



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
REDE DE BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA DA AMAZÔNIA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE
E BIOTECNOLOGIA**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL NANOTECNOLÓGICO DE
Aspergillus DO BIOMA AMAZÔNICO**

TACIANA DE AMORIM SILVA

MANAUS-AM

-2017-

TACIANA DE AMORIM SILVA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL NANOTECNOLÓGICO DE *Aspergillus*
DO BIOMA AMAZÔNICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal (Ponto focal Amazonas), como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Biodiversidade e Biotecnologia.

Orientação: Maria Francisca Simas Teixeira

Co-orientação: Nelson Eduardo Durán Caballero & José Odair Pereira

Área de Concentração: Biotecnologia

MANAUS-AM

-2017-

Ficha Catalográfica

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

S586a Silva, Taciana de Amorim
Avaliação do potencial nanotecnológico de *Aspergillus* do bioma Amazônico / Taciana de Amorim Silva. 2017
131 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Maria Francisca Simas Teixeira
Coorientador: Nelson Eduardo Durán Caballero
Coorientador: José Odair Pereira
Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Fungos. 2. Biossíntese . 3. Nanopartícula de prata. 4. Antimicrobiano. 5. bionanocompósitos. I. Teixeira, Maria Francisca Simas II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

TACIANA DE AMORIM SILVA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL NANOTECNOLÓGICO DE *Aspergillus*
DO BIOMA AMAZÔNICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal (Ponto focal Amazonas), como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Biodiversidade e Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a Doutora Maria Francisca Simas Teixeira
Universidade Federal do Amazonas
Presidente da Banca

Prof. Doutor Pedro Queiroz Lima Neto
Universidade Federal do Amazonas

Prof. Doutor Antônio Luiz Ribeiro Boechat Lopes
Universidade Federal do Amazonas

Prof. Doutor Carlos Gustavo Nunes da Silva
Universidade Federal do Amazonas

Prof^a Doutora Rosana Antunes Palheta
Instituto Federal de Educação Ciências e Tecnologia do Amazonas

Dedico essa obra aos meu pais Maria de Lourdes de Amorim e José Luiz da Silva (*in memoriam*), e ao meu companheiro Walter Botelho Seixas pelo apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à força criadora do Universo por todas as oportunidades de aprendizado.

Agradeço a minha mãe Maria de Lourdes de Amorim por ter me amando, educado e me apoiado, e a meu irmão Leonardo Luiz Amorim e Silva pela oportunidade de exercitar a paciência, a indulgência.

Agradeço a meu pai (*in memori*) por ter me ensinado a perdoar.

Agradeço a minha orientadora Doutora Maria Francisca Simas Teixeira pela dedicação e empenho que tanto me estimulam a continuar na área da pesquisa.

Agradeço ao Professor Doutor Nelson Durán e toda equipe do Laboratório de Química Biológica da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP.

Agradeço a toda equipe do Laboratório de Nanomateriais e Interações Biológicas (NanoBioss) do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP.

Agradeço a Silvia Nista e toda equipe do Laboratório de Biomateriais da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP.

Agradeço a professora Karen Segala do Departamento de Química da Universidade Federal do Amazonas - UFAM.

Agradeço aos colegas da Coleção de Culturas DPUA, Nelly Vinhote, Mircella Marialva, Salomão Martim, Lorisa Simas, Ana Rita Machado, Larissa Svetlana, Larissa Paiva, Bianca Cordeiro, Fabiano Brito e Rosilane Graça.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pelo financiamento deste trabalho. Assim como a Universidade Federal do Amazonas - UFAM e a rede BIONORTE por propiciar condições estruturais e financeiras necessária para execução deste projeto.

RESUMO

Neste estudo foi avaliado o potencial de linhagens de *Aspergillus* na síntese extracelular de nanopartículas de prata com propriedades antimicrobianas. As 20 linhagens de *Aspergillus* foram subcultivadas em caldo glicosado 2% (p/v) a 28 °C por sete dias. Após cultivo monospórico foram avaliadas as características morfológicas das culturas em ágar Czapek, CYA [ágar Czapek Dox e extrato de levedura 0,5% (p/v)] e ágar extrato de malte (MEA) para autenticação das linhagens. A identificação molecular foi realizada utilizando sequências da região ITS do rDNA. A produção de biomassa foi realizada por fermentação submersa em 200 mL de extrato de MGYP, a 28 °C, 180 rpm. E como inóculo foi adicionado no meio 10^6 esp/mL de meio. Após 96 h, no extrato micelial recuperado da lavagem da biomassa foi adicionado solução de AgNO_3 até concentração final de 1 mM. A reação de síntese das nanopartículas de prata foi realizada na ausência de luz, a 25 °C, 180 rpm. A confirmação das AgNPs foi feita por espectroscopia de UV-vis e a caracterização foi realizada por espalhamento dinâmica de luz, microscopia eletrônica de transmissão, difração de raios-X, energia dispersiva de raios-X e métodos de espectrometria e espectroscopia avançados. *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Candida albicans* e *Trichosporon beigeli* foram os micro-organismos teste utilizados na atividade antimicrobiana das AgNPs pela técnica de difusão em ágar e na determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI). A síntese da membrana foi feita por eletrofiliação e a espessura foi analisada no microscópio eletrônico de varredura (MEV). Posteriormente, as AgNPs foram adicionadas à NanoMAC e o efeito antimicrobiano foi avaliado pelo método de difusão em ágar. O teste de citotoxicidade foi realizado frente a fibroblastos humanos (MRC5) pelo método de *Alamar Blue*® utilizando 100 $\mu\text{g/mL}$ de AgNPs liofilizadas. As microesferas de alginato foram sintetizadas por coacervação complexa com incorporação de AgNPs pelo método *in situ* e *ex situ* e caracterizadas no MEV. As técnicas utilizadas na autenticação dos *Aspergillus* foram eficientes, e os testes moleculares classificaram as linhagens nos grupos niger e flavus. 70% dos *Aspergillus* mediarão a síntese de AgNPs, sendo as linhagens do grupo flavus mais eficazes. As AgNPs produzidas foram mais eficientes para leveduras, com CMI para *T. beigeli* de 0,11 $\mu\text{g/mL}$ e para *C. albicans* de 0,22 $\mu\text{g/mL}$, não apresentando toxicidade frente a linhagem MRC5. A NanoMAC revestida com AgNPs apresentou incremento na ação antifúngica de 24,22% quando testadas frente a *C. albicans*. A incorporação de AgNPs em microesferas de alginato potencializou o efeito antimicrobiano dessas moléculas, principalmente o efeito anti-levedura. Os *Aspergillus* isolados de substratos do bioma Amazônico são promissores para utilização em processos de síntese biológica de AgNPs com propriedades antimicrobianas relevantes, demonstrando grande potencial para utilização na área médica, farmacêutica e cosmética.

