



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
E RECURSOS PESQUEIROS



ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA DE *Trichoderma*
SOBRE *Aeromonas* spp. PROVENIENTES DE PISCICULTURA

KELVEN WLADIE DOS SANTOS ALMEIDA COELHO

MANAUS

2020

KELVEN WLADIE DOS SANTOS ALMEIDA COELHO

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA DE *Trichoderma*
SOBRE *Aeromonas* spp. PROVENIENTES DE PISCICULTURA

Orientador: Gustavo Yomar Hattori, Dr.

Coorientadores: Pedro de Queiroz Costa Neto, Dr.

Cheila de Lima Boijink, Dra.

José Odair Pereira, Dr.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros da Universidade Federal do Amazonas como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros, área de concentração em Produção Animal.

MANAUS

2020

Ficha Catalográfica

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

C672a Coelho, Kelven Wladie dos Santos Almeida
Atividade antibacteriana de nanopartículas de prata de
Trichoderma sobre Aeromonas spp. provenientes de piscicultura /
Kelven Wladie dos Santos Almeida Coelho. 2020
64 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Gustavo Yomar Hattori
Orientador: Pedro de Queiroz Costa Neto
Coorientadora: Cheila de Lima Boijink
Coorientador: José Odair Pereira
Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Recursos
Pesqueiros) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Nanotecnologia. 2. Miconanotecnologia. 3. Micossíntese. 4.
Síntese verde. I. Hattori, Gustavo Yomar. II. Universidade Federal
do Amazonas III. Título


KELVEN WLADIE DOS SANTOS ALMEIDA COELHO

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA DE *Trichoderma*
SOBRE *Aeromonas* spp. PROVENIENTES DE PISCICULTURA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros da Universidade Federal do Amazonas como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros, área de concentração em Produção Animal.

Aprovado em 28 de dezembro de 2020.

BANCA EXAMINADORA



Dr. Pedro de Queiroz Costa Neto, Presidente
Universidade Federal do Amazonas



Dr. José de Ribamar da Silva Nunes, Membro
Universidade Federal do Amazonas



Dr.ª Aline Christien de Figueiredo Rondon, Membro
Escola Superior Batista do Amazonas

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus pela vida, pela força e esperança de que tudo no final é recompensado. A toda a minha família que juntamente com Deus são sempre a base de tudo.

À FAPEM pelo aporte financeiro (Resolução N.º 002/2018 - POSGRAD 2018 – UFAM).

Ao meu Orientador Prof. Dr. Pedro de Queiroz Costa Neto pela orientação recebida desde os tempos de graduação, amizade e confiança, sobretudo o incentivo em fazer pesquisa.

Em especial ao meu novo Orientador Dr. Gustavo Yomar Hattori, pela disponibilidade em aceitar, por ocasião da fusão dos dois programas de pós-graduação, a orientação nesse trabalho.

Aos meus Coorientadores, Dra. Cheila de Lima Boijink e Prof. Dr. José Odair Pereira.

À Dra. Cláudia Majolo pelas cepas de *Aeromonas* spp. fornecidas, sendo bastante acessível e atenciosa ao ajudar um mestrando desesperado, meu muitíssimo obrigado.

Agradecimento especial à Prof.^a Dra. Maria Francisca Simas Teixeira por ter disponibilizado a estrutura do seu laboratório para realização de análises deste trabalho, à Dra. Taciana de Amorim Silva pelo profissionalismo, conhecimento repassado, esclarecimento de dúvidas e grande ajuda nas análises realizadas. À Prof.^a Dra. Tatiane Pereira de Sousa pela disponibilidade de realização das análises de DLS em seu laboratório.

Não poderia deixar de agradecer aos amigos que mantenho desde a graduação e que contribuem significativamente nos momentos de descontração: Mozanil Pantoja, Tayanne Lopes, Aline Lima, Ananda Vieira, Thalita Caroline, Mylla Perdigão, Patrícia Cruz e especialmente à Adrea Carvalho e ao Leandro Maquiné pelas grandes contribuições na execução desta pesquisa.

Agradeço também à força tarefa do Laboratório de Princípios Bioativos de Origem Microbiana que mesmo diante das barreiras, nunca desistem dos seus objetivos.

Serei eternamente grato por toda a ajuda que recebi de cada um de vocês.

RESUMO

A nanociência estuda fenômenos que ocorrem em escala nanométrica. A nanotecnologia por sua vez é a aplicação da nanociência na obtenção e estudo de materiais nanométricos. Dentre estes nanomateriais, estão as nanopartículas de prata que possuem as mais diversas aplicações, sendo a atividade antimicrobiana a mais comumente difundida em tempos onde a resistência antimicrobiana é considerada um problema grave. Estas nanopartículas podem ser obtidas a partir de síntese química, física e biológica, sendo esta última mais vantajosa se compararmos com as demais pois é considerada ecologicamente correta por ser menos poluente e de baixo custo. Este estudo teve como objetivo avaliar o potencial de quatro linhagens de *Trichoderma* em biossintetizar nanopartículas de prata. Foram avaliadas as linhagens *Trichoderma brevicompactum* P16D2, *T. harzianum* P4A, *T. inhamatum* P21C e *T. tomentosum* P14C2. O fungo *T. harzianum* P4A foi o mais eficiente, sendo detectada a mudança de coloração do filtrado micelial a partir de 24h. A mudança de coloração dos demais ocorreu a partir de 72h de biossíntese. A caracterização parcial foi realizada, e foram detectadas bandas de ressonância de plasmon de superfície com picos de 405 e 425 nm. A análise de DLS foi realizada apenas com a solução coloidal de *T. harzianum* P4A e *T. inhamatum* P21C, onde o tamanho hidrodinâmico foi de 72,22 e 73,82 nm; potencial zeta de -29,3 e -8,03 mV e índice de polidispersividade de 0,256 e 0,357, respectivamente. Foi realizado teste antibacteriano com a solução coloidal de nanopartículas dos quatro fungos contra quinze cepas de *Aeromonas* spp. obtidas lesões de pele e rim de tabaqui, e cepas de referência ATCC, sendo estas *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. As maiores zonas de inibição foram de 10,19 e 14,43 mm para *T. brevicompactum* P16D2, 10,30 e 11,54 mm para *T. harzianum* P4A, 11,03 e 13,20 mm para *T. inhamatum* P21C, 10,32 e 13,76 mm para *T. tomentosum* P14C2. O filtrado micelial de *T. harzianum* P4A e *T. tomentosum* P14C2 apresentaram zonas de inibição, onde os maiores valores variaram de 14,79 a 16,07 mm e 8,80 a 9,55 mm, respectivamente. Foi observada redução significativa da atividade antibacteriana após longo tempo de preservação das nanopartículas, sugerindo que sejam necessárias otimizações dos parâmetros de biossíntese para evitar a perda de atividade antibacteriana e torná-la mais eficiente.

Palavras-chave: Nanotecnologia. Miconanotecnologia. Micossíntese. Síntese verde.

ABSTRACT

Nanoscience studies phenomena that occur on a nanoscale. Nanotechnology in turn is the application of nanoscience in obtaining and studying nanometric materials. Among these nanomaterials, there are silver nanoparticles that have the most diverse applications, with antimicrobial activity being the most widespread in times when antimicrobial resistance is considered a serious problem. These nanoparticles can be obtained from chemical, physical and biological synthesis, the latter being more advantageous if compared to the others because it is considered ecologically correct because it is less polluting and low cost. This study aimed to evaluate the potential of four *Trichoderma* strains to biosynthesize silver nanoparticles. The strains *Trichoderma brevicompactum* P16D2, *T. harzianum* P4A, *T. inhamatum* P21C and *T. tomentosum* P14C2 were evaluated. The fungus *T. harzianum* P4A was the most efficient, being detected the color change of the mycelial filtrate after 24 hours. The color change of the others occurred after 72 hours of biosynthesis. Partial characterization was performed, and surface plasmon resonance bands with peaks of 405 and 425 nm were detected. DLS analysis was performed only with the colloidal solution of *T. harzianum* P4A and *T. inhamatum* P21C, where the hydrodynamic size was 72.22 and 73.82 nm; zeta potential of -29.3 and -8.03 mV and polydispersity index of 0.256 and 0.357, respectively. An antibacterial test was carried out with the colloidal solution of nanoparticles of the four fungi against fifteen strains of *Aeromonas* spp. obtained from skin lesions and kidney of tambaqui, and strains of ATCC reference, these being *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. The largest zones of inhibition were 10.19 and 14.43 mm for *T. brevicompactum* P16D2, 10.30 and 11.54 mm for *T. harzianum* P4A, 11.03 and 13.20 mm for *T. inhamatum* P21C, 10, 32 and 13.76 mm for *T. tomentosum* P14C2. The mycelial filtrate of *T. harzianum* P4A and *T. tomentosum* P14C2 showed zones of inhibition, where the highest values ranged from 14.79 to 16.07 mm and 8.80 to 9.55 mm, respectively. A significant reduction in antibacterial activity was observed after a long time of preservation of the nanoparticles, suggesting that optimizations of the biosynthesis parameters are necessary to avoid the loss of antibacterial activity and make it more efficient.

Keywords: Nanotechnology. Myconanotechnology. Mycosynthesis. Green synthesis.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Esquematização do teste de determinação da concentração inibitória mínima em placa de 96 poços..... 28
- Figura 2 - Crescimento micelial e esporulação de *Trichoderma brevicompactum* P16D2. A – meio CMA, 7 dias; B – meio BDA, 7 dias e C – meio SNA, 12 dias 31
- Figura 3 - Crescimento micelial e esporulação de *Trichoderma harzianum* P4A. A – meio CMA, 12 dias; B – meio BDA, 12 dias e C – meio SNA, 12 dias..... 31
- Figura 4 - Crescimento micelial e esporulação de *Trichoderma inhamatum* P21C. A – meio CMA, 12 dias; B – meio BDA, 12 dias e C – meio SNA, 12 dias 31
- Figura 5 - Crescimento e esporulação de *Trichoderma tomentosum* P14C2. A – meio CMA, 7 dias; B – meio BDA, 12 dias e C – meio SNA, 12 dias..... 31
- Figura 6 - Coloração da solução coloidal de nanopartículas de prata (i) e filtrado micelial (ii). A - Nitrato de prata a 1 mM; B - *Trichoderma brevicompactum* P16D2; C - *Trichoderma harzianum* P4A; D - *Trichoderma inhamatum* P21C; E - *Trichoderma tomentosum* P14C2.. 32
- Figura 7 - Atividade antibacteriana de *Trichoderma brevicompactum* P16D2. A - *Pseudomonas aeruginosa*; B - *Staphylococcus aureus*; C - *Aeromonas* sp. A96; D - *Klebsiella pneumoniae*. i – AgNPs; ii – filtrado micelial; iii – nitrato de prata; iv – cloranfenicol 35
- Figura 8 - Atividade antibacteriana de *Trichoderma harzianum* P4A. A – *Pseudomonas aeruginosa*; B – *Staphylococcus aureus*; C – *Klebsiella pneumoniae*; D – *Aeromonas* sp. A96. i – AgNPs; ii – filtrado micelial; iii – nitrato de prata; iv – cloranfenicol 36
- Figura 9 - Atividade antibacteriana de *Trichoderma inhamatum* P21C. A – *Pseudomonas aeruginosa*; B – *Klebsiella pneumoniae*; C – *Staphylococcus aureus*; D – *Aeromonas* sp. A96. i – AgNPs; ii – filtrado micelial; iii – nitrato de prata; iv – cloranfenicol 37
- Figura 10 - Atividade antibacteriana de *Trichoderma tomentosum* P14C2. A – *Pseudomonas aeruginosa*; B – *Klebsiella pneumoniae*; C – *Staphylococcus aureus*; D – *Aeromonas* sp. A96. i – AgNPs; ii – filtrado micelial; iii – nitrato de prata; iv – cloranfenicol 38
- Figura 11 - Atividade antibacteriana de AgNPs de *Trichoderma* spp. A – *Pseudomonas aeruginosa*; B – *Aeromonas* sp. A96; C – *Klebsiella pneumoniae*. i – *Trichoderma brevicompactum* P16D2; ii – *Trichoderma harzianum* P4A; iii – *Trichoderma inhamatum* P21C; iv – *Trichoderma tomentosum* P14C2; v – cloranfenicol; vi – nitrato de prata..... 39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Algumas espécies de fungos capazes de biossintetizar nanopartículas de prata	18
Tabela 2 - Linhagens de <i>Trichoderma</i> utilizadas neste estudo para a biossíntese de AgNPs..	24
Tabela 3 - Cepas de <i>Aeromonas</i> spp. cedidas pelo Laboratório de Piscicultura da Embrapa Amazônia Ocidental isoladas de tambaquis de cultivo.....	26
Tabela 4 - Diâmetro médio (mm) de zonas de inibição de crescimento bacteriano pela ação de AgNPs biossintetizadas a partir do filtrado micelial de <i>Trichoderma brevicompactum</i> P16D2	35
Tabela 5 - Diâmetro médio (mm) de zonas de inibição de crescimento bacteriano pela ação de AgNPs biossintetizadas a partir do filtrado micelial de <i>Trichoderma harzianum</i> P4A.....	36
Tabela 6 - Diâmetro médio (mm) de zonas de inibição de crescimento bacteriano pela ação de AgNPs biossintetizadas a partir do filtrado micelial de <i>Trichoderma inhamatum</i> P21C	37
Tabela 7 - Diâmetro médio (mm) de zonas de inibição de crescimento bacteriano pela ação de AgNPs biossintetizadas a partir do filtrado micelial de <i>Trichoderma tomentosum</i> P14C2.....	38
Tabela 8 - Comparação do diâmetro médio (mm) de zonas de inibição de crescimento bacteriano pela ação das AgNPs biossintetizadas a partir do filtrado micelial de <i>Trichoderma</i> spp.	40
Tabela 9 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) pela ação de AgNPs biossintetizadas pelo filtrado micelial de <i>Trichoderma</i> spp.....	41

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Espectroscopia Uv-Vis da solução coloidal de AgNPs biossintetizadas pelo filtrado micelial de <i>Trichoderma brevicompactum</i> P16D2	33
Gráfico 2 - Espectroscopia Uv-Vis da solução coloidal de AgNPs biossintetizadas pelo filtrado micelial de <i>Trichoderma harzianum</i> P4A	33
Gráfico 3 - Espectroscopia Uv-Vis da solução coloidal de AgNPs biossintetizadas pelo filtrado micelial de <i>Trichoderma inhamatum</i> P21C.....	33
Gráfico 4 - Espectroscopia Uv-Vis da solução coloidal de AgNPs biossintetizadas pelo filtrado micelial de <i>Trichoderma tomentosum</i> P14C2	33

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	14
2.1. Objetivo geral	14
2.2. Objetivos específicos	14
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1. Aspectos gerais sobre nanotecnologia e nanobiotecnologia	15
3.2. Nanopartículas de prata	16
3.3. Síntese biogênica de AgNPs por fungos	17
3.4. O gênero <i>Trichoderma</i>	19
3.5. Piscicultura no Amazonas	20
3.6. Resistência antimicrobiana na piscicultura	21
3.7. O gênero <i>Aeromonas</i>	22
4. MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1. Origem e reativação dos <i>Trichoderma</i> spp.	24
4.2. Avaliação da viabilidade	24
4.3. Produção de biomassa micelial e extrato aquoso	24
4.4. Biossíntese de AgNPs	25
4.5. Caracterização parcial das AgNPs	25
4.5.1. Espectroscopia no ultravioleta visível	25
4.5.2. Espalhamento dinâmico de luz: Potencial zeta, índice de polidispersividade e tamanho hidrodinâmico das nanopartículas	25
4.6. Determinação da atividade antibacteriana em meio sólido	26
4.7. Determinação da concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima	27
4.8. Análise estatística	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1. Viabilidade biológica de <i>Trichoderma</i> spp.	30
5.2. Biossíntese e caracterização parcial de AgNPs de <i>Trichoderma</i> spp.	32
5.3. Atividade antibacteriana de AgNPs de <i>Trichoderma</i> spp.	34
6. CONCLUSÕES	43
7. REFERÊNCIAS	44
8. ANEXOS	63

1. INTRODUÇÃO

A nanotecnologia nos dias atuais tem atraído a atenção de diversos pesquisadores, principalmente pela grande aplicabilidade que ela possui. É definida como a aplicação prática da nanociência, onde são desenvolvidos nanomateriais em escala nanométrica com variadas aplicações (ELWAKIEL *et al.*, 2020; SHAFIQ *et al.*, 2020).

As nanopartículas metálicas merecem certo destaque, pois a síntese é relativamente fácil e possuem variada atividade biológica. A síntese destas nanopartículas é bastante variável, e as técnicas utilizadas são classificadas como *top down* ou *bottom up*, fragmentando metais até atingirem a escala nanométrica ou a partir da forma atômica ou molecular, respectivamente (JAMKHANDE *et al.*, 2019). Dentre as nanopartículas metálicas estudadas atualmente, destacam-se as nanopartículas de prata que possuem variada atividade antimicrobiana contra vasta quantidade de microrganismos patogênicos, principalmente aqueles considerados multirresistentes a antibióticos (ZHENG *et al.*, 2018; QAIS *et al.*, 2019).

As técnicas utilizadas para a síntese de nanopartículas podem ser de origem química, física ou biológica, sendo esta última ecologicamente correta e de fácil estabilização. A síntese biológica tem atraído a atenção nos últimos anos, pois podem ser utilizados diferentes organismos na obtenção destas nanopartículas (PANTIDOS E HORSFALL, 2014; SINGH, 2019; GANESAN *et al.*, 2020). Os fungos são considerados microrganismos excelentes para emprego em nanotecnologia, o que contribuiu com o surgimento da miconanotecnologia, área que utiliza estes indivíduos em processos nanotecnológicos (KASHYAP *et al.*, 2012; HANAFY, 2018). Os fungos do gênero *Trichoderma* são bastante promissores nessa área, visto que já são reconhecidos por possuírem enorme potencial biotecnológico, principalmente pela produção de diversas biomoléculas, além de já serem utilizados na agricultura (DAS *et al.*, 2019; IKRAM *et al.*, 2019; DELABONA *et al.*, 2020; JI *et al.*, 2020; REHMAN *et al.*, 2020).

A resistência antimicrobiana é considerada um problema global, pois o uso inadequado e desenfreado de antibióticos tem favorecido a dispersão horizontal de genes de resistência entre bactérias, pois bactérias podem atuar como reservatórios destes genes (SEKIZUKA *et al.*, 2019). Na piscicultura não é diferente, pois muitos estudos isolam e detectam genes de resistência em bactérias isoladas de peixes e viveiros, o que pode contribuir com a infecção cruzada em humanos. Bactérias do gênero *Aeromonas* são onipresentes na piscicultura. Possuem ampla distribuição ambiental e são consideradas patógenos oportunistas, tanto em

peixes quanto em humanos, podendo ser isoladas de amostras clínicas e de produtos de origem animal contaminados (CHANDRARATHNA *et al.*, 2018; WU *et al.*, 2019; TANG *et al.*, 2020).

A aplicação da nanotecnologia na piscicultura é extremamente interessante pois pode contribuir com alternativas ao uso da antibioticoterapia em infecções bacterianas, além de atuar no desenvolvimento de nanotecnologias aplicadas a essa área (VINAY *et al.*, 2017).

Este estudo teve como objetivo avaliar o potencial de biossíntese de nanopartículas de prata por quatro espécies de *Trichoderma* do bioma amazônico, além de determinar a atividade antibacteriana contra cepas de *Aeromonas* provenientes de piscicultura.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar a atividade antibacteriana de nanopartículas de prata biogênicas de *Trichoderma* spp. sobre *Aeromonas* spp. provenientes de piscicultura.

2.2. Objetivos específicos

Avaliar a viabilidade biológica de linhagens de *Trichoderma* spp.;

Biossintetizar e caracterizar parcialmente as nanopartículas de prata obtidas a partir do filtrado micelial de *Trichoderma* spp.;

Avaliar a atividade antibacteriana das nanopartículas de prata obtidas sobre *Aeromonas* spp.;

Determinar a concentração inibitória mínima e a concentração bactericida mínima das nanopartículas de prata obtidas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Aspectos gerais sobre nanotecnologia e nanobiotecnologia

O conceito de nanotecnologia foi primeiramente proposto por Richard Feynman, em 29 de dezembro de 1959, no Instituto de Tecnologia da Califórnia. O termo “nano” deriva do grego e significa anão, definindo a nanotecnologia como o estudo em escala nanométrica, na faixa de 1 a 100 nanômetros, onde 1 nm equivale a 10^{-9} metros (KESAVAN E VENKATRAMAN, 2014).

A nanotecnologia é a aplicação prática da nanociência e objetiva manipular a matéria em nível atômico ou molecular, com o objetivo de criar ou melhorar materiais, aos quais melhora as já existentes ou confere novas propriedades (SINGH, JAIRATH E AHLAWAT, 2015; ELWAKIEL *et al.*, 2020; RADAIC *et al.*, 2020). É considerada uma área multidisciplinar, pois engloba a física, a química, a biologia e suas mais diversas derivações. Essa multidisciplinaridade possibilita o desenvolvimento de diversos nanomateriais, sejam eles nanorobôs, nanotubos, nanoemulsões, nanopartículas e etc (CARVALHO *et al.*, 2019; CITARTAN *et al.*, 2019; MAZARE *et al.*, 2019; YI *et al.*, 2019).

