nanoparticles from fungi and metal salts: scope and application. *Nanoscale Research Letters* 11: 98. DOI: <https://doi.org/10.1186/s11671-016-1311-2>.

SIDDIQI, K. S., HUSEN, A. & RAO, R. A. K., 2018. A review on biosynthesis of silver nanoparticles and their biocidal properties. *Journal of Nanobiotechnology* 16(14): 28 p. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0334-5>.

SILVA, T. A., 2017. Avaliação do potencial nanotecnológico de *Aspergillus* do bioma amazônico. Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte) – Universidade Federal do Amazonas. 131 f.

SILVA, T.A., P. F. ANDRADE, K. SEGALA, L. S. C. SILVA, L. P. SILVA, S. V. G. NISTA, L. H. I. MEI, N. DURÁN & M. F. S. TEIXEIRA, 2017. Silver nanoparticles biosynthesis and impregnation in cellulose acetate membrane for anti-yeast therapy. *African Journal of Biotechnology* 16(27): 1490-1500. DOI: <https://doi.org/10.5897/AJB2017.16024>.

SONAR, H., NAGAONKAR, D., INGLE, A. P. & RAI, M., 2017. Mycosynthesized silver nanoparticles as potent growth inhibitory agents against selected waterborne human pathogens. *Clean – Soil Air Water* 45(4): 1600247. DOI: <https://doi.org/10.1002/clen.201600247>.

SONKER, A. S., RICHA, J. P., KANNAUJIYA, V. K. & SINHA, R. P., 2017. Characterization and in vitro antitumor, antibacterial and antifungal activities of green synthesized silver nanoparticles using cell extract of *Nostoc* sp. strain HKAR-2. *Canadian Journal of Biotechnology* 1(1): 26-37. DOI: <https://doi.org/10.24870/cjb.2017-000103>.

SOUSA, C. R. S., HOLANDA, A. L., NUNES, A. B. A., ALVES, G. S. A. & SAMPAIO, M. C., 2018. Nanotecnologia e Nanociência: considerações histórica e interdisciplinar. *Hegemonia – Revista Eletrônica do Programa de Mestrado em Direitos Humanos, Cidadania e Violência/Ciência Política do Centro Universitário Unieuro* 25: 150-178.

SRIKAR, S. K., GIRI, D. D., PAL, D. B., MISHRA, P. K. & UPADHYAY, S. N., 2016. Green Synthesis of Silver Nanoparticles: A Review. *Green and Sustainable Chemistry* 6: 34-56. DOI: <http://dx.doi.org/10.4236/gsc.2016.61004>.

SUMAN, T. Y., RAJASREE, S. R. R., KANCHANA, A. & ELIZABETH, S. B., 2013. Biosynthesis, characterization and cytotoxic effect of plant mediated silver nanoparticles using *Morinda citrifolia* root extract. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 106: 74-78. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.01.037>.

SURUDŽIĆ, R., JANKOVIĆ, A., VUKAŠINOVIĆ-SEKULIĆ, M., PERIĆ-GRUJIĆ, A., RHEE, K. Y. & MIŠKOVIĆ-STANKOVIĆ, V., 2017. Optimization of the electrochemical synthesis of silver nanoparticles in poly(vinyl alcohol) colloid solutions. *Bulgarian Chemical Communications* 49: 186-193.

TAMBORINI, A., ROBERTSON, E., TALBOT, J. J. & BARRS, V. R., 2016. Sinusitis aspergillosis in a British shorthair cat in the UK. *Journal of Feline Medicine and Surgery Open Reports* 2. DOI: <https://doi.org/10.1177%2F2055116916653775>.

THAKKAR, K. N., MHATRE, S. S., RASESH, Y. & PARIKH, R. Y., 2010. Biological synthesis of metallic nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 6(2): 257-262. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nano.2009.07.002>.

TIPPAYAWAT, P., PHROMVIYO, N., BOUEROY, P. & CHOMPOOSOR, A., 2016. Green synthesis of silver nanoparticles in *Aloe vera* plant extract prepared by a hydrothermal method and their synergistic antibacterial activity. *PeerJ – Life & Environment* 4: 1–15.

TOH, H. S., JURKSCHAT, K. & COMPTON, R. G., 2015. The influence of the capping agent on the oxidation of silver nanoparticles: nano-impacts versus stripping voltammetry. *Chemistry European Journal* 21: 2998-3004. DOI: <https://doi.org/10.1002/chem.201406278>.

VALCHEVA-TRAYKOVA, M., BOCHEVA, G., RAZMIROV, S., KARASHANOVA, D. & TRAYKOV, T., 2018. Antioxidant effect of green synthesized silver nanoparticles on moderate local heat burn injury. *Bulgarian Chemical Communications* 50: 225-230.

VAMANU, E., 2016. Bioactive capacity of some Romanian wild edible mushrooms consumed mainly by local communities. *Natural Product Research* 32(4): 440-443. DOI: [10.1080/14786419.2017.1308365](https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1308365).

VERMA, S., RAO, B. T., SRIVASTAVA, A. P., SRIVASTAVA, D., KAUL, R & SINGH, B., 2017. A facile synthesis of broad plasmon wavelength tunable silver nanoparticles in citrate aqueous solutions by laser ablation and light irradiation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 527: 23-33. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.05.003>.

VIJAYAN, S., KOILAPARAMBIL, D., GEORGE, T. K. & SHAIKMOIDEEN, J. M., 2016. Antibacterial and cytotoxicity studies of silver nanoparticles synthesized by endophytic *Fusarium solani* isolated from *Withania somnifera* (L.). *Journal of Water and Environmental Nanotechnology* 1(2): 91-103. DOI: <https://dx.doi.org/10.7508/jwent.2016.02.003>.