Palavras-chave: fungos, biossíntese, nanopartícula de prata, antimicrobiano, bionanocompósitos.

ABSTRACT

This study evaluated the potential of *Aspergillus* strains in the extracellular synthesis of silver nanoparticles with antimicrobial properties. The 20 *Aspergillus* lines were subcultured in 2% (w/v) glycoside broth at 28 °C for seven days. After monosporic cultivation, the morphological characteristics of Czapek agar, CYA [Czapek Dox agar and 0.5% (w/v) yeast extract] and malt extract agar (MEA) were evaluated for lineage authentication. Molecular identification was performed using rDNA ITS region sequences. The biomass production was done by submerged fermentation in 200 mL of MGYP extract, at 28 °C, 180 rpm. And as inoculum was added in medium 10^6 spores/mL medium. After 96 h, in the mycelial extract recovered from the biomass washing AgNO_3 solution was added to a final concentration of 1 mM. The synthesis reaction of the silver nanoparticles was performed in the absence of light, at 25 °C, 180 rpm. The AgNPs were confirmed by UV-vis spectroscopy and the characterization was performed by dynamic light scattering, transmission electron microscopy, X-ray diffraction, X-ray dispersive energy and advanced spectroscopy and spectroscopy methods. *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Candida albicans* and *Trichosporon beigeli* were the test microorganisms used in the antimicrobial activity of AgNPs by the agar diffusion technique and in the determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC). The membrane was synthesized by electro-spinning and the thickness was analyzed by scanning electron microscopy (SEM). Subsequently, the AgNPs were added to the NanoMAC and the antimicrobial effect was evaluated by the agar diffusion method. The cytotoxicity test was performed against human fibroblasts (MRC5) by the method of Alamar Blue® using 100 µg/ml of lyophilized AgNPs. The alginate microspheres were synthesized by complex coacervation with incorporation of AgNPs by the *in situ* and *ex situ* method and characterized in the SEM. The techniques used in the authentication of *Aspergillus* were efficient, and the molecular tests classified the strains in the niger and flavus groups. 70% of *Aspergillus* mediated the synthesis of AgNPs, and the flavus group lineages were more effective. The AgNPs produced were more efficient for yeasts, with CMI for *T. beigeli* of 0.11 µg/mL and for *C. albicans* of 0.22 µg/mL, showing no toxicity against the MRC5 lineage. NanoMAC coated with AgNPs showed an increase in antifungal activity of 24.22% when tested against *C. albicans*. The incorporation of AgNPs into alginate microspheres potentiated the antimicrobial effect of these molecules, especially the anti-yeast effect. *Aspergillus* isolates from Amazonian biome substrates are promising for use in biological synthesis processes of AgNPs with relevant antimicrobial properties, demonstrating great potential for use in the medical, pharmaceutical and cosmetic fields.

Key words: fungi, biosynthesis, silver nanoparticle, antimicrobial, bionanocomposites.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I – REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1 - Interação da prata na escala nano com células bacterianas.....	23
Figura 2 - Mecanismo hipotético da biossíntese de nanopartículas de prata por intermédio de nitrato redutase.....	26
Figura 3 - Mecanismo que mostra o papel das proteínas extracelulares na síntese de nanopartículas de prata.....	27
Figura 4 - Estruturas macro e micromorfológicas de <i>Aspergillus</i> (forma anamórfica): (A) Colônia em ágar Czapek; (B) estrutura de reprodução (a: conidióforo; b: vesícula com esterigma e conídios).....	28
Figura 5 - Esquema simplificado do processo de eletrofiação de membranas nanoestruturadas.....	30
Figura 6 - Estrutura química do alginato de sódio, indicando ácido gulurônico (G) e ácido manurônico (M).....	31
Figura 7 - Esquema das ligações cruzadas do alginato com o cálcio. As esferas em preto representam os íons Ca^{++} , enquanto as linhas representam as cadeias de alginato.....	31