A nanobiotecnologia, também chamada de nanobiologia ou bionanotecnologia, surgiu da associação interdisciplinar entre a nanociência e a biologia, com o objetivo primordial de ser a principal ferramenta empregada na fabricação de novos produtos e materiais utilizando técnicas menos poluentes. Estes nanomateriais possuem as mais diversas aplicações, como por exemplo no transporte de fármacos, biossensores, remoção de poluentes, nanofertilizantes, biorremediação, liberação de medicamentos por tempo, terapia de genes, nanomedicina, tratamento de água, agentes antibióticos dentre outras (BRATOVVIC, 2019; GARINO *et al.*, 2019; ALI *et al.*, 2020; GEE *et al.*, 2020; GONZALEZ-JARTÍN *et al.*, 2020; KHAN *et al.*, 2020; OSHIN *et al.*, 2020; USMAN *et al.*, 2020; VÁZQUEZ-NÚÑEZ *et al.*, 2020).

Dentre nanomateriais obtidos desta forma, estão as nanopartículas metálicas, compostos nanoestruturados que podem variar em tamanho, forma e aplicação (KUMAR *et al.*, 2018; DONG *et al.*, 2019; KHAN *et al.*, 2019; LI *et al.*, 2020). Uma área bastante promissora de aplicação de nanopartículas metálicas é na área da microbiologia. Um exemplo disso é a atividade antimicrobiana de nanopartículas de prata (AgNPs), algo extremamente atrativo se levarmos em consideração o grande número de bactérias multirresistentes a antibióticos, que neste caso podem ser bastante eficazes podendo aumentar a susceptibilidade destas bactérias a

antibióticos já existentes (PANÁČEK *et al.*, 2016; BARROS *et al.*, 2018; VAZQUEZ-MUÑOZ *et al.*, 2019; QAIS *et al.*, 2019; IPE *et al.*, 2020).

3.2. Nanopartículas de prata

A prata foi bastante utilizada nos tempos passados como medida terapêutica no tratamento e prevenção de doenças, caindo em desuso com o passar do tempo devido a capacidade de bioacumulação no organismo (POLITANO *et al.*, 2013; MEDICI *et al.*, 2019). Apesar disso, as AgNPs merecem certo destaque pois possuem os mesmos benefícios da prata em si, sendo necessárias menores concentrações para se obter determinado efeito (RAJI *et al.*, 2019; PARVEKAR *et al.*, 2020), como também aumento da atividade e efeitos sinérgicos com antibióticos (KESHARI *et al.*, 2020; LIN *et al.*, 2020).

Diversos métodos são utilizados na síntese de nanopartículas metálicas, sendo classificados em dois tipos: *top down* e *bottom up*. Nas técnicas *top down*, o metal é quebrado até atingir a escala nanométrica, enquanto que nas técnicas *bottom up* as nanopartículas são sintetizadas a partir do agrupamento de metais, partindo da forma atômica (ARYAL *et al.*, 2019; BELUSSO *et al.*, 2019; JAMKHANDI *et al.*, 2019; LEE e JUN, 2019).

As nanopartículas metálicas, incluindo as de prata podem ser obtidas a partir da síntese física, química ou através da síntese biológica, sendo esta realizada com auxílio de organismos, sejam eles bactérias, fungos, algas e o extrato de plantas (PANTIDOS E HORSFALL, 2014; ARYA *et al.*, 2018; QUINTEROS *et al.*, 2019; SINGH, 2019; THANGAMANI E BHUVANESHWARI, 2019; GANESAN *et al.*, 2020). Possuem as mais diversas aplicações biológicas, principalmente pelas atividades antibacteriana, antifúngica, antiviral, anti-inflamatória, anticâncer, antiangiogênica, larvicida, anti-helmíntica e antiprotozoário (ZHANG *et al.*, 2016; HAGGAG *et al.*, 2019; HASSAN *et al.*, 2019; REHMAN *et al.*, 2019; SUTTHANONT *et al.*, 2019; AMARASINGHE *et al.*, 2020; WARIS *et al.*, 2020).

Apesar de todas estas aplicações, diversos estudos buscam avaliar a atividade antimicrobiana destas nanopartículas, algo extremamente necessário se levarmos em consideração os diversos relatos de microrganismos multirresistentes a antibióticos, considerado um problema global, e que com o passar dos anos se expande cada vez mais (ROCA *et al.*, 2015; ASLAM *et al.*, 2018; ZHENG *et al.*, 2018; ISLAM *et al.*, 2019; VIKESLAND *et al.*, 2019; ZHU *et al.*, 2019).

Os mecanismos de atividade antimicrobiana das AgNPs envolvem primeiramente a adesão à membrana celular, alterando a estrutura e permeabilidade da mesma; penetração na

célula e no núcleo, onde ocorrerá interação entre as organelas, desestabilização e desnaturação de biomoléculas intracelulares; geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), que oxidam proteínas, lipídios, polissacarídeos, nucleotídeos e ácidos nucleicos; e modulação do sinal celular, alterando o perfil da fosfotirosina, ocasionando assim a morte da célula (DAKAL *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2018; ESTEVEZ *et al.*, 2020; HAMIDA *et al.*, 2020). Embora o mecanismo de geração de ROS seja mais difundido, este, não está totalmente estabelecido, visto que a atividade de AgNPs pode, em certos casos, ser ou não dependente da formação de ROS (CHAIRUANGKITTI *et al.*, 2013; RADHAKRISHNAN *et al.*, 2018; LEE *et al.*, 2019; ADEYEMI *et al.*, 2020). Além disso, fatores como o tamanho e o formato das mesmas influenciam na atividade antimicrobiana, tornando possível o controle durante a síntese (LOGARANJAN *et al.*, 2016; CHEON *et al.*, 2019; KHODASHENAS e GHORBANI, 2019; AFFES *et al.*, 2020).

3.3. Síntese biogênica de AgNPs por fungos

Os fungos são microrganismos que possuem diversas aplicações e são considerados por muitos pesquisadores como verdadeiras fábricas de biomoléculas. Hyde *et al.* (2019) acreditam que estes microrganismos possuem incrível potencial de exploração, e listaram pelo menos 50 maneiras de exploração industrial destes indivíduos.

A síntese biogênica de AgNPs por fungos ocorre de forma intracelular ou extracelular (ZHAO *et al.*, 2017). Na síntese intracelular, a solução de nitrato de prata é adicionada à biomassa micelial, que irá incorporar as nanopartículas a mesma. Este processo requer que as nanopartículas sejam extraídas, com diversas metodologias que visam lisar as células para liberar as nanopartículas biossintetizadas (FARAMARZI *et al.*, 2020). A síntese extracelular, utilizando-se o extrato aquoso da biomassa micelial, contendo biomoléculas fúngicas, é mais comumente realizada, não sendo necessário nenhum processo de extração, já que será obtida uma solução coloidal com as nanopartículas em suspensão (TAHA *et al.*, 2019; RODRÍGUEZ-SERRANO *et al.*, 2020). O mecanismo de síntese biogênica através do extrato aquoso de fungos ocorre na redução de íons de prata (Ag^+) para prata metálica (Ag^0). Muitos autores citam que a principal enzima que auxilia no processo de biossíntese por microrganismos é a nitrato redutase, porém isto ainda não foi completamente estabelecido (HAMED I *et al.*, 2016; OVAIS *et al.*, 2018; SABLE *et al.*, 2020).

A síntese biológica possui diversas vantagens se compararmos com os métodos físicos e químicos. Estas técnicas, são consideradas caras, poluentes e de difícil estabilização. Diferente

da síntese biológica que é considerada mais segura, não necessitando de agentes estabilizantes, necessários nos outros métodos, além de resultar numa melhor atividade, como constatado no ensaio antimicrobiano realizado por Gudikandula e Maringati (2016) com o fungo *Pycnoporus* sp. e Logaranjan *et al.* (2016) com extrato de *Aloe vera*.

Vários fatores podem influenciar na síntese biológica, em fungos por exemplo, o meio de cultivo para produção de biomassa, a quantidade de biomassa utilizada, a temperatura de incubação, pH, agitação do extrato aquoso e concentração de nitrato de prata são alguns dos fatores que podem variar, dependendo da espécie com potencial de biossintetizar estas nanopartículas e outras (KHAN *et al.*, 2016; GUILGUER-CASAGRANDE E LIMA, 2019; ROSE *et al.*, 2019). Diversos estudos demonstram que os fungos são microrganismos promissores para a biossíntese de nanopartículas metálicas (Tabela 1), um exemplo disso é o surgimento de uma nova área de estudo, a miconanotecnologia que utiliza fungos em bioprocessos nanotecnológicos (KASHYAP *et al.*, 2012; HANAFY, 2018).

Tabela 1 - Algumas espécies de fungos capazes de biossintetizar nanopartículas de prata

Espécie	Tamanho	Referência
<i>Aspergillus fumigatus</i>	0,681 nm	Shahzad <i>et al.</i> (2019)
<i>Aspergillus tamarii</i>	40 nm	Nanda, Nayak e Moorthy (2018)
<i>Colletotrichum</i> sp.	20 a 50 nm	Azmath <i>et al.</i> (2016)
<i>Curvularia pallescens</i>	16,74 nm	Elgorban <i>et al.</i> (2017)
<i>Fusarium oxysporum</i>	5 a 13 nm	Husseiny, Salah e Anter (2015)
<i>Fusarium chlamydosporum</i>	6 a 26 nm	Khalil <i>et al.</i> (2018)
<i>Ganoderma applanatum</i>	20 a 25 nm	Jogaiah <i>et al.</i> (2019)
<i>Guignardia mangiferae</i>	5 a 30 nm	Balakumaran <i>et al.</i> (2015)
<i>Nemania</i> sp.	5 a 70 nm	Farsi e Farokhi (2018)
<i>Penicillium chrysogenum</i>	9 a 17,5 nm	Khalil <i>et al.</i> (2018)
<i>Penicillium duclauxii</i>	13 nm	Almaary <i>et al.</i> (2019)
<i>Penicillium italicum</i>	33 nm	Nayak <i>et al.</i> (2018)
<i>Pestalotiopsis microspora</i>	2 a 10 nm	Netala <i>et al.</i> (2016)
<i>Phomopsis liquidambaris</i>	18,7 nm	Seetharaman <i>et al.</i> (2018)
<i>Phoma glomerata</i>	66 nm	Gade <i>et al.</i> (2014)
<i>Talaromyces purpureogenus</i>	25 nm	Hu <i>et al.</i> (2019)
<i>Trametes trogii</i>	20 a 25 nm	Kobashigawa <i>et al.</i> (2019)
<i>Trichoderma harzianum</i>	88 a 182,5 nm	Guilger-Casagrande <i>et al.</i> (2019)
<i>Trichoderma reesei</i>	5 a 50 nm	Vahabi <i>et al.</i> (2011)
<i>Trichoderma viride</i>	1 a 50 nm	Elgorban <i>et al.</i> (2016)
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	10 nm	Elamawi <i>et al.</i> (2018)

3.4. O gênero *Trichoderma*

Quando se fala em microbiologia e biotecnologia, geralmente se pensa em bioprocessos utilizando-se microrganismos, porém, essa interação é mais diversificada pois a grande diversidade de microrganismos possibilita a bioprospecção e determinação da aplicabilidade de tal indivíduo (ZHOU *et al.*, 2018; LATA, DIVJOT E NATH, 2019; RAI *et al.*, 2019; ADHIKARI E PANDEY, 2020; SABO *et al.*, 2020). Hoje estes indivíduos possuem os mais diversos usos, seja na otimização de bioprocessos industriais, produção de enzimas extracelulares, pigmentos, antimicrobianos e inclusive na alimentação e uso medicinal (ARORA E KAUR, 2018; KANDASAMY *et al.*, 2019; MUSZYŃSKA *et al.*, 2019; ALI *et al.*, 2020; OLIVEIRA *et al.*, 2020; SANDI *et al.*, 2020).

O gênero *Trichoderma* engloba aproximadamente 254 espécies identificadas. Pertencem a família Hypocreaceae e possuem ampla distribuição ambiental, podendo ser encontrados no solo, biomas aquáticos, no ar e até no interior das plantas vivendo em simbiose (BISSETT *et al.*, 2015; CHANG *et al.*, 2019; HARMAN *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2019; BONONI *et al.*, 2020; KARMAKAR *et al.*, 2020; KIM *et al.*, 2020; MA *et al.*, 2020; ZHOU *et al.*, 2020).

Fungos deste gênero são bastante promissores, principalmente na agricultura. Muitas espécies de *Trichoderma* são utilizadas como biofertilizante e no controle biológico de microrganismos causadores de doenças em plantas, conhecidos como fitopatógenos (DAS *et al.*, 2019; WONGLOM *et al.*, 2019; JI *et al.*, 2020; MARUYAMA *et al.*, 2020).

Além do uso na agricultura, este gênero possui um enorme potencial biotecnológico, principalmente na produção de enzimas e diversos metabólitos secundários, como por exemplo alcalóides, flavonóides, terpenóides, glicosídeos, policetídeos e outros (PANG *et al.*, 2017; SARAVANAKUMAR *et al.*, 2018; IKRAM *et al.*, 2019; LIANG *et al.*, 2019; DELABONA *et al.*, 2020; DUDEK *et al.*, 2020; KHAN *et al.*, 2020; REHMAN *et al.*, 2020; SHI *et al.*, 2020a; SHI *et al.*, 2020b; SONG *et al.*, 2019; SONG *et al.*, 2020; SUN *et al.*, 2020). Esses metabólitos possuem extensa atividade bioativa, principalmente atividade antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidante dentre outras (DRUZIAN *et al.*, 2019; XU *et al.*, 2019; NUANKEAW *et al.*, 2020).

Por serem fungos encontrados naturalmente no solo e associados a plantas, isso faz com que o isolamento destes indivíduos seja relativamente fácil, possibilitando a preservação e criação de coleções microbianas para estudo posterior (NAHER *et al.*, 2019; PARK *et al.*, 2019a; PARK *et al.*, 2019b; SOOD *et al.*, 2020).

3.5. Piscicultura no Amazonas

O Amazonas é um Estado rico em biodiversidade e extensão territorial, o que faz com que seja o maior da região Norte e ocupe grande parte da Amazônia brasileira. Por esse motivo, o Estado possui potencial para o desenvolvimento da bioeconomia aliada com a sustentabilidade, porém, na prática não é o que acontece, devido a existência de vários fatores que dificultam esse processo (WILLERDING *et al.*, 2020).

A piscicultura brasileira tem crescido significativamente nos últimos anos. Segundo levantamentos da Associação Brasileira de Piscicultura – PeixeBr (2019), a produção saltou de 578.800 toneladas em 2014 para 722.560 em 2018. A espécie mais cultivada atualmente é a tilápia, ranqueando o Brasil em quarto lugar entre os maiores produtores do mundo, sendo a produção concentrada nos estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Minas Gerais e Bahia. Os estados da região Norte contribuem significativamente na produção de peixes, respondendo por cerca de 52,62% da produção nacional de nativos e 20,69% da produção total. O tambaqui é o peixe nativo mais presente nas pisciculturas brasileiras.

Ainda de acordo com levantamentos da PeixeBr (2019), a produção do Amazonas sofreu variações significativas. Em 2017 foram produzidas 28.000 toneladas, sofrendo queda de 45,5% em 2018, produzindo apenas 15.270 toneladas. Essa queda de produção pode ser justificada pela interferência de diversos fatores, como por exemplo o alto custo de investimentos e na aquisição de insumos, problemas sanitários causados por doenças microbianas e parasitárias, além do baixo incentivo à produção, que apesar de existir, ainda é pouco (LEIRA *et al.*, 2017; FEITOZA *et al.*, 2018; ROCHA *et al.*, 2018).

A criação está concentrada na região metropolitana de Manaus, englobando os municípios de Rio Preto da Eva, Iranduba, Itacoatiara, Manacapuru e Presidente Figueiredo, o que de certa forma facilita a logística da produção. Além disso, a criação é semi-intensiva e realizada em viveiros escavados e barragens em pequenas áreas alagadas, o que implica num baixo impacto ambiental (GANDRA, 2010; LIMA *et al.*, 2019).

Visando alternativas para a criação, muitos pesquisadores da região estudam a substituição de ingredientes na formulação de rações, e tecnologias de baixo custo para a produção, além de buscarem tratamentos alternativos no tratamento de doenças destes animais, o que contribui significativamente na redução de custos (ANDRADE *et al.*, 2018; MEDEIROS *et al.*, 2018; PAZ *et al.*, 2019; OLIVEIRA *et al.*, 2020).

3.6. Resistência antimicrobiana na piscicultura

Por viverem e se reproduzirem na água, os peixes são animais susceptíveis a doenças, sejam elas de origem microbiana, causada por fungos, bactérias, protozoários e vírus ou parasitárias, causadas por endo ou ectoparasitas. A sanidade destes animais depende de diversos fatores, sejam eles a nutrição adequada, a genética, densidade de estocagem, qualidade de água ou manejo nas diferentes fases de criação (SEWAKA *et al.*, 2019; HENRY *et al.*, 2020; IZEL-SILVA *et al.*, 2020).

Quando algum destes fatores entra em desequilíbrio, o resultado disso será espelhado na criação, fazendo com que os animais fiquem doentes. Os peixes cultivados são comumente afetados, uma vez que estão fora de seu ambiente natural e estresse em condições de criação inadequadas (GAO *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2020).

As bacterioses acometem facilmente estes animais fazendo com que ocorra alta taxa de mortalidade, incluindo a perda de todo o plantel se as medidas de controle não forem empregadas a tempo. O uso de antibióticos no tratamento destes animais corrige o problema, porém, o uso inadequado dos mesmos pode fazer com que determinada bactéria adquira resistência, tornando o tratamento com determinado antibiótico ou dose utilizada ineficaz (FERRANTE *et al.*, 2020).

A resistência bacteriana à antibióticos ocorre por meio da transferência horizontal de genes através da conjugação, transdução, absorção via transformação ou através de mutações no DNA (BELLO-LÓPEZ *et al.*, 2019; REDONDO-SALVO *et al.*, 2020). Essa transferência pode ocorrer entre bactérias de espécies ou gêneros diferentes, o que contribui significativamente na dispersão de genes ligados a resistência à antibióticos (NWAIWU E ADUBA, 2020). Outro fato preocupante em relação ao uso de antibióticos é a capacidade residual, o que favorece a resistência de cepas ambientais, tornando-as potenciais reservatórios de genes de resistência (SEKIZUKA *et al.*, 2019).

O caminho para contornar essa situação é buscar medidas de controle alternativas, não só de infecções bacterianas, mas também parasitárias. Muitos autores sugerem o uso de óleos essenciais, além de utilizarem probióticos, e conseguem resultados promissores (ZHANG *et al.*, 2017; BANDEIRA JUNIOR *et al.*, 2019; COSTA *et al.*, 2020).

O crescimento da nanotecnologia e o desenvolvimento de técnicas aplicadas a piscicultura tem avançado com o passar dos anos e no futuro pode contribuir significativamente na redução do uso de antibióticos, e atuar como forma preventiva para impedir a instalação e o desenvolvimento de infecções. Dentre os principais avanços, Shaalan *et al.* (2016) listaram o

uso de nanopartículas de prata, ouro, óxido de zinco e dióxido de titânio, sendo considerados como novos antimicrobianos na sanidade dos peixes. Além das nanopartículas, também são listados o uso de nanopartículas como veículo de transporte de medicamentos, desenvolvimento de vacinas baseadas em nanotecnologia e o uso de nanopartículas no diagnóstico de doenças causadas por bactérias, fungos e vírus (VINAY *et al.*, 2017).

3.7. O gênero *Aeromonas*

Este gênero é composto de bactérias Gram-negativas, com formato de bacilos, pertencentes a família Aeromonadaceae, que abrange aproximadamente mais de 32 espécies descritas desde 1943 (PESSOA *et al.*, 2019; FERNÁNDEZ-BRAVO E FIGUERAS, 2020). As bactérias deste gênero possuem ampla distribuição ambiental, podendo ser isoladas de praticamente todos os nichos ambientais onde existam comunidades microbianas, isso inclui habitats aquáticos, peixes, aves, invertebrados e alimentos (MIYAGI, GIRAI E SANO, 2016; TAHOUN *et al.*, 2016; CHAIX *et al.*, 2017; ALGHABSHI, AUSTIN E CRUMLISH, 2018; CUNNINGHAM *et al.*, 2018; RANJBAR, SALIGHEHZADEH E SHARIFIYAZDI, 2019). Apesar de serem comuns em ambientes aquáticos, também podem ser isoladas de amostras clínicas (WU *et al.*, 2019; ZHOU *et al.*, 2019; TANG *et al.*, 2020).

Por serem bactérias naturalmente encontradas na água, isso faz com que possuam enorme potencial patogênico, seja ele para animais aquáticos ou para o homem, sendo consideradas oportunistas em ambos (CHANDRARATHNA *et al.*, 2018; KWON *et al.*, 2019). São frequentes os relatos de infecção por *Aeromonas* em peixes, crustáceos ou anfíbios (ZHOU *et al.*, 2019; FADEL E EL-AMIE, 2019; MARINHO-NETO *et al.*, 2019). A infecção em humanos geralmente ocorre de forma cruzada, podendo ser facilmente adquirida a partir da ingestão de produtos de origem animal ou água contaminados (TAHOUN *et al.*, 2016; ELBEHIRY *et al.*, 2019; EL-GHAREEB *et al.*, 2019; JOHN, VIDYALAKSHMI E HATHA, 2019; HOSSAIN *et al.*, 2020; SILVA *et al.*, 2020).

Em animais aquáticos, principalmente peixes, os sinais clínicos de infecção por *Aeromonas* spp. são úlceras, dermatite e septicemia, hiperemia e lesões no fígado, acúmulo de líquido na cavidade abdominal, despigmentação, lesões e focos hemorrágicos na pele, hiperemia e edema na bexiga natatória (KOZIŃSKA e PEKALA, 2012; DIAS *et al.*, 2016; DONG *et al.*, 2017; MARINHO-NETO *et al.*, 2019).