VYSHNAVA, S. S., KANDERI, D. K., PANJALA, S. P., PANDIAN, K., BONTHA, R. R., GOUKANAPELLE, P. K. R. & BANAGANAPALLI, B., 2016. Effect of silver nanoparticles against the formation of biofilm by *Pseudomonas aeruginosa* an in silico approach. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 180(3): 426-437. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2107-7>.

XU, H., QU, F., XU, H., LAI, W., WANG, A., AGUILAR, Z. P. & WEI, H., 2012. Role of reactive oxygen species in the antibacterial mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli* O157:H7. *BioMetals* 25: 45-53. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10534-011-9482-x>.

YAMADA, M., FOOTE, M. & PROW, T. W., 2014. Therapeutic gold, silver and platinum nanoparticles. *WIREs Nanomedicine and Nanotechnology* 7: 428-445. DOI: <https://doi.org/10.1002/wnan.1322>.

YANG, L., LÜBECK, M. & LÜBECK, P. S., 2017. *Aspergillus* as a versatile cell factory for organic acid production. *Fungal Biology Reviews* 31(1): 33-49. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2016.11.001>.

YUAN, Z., LI, J., CUI, L., XU, B., ZHANG, H. & YU, C. P., 2013. Interaction of silver nanoparticles with pure nitrifying bacteria. *Chemosphere* 90(4): 1404-1411. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.08.032>.

ZAIN, N. M., STAPLEY, A. G. F. & SHAMA, G., 2014. Green synthesis of silver and copper nanoparticles using ascorbic acid and chitosan for antimicrobial applications. *Carbohydrate Polymers* 112: 195-202. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.05.081>.

ZAYNITDINOVA, L., VOKHIDOVA, N., TASHPULATOV, J., KUKANOVA, S. ASHUROV, N. & JURAEVA, R., 2017. Microorganisms-producers of nanoparticles of silver. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 3(1): 1-5.

ZEWDE, B., AMBAYE, A., STUBBS, J. & RAGHAVAN, D., 2016. A review of stabilized silver nanoparticles – synthesis, biological properties, characterization, and potential areas of applications. *JSM Nanotechnology and Nanomedicine* 4(2): 1043.

ZHANG, J., CHAKER, M. & MA, D., 2017. Pulsed laser ablation based synthesis of colloidal metal nanoparticles for catalytic applications. *Journal of Colloid and Interface Science* 498(1): 138-149. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2016.07.050>.

ZHAO, X., L. ZHOU, M. S. R. RAJOKA, L. YAN, C. JIANG, D. SHAO, J. ZHU, J. SHI, Q. HUANG, H. YANG & M. JIN, 2017. Fungal silver nanoparticles: synthesis, application and challenges. *Critical Reviews on Biotechnology* 38(6): 817-835. DOI: <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1414141>.

ZHOU, W., LIU, Y. L., STALLWORTH, A. M., YE, C. & LENHART, J. J., 2016. *Environmental Science and Technology* 50(22): 12214-12224. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b03237>.

ZOMORODIAN, K., POURSHAHID, S., SADATSHARIFI, A., MEHRYAR, P., PAKSHIR, K., RAHIMI, M. J. & MONFARED, A. A., 2016. Biosynthesis and characterization of silver nanoparticles by *Aspergillus* species. *BioMed Research International* 2016: 5435397. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2016/5435397>.

ANEXOS

Anexo 1. Comprovante de submissão do artigo “Síntese verde de nanopartículas de prata intermediada por fungo anamórfico e eficácia antibacteriana e antifúngica” para a revista “Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi: Ciências Naturais”.

Submissão de Manuscrito

8 mensagens

Dib Gomes <dibmady@gmail.com>
Para: boletim.naturais@museu-goeldi.br

25 de janeiro de 2019

Prezado editor,

Encaminho a solicitação de submissão do artigo científico cujas informações seguem abaixo:

Título: Síntese verde de nanopartículas de prata intermediada por fungo anamórfico e eficácia antibacteriana e antifúngica

Autor principal: Dib Mady Diniz Gomes

Demais autores: Nelson Durán, Amedea Barozzi Seabra, Larissa de Paiva Silva, Fabiano Brito Prado, Taciana de Amorim Silva e Maria Francisca Simas Teixeira.

Autor para correspondência: Dib Mady Diniz Gomes.

Endereço: Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brasil. Av. General Rodrigo Otávio Jordão Ramos, 6200 – Coroado I, Manaus, AM, Brasil. CEP 69080-900. **Telefone para contato** (92) 98101-3342

E-mail: dibmady@gmail.com


Link para acessar as figuras do trabalho no OneDrive:


<https://1drv.ms/fs!sIAIS9vNYMHFBA2Fy1gOZ824HDXBS>


Aguardo resposta.

Grato,
Dib Gomes.

3 anexos

 Dib Gomes - Síntese verde Aspergillus flavo-furcatis e atividade antimicrobiana.docx
44K

 Dib Gomes - Responsabilidade Inclusão Coautores.pdf
101K

 Dib Gomes - Figuras - Síntese verde Aspergillus flavo-furcatis e atividade antimicrobiana.docx
3143K

Boletim Naturais <boletim.naturais@museu-goeldi.br>
Para: Dib Gomes <dibmady@gmail.com>

28 de janeiro de 2019

Prezado Dib,

Obrigado pela mensagem e desculpe pela demora para responder.

Recebi os arquivos. Agradecemos seu interesse em contribuir com seu trabalho para o Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi-Ciências Naturais. Você poderia, por favor, enviar uma lista contendo o nome e e-mail de seis possíveis avaliadores?

Atenciosamente,

Fernando Carvalho Filho