CAPÍTULO III – RESULTADOS

ARTIGO 1

Figura 1 - <i>Aspergillus</i> do grupo niger cultivados a 28 °C por 7-10 dias em ágar CYA, CZ e Malte respectivamente. Microestrutura reprodutiva corada com azul de lactofenol (400X).....	59
Figura 2 - <i>Aspergillus</i> do grupo flavus cultivados a 28 °C por 7-10 dias em ágar CYA, CZ e Malte respectivamente. Microestrutura reprodutiva corada com azul de lactofenol (400X)	60
Figura 3 - Classificação das linhagens de <i>Aspergillus</i> de acordo com a comparação das sequencias de rDNA com as sequencias depositadas no banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information).....	62
Figura 4 -(A) Extrato aquoso da biomassa dos <i>Aspergillus</i> . (B): Reação do extrato aquoso da biomassa de <i>Aspergillus</i> após adição $AgNO_3$ [1 mol.L^{-1}] demonstrando a mudança de coloração para amarelo escuro após 96 h de reação.....	64
Figura 5 - Espectros de absorção das nanopartículas de prata sintetizadas a partir dos	68

extratos aquosos da biomassa de *Aspergillus flavo-furcatis* (A) e *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus sp.* (B), medidos após 96 h de reação.....

Figura 6 - Espectros de UV-vis do extrato aquoso da biomassa de *Aspergillus* do grupo niger adicionado de AgNO₃ após 96 h de reação..... 69

Figura 7 Atividade antimicrobiana das AgNPs biossintetizada por *Aspergillus* (A) AgNPs versus *C. albicans*; (B) AgNPs versus *S. aureus* (C) AgNPs X *E. coli*..... 73

ARTIGO 2

Figura 1 - (A) Extrato aquoso da biomassa de *Aspergillus oryzae* DPUA 1624: (a) sem AgNO₃; (b) com AgNO₃ (1 mol.L⁻¹); (B) Espectro de absorção de UV-vis das AgNPs após 96 h de reação..... 88

Figura 2 - Diâmetro hidrodinâmico das AgNPs biossintetizadas pelo extrato aquoso da biomassa de *Aspergillus oryzae* 89

Figura 3 - (A) Imagem de microscopia eletrônica de transmissão das AgNPs biossintetizada pelo extrato aquoso da biomassa de *Aspergillus oryzae*. (B) Histograma de distribuição das AgNPs em função do diâmetro..... 90

Figura 4 - Padrão de XRD das AgNPs liofilizada biossintetizada pelo extrato aquoso da biomassa de *Aspergillus oryzae*..... 91

Figura 5 - Espectro de FTIR da solução de AgNPs biossintetizada pelo extrato aquoso da biomassa de *Aspergillus oryzae*..... 92

Figura 6 - Espectro de Energia Dispersiva de Raios-X (EDX) da solução de AgNPs biossintetizada pelo extrato aquoso da biomassa de *Aspergillus oryzae*..... 93

Figura 7 - Atividade antimicrobiana das AgNPs biossintetizada pelo extrato aquoso da biomassa de *Aspergillus oryzae* contra *Candida albicans*: (a), (b) e (c) halos de inibição formados pelas AgNPs [134 µg/mL], (d) 1 mmol L⁻¹ de AgNO₃, (e) itraconazol (50 µg/mL)..... 94

Figura 8 - (A) Imagem em microscópio eletrônico de varredura de membrana de acetato de celulose (nanoMAC); (B) Atividade antimicrobiana de AgNPs impregnadas na nanoMAC contra *Candida albicans*: a), b) e c) nanoMAC com AgNPs (6,73 µg); d) nanoMAC sem AgNPs; e) nanoMAC com itraconazol + AgNP (6,73 µg cada); f), g) e h) suspensão de AgNPs (6,73 µg)..... 95

ARTIGO 3

Figura 1 - Espectro de absorção de UV-Vis das AgNPs biossintetizadas pelo extrato aquoso da biomassa de *Aspergillus flavo-furcatis* DPUA 1451 após 96 h de reação..... 110

Figura 2 - Microscopia eletrônica de transmissão das AgNPs biossintetizada pelo extrato aquoso da biomassa de <i>Aspergillus flavo-furcatis</i> . Seta destacando a formação de uma camada em volta das nanopartículas.....	112
Figura 3 - Padrão de DRX de AgNPs biossintetizadas pelo extrato aquoso da biomassa de <i>Aspergillus flavo-furcatis</i>	113
Figura 4 - Espectros de FTIR de AgNPs biossintetizadas pelo extrato aquoso da biomassa de <i>Aspergillus flavo-furcatis</i>	114
Figura 5 - Espectro de FTIR das AgNPs biossintetizadas pelo extrato aquoso da biomassa de <i>Aspergillus flavo-furcatis</i>	115
Figura 6 - Citotoxicidade das AgNPs biossintetizadas pelo extrato aquoso da biomassa de <i>Aspergillus flavo-furcatis</i> contra fibroblastos humanos MRC5 após 72 h de tratamento.....	118
Figura 7 - Micrografia eletrônica das microesferas de alginato obtidas em Microscópio Eletrônico de Varredura (LEO Electron Microscopy/Oxford) com aumento de 100 e 10 µm. (A) microesfera incorporada com AgNPs pelo método <i>in situ</i> ; (B) microesfera incorporada com AgNPs pelo método <i>ex situ</i>	120
Figura 8 - Atividade antifúngica das microesferas: (A) <i>Candida albicans</i> e (B) <i>Trichosporon beigelli</i> . M.E.E. a direita e M.E.I. a esquerda das placas de Petri.....	122
Figura 9 - Atividade antibacteriana das microesferas frente a <i>Escherichia coli</i> : (A) M.E.E e (B) M.E.I.....	122