No Brasil, os únicos antibióticos utilizados para o tratamento de infecções por bactérias deste gênero e outros em peixes são o florfenicol e a oxitetraciclina (MARIOTTO *et*

al., 2018; FERRANTE *et al.*, 2020), que tem como mecanismo de ação a inibição da síntese proteica (PAPICH, 2016). Apesar dos peixes responderem de forma positiva no tratamento com estes antibióticos, é frequente o isolamento de cepas de *Aeromonas* spp. resistentes à estes e outros antibióticos (REVINA *et al.*, 2017; EL-SON *et al.*, 2019; KIM *et al.*, 2019; MZULA *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2019).

A patogenicidade destas bactérias está relacionada a diversos fatores de virulência, que atuam facilitando a infecção no hospedeiro. Diversos genes que codificam fatores como proteases, lipases, elastases, hemolisinas, aerolisinas, enterotoxinas, dentre outros, são facilmente detectados com auxílio da biologia molecular, que tem contribuído significativamente em estudos com estas bactérias (BUNYAN E OBAIS, 2018; MANSOUR *et al.*, 2019; MZULA *et al.*, 2019; PESSOA *et al.*, 2020).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Origem e reativação dos *Trichoderma* spp.

Foram utilizadas quatro espécies (Tabela 2) de *Trichoderma*, endofíticas de *Piper marginatum* Jacq. Estes fungos foram obtidos anteriormente (Edital n. 005/2007 CNPq/FAPEAM) e estão preservados na Coleção de Culturas Microbianas do Laboratório de Princípios Bioativos de Origem Microbiana – LPBOM da Faculdade de Ciências Agrárias da UFAM. As linhagens puras foram reativadas em meio Ágar Batata Dextrosado (BDA) acrescido do antibiótico cloranfenicol (50 mg/L) para inibição do crescimento de bactérias e incubadas em estufa com demanda bioquímica de oxigênio (BOD) por sete dias a 27 °C.

Tabela 2 - Linhagens de *Trichoderma* utilizadas neste estudo para a biossíntese de AgNPs

Código	Identificação
P16D2	<i>Trichoderma brevicompactum</i>
P4A	<i>Trichoderma harzianum</i>
P21C	<i>Trichoderma inhamatum</i>
P14C2	<i>Trichoderma tomentosum</i>

4.2. Avaliação da viabilidade

Para avaliação da viabilidade, após a reativação, os fungos foram inoculados em placas de Petri contendo 20 mL dos meios BDA, Ágar Nutriente Sintético (SNA) e Ágar Farinha de Milho (CMA). Para visualização das características micromorfológicas, foi realizado microcultivo em SNA e CMA. As placas foram incubadas em estufa BOD a 25 °C sob fotoperíodo de 12 horas por sete dias (QIN e ZHUANG, 2017). Posteriormente as estruturas reprodutivas foram coradas com solução de azul de lactofenol e observadas em microscópio óptico Axio Lab.A1 equipado com câmera AxioCam Erc 5s - Zeiss.

4.3. Produção de biomassa micelial e extrato aquoso

Discos miceliais de 7 mm foram inoculados em frascos de Erlenmeyer com capacidade de 1 L contendo 500 mL de meio líquido: KH_2PO_4 - 7 g/L; K_2HPO_4 - 2 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,1 g/L; $(\text{NH}_2)\text{SO}_4$ - 1 g/L; extrato de levedura - 0,6 g/L e glicose - 10 g/L. Os frascos foram

dispostos em incubadora *shaker* orbital a 27 °C com agitação de 150 rpm, onde após 72 horas de crescimento, a biomassa micelial foi recuperada e lavada três vezes com água destilada deionizada para remoção dos restos de meio de cultura.

A biomassa fúngica foi transferida para novos frascos de Erlenmeyer, respeitando a proporção de 1:10 (p/v), ou seja, 10 g de biomassa micelial para 100 mL de água destilada deionizada esterilizada. Os frascos foram mantidos em agitação de 150 rpm a 27 °C por 48 horas (AHLUWALIA *et al.*, 2014; ELAMAWI *et al.*, 2018; NOSHAD *et al.*, 2019). Após a incubação, o extrato aquoso foi recuperado e filtrado, com auxílio de bomba de vácuo (Primatec - 121), primeiramente com papel filtro qualitativo e depois em membranas de *nylon* com porosidade de 0,45 µm e 0,22 µm para esterilização e prosseguimento da biossíntese.

4.4. Biossíntese de AgNPs

O filtrado micelial obtido foi homogeneizado com 1 mM de solução de nitrato de prata e incubado a 27 °C, agitação de 150 rpm por 144 horas em ausência de luz. Simultaneamente, dois controles: um do filtrado micelial e outro da solução de nitrato de prata foram mantidos nas mesmas condições da biossíntese. A confirmação da biossíntese das AgNPs foi confirmada pela mudança de coloração do filtrado, de transparente para marrom ou amarelo escuro, e pela presença de banda de ressonância de plasmon de superfície entre 400 a 530 nm confirmada em espectrofotômetro (ABBASI *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2019).

4.5. Caracterização parcial das AgNPs

4.5.1. Espectroscopia no ultravioleta visível

A mensuração do espectro ultravioleta visível (UV-Vis) das nanopartículas foi realizada com auxílio de espectrofotômetro de feixe duplo Cary 60 (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, EUA), na faixa de 200 a 800 nm. As amostras foram previamente diluídas em água destilada deionizada na proporção de 1:10 (v/v) para realização das leituras (ALYOUSEF *et al.*, 2019).

4.5.2. Espalhamento dinâmico de luz: Potencial zeta, índice de polidispersividade e tamanho hidrodinâmico das nanopartículas

O potencial zeta, o índice de polidispersividade e o tamanho hidrodinâmico das nanopartículas foram medidos em Nano Zetasizer (ZS) (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido), a 25 ° C. As amostras foram diluídas em água destilada deionizada na proporção de 1:10 (v/v) para realização das leituras.

4.6. Determinação da atividade antibacteriana em meio sólido

A atividade antibacteriana foi avaliada pela técnica de difusão em ágar por poço (BALOUIRI *et al.*, 2016; HAMAD, 2018) contra quinze linhagens de *Aeromonas* spp. (tabela 3) isoladas de tambaquis de piscicultura, cedidas pelo Laboratório de Piscicultura da Embrapa Amazônia Ocidental. Além destas bactérias, o experimento também foi realizado contra *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13899, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 para avaliação do espectro de ação contra estas cepas.

Tabela 3 - Cepas de *Aeromonas* spp. cedidas pelo Laboratório de Piscicultura da Embrapa Amazônia Ocidental isoladas de tambaquis de cultivo

Código	Identificação	Origem
A3	<i>Aeromonas</i> sp.	Rim
A19	<i>Aeromonas</i> sp.	Rim
A38	<i>Aeromonas</i> sp.	Rim
A47	<i>Aeromonas</i> sp.	Rim
A96	<i>Aeromonas</i> sp.	Rim
A97	<i>Aeromonas</i> sp.	Rim
A101	<i>Aeromonas</i> sp.	Rim
F50	<i>Aeromonas</i> sp.	Rim
F77	<i>Aeromonas</i> sp.	Rim
F84A	<i>Aeromonas</i> sp.	Rim
F93	<i>Aeromonas</i> sp.	Rim
PX26F.(A)	<i>Aeromonas</i> sp.	Lesão na pele
PX52	<i>Aeromonas</i> sp.	Lesão na pele
PX84	<i>Aeromonas</i> sp.	Lesão na pele
ST86	<i>Aeromonas</i> sp.	Lesão na pele

As bactérias foram previamente reativadas em 5 mL caldo Brain Heart Infusion (BHI) e incubadas em estufa bacteriológica a 30 °C por 24 horas. O inóculo foi padronizado utilizando-se solução fisiológica 0,9% na escala 0,5 de McFarland, o que corresponde a aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL.

Uma vez padronizadas, as bactérias foram inoculadas em placas de Petri de dimensões 90 x 10 mm contendo 20 mL de Ágar Mueller Hinton (MHA) com auxílio de *swabs* descartáveis até a completa incorporação ao meio. Em cada placa foram feitos quatro poços de 8 mm e foram aplicados em cada poço 100 µL da solução coloidal de AgNPs e como controle, 100 µL do filtrado micelial utilizado na biossíntese isento de nanopartículas, 100 µL da solução de nitrato de prata a 1 mM e 100 µL do antibiótico cloranfenicol na concentração de 0,30 mg/mL (MADAKKA *et al.*, 2018; OGUNSILE *et al.*, 2020; SALMEN E ALHARBI, 2020). As placas foram incubadas por 24 horas a 30 °C.

No ensaio de determinação da nanopartícula mais eficiente, foram feitos os mesmos procedimentos, porém em placas de Petri de dimensões 110 x 10 mm. Em cada placa foram feitos seis poços de 8 mm e foram aplicados em cada poço 100 µL da solução coloidal de cada nanopartícula biossintetizadas e como controle 100 µL de solução de nitrato de prata e 100 µL do antibiótico cloranfenicol na mesma concentração citada. As placas também foram incubadas por 24 horas a 30 °C. Cada ensaio foi realizado com três repetições e após a incubação, as placas foram examinadas e as zonas de inibição de crescimento bacteriano foram mensuradas perpendicularmente com auxílio de paquímetro digital (JAVADHESARI *et al.*, 2019; SCATOLINO *et al.*, 2019).

4.7. Determinação da concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada pela técnica de microdiluição em caldo, utilizando-se placa de 96 poços conforme documento M07-A10 (CLSI, 2015). As soluções coloidais de AgNPS foram avaliadas nas diluições de 1:2 a 1:1024 (v/v). Para isso, a partir da coluna 2 até a 11, foram depositados 200 µL de caldo Mueller Hinton (MHC) e foram feitas as diluições.

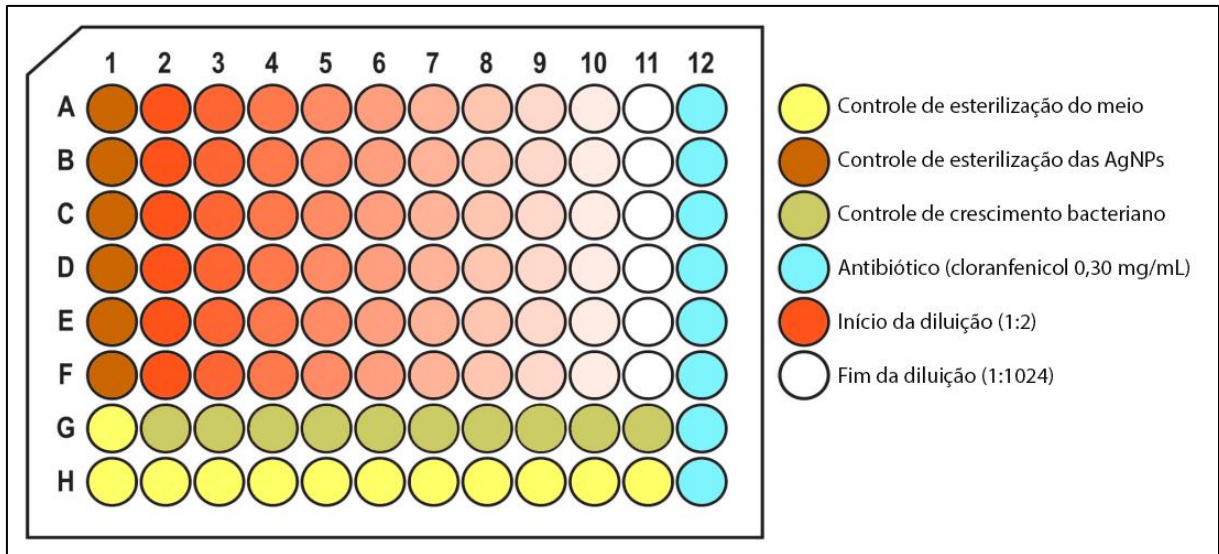


Figura 1 - Esquemática do teste de determinação da concentração inibitória mínima em placa de 96 poços

Fonte: Coelho, K. W. S. A. (2020)

Este ensaio foi realizado com as cepas de referência ATCC citadas anteriormente (item 4.6), onde foram cultivadas previamente em caldo BHI por 24 horas a 35 °C. O inóculo foi ajustado de acordo com a escala 0,5 de MacFarland, correspondendo a aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL.

Em cada poço foram inoculados 10 µL do inóculo ajustado, atingindo a concentração final de $1,5 \times 10^5$ UFC por poço. A coluna 1 foi preenchida com solução coloidal das AgNPs (controle de esterilização das AgNPs) e a coluna 12 foi preenchida com o antibiótico cloranfenicol (0,30 mg/mL) como controle positivo.

O controle de crescimento bacteriano foi realizado na linha G e o controle de esterilização do caldo na linha H. As placas foram incubadas a 35 °C por 24 horas. Após a incubação, as placas foram observadas para detecção de crescimento bacteriano, sendo considerado negativo com a transparência do caldo ou positivo com a ocorrência de turbidez, indicativo de crescimento bacteriano. O ensaio foi realizado em duplicata.

A concentração bactericida mínima (CBM) foi determinada a partir do CIM. As diluições com ausência de crescimento bacteriano nas placas de 96 poços foram inoculadas em placas de Petri contendo MHA com auxílio de alça de platina. As placas foram incubadas a 35 °C por 24 horas. Após a incubação, as placas foram observadas para classificação das diluições em bactericidas ou bacteriostáticas, com capacidade de matar ou inibir o crescimento bacteriano respectivamente (MIRSADEGHI *et al.*, 2019).

4.8. Análise estatística

Os dados de atividade antibacteriana em meio sólido obtidos foram submetidos à análise de variância. Nos ensaios com cada fungo de forma isolada, foram considerados tratamentos a solução coloidal de nanopartículas biossintetizadas por determinado fungo, o filtrado micelial do mesmo utilizado para biossíntese, a solução de nitrato de prata e o cloranfenicol como controle, sendo considerados quatro tratamentos em arranjo fatorial contra 20 bactérias com três repetições.

No ensaio de determinação da nanopartícula mais eficiente em meio sólido, foram considerados tratamentos as quatro nanopartículas e os dois controles, totalizando seis tratamentos em arranjo fatorial contra 20 bactérias com três repetições e delineamento inteiramente casualizado. Foi aplicado o teste de Skot Knott a 5% de probabilidade para comparação das médias, sendo consideradas significativas se $p \leq 0,01$ ou $0,05$. A análise estatística foi realizada com auxílio do *software* Sisvar (FERREIRA, 2011). Os gráficos foram criados com auxílio do *software* Origin 8.5.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Viabilidade biológica de *Trichoderma* spp.

A preservação de fungos facilita o estudo destes, porém deve-se atentar para quais técnicas utilizar, pois estas apresentam vantagens e desvantagens quando comparadas entre si (FREIRE *et al.*, 2016; AYALA-ZERMEÑO *et al.*, 2017; CHAVES NETO *et al.*, 2019; ESCOBAR *et al.*, 2020). Estas técnicas são classificadas em curto, médio e longo prazo. As técnicas de médio prazo são mais comumente empregadas, dentre elas a técnica de Castellani e a que se utiliza óleo mineral, onde basicamente discos de micélio das colônias previamente cultivadas são preservados em frascos de vidro contendo água destilada ou óleo mineral, técnicas consideradas baratas e tecnologicamente simples.

Os fungos utilizados neste estudo foram preservados pelo método Castellani e apesar de terem sido isolados há aproximadamente treze anos, todos os quatro *Trichoderma* apresentaram bom crescimento e esporulação em meio sólido, apresentando as características micromorfológicas típicas do gênero (Anexo 6). Também foi observada a ocorrência de pleomorfismo, nas cepas *T. harzianum* P4A e *T. tomentosum* P14C2. O crescimento e esporulação destes fungos é bastante variável, e depende basicamente das condições empregadas no cultivo (PETRISOR, PAICA E CONSTANTINESCU, 2016; ZEHRA *et al.*, 2017; MING *et al.*, 2019).

Avaliando o crescimento de *T. harzianum* e *T. viride*, Sinha *et al.* (2018) obtiveram as melhores taxas médias de crescimento utilizando o meio BDA. Resultado similar ao observado por Petrisor, Paica e Constantinescu (2016) em estudo com *T. pseudokoningii* e *T. viride*, a esporulação ocorreu por volta do quarto dia de cultivo em placa.

Neste estudo, o crescimento foi excelente em BDA (Figuras 1, 2, 3, 4 B) e razoável em CMA (Figuras 1, 2, 3, 4 A), resultado similar ao de Sankhwar e Srivastava (2019) em estudo com *T. asperellum*, porém a esporulação foi bem mais rápida em CMA, enquanto que no meio SNA (Figuras 1, 2, 3, 4 C) houve pouca produção de micélio e pouca esporulação. No estudo de Daryaei *et al.* (2016) a composição do meio afetou a produção, germinação de conídios e bioatividade de *T. atroviride*, fato associado à concentração de carbono e nitrogênio contidos no meio.

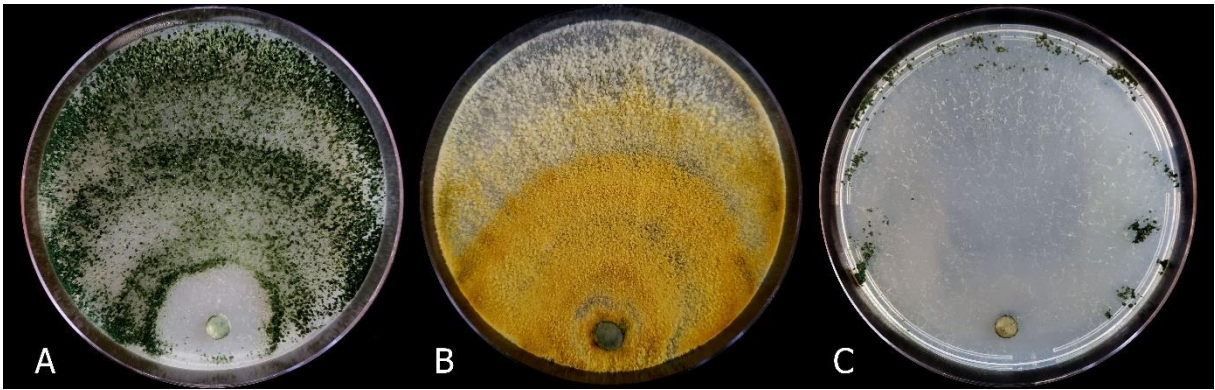


Figura 2 - Crescimento micelial e esporulação de *Trichoderma brevicompactum* P16D2. A – meio CMA, 7 dias; B – meio BDA, 7 dias e C – meio SNA, 12 dias

Foto: Coelho, K. W. S. A. (2020)

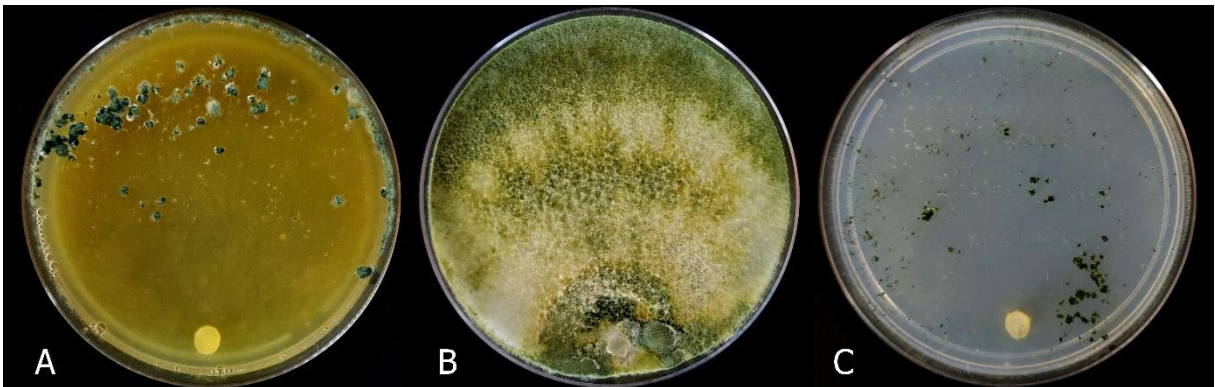


Figura 3 - Crescimento micelial e esporulação de *Trichoderma harzianum* P4A. A – meio CMA, 12 dias; B – meio BDA, 12 dias e C – meio SNA, 12 dias

Foto: Coelho, K. W. S. A. (2020)

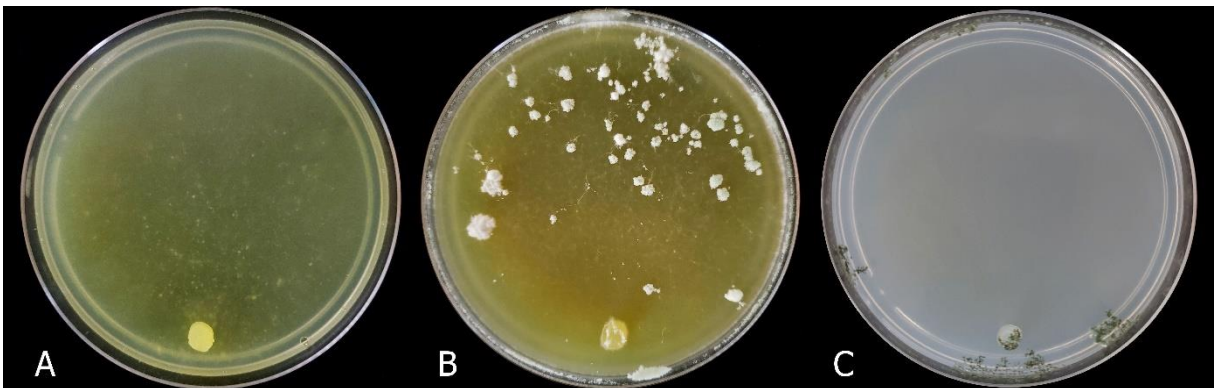


Figura 4 - Crescimento micelial e esporulação de *Trichoderma inhamatum* P21C. A – meio CMA, 12 dias; B – meio BDA, 12 dias e C – meio SNA, 12 dias

Foto: Coelho, K. W. S. A. (2020)

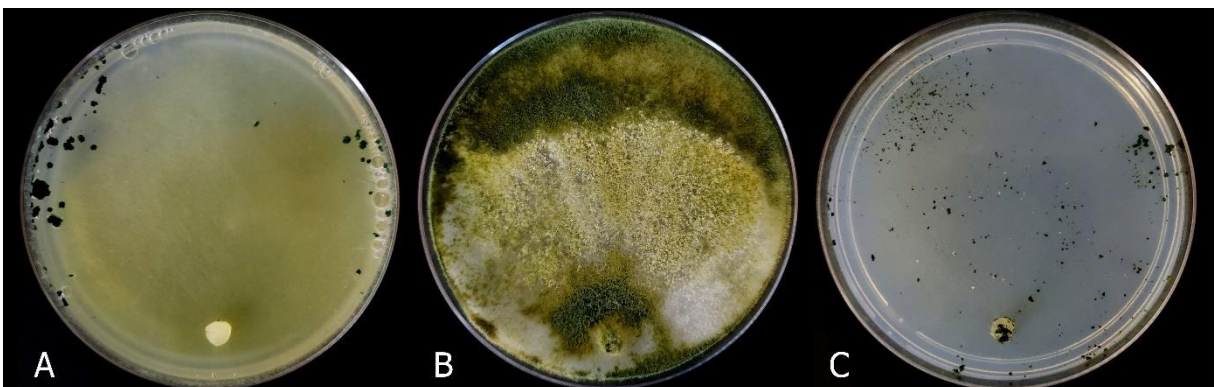


Figura 5 - Crescimento e esporulação de *Trichoderma tomentosum* P14C2. A – meio CMA, 7 dias; B – meio BDA, 12 dias e C – meio SNA, 12 dias

Foto: Coelho, K. W. S. A. (2020)

5.2. Biossíntese e caracterização parcial de AgNPs de *Trichoderma* spp.

Os filtrados miceliais (Figura 6) de todas as linhagens de *Trichoderma* utilizadas neste estudo foram capazes de biossintetizar AgNPs. A linhagem *T. harzianum* P4A foi a que demonstrou biossíntese mais acelerada, sendo detectada mudança de coloração do filtrado micelial contendo 1 mM de nitrato de prata logo 24 horas após a incubação, onde ocorreu mudança de cor do filtrado, passando de transparente para marrom escuro. O filtrado micelial desta linhagem foi considerado o mais eficiente na biossíntese de AgNPs.