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO III – RESULTADOS

ARTIGO 1

Tabela 1 - Linhagens de <i>Aspergillus</i> do acervo da Coleção de Culturas DPUA selecionadas.....	55
Tabela 2 - Características macro e micromorfológicas de <i>Aspergillus</i> do grupo niger e flavus em meio CZ segundo Raper e Fennell (1977) observadas nas linhagens autenticadas.....	61
Tabela 3 - Comparação de sequencias com o banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information).....	63
Tabela 4 - Mudança de coloração dos extratos aquosos após reação com AgNO ₃ [1 mol.L ⁻¹] (96 h de incubação).....	65
Tabela 5 - Parâmetros dos espectros de UV-vis do extrato aquosos da biomassa dos <i>Aspergillus</i> + AgNO ₃ [1 mol.L ⁻¹] obtidos após 96 h de reação.....	66
Tabela 6 - Parâmetros físico-químicos das nanopartículas de prata obtidos por DLS	70
Tabela 7 - Atividade antibacteriana das AgNPs sintetizadas a partir do extrato aquoso da biomassa dos <i>Aspergillus</i>	71
Tabela 8 - Atividade antifúngica das AgNPs sintetizada a partir do extrato aquoso da biomassa de <i>Aspergillus</i>	72

ARTIGO 2

Tabela 1 - Atividade antifúngica das suspensões de AgNPs sintetizadas a partir do extrato aquoso da biomassa de <i>Aspergillus oryzae</i>	96
--	----

ARTIGO 3

Tabela 1 - Diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta das suspensões de AgNPs.....	111
Tabela 2 - Concentração de prata das suspensões de AgNPs biossintetizadas pelo extrato aquoso da biomassa de <i>Aspergillus flavo-furcatis</i>	116
Tabela 3 - Atividade antimicrobiana das AgNPs biossintetizadas pelo extrato aquoso da biomassa de <i>Aspergillus flavo-furcatis</i>	116
Tabela 4 - Concentração mínima inibitória (CMI) das suspensões de AgNPs biossintetizadas pelo extrato aquoso da biomassa de <i>Aspergillus flavo-furcatis</i>	117
Tabela 5 - Atividade antimicrobiana das AgNPs biossintetizadas pelo extrato aquoso da biomassa de <i>Aspergillus flavo-furcatis</i> imobilizadas com alginato de cálcio.....	121

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AgNPs	Nanopartículas de Prata
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
DLS	Espalhamento Dinâmico de Luz e Potencial Zeta
DRX	Difratometria de Raios X
EDX	Energia Dispersiva de Raios X
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
ICP-OES	Espectrometria Óptica de Emissão por Plasma Indutivamente Acoplado
NanoMAC	Nanomembranas de acetato de celulose
MIC	Concentração Mínima Inibitória
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
TEM	Microscopia Eletrônica de Transmissão
SPR	Banda Plasmônica Superficial
ITS	Internal Transcribed Spacer Region
UV-vis	Espectroscopia Eletrônica na Região Ultravioleta e Visível

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	14
1.1 OBJETIVOS.....	17
1.1.1 Objetivo Geral.....	17
1.1.2 Objetivos Específicos.....	17
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	18
CAPÍTULO I – REVISÃO DE LITERATURA.....	20
1. REVISÃO DE LITERATURA.....	21
1.1 Nanotecnologia & Bionanotecnologia.....	21
1.2 Propriedades antimicrobianas e aplicações das nanopartículas de prata.....	22
1.3 Relevância da síntese biológica de nanopartículas de prata.....	23
1.4 Síntese biológica de nanopartículas de prata por fungos.....	25
1.5 O Gênero <i>Aspergillus</i>	27
1.6 Nanomembrana de acetado de celulose.....	29
1.7 Micropartículas de alginato de sódio.....	30
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32
CAPÍTULO II – MATERIAL E MÉTODOS.....	38
1. MATERIAL E MÉTODOS.....	39
1.1 Reativação dos <i>Aspergillus</i>	39
1.2 Obtenção de culturas monospóricas	39
1.3 Autenticação das características macro e micromorfológicas.....	39
1.4 Identificação molecular das linhagens de <i>Aspergillus</i>	40
1.5 Produção de compostos bioativos para síntese de AgNPs.....	41
1.6 Síntese biológica de AgNPs.....	41
1.7 Caracterização das AgNPs.....	41
1.7.1 Espectroscopia de Ultravioleta-Visível (UV-vis).....	42
1.7.2 Determinação de diâmetro hidrodinâmico das AgNPs e potencial zeta das soluções coloidais.	42
1.7.3 Determinação do diâmetro e da forma das AgNPs por Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM).....	43
1.7.4 Confirmação da presença de prata metálica por difração de Raios-X DRX).....	43
1.7.5 Espectroscopia de Infra-Vermelho com Transformada de <i>Fourier</i> (FTIR).....	43