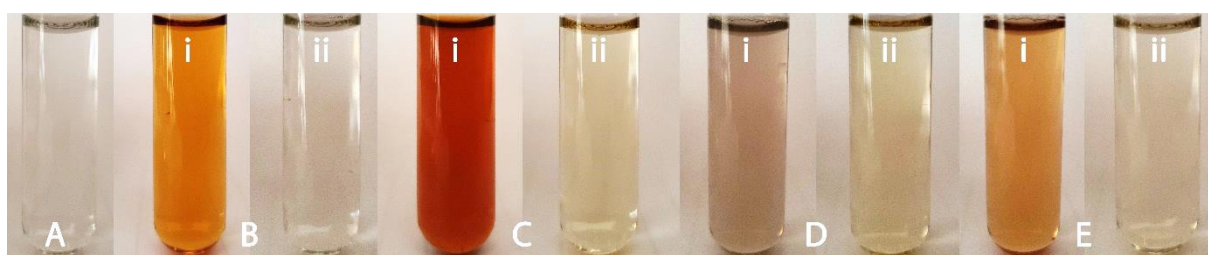


Figura 6 - Coloração da solução coloidal de nanopartículas de prata (i) e filtrado micelial (ii). A - Nitrato de prata a 1 mM; B - *Trichoderma brevicompactum* P16D2; C - *Trichoderma harzianum* P4A; D - *Trichoderma inhamatum* P21C; E - *Trichoderma tomentosum* P14C2

Foto: Coelho, K. W. S. A. (2020)

Quanto às demais linhagens, a mudança de coloração ocorreu a partir de 72 horas, também observada no estudo de Guilger-Casagrande *et al.* (2019) com *T. harzianum*. Essa alteração de cor do filtrado micelial também ocorreu nos estudos de Elamawi *et al.* (2018) com *T. harzianum* e *T. viride*, sendo detectada após 72 horas e não sendo detectada com *T. longibrachiatum*, que posteriormente teve os parâmetros de biossíntese otimizados. A otimização da biossíntese de AgNPs é algo recorrente. Gemishev *et al.* (2019) concluíram que 10% de biomassa fúngica e 10 mM de nitrato de prata foram mais favoráveis para *T. reesei*. Omran *et al.* (2018) também conseguiram otimizar os parâmetros de biossíntese de *T. longibrachiatum*, tendo como condições ótimas a temperatura de 40 °C, 24 horas de biossíntese, pH 12, 3% de biomassa micelial, 4 mM de nitrato de prata e agitação de 150 rpm no escuro.

A mudança de coloração se deve pela conversão do AgNO₃ em AgNPs, fato esse confirmado pela formação da banda de ressonância de plasmon de superfície, resultante da interação entre a luz e os elétrons da superfície das nanopartículas, onde os picos ocorrem na faixa de comprimento entre 400 a 530 nm (ABBASI *et al.*, 2016). Essa alteração de coloração do filtrado micelial não é restrita a AgNPs e ocorre com outros metais, como por exemplo no estudo de Abdel-Kareem e Zohri (2018) que biossintetizaram nanopartículas de ouro e houve

mudança de coloração do filtrado micelial de *T. hamatum* de transparente para vermelho escuro e no estudo de Diko *et al.* (2020), onde o filtrado micelial de *Trichoderma* sp. mudou de transparente para laranja na biossíntese de nanopartículas de selênio.

A presença de banda de ressonância de plasmon de superfície foi confirmada, sendo super evidente na solução coloidal de *T. harzianum* P4A (Gráfico 2), mais discreta em *T. brevicompactum* P16D2 (Gráfico 1) e menos evidente em *T. inhamatum* P21C (Gráfico 3) e *T. tomentosum* P14C2 (Gráfico 4). Os picos de absorção ocorreram em 425 nm, exceto na solução coloidal de *T. inhamatum* P21C onde o pico foi de 405 nm.

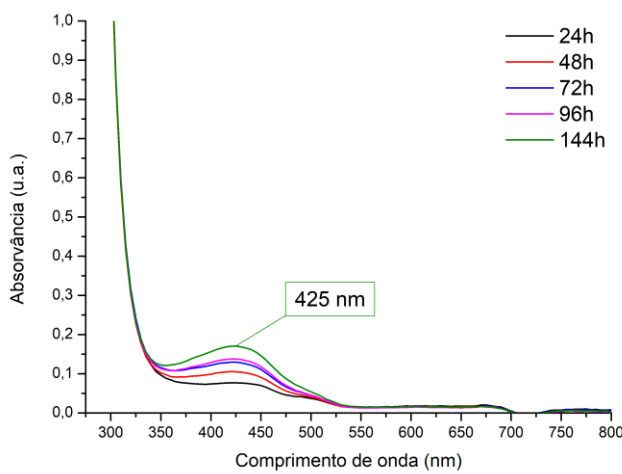


Gráfico 1 - Espectroscopia Uv-Vis da solução coloidal de AgNPs biossintetizadas pelo filtrado micelial de *Trichoderma brevicompactum* P16D2

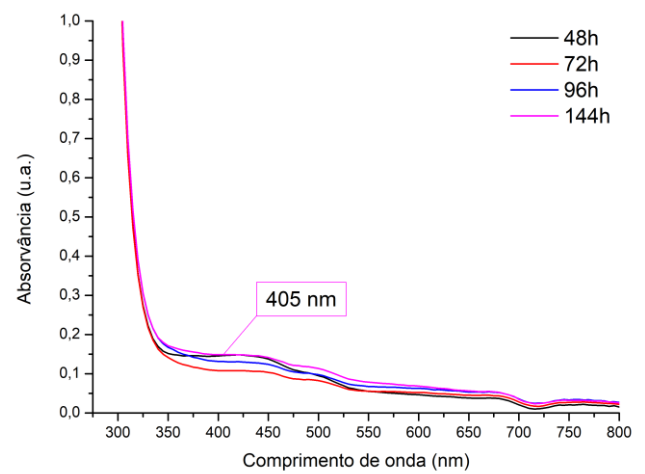


Gráfico 3 - Espectroscopia Uv-Vis da solução coloidal de AgNPs biossintetizadas pelo filtrado micelial de *Trichoderma inhamatum* P21C

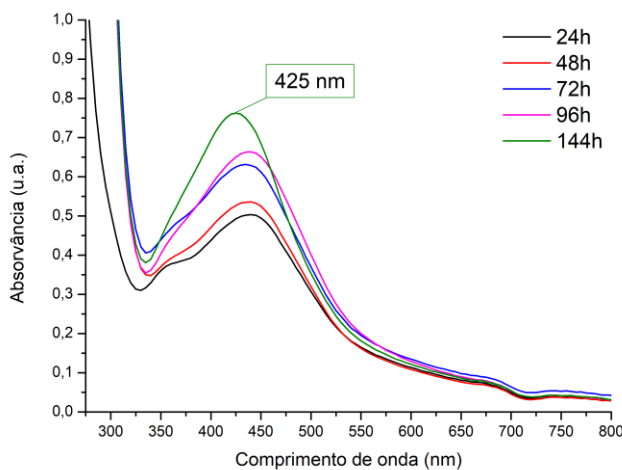


Gráfico 2 - Espectroscopia Uv-Vis da solução coloidal de AgNPs biossintetizadas pelo filtrado micelial de *Trichoderma harzianum* P4A

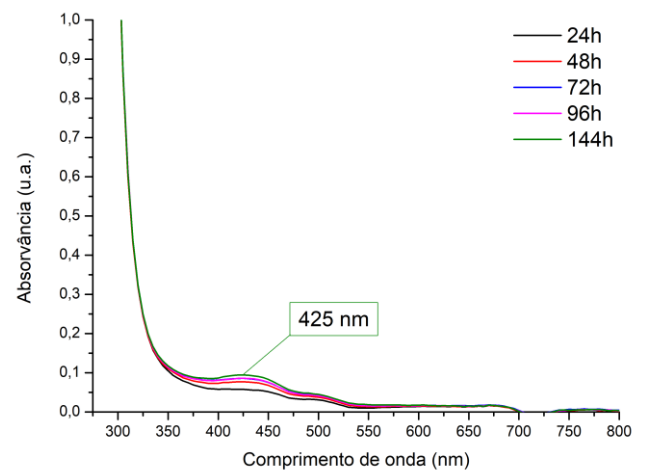


Gráfico 4 - Espectroscopia Uv-Vis da solução coloidal de AgNPs biossintetizadas pelo filtrado micelial de *Trichoderma tomentosum* P14C2

A análise de espalhamento dinâmico de luz (DLS) demonstrou que a solução coloidal de AgNPs de *T. harzianum* P4A possuem tamanho hidrodinâmico de 72,22 nm, com potencial zeta de -29,3 mV e índice de polidispersividade (PDI) de 0,256 enquanto que o *T. inhamatum* P21C apresenta tamanho de 73,82, potencial zeta de -8,03 mV e PDI de 0,357. A análise de DLS não pode ser determinada com as soluções coloidais dos demais fungos.

Diferindo deste estudo, Guilger-Casagrande *et al.* (2019) obtiveram o tamanho hidrodinâmico de 81,84 nm, com potencial zeta e PDI de respectivamente -18,30 mV e 0,52 em estudo com *T. harzianum*. No estudo com *T. longibrachiatum*, Omran *et al.* (2018) obtiveram o tamanho hidrodinâmico de 17,75 nm, sendo o potencial zeta (-26,8 mV) e PDI (0,279) relativamente próximos ao obtido neste estudo. Gemishev *et al.* (2019) obtiveram valores maiores de potencial zeta (-38,5; -45,2 e -40,0 mV), influenciados respectivamente pela quantidade de biomassa micelial utilizada (5, 10 e 15%) em estudo com *T. reesei*. No estudo de Guilger *et al.* (2017) com *T. harzianum*, foram obtidas AgNPs com baixa variabilidade de tamanho (100,7 nm) e boa estabilidade, com potencial zeta de -6,85 mV e PDI de 0,27.

O potencial zeta é um indicador da carga elétrica superficial e através dele é possível determinar a estabilidade de nanopartículas metálicas em suspensões aquosas. De forma geral, soluções coloidais de nanopartículas com valores na faixa entre ± 20 e 30 mV ou mais, são considerados estáveis (MOURDIKOU DIS, PALLARES E THANH, 2018), enquanto que para serem consideradas monodispersas, o PDI deve estar abaixo de 0,3, o que indica homogeneidade morfológica (BASTOS *et al.*, 2017; SHARONOVA *et al.*, 2019).

5.3. Atividade antibacteriana de AgNPs de *Trichoderma* spp.

Todas as nanopartículas apresentaram atividade antibacteriana contra quase todas as cepas de *Aeromonas* spp., sendo menos eficientes a algumas, algo também observado nos ensaios contra as cepas de referência ATCC, onde as nanopartículas foram menos eficientes contra *A. hydrophila* e *E. coli*. Quanto aos controles utilizados, o antibiótico cloranfenicol se mostrou eficiente contra todas as bactérias testadas, com exceção da cepa *Aeromonas* sp. F77 e *P. aeruginosa*, onde não houve zona de inibição formada. O nitrato de prata apresentou, em certos casos, atividade antibacteriana superior ou inferior às nanopartículas, algo também observado no estudo de Balakumaran *et al.* (2016).

No ensaio com o fungo *T. brevicompactum* P16D2, as cepas *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *Aeromonas* sp. A96 foram as mais inibidas (Figura 7), com zonas de inibição entre 14,43 e

10,19 mm. As demais cepas ficaram na faixa de inibição entre 9,89 e 3,89 mm. O filtrado micelial deste fungo não apresentou atividade inibitória contra nenhuma cepa testada.

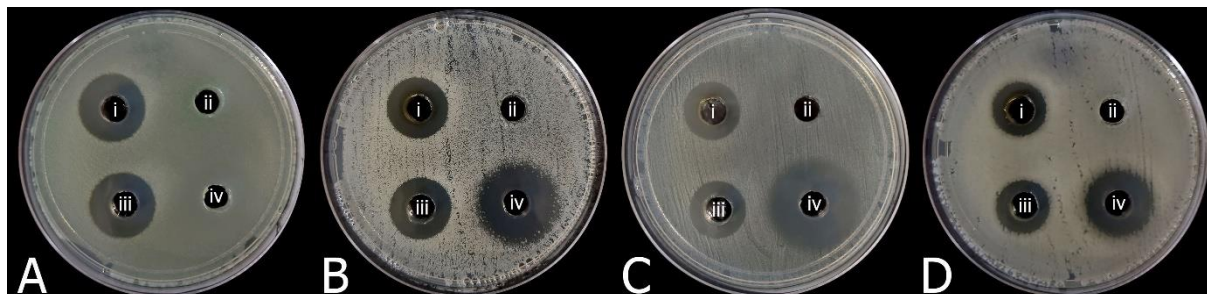


Figura 7 - Atividade antibacteriana de *Trichoderma brevicompactum* P16D2. A - *Pseudomonas aeruginosa*; B - *Staphylococcus aureus*; C - *Aeromonas* sp. A96; D - *Klebsiella pneumoniae*. i - AgNPs; ii - filtrado micelial; iii - nitrato de prata; iv - cloranfenicol

Foto: Coelho, K. W. S. A. (2020)

Tabela 4 - Diâmetro médio (mm) de zonas de inibição de crescimento bacteriano pela ação de AgNPs biossintetizadas a partir do filtrado micelial de *Trichoderma brevicompactum* P16D2

Bactérias	AgNPs	FM	AgNO ₃	Cloranfenicol
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	14,43 a A	0,00 b A	13,99 a A	0,00 b G
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	11,64 b B	0,00 c A	12,07 b B	16,71 a E
<i>Aeromonas</i> sp. A96	10,19 b C	0,00 c A	10,12 b C	19,12 a D
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13899	9,89 b C	0,00 c A	9,93 b C	15,03 a E
<i>Aeromonas</i> sp. PX84	7,66 b D	0,00 c A	7,95 b D	22,65 a C
<i>Aeromonas</i> sp. A38	7,19 b D	0,00 c A	7,21 b D	24,08 a B
<i>Aeromonas</i> sp. PX52	6,65 b D	0,00 c A	6,76 b D	24,07 a B
<i>Aeromonas</i> sp. PX26F.(A)	6,40 b D	0,00 c A	6,44 b D	23,81 a B
<i>Aeromonas</i> sp. A19	6,36 b D	0,00 c A	6,61 b D	24,02 a B
<i>Aeromonas</i> sp. A101	6,11 b D	0,00 c A	6,36 b D	25,78 a A
<i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 7966	5,91 b E	0,00 c A	5,97 b D	26,85 a A
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	5,73 b E	0,00 c A	6,13 b D	10,55 a F
<i>Aeromonas</i> sp. F84A	5,71 b E	0,00 c A	5,97 b D	23,63 a B
<i>Aeromonas</i> sp. F77	5,63 a E	0,00 b A	5,73 a E	0,00 b G
<i>Aeromonas</i> sp. A47	5,45 b E	0,00 c A	5,40 b E	16,01 a E
<i>Aeromonas</i> sp. A3	5,45 b E	0,00 c A	5,32 b E	25,03 a A
<i>Aeromonas</i> sp. A97	5,16 b E	0,00 c A	5,14 b E	21,95 a C
<i>Aeromonas</i> sp. ST86	5,03 b E	0,00 c A	4,72 b E	24,09 a B
<i>Aeromonas</i> sp. F50	4,88 b E	0,00 c A	4,72 b E	23,40 a B
<i>Aeromonas</i> sp. F93	3,89 b E	0,00 c A	3,90 b E	20,34 a D
C.V. (%)			10,77	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na horizontal e maiúscula na vertical não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o teste de Skot-Knott a 5% ($P < 0,05$) de probabilidade. FM - filtrado micelial; AgNO₃ - nitrato de prata a 1 mM; cloranfenicol - 0,30 mg/mL; C.V. - coeficiente de variação

No ensaio antibacteriano com o fungo *T. harzianum* P4A, as nanopartículas apresentaram atividade considerável contra *Aeromonas* sp. A96 e também contra *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, enquanto que as cepas *Aeromonas* sp. F84A, A47, F93 foram menos inibidas, não ocorrendo zona de inibição contra *E. coli*. As demais cepas ficaram em escala intermediária. O filtrado micelial deste fungo apresentou as maiores zonas de inibição (Figura 8) contra *Aeromonas* sp. A96, *S. aureus*, *K. pneumoniae* e *A. hydrophila*, as cepas menos inibidas foram *Aeromonas* sp. F84A, A47 e *E. coli*.

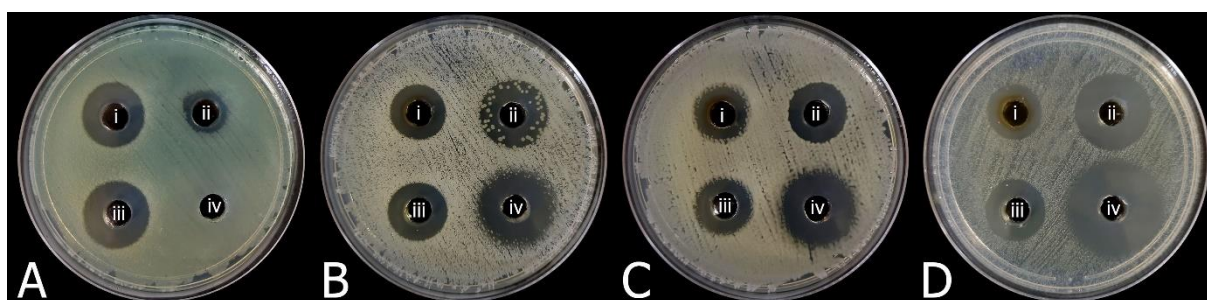


Figura 8 - Atividade antibacteriana de *Trichoderma harzianum* P4A. A – *Pseudomonas aeruginosa*; B – *Staphylococcus aureus*; C – *Klebsiella pneumoniae*; D – *Aeromonas* sp. A96. i – AgNPs; ii – filtrado micelial; iii – nitrato de prata; iv – cloranfenicol

Foto: Coelho, K. W. S. A. (2020)

Tabela 5 - Diâmetro médio (mm) de zonas de inibição de crescimento bacteriano pela ação de AgNPs biossintetizadas a partir do filtrado micelial de *Trichoderma harzianum* P4A

Bactérias	AgNPs	FM	AgNO ₃	Cloranfenicol
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	11,54 b A	4,91 c F	13,57 a A	0,00 d J
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	10,30 c A	14,79 b A	11,42 c B	16,96 a F
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13899	8,85 c B	10,83 b B	10,13 b B	15,38 a G
<i>Aeromonas</i> sp. A96	8,51 d B	16,07 b A	11,19 c B	21,99 a D
<i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 7966	6,35 c C	10,52 b B	6,75 c C	26,50 a A
<i>Aeromonas</i> sp. PX26F.(A)	5,88 b C	6,84 b E	7,16 b C	25,77 a A
<i>Aeromonas</i> sp. A38	5,84 b C	7,10 b E	7,11 b C	22,89 a C
<i>Aeromonas</i> sp. F77	5,33 b C	4,69 b F	6,59 a C	0,00 c J
<i>Aeromonas</i> sp. F50	5,31 c C	8,50 b D	5,42 c D	25,12 a B
<i>Aeromonas</i> sp. A97	5,22 c C	9,54 b C	5,11 c D	24,34 a B
<i>Aeromonas</i> sp. PX84	5,10 c C	8,03 b D	5,87 c C	25,70 a A
<i>Aeromonas</i> sp. ST86	4,83 c D	7,42 b E	4,87 c D	24,86 a B
<i>Aeromonas</i> sp. A19	4,64 c D	6,46 b E	5,17 c D	23,91 a C
<i>Aeromonas</i> sp. A3	4,53 c D	8,69 b D	3,90 c E	23,59 a C
<i>Aeromonas</i> sp. PX52	4,50 c D	6,79 b E	4,12 c E	21,74 a D
<i>Aeromonas</i> sp. A101	4,30 c D	9,33 b C	4,69 c D	22,15 a D
<i>Aeromonas</i> sp. F84A	3,71 b D	4,89 b F	4,87 b D	23,23 a C
<i>Aeromonas</i> sp. A47	3,62 b D	2,28 c G	4,21 b E	14,02 a H
<i>Aeromonas</i> sp. F93	3,40 c D	6,42 b E	3,72 c E	19,04 a E

<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0,00 d E	2,29 c G	3,64 b E	9,81 a I
C.V. (%)	8,15			

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na horizontal e maiúscula na vertical não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o teste de Skot-Knott a 5% ($P < 0,05$) de probabilidade. FM – filtrado micelial; AgNO₃ – nitrato de prata a 1 mM; cloranfenicol – 0,30 mg/mL; C.V. – coeficiente de variação

No ensaio com o fungo *T. inhamatum* P21C, as nanopartículas apresentaram as maiores zonas de inibição contra *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* e *S. aureus*. As zonas de inibição (Figura 9) contra as *Aeromonas* sp. ficaram abaixo de 8,77 mm, onde a cepa *Aeromonas* sp. 101 foi a única não inibida. Assim como *T. brevicompactum* P16D2, o filtrado micelial deste fungo não apresentou atividade.

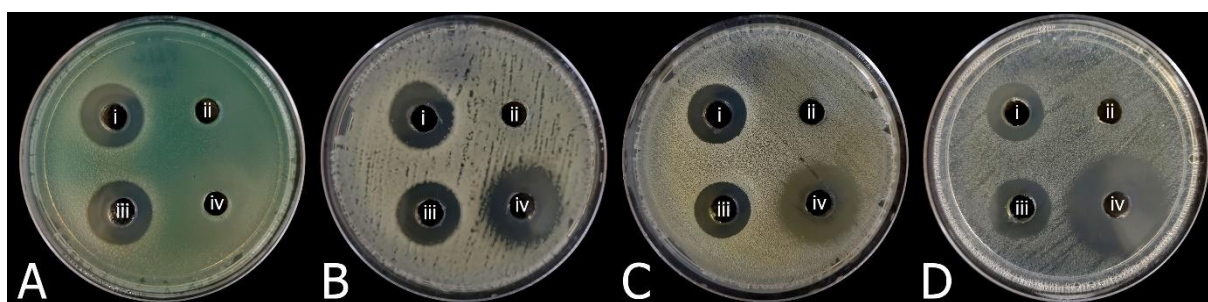


Figura 9 - Atividade antibacteriana de *Trichoderma inhamatum* P21C. A – *Pseudomonas aeruginosa*; B – *Klebsiella pneumoniae*; C – *Staphylococcus aureus*; D – *Aeromonas* sp. A96. i – AgNPs; ii – filtrado micelial; iii – nitrato de prata; iv – cloranfenicol

Foto: Coelho, K. W. S. A. (2020)

Tabela 6 - Diâmetro médio (mm) de zonas de inibição de crescimento bacteriano pela ação de AgNPs biossintetizadas a partir do filtrado micelial de *Trichoderma inhamatum* P21C

Bactérias	AgNPs	FM	AgNO ₃	Cloranfenicol
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	13,20 a A	0,00 b A	13,48 a A	0,00 b F
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13899	11,32 b B	0,00 c A	12,18 b A	15,89 a D
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	11,03 b B	0,00 c A	10,92 b B	15,82 a D
<i>Aeromonas</i> sp. A96	8,77 b C	0,00 c A	10,20 b B	22,42 a B
<i>Aeromonas</i> sp. A38	8,22 b C	0,00 c A	8,52 b C	26,65 a A
<i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 7966	6,94 b D	0,00 c A	7,06 b D	26,72 a A
<i>Aeromonas</i> sp. F84A	6,63 b D	0,00 c A	7,25 b D	26,19 a A
<i>Aeromonas</i> sp. PX52	5,19 b E	0,00 c A	5,86 b E	23,27 a B
<i>Aeromonas</i> sp. PX84	5,04 b E	0,00 c A	5,65 b E	24,39 a B
<i>Aeromonas</i> sp. A19	4,68 b E	0,00 c A	4,88 b E	22,88 a B
<i>Aeromonas</i> sp. A3	4,22 b E	0,00 c A	4,31 b F	23,27 a B
<i>Aeromonas</i> sp. F93	3,84 b F	0,00 c A	4,19 b F	20,36 a C
<i>Aeromonas</i> sp. A47	3,66 b F	0,00 c A	4,17 b F	12,35 a E
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	3,54 c F	0,00 d A	5,66 b E	12,10 a E
<i>Aeromonas</i> sp. PX26F.(A)	3,17 c F	0,00 d A	5,06 b E	24,25 a B
<i>Aeromonas</i> sp. F50	3,04 b F	0,00 c A	3,40 b F	24,47 a B

<i>Aeromonas</i> sp. F77	1,92 b G	0,00 c A	5,01 a E	0,00 c F
<i>Aeromonas</i> sp. ST86	1,82 b G	0,00 c A	3,08 b F	23,76 a B
<i>Aeromonas</i> sp. A97	1,71 c G	0,00 d A	3,41 b F	20,85 a C
<i>Aeromonas</i> sp. A101	0,00 c H	0,00 c A	3,24 b F	23,51 a B
C.V. (%)	11,99			

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na horizontal e maiúscula na vertical não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o teste de Skot-Knott a 5% ($P < 0,05$) de probabilidade. FM – filtrado micelial; AgNO_3 – nitrato de prata a 1 mM; cloranfenicol – 0,30 mg/mL; C.V. – coeficiente de variação

Já no ensaio com *T. tomentosum* P14C2, novamente, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* e *S. aureus* foram as cepas mais inibidas, com zonas de inibição de 13,76; 10,63 e 10,32 mm, respectivamente. Todas as cepas de *Aeromonas* spp. foram inibidas, as zonas de inibição (Figura 10) variaram de 9,49 a 3,57 mm, expressos respectivamente pelas cepas *Aeromonas* sp. A96 e F93. Em relação ao filtrado micelial deste fungo, a maior zona de inibição foi de 9,55 mm, demonstrado pela *Aeromonas* sp. F50, sendo mais eficiente que as nanopartículas. As únicas cepas não inibidas pelo filtrado foram *Aeromonas* sp. A47, *P. aeruginosa* e *E. coli*.

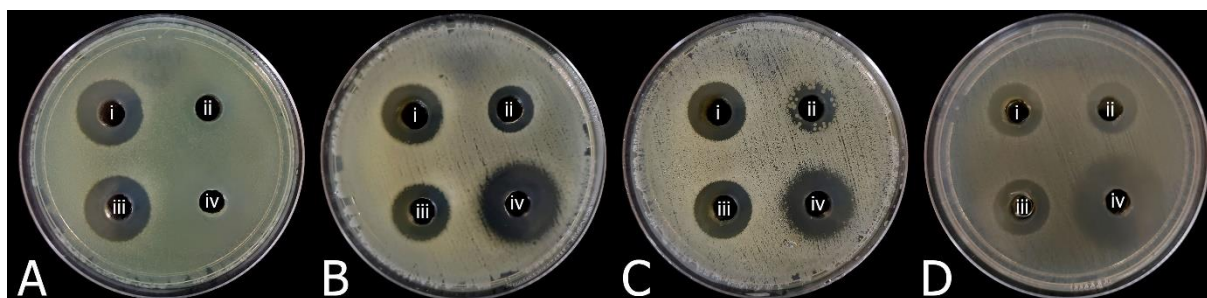


Figura 10 - Atividade antibacteriana de *Trichoderma tomentosum* P14C2. A – *Pseudomonas aeruginosa*; B – *Klebsiella pneumoniae*; C – *Staphylococcus aureus*; D – *Aeromonas* sp. A96. i – AgNPs; ii – filtrado micelial; iii – nitrato de prata; iv – cloranfenicol

Foto: Coelho, K. W. S. A. (2020)

Tabela 7 - Diâmetro médio (mm) de zonas de inibição de crescimento bacteriano pela ação de AgNPs biossintetizadas a partir do filtrado micelial de *Trichoderma tomentosum* P14C2

Bactérias	AgNPs	FM	AgNO_3	Cloranfenicol
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	13,76 a A	0,00 b D	14,07 a A	0,00 b G
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13899	10,63 b B	5,50 c B	10,54 b B	15,84 a E
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	10,32 b B	8,11 c A	10,91 b B	15,91 a E
<i>Aeromonas</i> sp. A96	9,49 b B	8,68 b A	9,56 b B	20,90 a C
<i>Aeromonas</i> sp. F50	6,96 c C	9,55 b A	7,38 c C	26,67 a A
<i>Aeromonas</i> sp. A19	6,76 b C	8,80 b A	7,04 b C	24,33 a A
<i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 7966	6,72 b C	4,36 b B	6,21 b C	25,11 a A
<i>Aeromonas</i> sp. A38	6,71 b C	3,36 c C	6,38 b C	22,82 a B
<i>Aeromonas</i> sp. ST86	6,33 b C	4,06 c C	6,15 b C	23,55 a B
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	6,34 b C	0,00 c D	6,06 b C	13,40 a F

<i>Aeromonas</i> sp. PX84	6,01 b C	5,28 b B	6,69 b C	25,08 a A
<i>Aeromonas</i> sp. F77	5,91 a C	0,00 b D	5,74 a C	0,00 b G
<i>Aeromonas</i> sp. PX52	5,89 b C	4,23 b C	5,95 b C	23,70 a B
<i>Aeromonas</i> sp. A47	5,67 b C	0,00 c D	5,69 b C	11,84 a F
<i>Aeromonas</i> sp. PX26F.(A)	5,08 b D	2,00 c C	5,76 b C	23,01 a B
<i>Aeromonas</i> sp. A97	5,07 b D	3,84 b C	5,08 b D	21,74 a C
<i>Aeromonas</i> sp. F84A	5,06 b D	2,54 c C	4,87 b D	25,35 a A
<i>Aeromonas</i> sp. A3	4,97 b D	5,50 b B	4,91 b D	23,35 a B
<i>Aeromonas</i> sp. A101	4,03 b D	3,80 b C	3,58 b D	20,99 a C
<i>Aeromonas</i> sp. F93	3,57 b D	1,17 c D	3,42 b D	19,54 a D
C.V. (%)				14,29

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na horizontal e maiúscula na vertical não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o teste de Skot-Knott a 5% ($P < 0,05$) de probabilidade. FM – filtrado micelial; AgNO_3 – nitrato de prata a 1 mM; cloranfenicol – 0,30 mg/mL; C.V. – coeficiente de variação

No ensaio de determinação da nanopartícula mais eficiente, houve significativa redução da atividade antibacteriana, algo também observado com a solução de nitrato de prata utilizada como controle, não ocorrendo com o cloranfenicol. Neste ensaio, as maiores zonas de inibição (Figura 11) foram demonstradas pelas nanopartículas do *T. tomentosum* P14C2, entre 9,12 mm contra *Aeromonas* sp. A96 e 9,52 mm contra *P. aeruginosa*, e pelo *T. brevicompactum* P16D2, entre 9,41 mm contra *P. aeruginosa* e 8,77 mm contra *Aeromonas* sp. A96. As zonas de inibição das nanopartículas dos fungos *T. harzianum* P4A e *T. inhamatum* P21C ficaram abaixo de 5,31 mm. Essa redução da atividade antibacteriana pode ser resultante de vários fatores, como por exemplo aglomeração, foto-oxidação ou precipitação das nanopartículas (FAVELA-CAMACHO *et al.*, 2019).

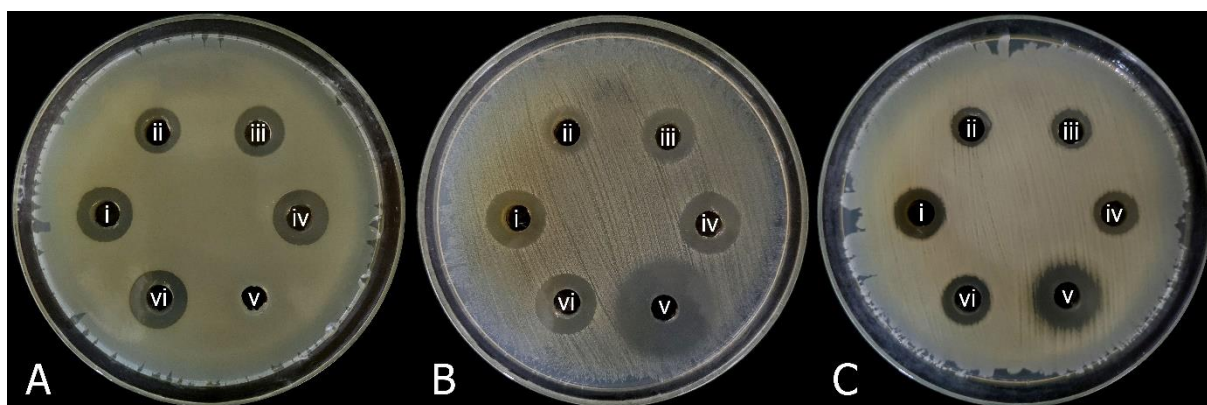


Figura 11 - Atividade antibacteriana de AgNPs de *Trichoderma* spp. A – *Pseudomonas aeruginosa*; B – *Aeromonas* sp. A96; C – *Klebsiella pneumoniae*. i – *Trichoderma brevicompactum* P16D2; ii – *Trichoderma harzianum* P4A; iii – *Trichoderma inhamatum* P21C; iv – *Trichoderma tomentosum* P14C2; v – cloranfenicol; vi – nitrato de prata

Foto: Coelho, K. W. S. A. (2020)

Tabela 8 - Comparação do diâmetro médio (mm) de zonas de inibição de crescimento bacteriano pela ação das AgNPs biossintetizadas a partir do filtrado micelial de *Trichoderma* spp.

Bactérias	P16D	P4A	P21C	P14C2	AgNO ₃	CLO
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	9,41 a A	4,16 b A	5,31 b A	9,52 a A	9,87 a A	0,00 c F
<i>Aeromonas</i> sp. A96	8,77 b A	3,43 c A	5,01 c A	9,12 b A	9,84 b A	18,80 a C
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13899	7,14 b B	2,86 c A	3,59 c A	4,93 c C	6,30 b B	10,06 a E
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	6,13 b B	2,92 d A	4,71 c A	6,76 b B	7,30 b B	13,54 a D
<i>Aeromonas</i> sp. A3	5,46 b C	4,51 b A	4,45 b A	5,11 b C	5,43 b C	23,96 a A
<i>Aeromonas</i> sp. A97	5,40 b C	3,57 b A	3,55 b A	4,35 b C	4,38 b C	22,24 a A
<i>Aeromonas</i> sp. PX84	5,41 b C	3,11 c A	3,39 c A	4,78 b C	5,58 b C	23,93 a A
<i>Aeromonas</i> sp. F84A	5,15 b C	3,26 b A	3,34 b A	3,87 b C	3,84 b C	22,50 a A
<i>Aeromonas</i> sp. ST86	4,43 b C	3,06 b A	2,92 b A	3,69 b C	3,89 b C	23,66 a A
<i>Aeromonas</i> sp. PX52	4,40 b C	3,43 b A	3,53 b A	3,65 b C	3,97 b C	23,03 a A
<i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 7966	4,10 b C	3,81 b A	4,04 b A	4,04 b C	4,88 b C	22,87 a A
<i>Aeromonas</i> sp. PX26F.(A)	3,93 b D	4,15 b A	3,27 b A	4,32 b C	4,01 b C	21,36 a B
<i>Aeromonas</i> sp. A47	3,81 b D	2,69 b A	3,04 b A	3,88 b C	4,10 b C	14,68 a D
<i>Aeromonas</i> sp. A101	3,53 b D	2,70 b A	2,73 b B	3,14 b D	2,70 b D	19,52 a C
<i>Aeromonas</i> sp. A19	3,49 b D	3,18 b A	2,40 b B	3,89 b C	4,19 b C	20,89 a B
<i>Aeromonas</i> sp. F50	3,00 b D	1,83 b B	1,75 b B	2,24 b D	2,66 b D	21,63 a B
<i>Aeromonas</i> sp. F77	3,01 a D	1,82 a B	1,67 a B	2,80 a D	2,97 a D	0,00 b F
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	2,65 b D	0,00 c B	0,00 c B	2,43 b D	3,15 b D	8,88 a E
<i>Aeromonas</i> sp. F93	2,36 b D	1,72 b B	1,19 b B	1,49 b D	1,87 b D	20,21 a C
<i>Aeromonas</i> sp. A38	2,09 b D	0,80 c B	2,35 b B	3,16 b D	0,00 c E	21,55 a B
C.V. (%)	17,22					

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na horizontal e maiúscula na vertical não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o teste de Skot-Knott a 5% ($P < 0,05$) de probabilidade. AgNPs: P16D2 - *T. brevicompactum*, P4A - *T. harzianum*, P21C - *T. inhamatum*, P14C2 - *T. tomentosum*; AgNO₃ - nitrato de prata a 1 mM; CLO - cloranfenicol (0,30 mg/mL); C.V. - coeficiente de variação

A CIM das nanopartículas (Tabela 9) ficou na faixa de diluição até 1:4, sendo visível o crescimento bacteriano nos poços a partir da diluição 1:8 até 1:1024. A CIM da solução coloidal de AgNPs de *T. brevicompactum* P16D2 e *T. tomentosum* P14C2 foi de 1:4 para todas as bactérias, com exceção de *E. coli* que foi de 1:2 e não inibida respectivamente.

A CIM das AgNPs de *T. harzianum* P4A e *T. inhamatum* P21C apresentaram CIM de 1:2, não apresentando inibição contra *E. coli*. A menor CBM foi de 1:4 expressa pelas AgNPs de *T. brevicompactum* P16D2 e *T. tomentosum* P14C2 contra *A. hydrophila*, *K pneumoniae*, e *P. aeruginosa*.

A CBM das AgNPs de *T. harzianum* P4A e *T. inhamatum* P21C foi de 1:2 contra todas as bactérias, menos *E. coli*, que foi capaz de crescer nessa diluição. Também foi observado efeito bacteriostático das AgNPs contra algumas cepas. Diferindo deste estudo, Oliveira *et al.* (2013) obtiveram resultados mais significativos, onde as AgNPs apresentaram CIM de 1:8 até 1:256. Esse fato está relacionado diretamente com a concentração de prata de 5 mM que foi utilizada, diferindo deste estudo onde foi utilizado 1 mM.

Tabela 9 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) pela ação de AgNPs biossintetizadas pelo filtrado micelial de *Trichoderma* spp.

Bactérias	P16D2		P4A		P21C		P14C2	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
<i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 7966	1:4	1:4	1:2	1:2*	1:2	1:2	1:4	1:4
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	1:2	1:2	-	-	-	-	1:2	1:2*
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13899	1:4	1:4	1:2	1:2	1:2	1:2	1:4	1:4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	1:4	1:2*	1:2	1:2*	1:2	1:2*	1:4	1:4
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	1:4	1:2	1:2	1:2*	1:2	1:2*	1:4	1:2

P16D2 - *Trichoderma brevicompactum*, P4A - *T. harzianum*, P21C - *T. inhamatum*, P14C2 - *T. tomentosum*; (-) não houve inibição; (*) efeito bacteriostático

A interação de nanopartículas de prata com bactérias Gram-negativas e Gram-positivas é diferenciada, isso se deve principalmente pela espessura da parede celular. O tamanho das nanopartículas, o formato e a concentração são fatores determinantes na eficácia antibacteriana (ACHARYA *et al.*, 2018; DONG *et al.*, 2019; UGWOKÉ *et al.*, 2019).

As AgNPs biossintetizadas neste estudo apresentaram atividade antibacteriana com pequenas variações. Os tamanhos de 72,22 e 73,82 nm das nanopartículas podem ter influenciado nestes resultados, algo que foi constatado no estudo de Dong *et al.* (2019), onde a medida que o tamanho das AgNPs aumentava, a CIM e a CBM também aumentavam, sendo de respectivamente de 1,0 e 1,1 µg/mL no tamanho de 10 ± 5 nm, enquanto que no tamanho de 90 ± 5 nm a CIM e a CBM foram de 11,5 e 11,7 µg/mL. Elgorban *et al.* (2016) e El-Waseif *et al.* (2017) obtiveram zonas de inibição excelentes, acima de 20 mm, com AgNPs de *T. viride* e *T. harzianum*, respectivamente. O tamanho das nanopartículas obtidas ficou na faixa de 1-50 nm e 5,33-29,46 nm, que por serem menores que as nanopartículas obtidas neste estudo, podem ter contribuído significativamente na atividade antibacteriana. O efeito antibacteriano mais eficiente de AgNPs pequenas pode ser explicado pela facilidade destas em adentrar a célula bacteriana.