1.7.6 Energia Dispersiva de Raios-X (EDX)	44
1.7.7 Espectrometria de Emissão de Plasma (ICP).....	44
1.8 Determinação da Atividade antimicrobiana das AgNPs.....	44
1.9 Determinação da Concentração Mínima Inibitória.....	45
1.10 Determinação de citotoxicidade <i>in vitro</i>	45
1.11 Síntese de nanomembrana de acetato de celulose.....	46
1.12 Morfologia da nanomembrana de acetato de celulose.....	46
1.13 Atividade antimicrobiana da nanomembrana de acetato de celulose adicionada de AgNPs.....	47
1.14 Síntese de microesfera de alginato	47
1.15 Caracterização das microesferas de alginato de sódio.....	48
1.16 Atividade antimicrobiana da microesfera de alginato.....	48
1.17 Análise estatística.....	48
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
CAPÍTULO III – RESULTADOS.....	51
ARTIGO 1	
Biossíntese de nanopartícula de prata para desenvolvimento de antimicrobianos utilizando a diversidade de <i>Aspergillus</i> nativos da Amazônia Brasileira.....	52
ARTIGO 2	
Biossíntese de nanopartícula de prata e impregnação em membrana de acetato de celulose para uso na terapia anti-levedura	79
ARTIGO 3	
Biossíntese de nanopartículas de prata e imobilização em microesferas de alginato.....	102
CONCLUSÕES GERAIS.....	128
ANEXOS.....	130

1 INTRODUÇÃO GERAL

O uso da nanotecnologia na criação de novos materiais vem proporcionando o desenvolvimento de produtos e processos mais eficientes, com menor gasto de energia e menos agressivos ao meio ambiente. A melhoria no desempenho desses novos materiais está associada em grande parte à redução do tamanho das estruturas e conseqüente aumento da área superficial (Faria-Tischer and Tischer, 2012; Cavalcante, 2014).

Dentre os nanomateriais mais pesquisados as nanopartículas metálicas se destacam pois apresentam propriedades físicas e químicas únicas que proporcionam sua aplicação em diversas áreas tais como medicina, agricultura, indústria de alimentos, fármacos e outros (Gúzman et al., 2009; Cavalcante, 2014).

As nanopartículas de prata (AgNPs) ganham especial destaque dentre as nanopartículas metálicas, principalmente na área biomédica e farmacêutica pois funcionam como excelentes antimicrobianos, apresentam boas propriedades anti-inflamatórias e são eficientes transportadores de fármacos (Gúzman et al., 2009; Antunes et al., 2013).

Muitos pesquisadores já relataram a utilização de AgNPs para tratar infecções; prevenir colonização bacteriana em superfícies de próteses, cateteres e materiais odontológicos e, também no tratamento da água e na fabricação de tintas com propriedades antibacterianas (Gúzman et al., 2009; Durán et al., 2011; Antunes et al., 2013).

As soluções coloidais de AgNPs apresentam propriedades antimicrobianas contra diversos organismos patogênicos, bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, fungos e vírus. Várias pesquisas têm comprovado a ação antagonista de íons de prata contra mais de 650 agentes patogênicos (Petica, 2008; Rai et al., 2009; Antunes et al., 2013).

Apesar da versatilidade das nanopartículas de prata, o método químico empregado para síntese das mesmas geram resíduos tóxicos que poluem o meio ambiente e perturbam o ecossistema. Além do mais, a utilização das AgNPs obtidas por síntese química na biomedicina é restrita pois possuem baixa biocompatibilidade. Uma alternativa sustentável e vantajosa que não agride o ambiente é a síntese “verde” ou “eco-amigável” das AgNPs por sistemas biológicos (Dhanasekaran et al., 2011; Zhang et al., 2011; Kulkarni and Muddapur, 2014).

Síntese verde é a designação comum dada às tecnologias que utilizam produtos químicos atóxicos, biodegradáveis e de custo baixo para sintetizar nanomateriais, tendo como iniciador um organismo biológico ou partes dele (Machado, 2011).

Dentre os sistemas biológicos empregados para síntese “verde” de AgNPs, os fungos são os mais promissores pois têm tolerância aos metais pesados, secretam grande quantidade de enzimas e são economicamente viáveis (Aziz et al., 2012; Birla et al., 2013; Hulkoti and Taranath et al., 2014). Outra vantagem é que as nanopartículas produzidas por fungos apresentam uma interfase biocompatível e são menos tóxicas, uma vez que podem ser estabilizadas por proteínas conforme foi verificado em *Fusarium oxysporum* (Durán et al., 2005).

O gênero *Aspergillus* é composto por mais de 200 espécies de fungos e devido ao grande potencial de adaptação fisiológica, muitas espécies são importantes produtoras de moléculas com atividade biológica relevante para indústria. Pelo menos 27 enzimas diferentes produzidas por espécies desse gênero estão sendo comercializadas (Scazzocchio, 2009). Essa capacidade de produzir e secretar uma ampla gama de moléculas bioativas faz dos *Aspergillus*, não toxigênicos, ótimos candidatos para síntese biológica de nanopartículas de prata (Vahabi et al., 2011).

A biossíntese de AgNPs por *Aspergillus* já foi relatada em diversos estudos, inclusive, de tamanho reduzido, monodispersividade e estabilidade, características peculiares para aplicação na indústria farmacêutica, atributos observadas nas AgNPs de *A. flavus* e *A. niger*, com diâmetro de 7 nm e 1 a 20 nm, respectivamente (Moharrer et al., 2012; Sagar and Ashok, 2012).