O formato das AgNPs influencia na eficácia antibacteriana porque a área de superfície de contato com a membrana celular muda, esse fato foi confirmado no estudo de Alshareef *et al.* (2017), que observaram atividade antibacteriana mais eficiente de AgNPs com formato de octaedro comparadas com as de formato esférico. No estudo de Cheon *et al.* (2019) nanodiscos e nanoesferas de prata foram mais eficientes que nanotriângulos em ensaio contra *E. coli*. A CIM de AgNPs esféricas foi menor quando comparada com nanobastões no estudo de Acharya *et al.* (2018). O formato das nanopartículas obtidas neste estudo não pode ser determinado.

A concentração de AgNPs e do AgNO₃ influenciam significativamente na atividade antibacteriana, pois à medida que estas concentrações aumentam, o efeito antibacteriano tende

a ser maior. Esse fato ocorreu com pequenas variações no estudo de Ibrahim e Hassan (2016), porém foi mais expressivo no estudo de Pazos-Ortiz *et al.* (2017), onde a concentração de 100 mM de AgNO₃ promoveu zonas de inibição acima de 34 mm.

A concentração de 1 mM de AgNO₃ utilizada neste estudo possibilitou a conversão em AgNPs pelos fungos avaliados, sendo o *T. harzianum* P4A mais eficiente, o que permite concluir que a otimização dos parâmetros de biossíntese, variando a concentração de AgNO₃ e dos demais fatores, pode melhorar a eficácia antibacteriana deste e dos demais fungos.

Estudos *in vitro* como este tem demonstrado resultados promissores com AgNPs e outras nanopartículas metálicas, o que permite a realização de pesquisa *in vivo*, para determinar de fato como as nanopartículas irão funcionar. Shaalan *et al.* (2018) obtiveram sucesso em ensaio com truta arco-íris desafiada com *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*, onde não houveram sinais clínicos de infecção, alterações histopatológicas ou mortalidade no grupo que recebeu AgNPs como tratamento. No estudo de Vijayakumar *et al.* (2017) foi comprovada a eficácia de uma terapia antibacteriana para controle de infecções por *A. hydrophila* em *Oreochromis mossambicus* usando nanopartículas de ouro revertidas pelo fucoidan, polissacarídeo oriundo de algas marinhas. A taxa de mortalidade de *O. mossambicus* infectados foi acima de 90% enquanto que a mortalidade do grupo que recebeu as nanopartículas de ouro revestidas por fucoidan como tratamento foi menor que 30%. Em ensaio AgNPs na concentração de 10 mg/L, Kanwal *et al.* (2019) constataram eficiência desta concentração no controle de infecção causada por *P. aeruginosa* em *Labeo rohita*.

Apesar da nanotecnologia contribuir significativamente na otimização de propriedades de materiais, a sua aplicação na piscicultura e ciência animal como um todo tem caminhado lentamente, apesar do aumento de pesquisas nessa área. Isso faz com que novos estudos sejam necessários para determinar como utilizar nanopartículas ou outros nanomateriais sem que sejam tóxicos aos animais, visto que vários autores comprovam o potencial nanotóxico de nanopartículas, principalmente de nanopartículas metálicas, algo que necessita de estudos mais aprofundados levando em consideração a diversidade de espécies de peixes criadas em cativeiro, além de comparar a toxicidade de nanopartículas *in vivo* e definir a melhor aplicação das mesmas na piscicultura (ALE *et al.*, 2018; LIU *et al.*, 2019; SRINIVASAN *et al.*, 2019).

6. CONCLUSÕES

Todos as linhagens de *Trichoderma* spp. encontram-se viáveis, mesmo após treze anos de preservação. Os filtrados miceliais das quatro linhagens foram capazes de biossintetizar nanopartículas de prata. A linhagem *T. harzianum* P4A foi a que mais se destacou, sendo detectada a biossíntese a partir de 24 horas após a incubação, enquanto as demais exibiram mudança de coloração a partir de 72 horas.

A caracterização parcial confirmou a presença de nanopartículas de prata, o que indicou que as nanopartículas biossintetizadas por *T. harzianum* P4A apresentam boa estabilidade, são monodispersas e possuem homogeneidade morfológica.

Todas as nanopartículas apresentaram atividade antibacteriana, sendo observada redução da atividade, além de efeitos bactericida e bacteriostático. Diante disso, são necessárias otimizações dos parâmetros de biossíntese a fim de tornar a atividade antibacteriana mais eficiente, além de realizar caracterização físico-química mais aprofundada destas nanopartículas.

7. REFERÊNCIAS

ABBASI, E. *et al.* Silver nanoparticles: synthesis methods, bio-applications and properties. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 173-180, 2016.

ABDEL-KAREEM, M. M.; ZOHRI, A. A. Extracellular mycosynthesis of gold nanoparticles using *Trichoderma hamatum*: optimization, characterization and antimicrobial activity. **Letters in Applied Microbiology**, v. 67, n. 5, p. 465-475, 2018.

ACHARYA, D. *et al.* Shape dependent physical mutilation and lethal effects of silver nanoparticles on bacteria. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1-11, 2018.

ADEYEMI, O. S. *et al.* Silver nanoparticles restrict microbial growth by promoting oxidative stress and DNA damage, **EXCLI Journal**, v. 19, p. 492-500, 2020.

ADHIKARI, P.; PANDEY, A. Bioprospecting plant growth promoting endophytic bacteria isolated from Himalayan yew (*Taxus wallichiana* Zucc.). **Microbiological Research**, v. 239, p. 1-7, 2020.

AFFES, S. *et al.* Controlled size green synthesis of bioactive silver nanoparticles assisted by chitosan and its derivatives and their application in biofilm preparation. **Carbohydrate Polymers**, v. 236, p. 1-14, 2020.

AHLUWALIA, V. *et al.* Green synthesis of silver nanoparticles by *Trichoderma harzianum* and their bio-efficacy evaluation against *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumonia*. **Industrial Crops And Products**, v. 55, p. 202-206, 2014.

ALE, A. *et al.* Integrative assessment of silver nanoparticles toxicity in *Prochilodus lineatus* fish. **Ecological Indicators**, v. 93, p. 1190-1198, 2018.

ALGHABSHI, A.; AUSTIN, B.; CRUMLISH, M. *Aeromonas salmonicida* isolated from wild and farmed fish and invertebrates in Oman. **International Aquatic Research**, v. 10, n. 2, p. 145-152, 2018.

ALI, S. G. *et al.* Biogenic gold nanoparticles as potent antibacterial and antibiofilm nano-antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa*. **Antibiotics**, v. 9, n. 3, p. 1-13, 2020.

ALI, W. B. *et al.* Screening of five marine-derived fungal strains for their potential to produce oxidases with laccase activities suitable for biotechnological applications. **Bmc Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 1-13, 2020.

ALMAARY, K. S. *et al.* Complete green synthesis of silver-nanoparticles applying seed-borne *Penicillium duclauxii*. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 27, n. 5, p. 1333-1339, 2020.

ALSHAREEF, A. *et al.* Shape-dependent antibacterial activity of silver nanoparticles on *Escherichia coli* and *Enterococcus faecium* bacterium. **Applied Surface Science**, v. 424, p. 310-315, 2017.

ALYOUSEF, A. A. *et al.* Biogenic silver nanoparticles by *Myrtus communis* plant extract: biosynthesis, characterization and antibacterial activity. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 33, n. 1, p. 931-936, 2019.

AMARASINGHE, L. D. *et al.* Comparative study on larvicidal activity of green synthesized silver nanoparticles and *Annona glabra* (Annonaceae) aqueous extract to control *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: culicidae). **Heliyon**, v. 6, n. 6, p. 1-8, 2020.

ANDRADE, J. I. A. *et al.* Hematology and biochemistry of *Colossoma macropomum* co-infected with *Aeromonas hydrophila* and monogenean *Anacanthorus spathulatus* after treatment with seed extract of *Bixa orellana*. **Aquaculture**, v. 495, p. 452-457, 2018.

ARORA, D. S.; KAUR, N. Antimicrobial potential of fungal endophytes from *Moringa oleifera*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 187, n. 2, p. 628-648, 2018.

ARYA, A. *et al.* Biogenic synthesis of copper and silver nanoparticles using green alga *Botryococcus braunii* and its antimicrobial activity. **Bioinorganic Chemistry and Applications**, v. 2018, p. 1-9, 2018.

ARYAL, S. *et al.* Top-down fabrication-based nano/microparticles for molecular imaging and drug delivery. **International Journal of Nanomedicine**, v. 14, p. 6631-6644, 2019.

ASLAM, B. *et al.* Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. **Infection and Drug Resistance**, v. 11, p. 1645-1658, 2018.

AYALA-ZERMEÑO, M. A. *et al.* Viability, purity, and genetic stability of entomopathogenic fungi species using different preservation methods. **Fungal Biology**, v. 121, n. 11, p. 920-928, 2017.

AZMATH, P. *et al.* Mycosynthesis of silver nanoparticles bearing antibacterial activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 24, n. 2, p. 140-146, 2016.

BALAKUMARAN, M. D. *et al.* Exploitation of endophytic fungus, *Guignardia mangiferae* for extracellular synthesis of silver nanoparticles and their *in vitro* biological activities. **Microbiological Research**, v. 178, p. 9-17, 2015.

BALAKUMARAN, M. D. *et al.* Mycosynthesis of silver and gold nanoparticles: optimization, characterization and antimicrobial activity against human pathogens. **Microbiological Research**, v. 182, p. 8-20, 2016.

BALOUIRI, M. *et al.* Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: a review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 6, n. 2, p. 71-79, 2016.

BARROS, C. *et al.* Biogenic nanosilver against multidrug-resistant bacteria (MDRB). **Antibiotics**, v. 7, n. 3, p. 1-24, 2018.

BASTOS, V. *et al.* Coating independent cytotoxicity of citrate- and PEG-coated silver nanoparticles on a human hepatoma cell line. **Journal of Environmental Sciences**, v. 51, p. 191-201, 2017.

BELLO-LÓPEZ, J. M. *et al.* Horizontal gene transfer and its association with antibiotic resistance in the genus *Aeromonas* spp. **Microorganisms**, v. 7, n. 9, p. 1-11, 2019.

BELUSSO, L. C. S. *et al.* Synthesis of silver nanoparticles from bottom up approach on borophosphate glass and their applications as SERS, antibacterial and glass-based catalyzt. **Applied Surface Science**, v. 473, p. 303-312, 2019.

BISSETT, J. *et al.* Accepted *Trichoderma* names in the year 2015. **Ima Fungus**, v. 6, n. 2, p. 263-295, 2015.

BONONI, L. *et al.* Phosphorus-solubilizing *Trichoderma* spp. from Amazon soils improve soybean plant growth. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1-13, 2020.

BRATOVČIĆ, A. Different applications of nanomaterials and their impact on the environment. **SSRG International Journal of Material Science and Engineering**, v. 5, n. 1, p. 1-7, 2019.

BUNYAN, I.; OBAIS, I. Genotypic detection of some virulence factors among *Aeromonas hydrophila* isolated from diarrhea cases (Iraq). **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 85-93, 2018.

CARVALHO, V. F. M. *et al.* Optimization of composition and obtainment parameters of biocompatible nanoemulsions intended for intraductal administration of piplartine (piperlongumine) and mammary tissue targeting. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 567, p. 1-13, 2019.

CHAIRUANGKITTI, P. *et al.* Silver nanoparticles induce toxicity in A549 cells via ROS-dependent and ROS-independent pathways. **Toxicology in Vitro**, v. 27, n. 1, p. 330-338, 2013.

CHAIX, G. *et al.* Distinct *Aeromonas* populations in water column and associated with copepods from estuarine environment (Seine, France). **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1-13, 2017.

CHANDRARATHNA, H. P. S. U. *et al.* Outcome of co-infection with opportunistic and multidrug resistant *Aeromonas hydrophila* and *A. veronii* in zebrafish: identification, characterization, pathogenicity and immune responses. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 80, p. 573-581, 2018.

CHANG, Y. *et al.* Primary investigation of the diversity and distribution characteristics of *Trichoderma* spp. in the specific soil of volcanoic forest park and volcano platform. **Pakistan Journal of Botany**, v. 52, n. 1, p. 1-9, 2019.

CHAVES NETO, J. R. *et al.* Avaliação de diferentes métodos de preservação do fungo *Phoma dimorpha*. **Colloquium Agrariae**, v. 15, n. 4, p. 01-10, 2019.

CHEON, J. Y. *et al.* Shape-dependent antimicrobial activities of silver nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v. 14, p. 2773-2780, 2019.

CLSI. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard – 10th Edition**. CLSI document M07-A10. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015.

CITARTAN, M. *et al.* Aptamers as the chaperones (Aptachaperones) of drugs-from siRNAs to DNA nanorobots. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 567, p. 1-16, 2019.

COSTA, C. M. S. *et al.* Efficacy of the essential oils of *Mentha piperita*, *Lippia alba* and *Zingiber officinale* to control the acanthocephalan *Neoechinorhynchus buttnerae* in *Colossoma macropomum*. **Aquaculture Reports**, v. 18, p. 1-9, 2020.

CUNNINGHAM, F. L. *et al.* Potential of double-crested cormorants (*Phalacrocorax auritus*), American white pelicans (*Pelecanus erythrorhynchos*), and wood storks (*Mycteria americana*) to transmit a hypervirulent strain of *Aeromonas hydrophila* between channel catfish culture ponds. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 54, n. 3, p. 548-552, 2018.

DAKAL, T. C. *et al.* Mechanistic basis of antimicrobial actions of silver nanoparticles. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1-17, 2016.

DANANJAYA, S. H. S. *et al.* Preparation, characterization, and antimicrobial properties of chitosan–silver nanocomposites films against fish pathogenic bacteria and fungi. **Indian Journal of Microbiology**, v. 57, n. 4, p. 427-437, 2017.

DARYAEI, A. *et al.* Nutrient amendments affect *Trichoderma atroviride* conidium production, germination and bioactivity. **Biological Control**, v. 93, p. 8-14, 2016.

DAS, M. M. *et al.* Biological control of black pepper and ginger pathogens, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* and *Phytophthora capsici*, using *Trichoderma* spp. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 17, p. 177-183, 2019.

DELABONA, P. S. *et al.* The impact of putative methyltransferase overexpression on the *Trichoderma harzianum* cellulolytic system for biomass conversion. **Bioresource Technology**, v. 313, p. 1-7, 2020.

DIAS, M. K. R. *et al.* Lethal dose and clinical signs of *Aeromonas hydrophila* in *Arapaima gigas* (Arapaimidae), the giant fish from Amazon. **Veterinary Microbiology**, v. 188, p. 12-15, 2016.

DIKO, C. S. *et al.* Optimal synthesis conditions and characterization of selenium nanoparticles in *Trichoderma* sp. WL-Go culture broth. **Materials Chemistry and Physics**, v. 246, p. 1-6, 2020.

DONG, H. T. *et al.* *Aeromonas jandaei* and *Aeromonas veronii* caused disease and mortality in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). **Journal of Fish Diseases**, v. 40, n. 10, p. 1395-1403, 2017.

DONG, Y. *et al.* Antibacterial activity of silver nanoparticles of different particle size against *Vibrio natriegens*. **Plos One**, v. 14, n. 9, p. 1-12, 2019.

DRUZIAN, S. P. *et al.* Production of metabolites with antioxidant activity by *Botryosphaeria dothidea* in submerged fermentation. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 43, n. 1, p. 13-20, 2019.

DUBEY, S. *et al.* *Aeromonas hydrophila* OmpW PLGA nanoparticle oral vaccine shows a dose-dependent protective immunity in rohu (*Labeo rohita*). **Vaccines**, v. 4, n. 2, p. 1-11, 2016.

DUDEK, D. N. *et al.* Enhance of cellulase production and biomass degradation by transformation of the *Trichoderma reesei* RUT-C30 Δ zface1 strain. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 63, p. 1-12, 2020.

EL-GHAREEB, H. M. *et al.* Occurrence, molecular characterization and antimicrobial resistance of pathogenic *Aeromonas Hydrophila* from retail fish. **Alexandria Journal of Veterinary Sciences**, v. 62, n. 1, p. 172-187, 2019.

EL-SON, M. A. M. *et al.* 2019. Phenotypic and biochemical detection of *Aeromonas hydrophila* isolated from cultured *Oreochromis niloticus* during disease outbreaks. **International Journal of Fisheries and Aquatic Studies**, n. 7, v. 3, p. 192-202, 2019.

EL-WASEIF, A. A. -M. *et al.* Bioactivity enhancement with microbial silver nanoparticles produced and characterized from *Streptomyces* and *Trichoderma*. **The Egyptian Journal of Experimental Biology (Botany)**, v. 13, n. 2, p. 439-445, 2017.

ELAMAWI, R. M. *et al.* Biosynthesis and characterization of silver nanoparticles using *Trichoderma longibrachiatum* and their effect on phytopathogenic fungi. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 28, n. 1, p. 1-11, 2018.

ELBEHIRY, A. *et al.* Proteomic characterization and discrimination of *Aeromonas* species recovered from meat and water samples with a spotlight on the antimicrobial resistance of *Aeromonas hydrophila*. **MicrobiologyOpen**, v. 8, n. 11, p. 1-14, 2019.

ELGORBAN, A. M. *et al.* Bioengineered silver nanoparticles using *Curvularia pallescens* and its fungicidal activity against *Cladosporium fulvum*. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 24, n. 7, p. 1522-1528, 2017.

ELGORBAN, A. M. *et al.* Antimicrobial activity and green synthesis of silver nanoparticles using *Trichoderma viride*. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 30, n. 2, p. 299-304, 2016.

ELWAKIEL, N. *et al.* Synthesis, characterization of Ag⁺ and Sn²⁺ complexes and their applications to improve the biologic and mechanical properties of denture base materials. **Journal of Molecular Structure**, v. 1219, p. 1-9, 2020.

ESCOBAR, L. P. B. *et al.* Effect of culture preservation methods in the stability and nutritional characteristics of *Pleurotus ostreatus*. **Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences**, v. 22, n. 2, p. 359-368, 2020.

ESTEVEZ, M. B. *et al.* Biogenic silver nanoparticles: understanding the antimicrobial mechanism using confocal raman microscopy. **Materials Research Express**, v. 6, n. 12, p. 1-12, 2020.

FADEL, H. M.; EL-LAMIE, M. M. M. Vibriosis and *Aeromonas* infection in shrimp: isolation, sequencing, and control. **International Journal of One Health**, p. 38-48, 2019.

FARAMARZI, S.; ANZABI, Y.; JAFARIZADEH-MALMIRI, H. Nanobiotechnology approach in intracellular selenium nanoparticle synthesis using *Saccharomyces cerevisiae* - fabrication and characterization. **Archives of Microbiology**, v. 202, n. 5, p. 1203-1209, 2020.

FARSI, M.; FAROKHI, S. Biosynthesis of antibacterial silver nanoparticles by endophytic fungus *Nemania* sp. isolated from *Taxus baccata* L. (Iranian Yew). **Zahedan Journal of Research in Medical Sciences**, v. 20, n. 6, p. 1-7, 2018.

FAVELA-CAMACHO, S. E. *et al.* How to decrease the agglomeration of magnetite nanoparticles and increase their stability using surface properties. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 574, p. 29-35, 2019.

FEITOZA, D. L. S. *et al.* Risco da rentabilidade em pisciculturas de tambaqui nos estados do Amazonas, Rondônia e Roraima. **Revista iPecege**, v. 4, n. 4, p. 40-53, 2019.

FERNÁNDEZ-BRAVO, A.; FIGUERAS, M. J. An Update on the Genus *Aeromonas*: taxonomy, epidemiology, and pathogenicity. **Microorganisms**, v. 8, n. 1, p. 1-39, 2020.

FERRANTE, M. *et al.* Evaluation of the florfenicol treatment of infections caused by *Streptococcus* spp and *Aeromonas* spp in tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Advances in Animal and Veterinary Sciences**, v. 8, n. 6, p. 1-5, 2020.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

FREIRE, A. K. L. *et al.* Availability and morphological characteristics of endophytic fungi held in different methods of preservation. **Scientific Research and Essays**, v. 11, n. 6, p. 76-79, 2016.

GADE, A. *et al.* Green synthesis of silver nanoparticles by *Phoma glomerata*. **Micron**, v. 59, p. 52-59, 2014.

GANDRA, A. L. O mercado de pescado na Região Metropolitana de Manaus. **Infopesca**, 33p. 2010.

GANESAN, V. *et al.* *Periconium* sp. (endophytic fungi) extract mediated sol-gel synthesis of ZnO nanoparticles for antimicrobial and antioxidant applications. **Materials Science in Semiconductor Processing**, v. 105, p. 1-12, 2020.

GAO, J. *et al.* The stress hormone norepinephrine increases the growth and virulence of *Aeromonas hydrophila*. **MicrobiologyOpen**, v. 8, n. 4, p. 1-10, 2018.

GARINO, N. *et al.* Zinc oxide nanocrystals as a nanoantibiotic and osteoinductive agent. **Rsc Advances**, v. 9, n. 20, p. 11312-11321, 2019.

GEE, P. *et al.* Extracellular nanovesicles for packaging of CRISPR-Cas9 protein and sgRNA to induce therapeutic exon skipping. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 1-18, 2020.