Entretanto, apesar dos benefícios da síntese biológica de nanopartículas de prata, Narayanan e Sakthivel (2010) destacaram que esse método tem algumas desvantagens: taxa lenta de produção, dificuldade de controlar o tamanho, a forma e a dispersividade. Por isso, a busca por novos organismos e o desenvolvimento de novas metodologias para otimização da síntese biológica de nanopartículas de prata se faz necessária.

Além disso, a disponibilização de novos compostos antimicrobianos no mercado tem grande relevância para a sociedade, pois a resistência aos antibióticos vem sendo um grave problema de saúde pública no mundo. Nesse contexto, o uso de nanopartículas de prata é uma opção relevante, pois tais moléculas não são tóxicas para o corpo humano em baixas concentrações, têm ações antibacterianas de largo espectro e os micro-organismos não conseguem desenvolver resistência facilmente (Sagar and Ashok, 2012; Antunes, 2013; Kulkarni and Muddapur, 2014).

A solução coloidal de AgNPs pode ser combinada com diversas matrizes poliméricas com a finalidade de prolongar a liberação desses antimicrobianos e aumentar sua

biocompatibilidade. As nanofibras eletrofiadas, por exemplo, são polímeros que tem grande potencial de aplicação nas indústrias farmacêuticas e cosméticas para a regeneração da pele e órgãos, terapias de administração de fármacos, dentre outros (Nista et al., 2015; Segala et al., 2015).

Outro sistema utilizado para imobilização é a microencapsulação muito empregada na indústria para carrear fármacos ativos a sítios específicos no corpo humano (Freitas et al., 2005). Dentre os sistemas biopolímeros utilizados em processos de microencapsulamento o alginato de sódio destaca-se pois apresenta um amplo leque de aplicações nas áreas médica e farmacêutica, pois são de fácil degradação hidrolítica e enzimática, biocompatíveis e atóxicos (Kleinubing et al., 2014).

Embora citações da literatura mostrem diversas espécies de *Aspergillus* na síntese de nanopartículas são raros os estudos sobre o potencial dos fungos de ecossistemas Amazônicos na mediação da biossíntese de AgNPs. Por outro lado a interação de AgNPs biológicas com sistemas biopoliméricos também é uma investigação inédita, pois a maioria das pesquisas que buscam o desenvolvimento de nanocompósitos antissépticos utilizam AgNPs obtidas por síntese química.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial de linhagens de *Aspergillus* como fonte de nanopartículas de prata com atividade antimicrobiana frente a bactérias Gram-negativas, Gram-positivas e leveduras para desenvolver estruturas biopoliméricas com propriedades assépticas.

2.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver uma metodologia eficiente, sustentável e de baixo custo para síntese extracelular de nanopartículas de prata a partir de culturas de *Aspergillus* isoladas do Bioma Amazônico;
- Caracterizar as nanopartículas de prata sintetizadas por linhagens de *Aspergillus* de acordo com a forma, tamanho e composição;
- Avaliar o potencial antibacteriano e antifúngico das nanopartículas de prata sintetizadas por linhagens de *Aspergillus* frente aos micro-organismos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Candida albicans* e *Trichosporon beigelii*;
- Verificar a citotoxicidade das nanopartículas de prata sintetizadas por linhagens de *Aspergillus*;
- Desenvolver estruturas biopoliméricas com propriedades antimicrobianas por meio da incorporação das AgNPs em membranas eletrofiadas de acetato de celulose e microesferas de alginato.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Antunes F, Dal'Acqua N, Bergmann C, Giovanela M. Síntese, caracterização e aplicação de nanopartículas de prata como agentes antimicrobianos. *Estud Tecnológicos em Eng.* 2013;9(1):20–6.

Aziz ARMA, Al-Othman MR, Alsohaibani SA, Mahmoud MA, Sayed SRM. Extracellular biosynthesis and characterization of silver nanoparticles using *Aspergillus niger* isolated from Saudi Arabia (strain ksu-12). *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures.* 2012; v. 7, n. 4, p.1491-1499.

Birla SS, Gaikwad SC, Gade AK, Rai MK. Rapid synthesis of silver nanoparticles from *Fusarium oxysporum* by optimizing physiocultural conditions. *The Scientific World Journal,* v. 2013, p.1-12. 2013.

Cavalcanti NB. Nanopartículas de prata produzidas por *Curvularia inaequalis* (Sdhear) Boedijn *Curvularia inaequalis* (Shear) Boedijn. Universidade Federal do Vale o São Francisco; 2014.

Dhanasekaran D, Latha S, Saha S, Thajuddin N, Panneerselvam A. Biosynthesis and antimicrobial potential of metal nanoparticles. *Int J Green Nanotechnol Biomed.* 2011;3(1):72–82.

Durán N, Marcato PD, Alves OL, Souza GIH De, Esposito E. Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains. *J Nanobiotechnology.* 2005; 3:8.

Durán N, Marcato PD, Durán M, Yadav A, Gade A, Rai M. Mechanistic aspects in the biogenic synthesis of extracellular metal nanoparticles by peptides, bacteria, fungi, and plants. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011;90(5):1609–24.

Faria-Tischer PCS, Tischer CA. Nanobiotecnologia: plataforma tecnológica para biomateriais e aplicação biológica de nanoestruturas. *Biochemistry and Biotechnology Reports.* 2012; v1, n1, p.32.

Freitas MN, Marchetti JM, Nimesulide PLA. microspheres as a potential sustained release system for the treatment of inflammatory diseases. *INT. J. I. Pharm.* 2005; v. 295, n.1-2, p. 201-211.

Gúzman MG, Dille J, Godet S. Synthesis of silver nanoparticles by chemical reduction method and their antibacterial activity. *International Journal of Chemical and Biomolecular Engineering.* 2009 v. 2, p. 3.

Hulkoti NI, Taranath TC. Biosynthesis of nanoparticles using microbes-A review. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2014;121:474–83.

- Kleinubing SA, Seraphim DC, Vieira MGA, Canevesi RLS, Da Silva EA, César CL, et al. Gastro-resistant controlled release of OTC encapsulated in alginate/chitosan matrix coated with acryl-EZE® MP in fluidized bed. *J Appl Polym Sci*. 2014;131(12):1–9.
- Kulkarni N, Muddapur U. Biosynthesis of Metal Nanoparticles. *J Nanotechnol*. 2014; 2014:27–100.
- Machado AASC. Da gênese ao ensino da química verde. *Quim Nova*. 2011;34(3):535–43.
- Moharrer S, Mohammadi B, Gharamohammadi RA, Yargoli M. Biological synthesis of silver nanoparticles by *Aspergillus flavus*, isolated from soil of Ahar copper mine. *Indian J Sci Technol* Vol. 2012;5(May 2011):2443–4.
- Narayanan KB, Sakthivel N. Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes. *Adv Colloid Interface Sci*. 2010;156(1–2):1–13.
- Nista SVG, Bettini J, Lucia Helena Innocentini Mei. Coaxial Nanofibers of Chitosan-Alginate-PEO polycomplex 2 obtained by electrospinning 3. *Carbohydr Polym* . 2015.
- Petica A, Gavrilu S, Lungu M, Buruntea N, Panzaru C. Colloidal silver solutions with antimicrobial properties. *Materials Science and Engineering B*. 2008; v.152, p.22-27.
- Rai M, Yadav A, Gade A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnol Adv*. 2009;27(1):76–83.
- Sagar G, Ashok B. Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using *Aspergillus niger* and Its Efficacy Against Human Pathogens. *Eur J Exp Biol*. 2012;2(5):1654–8.
- Scazzocchio C. *Aspergillus*: A Multifaceted Genus. *Encycl Microbiol*. 2009;2:401–21.
- Segala K, Vaz S, Nista G, Cordi L, Trindade M, Bizarria M, et al. Silver nanoparticles incorporated into nanostructured biopolymer membranes produced by electrospinning : a study of antimicrobial activity. *Brazilian J Pharm Sci*. 2015;51(4):911–21.
- Vahabi K, Mansoori GA, Karimi S. Biosynthesis of silver nanoparticles by fungus *Trichoderma reesei*. *Insciences J*. 2011;1(1):65–79.
- Zhang X, Yan S, Tyagi RD, Surampalli RY. Synthesis of nanoparticles by microorganisms and their application in enhancing microbiological reaction rates. *Chemosphere*. 2011;82(4):489–94.

CAPÍTULO I
REVISÃO DE LITERATURA

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Nanotecnologia & Bionanotecnologia

A nanotecnologia, desenvolvida a partir da aplicação prática da nanociência, é uma tecnologia multidisciplinar que alia os conhecimentos de diversas áreas para produzir novos materiais ou melhorar as características de produtos já existentes (Faria-Tischer and Tischer, 2012).

O termo nanotecnologia foi usado pela primeira vez em 1974 por Norio Taniguchi, quando descrevia as tecnologias usadas na construção de materiais na escala nanométrica e desde então o prefixo nano vem sendo utilizado para descrever objetos, sistemas ou fenômenos com características decorrentes de sua minúscula estrutura (Buzea et al., 2007; Drexler, 2007; Cavalcanti, 2014).

Nanotecnologia pode ser definida como um campo científico multidisciplinar que estuda a matéria em níveis atômicos, moleculares ou macromoleculares buscando o desenvolvimento, a caracterização, a produção e a aplicação de estruturas com forma e tamanho na escala nanométrica (1 a 100 nm) (Bawa et al., 2005; Faria-Tischer and Tischer, 2012; Sant'anna et al., 2013).

A grande inovação da nanotecnologia é a criação e aplicação de nanomateriais, que são estruturas com propriedades físicas, químicas, eletrônicas, elétricas, mecânicas, magnéticas, térmicas, dielétricas, ópticas e biológicas diferenciadas dos compostos de maiores dimensões, essas propriedades são causadas em grande parte pela grande área e energia de superfície, dessa forma os nanomateriais se tornam mais disponíveis e susceptíveis para a interação com outras moléculas, células, tecidos, partículas e íons (Narayanan et al., 2010; Faria-Tischer and Tischer, 2012).

Punjabi et al. (2015) afirmam que a nanotecnologia está em expansão, causando um impacto em todas as esferas da vida humana. Cavalcanti (2014) comparou o impacto dessa nova ciência na economia e na sociedade com as mudanças causadas pelo desenvolvimento da tecnologia da informação ou com os avanços da biologia molecular e celular.