GEMISHEV, O. T. *et al.* A green approach for silver nanoparticles preparation by cell-free extract from *Trichoderma reesei* fungi and their characterization. **Materials Research Express**, v. 6, n. 9, p. 1-12, 2019.

GONZÁLEZ-JARTÍN, J. M. *et al.* Magnetic nanostructures for marine and freshwater toxins removal. **Chemosphere**, v. 256, p. 1-11, 2020.

GUDIKANDULA, K.; MARINGANTI, S. C. Synthesis of silver nanoparticles by chemical and biological methods and their antimicrobial properties. **Journal of Experimental Nanoscience**, v. 11, n. 9, p. 714-721, 2016.

GUILGER, M. *et al.* Biogenic silver nanoparticles based on *Trichoderma harzianum*: synthesis, characterization, toxicity evaluation and biological activity. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-13, 2017.

GUILGER-CASAGRANDE, M. *et al.* Biosynthesis of silver nanoparticles employing *Trichoderma harzianum* with enzymatic stimulation for the control of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-9, 2019.

GUILGER-CASAGRANDE, M.; LIMA, R. de. Synthesis of silver nanoparticles mediated by fungi: a review. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 7, p. 1-16, 2019.

HAGGAG, E. *et al.* Antiviral potential of green synthesized silver nanoparticles of *Lampranthus coccineus* and *Malephora lutea*. **International Journal of Nanomedicine**, v. 14, p. 6217-6229, 2019.

HAMAD, M. T. Biosynthesis of silver nanoparticles by fungi and their antibacterial activity. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 16, n. 2, p. 1015-1024, 2018.

HAMED, S. *et al.* Controlled biosynthesis of silver nanoparticles using nitrate reductase enzyme induction of filamentous fungus and their antibacterial evaluation. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 45, n. 8, p. 1588-1596, 2016.

HAMIDA, R. S. *et al.* Cytotoxic effect of green silver nanoparticles against ampicillin-resistant *Klebsiella pneumoniae*. **Rsc Advances**, v. 10, n. 36, p. 21136-21146, 2020.

HANAFY, M. H. Myconanotechnology in veterinary sector: status quo and future perspectives. **International Journal of Veterinary Science and Medicine**, v. 6, n. 2, p. 270-273, 2018.

HARMAN, G. E. *et al.* Endophytic strains of *Trichoderma* increase plants' photosynthetic capability. **Journal of Applied Microbiology**, p. 1-18, 2019.

HASSAN, D. *et al.* Antiprotozoal activity of silver nanoparticles against *Cryptosporidium parvum* oocysts: new insights on their feasibility as a water disinfectant. **Journal of Microbiological Methods**, v. 165, p. 1-7, 2019.

HENRY, M. A. *et al.* Dietary micronutrient supplementation in low fishmeal based diets for optimum growth and immune status of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. **Aquaculture**, v. 528, p. 1-11, 2020.

HOSSAIN, S. *et al.* Species identification, virulence markers and antimicrobial resistance profiles of *Aeromonas* sp. isolated from marketed hard-shelled mussel (*Mytilus coruscus*) in Korea. **Letters in Applied Microbiology**, v. 70, n. 3, p. 221-229, 2020.

HU, X. *et al.* Mycosynthesis, characterization, anticancer and antibacterial activity of silver nanoparticles from endophytic fungus *Talaromyces purpureogenus*. **International Journal of Nanomedicine**, v. 14, p. 3427-3438, 2019.

HUSSEIN, M. A. Silver tolerance and silver nanoparticle biosynthesis by *Neoscytalidium novaehollandiae* and *Trichoderma inhamatum*. **European Journal of Biological Research**, v. 6, n. 1, p. 28-35, 2016.

HUSSEINY, S. M.; SALAH, T. A.; ANTER, H. A. Biosynthesis of size controlled silver nanoparticles by *Fusarium oxysporum*, their antibacterial and antitumor activities. **Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 4, n. 3, p. 225-231, 2015.

HYDE, K. D. *et al.* The amazing potential of fungi: 50 ways we can exploit fungi industrially. **Fungal Diversity**, v. 97, n. 1, p. 1-136, 2019.

IBRAHIM, H. M. M.; HASSAN, M. S. Characterization and antimicrobial properties of cotton fabric loaded with green synthesized silver nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, v. 151, p. 841-850, 2016.

IKRAM, M. *et al.* Novel antimicrobial and antioxidative activity by endophytic *Penicillium roqueforti* and *Trichoderma reesei* isolated from *Solanum surattense*. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 41, n. 9, p. 1-11, 2019.

IPE, D. S. *et al.* Silver Nanoparticles at biocompatible dosage synergistically increases bacterial susceptibility to antibiotics. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1-11, 2020.

ISLAM, S. *et al.* Global antimicrobial resistance: a complex and dire threat with few definite answers. **Tropical Medicine & International Health**, v. 24, n. 6, p. 658-662, 2019.

IZEL-SILVA, J. *et al.* Aeration strategy in the intensive culture of tambaqui, *Colossoma macropomum*, in the tropics. **Aquaculture**, v. 529, p. 1-7, 2020.

JAMKHANDE, P. G. *et al.* Metal nanoparticles synthesis: an overview on methods of preparation, advantages and disadvantages, and applications. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 53, p. 1-11, 2019.

JAVADHESARI, S. M. *et al.* Antibacterial activity of ultra-small copper oxide (II) nanoparticles synthesized by mechanochemical processing against *S. aureus* and *E. coli*. **Materials Science and Engineering: C**, v. 105, p. 1-10, 2019.

Ji, S. *et al.* The effect of *Trichoderma* biofertilizer on the quality of flowering Chinese cabbage and the soil environment. **Scientia Horticulturae**, v. 262, p. 1-8, 2020.

JOGAIAH, S. *et al.* *Ganoderma applanatum*-mediated green synthesis of silver nanoparticles: structural characterization, and *in vitro* and *in vivo* biomedical and agrochemical properties. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 12, n. 7, p. 1108-1120, 2019.

JOHN, N.; VIDYALAKSHMI, V. B.; HATHA, A. A. M. Effect of pH and salinity on the production of extracellular virulence factors by *Aeromonas* from Food Sources. **Journal of Food Science**, v. 84, n. 8, p. 2250-2255, 2019.

KANDASAMY, S. *et al.* Assessment of antioxidant, antibacterial activities and bioactive compounds of the wild edible mushroom *Pleurotus sajor-caju*. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 26, n. 3, p. 1575-1581, 2019.

KANWAL, Z. *et al.* In vivo anti-proliferative activity of silver nanoparticles against *Pseudomonas aeruginosa* in freshwater *Labeo rohita*. **Applied Nanoscience**, v. 9, n. 8, p. 2039-2049, 2019.

KARMAKAR, P. *et al.* Bio-Monitoring of airborne fungi and antifungal activity of *Clerodendrum infortanum* L. against dominant fungi. **Sustainability, Agri, Food and Environmental Research**, p. 1-15, 2020.

KASHYAP, P. L. *et al.* Myconanotechnology in agriculture: a perspective. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 2, p. 191-207, 2012.

KESAVAN, A.; VENKATRAMAN, G. Nanotechnology and its applications. **The Scitech Journal**, v. 01, n. 06, p. 12-13, 2014.

KESHARI, A. *et al.* Synergistic Activity of green silver nanoparticles with antibiotics. **Nanomedicine Research Journal**, v. 5, n. 1, p. 1-11, 2020.

KHALIL, N. M. *et al.* Antifungal and anti-mycotoxin efficacy of biogenic silver nanoparticles produced by *Fusarium chlamydosporum* and *Penicillium chrysogenum* at non-cytotoxic doses. **Chemosphere**, v. 218, p. 477-486, 2019.

KHAN, N. T. *et al.* Optimizing Physioculture Conditions for the Synthesis of Silver Nanoparticles from *Aspergillus niger*. **Journal of Nanomedicine and Nanotechnology**, v. 7, n; 5, p. 1-4, 2016.

KHAN, I. *et al.* Nanoparticles: properties, applications and toxicities. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 12, n. 7, p. 908-931, 2019.

KHAN, A. U. *et al.* Selected nanotechnologies and nanostructures for drug delivery, nanomedicine and cure. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 43, n. 8, p. 1339-1357, 2020.

KHAN, R. A. A. *et al.* Bioactive secondary metabolites from *Trichoderma* spp. against phytopathogenic bacteria and root-knot Nematode. **Microorganisms**, v. 8, n. 3, p. 1-15, 2020.

KHODASHENAS, B.; GHORBANI, H. R. Synthesis of silver nanoparticles with different shapes. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 12, n. 8, p. 1823-1838, 2019.

KIM, F. J. P. *et al.* Elevada frequência de *Aeromonas* spp. e genes de virulência em cultivos de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) em tanques-rede, na região semiárida de Pernambuco, Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 71, n. 5, p. 1609-1615, 2019.

KIM, K. *et al.* Diversity of *Trichoderma* spp. in marine environments and their biological potential for sustainable industrial applications. **Sustainability**, v. 12, n. 10, p. 1-12, 2020.

KOBASHIGAWA, J. M. *et al.* Influence of strong bases on the synthesis of silver nanoparticles (AgNPs) using the ligninolytic fungi *Trametes troglitii*. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 26, n. 7, p. 1331-1337, 2019.

KOZIŃSKA, A.; PEKALA, A. Characteristics of disease spectrum in relation to species, serogroups, and adhesion ability of motile aeromonads in fish. **The Scientific World Journal**, v. 2012, p. 1-9, 2012.

KUMAR, H. K. *et al.* Metallic nanoparticles: a review. **Biomedical Journal of Scientific and Technical Research**, v. 4, n. 2, p. 1–11, 2018.

KWON, J. *et al.* A case of mortality caused by *Aeromonas hydrophila* in wild-caught red-eyed crocodile skinks (*Tribolonotus gracilis*). **Veterinary Sciences**, v. 7, n. 1, p. 1-6, 2019.

LATA, R. K.; DIVJOT, K.; NATH, Y. A. Endophytic microbiomes: Biodiversity, ecological significance and biotechnological applications. **Research Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 10, p. 142-162, 2019.

LEE, B. *et al.* Silver nanoparticles induce reactive oxygen species-mediated cell cycle delay and synergistic cytotoxicity with 3-bromopyruvate in *Candida albicans*, but not in *Saccharomyces cerevisiae*. **International Journal of Nanomedicine**, v. 14, p. 4801-4816, 2019.

LEE, S.; JUN, B. -H. Silver Nanoparticles: synthesis and application for nanomedicine. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 20, n. 4, p. 1-24, 2019.

LEIRA, M. H. *et al.* Problemas sanitários das pisciculturas brasileiras. **PUBVET**, v. 11, n. 6, p. 538-544, 2017.

LI, X. *et al.* Size-dependent catalytic activity of cobalt phosphides for hydrogen evolution reaction. **Journal of Energy Chemistry**, v. 43, p. 121-128, 2020.

LIANG, X.-R. *et al.* Trichosordarin A, a norditerpene glycoside from the marine-derived fungus *Trichoderma harzianum* R5. **Natural Product Research**, v. 34, n. 14, p. 2037-2042, 2019.

LIMA, C. A. S. *et al.* Sistemas de produção e grau de impacto ambiental das pisciculturas no estado do Amazonas, Brasil. **Revista Colombiana de Ciência Animal**, v. 11, n. 1, p. 1-13, 2019.

LIN, P. *et al.* An Enhancement of Antibacterial Activity and Synergistic Effect of Biosynthesized Silver Nanoparticles by *Eurotium cristatum* with Various Antibiotics. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 25, n. 3, p. 450-458, 2020.

LIU, H. *et al.* Toxicity responses of different organs of zebrafish (*Danio rerio*) to silver nanoparticles with different particle sizes and surface coatings. **Environmental Pollution**, v. 246, p. 414-422, 2019.

- LOGARANJAN, K. *et al.* Shape- and size-controlled synthesis of silver nanoparticles using *Aloe vera* plant extract and their antimicrobial activity. **Nanoscale Research Letters**, v. 11, n. 1, p. 1-9, 2016.
- MA, J. *et al.* Biodiversity of *Trichoderma* from grassland and forest ecosystems in Northern Xinjiang, China. **3 Biotech**, v. 10, n. 8, p. 1-13, 2020.
- MADAKKA, M. *et al.* Mycosynthesis of silver nanoparticles and their characterization. **Methodsx**, v. 5, p. 20-29, 2018.
- MANSOUR, A. *et al.* Molecular identification of *Aeromonas hydrophila* strains recovered from kafrelsheikh fish farms. **Slovenian Veterinary Research**, v. 56, n. 22-, p. 201-208, 2019.
- MARINHO-NETO, F. A. *et al.* Morphological, microbiological and ultrastructural aspects of sepsis by *Aeromonas hydrophila* in *Piaractus mesopotamicus*. **Plos One**, v. 14, n. 9, p. 1-20, 2019.
- MARIOTTO, I. F. *et al.* Eficácia de Oxitetraciclina no tratamento de *Streptococcus Agalactiae* em tilápia a diferentes temperaturas de criação. **Pubvet**, v. 12, n. 10, p. 1-5, 2018.
- MARUYAMA, C. R. *et al.* Encapsulation of *Trichoderma harzianum* preserves enzymatic activity and enhances the potential for biological control. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, p. 1-14, 2020.
- MAZARE, A. *et al.* Black TiO₂ nanotubes: efficient electrodes for triggering electric field-induced stimulation of stem cell growth. **Acta Biomaterialia**, v. 97, p. 681-688, 2019.
- MEDEIROS, P. A. *et al.* Tecnologias de baixo custo para piscicultura familiar no Amazonas, Brasil. **Nexus Revista de Extensão do IFAM**, v. 4, n. 1, p. 11-18, 2018.
- MEDICI, S. *et al.* Medical uses of silver: history, myths, and scientific evidence. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 62, n. 13, p. 5923-5943, 2019.
- MING, S. *et al.* The solid fermentation state's optimization of *Trichoderma harzianum* M1. **Iop Conference Series: Materials Science and Engineering**, v. 612, p. 1-7, 2019.
- MIRSADEGHI, S. *et al.* Green and simple synthesis of silver nanoparticles by aqueous extract of *Perovskia abrotanoides*: characterization, optimization and antimicrobial activity. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 21, n. 11, p. 1129-1137, 2020.
- MIYAGI, K.; HIRAI, I.; SANO, K. Distribution of *Aeromonas* species in environmental water used in daily life in Okinawa Prefecture, Japan. **Environmental Health and Preventive Medicine**, v. 21, n. 5, p. 287-294, 2016.
- MOURDIKOU DIS, S.; PALLARES, R. M.; THANH, N. T. K. Characterization techniques for nanoparticles: comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties. **Nanoscale**, v. 10, n. 27, p. 12871-12934, 2018.

MUSZYŃSKA, B. *et al.* *Lentinula edodes* as a source of bioelements released into artificial digestive juices and potential anti-inflammatory material. **Biological Trace Element Research**, v. 194, n. 2, p. 603-613, 2019.

MZULA, A. *et al.* Phenotypic and molecular detection of *Aeromonas* infection in farmed *Nile tilapia* in Southern highland and Northern Tanzania. **Heliyon**, v. 5, n. 8, p. 1-8, 2019.

NAHER, L. *et al.* *Trichoderma* species diversity in rhizosphere soils and potential antagonism with *Fusarium oxysporum*. **Bioscience Journal**, p. 13-26, 2019.

NANDA, A.; NAYAK, B. K.; MOORTHY, K. Antimicrobial properties of biogenic silver nanoparticles synthesized from phylloplane fungus, *Aspergillus tamarii*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 16, p. 225-228, 2018.

NAYAK, B. K. *et al.* Biogenic synthesis of silver nanoparticle from wasp nest soil fungus, *Penicillium italicum* and its analysis against multi drug resistance pathogens. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 16, p. 412-418, 2018.

NETALA, V. *et al.* Biogenesis of silver nanoparticles using endophytic fungus *Pestalotiopsis microspora* and evaluation of their antioxidant and anticancer activities. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 5683-5696, 2016.

NOSHAD, A. *et al.* Antibacterial effect of silver nanoparticles (AgNPs) synthesized from *Trichoderma harzianum* against *Clavibacter michiganensis*. **Journal of Nano Research**, v. 58, p. 10-19, 2019.

NWAIWU, O.; ADUBA, C. C. An in silico analysis of acquired antimicrobial resistance genes in *Aeromonas* plasmids. **AIMS Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 75-91, 2020.

NUANKEAW, K. *et al.* First report of secondary metabolites, Violaceol I and Violaceol II produced by endophytic fungus, *Trichoderma polyalthiae* and their antimicrobial activity. **Mycoscience**, v. 61, n. 1, p. 16-21, 2020.

OGUNSILE, B. O. *et al.* Green synthesis of silver nanoparticles from leaf extract of *Tetrapleura tetraptera* and its antimicrobial activity. **Iop Conference Series: Materials Science and Engineering**, v. 805, p. 1-11, 2020.

OLIVEIRA, H. P. *et al.* Antimicrobial activity of silver nanoparticles synthesized by the fungus *Curvularia inaequalis*. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 20, p. 2917-2923, 2013.

OLIVEIRA, F. de *et al.* Biosynthesis of natural colorant by *Talaromyces amestolkiae*: mycelium accumulation and colorant formation in incubator shaker and in bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 161, p. 1-11, 2020.

OLIVEIRA, W. S. *et al.* Resíduo de macaxeira e de banana como fontes de carbono na criação de tambaqui (*Colossoma macropomum*) em sistema bioflocos no estado do Amazonas, Brasil. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 10, p. 76711-76724, 2020.

OMRAN, B. A. *et al.* Physicochemical properties of *Trichoderma longibrachiatum* DSMZ 16517-synthesized silver nanoparticles for the mitigation of halotolerant sulphate-reducing bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 126, n. 1, p. 138-154, 2018.

OSHIN, O. *et al.* Graphene-based biosensor for early detection of iron deficiency. **Sensors**, v. 20, n. 13, p. 1-13, 2020.

OVAIS, M. *et al.* Biosynthesis of metal nanoparticles via microbial enzymes: a mechanistic approach. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 12, p. 1-20, 2018.

PANÁČEK, A. *et al.* Silver nanoparticles strongly enhance and restore bactericidal activity of inactive antibiotics against multiresistant Enterobacteriaceae. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 142, p. 392-399, 2016.

PANG, X. *et al.* Three new polyketides from the marine sponge-derived fungus *Trichoderma* sp. SCSIO41004. **Natural Product Research**, v. 32, n. 1, p. 105-111, 2017.

PANTIDOS, N.; HORSFALL, L. E. Biological synthesis of metallic nanoparticles by bacteria, fungi and plants. **Journal of Nanomedicine & Nanotechnology**, v. 05, n. 05, p. 1-11, 2014.

PAPICH, M. G. **Saunders Handbook of Veterinary Drugs: Small and Large Animal**. Fourth edition, Elsevier, 932p, 2016.

PARK, Y. J. *et al.* Control effect of *Fusarium* wilt of cucumber by *Trichoderma* collection strain. **Journal of Environmental Science International**, v. 28, n. 3, p. 385-392, 2019.

PARK, Y.-H. *et al.* Endophytic *Trichoderma citrinoviride* isolated from mountain-cultivated ginseng (*Panax ginseng*) has great potential as a biocontrol agent against ginseng pathogens. **Journal of Ginseng Research**, v. 43, n. 3, p. 408-420, 2019.

PARVEKAR, P. *et al.* The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of silver nanoparticles against *Staphylococcus aureus*. **Biomaterial Investigations in Dentistry**, v. 7, n. 1, p. 105-109, 2020.

PAZ, A. L. *et al.* Protective effects of the fructooligosaccharide on the growth performance, hematology, immunology indicators and survival of tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characiformes: serrasalmidae) infected by *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture Reports**, v. 15, p. 1-8, 2019.

PAZOS-ORTIZ, E. *et al.* Dose-dependent antimicrobial activity of silver nanoparticles on polycaprolactone fibers against Gram-Positive and Gram-Negative bacteria. **Journal of Nanomaterials**, v. 2017, p. 1-9, 2017.

PeixeBr – Associação Brasileira de Piscicultura. **Anuário PeixeBR da piscicultura 2019**, 148p.

PESSOA, R. B. G. *et al.* Molecular characterization and evaluation of virulence traits of *Aeromonas* spp. isolated from the tambaqui fish (*Colossoma macropomum*). **Microbial Pathogenesis**, v. 147, p. 1-7, 2020.

PESSOA, R. B. G. *et al.* The genus *Aeromonas*: a general approach. **Microbial Pathogenesis**, v. 130, p. 81-94, 2019.

PETRISOR, C.; PAICA, A.; CONSTANTINESCU, F. Influence of abiotic factors on *in vitro* growth of *Trichoderma* strains. **Proceedings of the Romanian Academy. Series B**, v. 18, n. 1, p. 11–14, 2016.

POLITANO, A. D. *et al.* Use of silver in the prevention and treatment of infections: silver review. **Surgical Infections**, v. 14, n. 1, p. 8-20, 2013.

QAIS, F. A. *et al.* Antibacterial effect of silver nanoparticles synthesized using *Murraya koenigii* (L.) against multidrug-resistant pathogens. **Bioinorganic Chemistry and Applications**, v. 2019, p. 1-11, 2019.

QIN, W.-T.; ZHUANG, W.-Y. Seven new species of *Trichoderma* (Hypocreales) in the Harzianum and Strictipile clades. **Phytotaxa**, v. 305, n. 3, p. 1-19, 2017.

QUINTEROS, M. A. *et al.* Biogenic nanoparticles: synthesis, stability and biocompatibility mediated by proteins of *Pseudomonas aeruginosa*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 184, p. 1-6, 2019.

RADAIC, A. *et al.* Bacterial anti-microbial peptides and nano-sized drug delivery systems: the state of the art toward improved bacteriocins. **Journal of Controlled Release**, v. 321, p. 100-118, 2020.

RADHAKRISHNAN, V. S. *et al.* *In vitro* studies on oxidative stress-independent, Ag nanoparticles-induced cell toxicity of *Candida albicans*, an opportunistic pathogen. **International Journal of Nanomedicine**, v. 13, p. 91-96, 2018.

RAI, A. K. *et al.* Biotechnological potential of yeasts in functional food industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 83, p. 129-137, 2019.

RAJI, P. *et al.* Antibacterial activity of alkaloids, flavonoids, saponins and tannins mediated green synthesised silver nanoparticles against *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis*. **Journal of Cluster Science**, v. 30, n. 4, p. 881-895, 2019.

RANJBAR, R.; SALIGHEHZADEH, R.; SHARIFIYAZDI, H. Antimicrobial Resistance and Incidence of Integrons in *Aeromonas* Species Isolated from Diseased Freshwater Animals and Water Samples in Iran. **Antibiotics**, v. 8, n. 4, p. 1-7, 2019.

REDONDO-SALVO, S. *et al.* Pathways for horizontal gene transfer in bacteria revealed by a global map of their plasmids. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 1-13, 17 jul. 2020.

REHMAN, A. *et al.* *In vitro* anthelmintic effect of biologically synthesized silver nanoparticles on liver amphistome, *Gigantocotyle explanatum*. **Experimental Parasitology**, v. 198, p. 95-104, 2019.

REHMAN, S. U. *et al.* One new terphenyl glycoside from a sponge-derived fungus *Trichoderma reesei* (HN-2016-018). **Natural Product Communications**, v. 15, n. 2, p. 1-5, 2020.

REVINA, O. *et al.* Antimicrobial resistance of *Aeromonas* spp. isolated from the sea trout (*Salmo trutta* L.) in Latvia. **Veterinary Medicine**, p. 1-5, 2017.

ROCA, I. *et al.* The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention. **New Microbes and New Infections**, v. 6, p. 22-29, 2015.

ROCHA, M. J. S. *et al.* Changes in hematological and biochemical parameters of tambaqui (*Colossoma macropomum*) parasitized by metazoan species. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 27, n. 4, p. 488-494, 2018.

RODRÍGUEZ-SERRANO, C. *et al.* Biosynthesis of silver nanoparticles by *Fusarium scirpi* and its potential as antimicrobial agent against uropathogenic *Escherichia coli* biofilms. **Plos One**, v. 15, n. 3, p. 1-20, 2020.

ROSE, G. K. *et al.* Optimization of the biological synthesis of silver nanoparticles using *Penicillium oxalicum* GRS-1 and their antimicrobial effects against common food-borne pathogens. **Green Processing and Synthesis**, v. 8, n. 1, p. 144-156, 2019.

SABLE, S. V. *et al.* Bioreduction mechanism of silver nanoparticles. **Materials Science and Engineering: C**, v. 107, p. 1-12, 2020.

SABO, S. S. *et al.* Bioprospecting of probiotics with antimicrobial activities against *Salmonella heidelberg* and that produce B-complex vitamins as potential supplements in poultry nutrition. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1-14, 2020.

SALMEN, S. H.; ALHARBI, S. A. Silver nanoparticles synthesized biogenically from *Aloe fleurentiniorum* extract: characterization and antibacterial activity. **Green Chemistry Letters And Reviews**, v. 13, n. 1, p. 1-5, 2020.

SANDI, J. *et al.* Diversity of lipase-producing microorganisms from tropical oilseeds *Elaeis guineensis*, *Ricinus communis*, and *Jatropha curcas* L. from Costa Rica. **Current Microbiology**, v. 77, n. 6, p. 943-952, 2020.

SANKHWAR, S.; SRIVASTAVA, A. Evaluation of different pH, temperature and culture media on the mycelia growth of *Trichoderma asperellum*. **International Journal of Development Research**, v. 9, n. 3, p. 26831-26383, 2019.

SARAVANAKUMAR, K. *et al.* Antibacterial, and antioxidant potentials of non-cytotoxic extract of *Trichoderma atroviride*. **Microbial Pathogenesis**, v. 115, p. 338-342, 2018.

SARAVANAKUMAR, K.; WANG, M.-H. *Trichoderma* based synthesis of anti-pathogenic silver nanoparticles and their characterization, antioxidant and cytotoxicity properties. **Microbial Pathogenesis**, v. 114, p. 269-273, 2018.

SCATOLINO, M. V. *et al.* Tannin-stabilized silver nanoparticles and citric acid added associated to cellulose nanofibrils: effect on film antimicrobial properties. **Sn Applied Sciences**, v. 1, n. 10, p. 1-9, 2019.

SEETHARAMAN, P. K. *et al.* Antimicrobial and larvicidal activity of eco-friendly silver nanoparticles synthesized from endophytic fungi *Phomopsis liquidambaris*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 16, p. 22-30, 2018.

SEKIZUKA, T. *et al.* Potential KPC-2 carbapenemase reservoir of environmental *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas caviae* isolates from the effluent of an urban wastewater treatment plant in Japan. **Environmental Microbiology Reports**, v. 11, n. 4, p. 589-597, 2019.

SEWAKA, M. *et al.* Efficacy of synbiotic Jerusalem artichoke and *Lactobacillus rhamnosus* GG-supplemented diets on growth performance, serum biochemical parameters, intestinal morphology, immune parameters and protection against *Aeromonas veronii* in juvenile red tilapia (*Oreochromis* spp.). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 86, p. 260-268, 2019.

SHAALAN, M. *et al.* Recent progress in applications of nanoparticles in fish medicine: a review. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 12, n. 3, p. 701-710, 2016.

SHAALAN, M. *et al.* Silver nanoparticles: their role as antibacterial agent against *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Research in Veterinary Science**, v. 119, p. 196-204, 2018.

SHAFIQ, M. *et al.* An overview of the applications of nanomaterials and nanodevices in the food industry. **Foods**, v. 9, n. 2, p. 1-27, 3 2020.

SHAHZAD, A. *et al.* Size-controlled production of silver nanoparticles by *Aspergillus fumigatus* BTCB10: likely antibacterial and cytotoxic effects. **Journal of Nanomaterials**, v. 2019, p. 1-14, 2019.

SHARONOVA, A. *et al.* Surface functionalization of titanium with silver nanoparticles. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 1145, p. 1-7, 2019.

SHI, T. *et al.* Terpenoids from the coral-derived fungus *Trichoderma harzianum* (XS-20090075) induced by chemical epigenetic manipulation. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1-12, 2020.

SHI, X.-S. *et al.* Highly oxygenated polyketides produced by *Trichoderma koningiopsis* QA-3, an endophytic fungus obtained from the fresh roots of the medicinal plant *Artemisia argyi*. **Bioorganic Chemistry**, v. 94, p. 1-9, 2020.

SILVA, A. dos S. *et al.* The occurrence of bacteria of the genus *Aeromonas* spp. in *Oreochromis niloticus* (Tilapia) and in the water of amateur sport fish ponds and sensitiveness to antimicrobials. **Food and Nutrition Sciences**, v. 10, n. 01, p. 81-97, 2019.

SILVA, B. C. J. de *et al.* Multi-drug resistant mesophilic aeromonads isolated from marketed scallops (*Patinopecten yessoensis*) harboring resistance genes. **Fisheries & Aquatic Life**, v. 28, n. 1, p. 1-10, 2020.

SINGH, P. K.; JAIRATH, G.; AHLAWAT, S. S. Nanotechnology: a future tool to improve quality and safety in meat industry. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 4, p. 1739-1749, 2015.

SINGH, I. Biosynthesis of silver nanoparticle from fungi, algae and bacteria. **European Journal of Biological Research**, v. 9, n. 1, p. 45-56, 2019.

SINHA, A. *et al.* Comprehensive evaluation of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* on different culture media and at different temperature and pH. **The Pharma Innovation Journal**, v. 7, n. 2, p. 193-195, 2018.

SONG, Y.-P. *et al.* Harziane and cadinane terpenoids from the alga-endophytic fungus *Trichoderma asperellum* A-YMD-9-2. **Phytochemistry Letters**, v. 32, p. 38-41, 2019.

SONG, Y. *et al.* Three nitrogen-containing metabolites from an algicolous isolate of *Trichoderma asperellum*. **Marine Life Science & Technology**, v. 2, n. 2, p. 155-160, 2020.

SOOD, M. *et al.* *Trichoderma*: the “secrets” of a multitasking biocontrol agent. **Plants**, v. 9, n. 6, p. 1-25, 18 jun. 2020.

SRINIVASAN, M. *et al.* Green synthesis and characterization of titanium dioxide nanoparticles (TiO₂ NPs) using *Sesbania grandiflora* and evaluation of toxicity in zebrafish embryos. **Process Biochemistry**, v. 80, p. 197-202, 2019.

SUN, J. *et al.* Glycoside hydrolase family 62 A-L-Arabinofuranosidase from *Trichoderma reesei* and its applicable potential during mashing. **Foods**, v. 9, n. 3, p. 1-13, 2020.

SUTTHANONT, N.; ATTRAPADUNG, S.; NUCHPRAYOON, S. Larvicidal activity of synthesized silver nanoparticles from *Curcuma zedoaria* essential oil against *Culex quinquefasciatus*. **Insects**, v. 10, n. 1, p. 1-11, 2019.

TAHA, Z. K.; HAWAR, S. N.; SULAIMAN, G. M. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles from *Penicillium italicum* and its antioxidant, antimicrobial and cytotoxicity activities. **Biotechnology Letters**, v. 41, n. 8-9, p. 899-914, 2019.

TAHOUN, A. B. M. B. *et al.* Molecular characterisation, genotyping and survival of *Aeromonas hydrophila* isolated from milk, dairy products and humans in Egypt. **International Dairy Journal**, v. 63, p. 52-58, 2016.

TANG, L. *et al.* Co-occurrence of the blaKPC-2 and Mcr-3.3 gene in *Aeromonas caviae* SCAC2001 isolated from patients with diarrheal disease. **Infection and Drug Resistance**, v. 13, p. 1527-1536, 2020.

THANGAMANI, N.; BHUVANESHWARI, N. Green synthesis of gold nanoparticles using *Simarouba glauca* leaf extract and their biological activity of micro-organism. **Chemical Physics Letters**, v. 732, p. 1-7, 2019.

UGWOKE, E. *et al.* Concentration induced properties of silver nanoparticles and their antibacterial study. **Surfaces and Interfaces**, v. 18, p. 1-9, 2020.

USMAN, M. *et al.* Nanotechnology in agriculture: current status, challenges and future opportunities. **Science Of The Total Environment**, v. 721, p. 1-16, 2020.

VAHABI, K. *et al.* Biosynthesis of silver nanoparticles by fungus *Trichoderma reesei* (a route for large-scale production of AgNPs). **Insciences Journal**, v. 1, n. 1, p. 65-79, 2011.

VAZQUEZ-MUÑOZ, R. *et al.* Enhancement of antibiotics antimicrobial activity due to the silver nanoparticles impact on the cell membrane. **Plos One**, v. 14, n. 11, p. 1-18, 2019.

VÁZQUEZ-NÚÑEZ, E. *et al.* Use of nanotechnology for the bioremediation of contaminants: a review. **Processes**, v. 8, n. 7, p. 1-17, 2020.

VIJAYAKUMAR, S. *et al.* A novel antimicrobial therapy for the control of *Aeromonas hydrophila* infection in aquaculture using marine polysaccharide coated gold nanoparticle. **Microbial Pathogenesis**, v. 110, p. 140-151, 2017.

VIKESLAND, P. *et al.* Differential drivers of antimicrobial resistance across the World. **Accounts of Chemical Research**, v. 52, n. 4, p. 916-924, 2019.

VINAY, T. N. *et al.* Recent advances in application of nanoparticles in fish vaccine delivery. **Reviews in Fisheries Science & Aquaculture**, v. 26, n. 1, p. 29-41, 2017.

WANG, L. *et al.* Effects of endophytic fungi diversity in different coniferous species on the colonization of *Sirex noctilio* (Hymenoptera: siricidae). **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-11, 2019.

WARIS, M. *et al.* Evaluation of larvicidal efficacy of *Ricinus communis* (Castor) and synthesized green silver nanoparticles against *Aedes aegypti* L. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 27, n. 9, p. 2403-2409, 2020.

WILLERDING, A. L. *et al.* Estratégias para o desenvolvimento da bioeconomia no estado do Amazonas. **Estudos Avançados**, v. 34, n. 98, p. 145-166, 2020.

WONGLOM, P. *et al.* Biological control of *Sclerotium* fruit rot of snake fruit and stem rot of lettuce by *Trichoderma* sp. T76-12/2 and the mechanisms involved. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 107, p. 1-7, 2019.

WU, C.-J. *et al.* *Aeromonas* isolates from fish and patients in Tainan City, Taiwan: genotypic and phenotypic characteristics. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 85, n. 21, p. 1-12, 2019.

XU, J. *et al.* A review of anti-inflammatory compounds from marine fungi, 2000–2018. **Marine Drugs**, v. 17, n. 11, p. 1-24, 2019.

YI, T.-F. *et al.* ZnS nanoparticles as the electrode materials for high-performance supercapacitors. **Solid State Ionics**, v. 343, p. 1-5, 2019.

ZEHRA, A. *et al.* Effect of different environmental conditions on growth and sporulation of some *Trichoderma* species. **Journal of Environmental Biology**, v. 38, n. 2, p. 197-203, 2017.

ZHANG, C. *et al.* Plasmon Enhanced Fluorescence and Raman Scattering by [Au-Ag Alloy NP Cluster]@SiO₂ Core-Shell Nanostructure. **Frontiers in Chemistry**, v. 7, p. 1-7, 2019.

- ZHANG, C.-N. *et al.* Effects of *Lactobacillus delbrueckii* on immune response, disease resistance against *Aeromonas hydrophila*, antioxidant capability and growth performance of *Cyprinus carpio* Huanghe var. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 68, p. 84-91, 2017.
- ZHANG, D. *et al.* The severity of motile *Aeromonas* septicemia caused by virulent *Aeromonas hydrophila* in channel catfish is influenced by nutrients and microbes in water. **Aquaculture**, v. 519, p. 1-6, 2020.
- ZHANG, L. *et al.* Size-dependent cytotoxicity of silver nanoparticles to *Azotobacter vinelandii*: growth inhibition, cell injury, oxidative stress and internalization. **Plos One**, v. 13, n. 12, p. 1-18, 2018.
- ZHANG, X.-F. *et al.* Silver Nanoparticles: synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 9, p. 1-34, 2016.
- ZHAO, X. *et al.* Fungal silver nanoparticles: synthesis, application and challenges. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 38, n. 6, p. 817-835, 2017.
- ZHENG, K. *et al.* Antimicrobial silver nanomaterials. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 357, p. 1-17, 2018.
- ZHOU, C. *et al.* Isolation of *Trichoderma* from forestry model base and the antifungal properties of isolate TpsT17 toward *Fusarium oxysporum*. **Microbiological Research**, v. 231, p. 1-11, 2020.
- ZHOU, H. *et al.* *Aeromonas hydrophila*, an emerging causative agent of freshwater-farmed whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Microorganisms**, v. 7, n. 10, p. 1-20, 2019.
- ZHOU, J. *et al.* Diversity, roles, and biotechnological applications of symbiotic microorganisms in the gut of termite. **Current Microbiology**, v. 76, n. 6, p. 755-761, 2018.
- ZHOU, Y. *et al.* Taxonomy, virulence genes and antimicrobial resistance of *Aeromonas* isolated from extra-intestinal and intestinal infections. **Bmc Infectious Diseases**, v. 19, n. 1, p. 1-9, 2019.
- ZHU, Y.-G. *et al.* Soil biota, antimicrobial resistance and planetary health. **Environment International**, v. 131, p. 1-7, 2019.

8. ANEXOS

Anexo 1 - Análise de variância do ensaio antibacteriano com *Trichoderma brevicompactum* P16D2

Fonte de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	p
Tratamentos	3	11670,177248	3890,059083	4824,678	0,0000*
Bactérias	19	706,706118	37,195059	46,131	0,0000*
Tratamentos x Bactérias	57	3532,562152	61,974775	76,865	0,0000*
Erro	160	129,005400	0,806284		
Total	239	16038,450918			
C.V. (%) =	10,77				
Média geral:	8,3360833	Número de observações:		240	

*efeito significativo de 1% ($p < 0,01$); C.V. – coeficiente de variação

Anexo 2 - Análise de variância do ensaio antibacteriano com *Trichoderma harzianum* P4A

Fonte de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	p
Tratamentos	3	7439,591002	2479,863667	3879,260	0,0000*
Bactérias	19	1709,289368	89,962598	140,729	0,0000*
Tratamentos x Bactérias	57	3443,281682	60,408451	94,497	0,0000*
Erro	160	102,281933	0,639262		
Total	239	12694,443985			
C.V. (%) =	8,15				
Média geral:	9,8052500	Número de observações:		240	

*efeito significativo de 1% ($p < 0,01$); C.V. – coeficiente de variação

Anexo 3 - Análise de variância do ensaio antibacteriano com *Trichoderma inhamatum* P21C

Fonte de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	p
Tratamentos	3	12273,465741	4091,155247	4666,118	0,0000*
Bactérias	19	1088,100321	57,268438	65,317	0,0000*
Tratamentos x Bactérias	57	3777,862000	66,278281	75,593	0,0000*
Erro	160	140,284667	0,876779		
Total	239	17279,712730			
C.V. (%) =	11,99				
Média geral:	7,8082083	Número de observações:		240	

*efeito significativo de 1% ($p < 0,01$); C.V. – coeficiente de variação

Anexo 4 - Análise de variância do ensaio antibacteriano com *Trichoderma tomentosum* P14C2

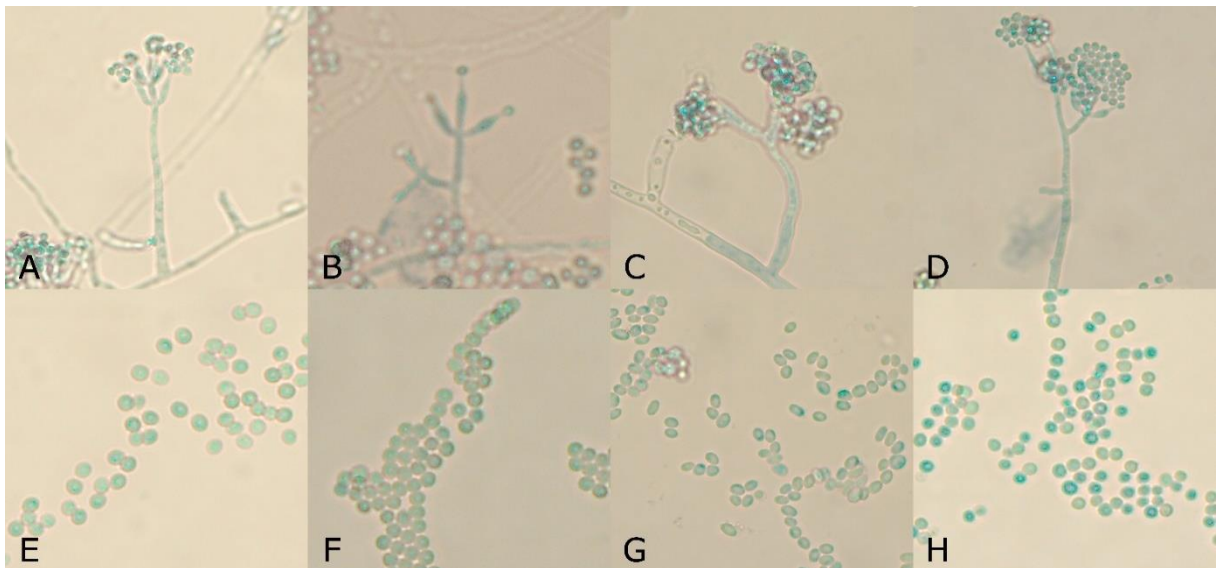
Fonte de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	p
Tratamentos	3	8233,200741	2744,400247	1588,226	0,0000*
Bactérias	19	1324,662658	69,719087	40,347	0,0000*
Tratamentos x Bactérias	57	3349,131450	58,756692	34,003	0,0000*
Erro	160	276,474600	1,727966		
Total	239	13183,469450			
C.V. (%) =	14,29				
Média geral:	9,1957917	Número de observações:		240	

*efeito significativo de 1% ($p < 0,01$); C.V. – coeficiente de variação

Anexo 5 - Análise de variância da atividade antibacteriana das nanopartículas de *Trichoderma* spp.

Fonte de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	p
Tratamentos	5	9615,773470	1923,154694	1677,741	0,0000*
Bactérias	19	953,564701	50,187616	43,783	0,0000*
Tratamentos x Bactérias	95	3216,168352	33,854404	29,534	0,0000*
Erro	240	275,106267	1,146276		
Total	359	14060,612790			
C.V. (%) =	17,23				
Média geral:	6,2135000		Número de observações:	360	

*efeito significativo de 1% ($p < 0,01$); C.V. – coeficiente de variação



Anexo 6 - Características micromorfológicas de *Trichoderma* spp. Conidióforos e conídios de *Trichoderma brevicompactum* P16D2 (A, E); *Trichoderma harzianum* P4A (B, F); *Trichoderma inhamatum* P21C (C, G); *Trichoderma tomentosum* P14C2 (D, H)

Fonte: Coelho, K. W. S. A. (2020)