Nas últimas décadas a nanotecnologia vem se desenvolvendo tão rapidamente que os investimentos nessa área cresceram extensivamente, a previsão para 2020 é que as nanotecnologias movimentem aproximadamente US\$ 3 trilhões, condição que pode

proporcionar o surgimento de novos empregos para cerca de 6 milhões de trabalhadores até o final da década (Duncan, 2011).

Uma das áreas mais promissoras da nanotecnologia, a nanobiotecnologia emergiu do cruzamento da nanociência com a biotecnologia e vem se tornando a ferramenta mais utilizada na fabricação de nanoestruturas funcionais, pois utiliza tecnologias biossintéticas e ambientalmente amigáveis para síntese de bionanomateriais (Niemeyer, 2006; Zhang et al., 2007; Rai et al., 2009).

Vários tipos de matérias podem obtidas por meio da nanobiotecnologia, como exemplo as nanopartículas, que são definidas como sistemas coloidais poliméricos nanoestruturados (Santos and Fialho, 2008). Percebe-se um grande interesse na utilização de nanopartículas de prata devido as suas propriedades notáveis como boa condutividade, elevado efeito catalítico, alta área superficial e excelente atividade antimicrobiana (Gúzman et al., 2009; Antunes, 2013).

1.2 Propriedades antimicrobianas e aplicações das nanopartículas de prata

O efeito antimicrobiano da prata é reconhecido há muitos anos. Na antiguidade, a mesma era utilizada no tratamento de queimaduras e como agente quimioterápico contra patologias provocadas por bactérias, como a *Staphylococcus aureus*. Após a descoberta da penicilina, o uso da prata como agente bactericida diminuiu consideravelmente, porém, com a seleção de cepas resistentes a antibióticos, a prata voltou a despertar interesse na comunidade científica em virtude do desenvolvimento de novos antimicrobianos (Chopra, 2007; Antunes et al., 2013).

A prata em seu estado metálico é inerte, entretanto, quando em contato com a pele úmida das feridas, fica ionizada e extremamente reativa, apresentando forte propriedade antimicrobiana uma vez que se liga a proteínas, causa mudanças estruturais na parede celular bacteriana e na membrana nuclear levando à morte celular. Outro mecanismo de ação descrito se deve à capacidade da prata ionizada se ligar ao material genético bacteriano e inibir sua replicação (Landsdown, 2002; Rai et al., 2009).

As nanopartículas de prata também têm forte atividade antimicrobiana, muitas vezes são mais eficientes do que os íons de prata, devido a área de superfície extremamente grande, que proporciona um melhor contato com os micro-organismos (Rai et al., 2009).

O mecanismo de ação antimicrobiano das nanopartículas de prata ainda não está bem elucidado, entretanto, estudos revelam que a liberação dos íons metálicos presentes na superfície das AgNPs reagem com os grupos tiol e sulfidril presentes nas proteínas, diminuindo a permeabilidade da membrana, podendo provocar a morte celular (Rai et al., 2009; Andrade, 2013).

Quando as AgNPs penetram no interior da célula os íons de prata liberados provocam a desnaturação do DNA impedindo a divisão celular e inativam enzimas da cadeia respiratória, provocando um aumento na produção de radicais livre (Figura 1). Grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio (ROS), podem induzir a apoptose e consequentemente a morte celular (Rai et al., 2009; Kon and Rai, 2013).

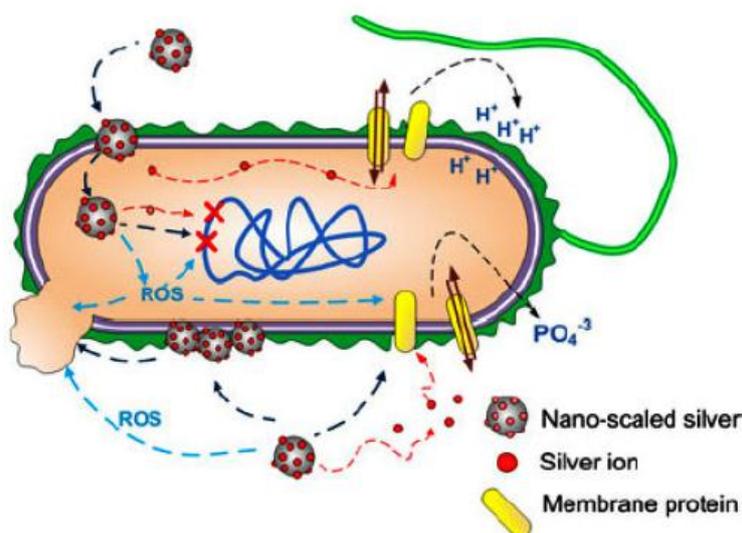


Figura 1 - Interação da prata na escala nano com células bacterianas
Fonte: Durán et al. (2011).

1.3 Relevância da síntese biológica de nanopartículas de prata

Uma variedade de técnicas tem sido desenvolvidas para sintetizar nanopartículas metálicas, incluindo a redução química por NaBH_4 , N_2H_4 , NH_2OH , etanol, etileno glicol, e N,N -dimetilformamida (DMF); deposição eletroquímica ou sonoquímica; técnicas de aerossol; redução fotoquímica e irradiação a laser. Dentre estes o método químico é o mais empregado pois possibilita a produção de grandes quantidades de nanopartículas num curto período de tempo com uma boa dispersão e controle da distribuição de tamanho (Dhanasekaran et al., 2011).

Entretanto os métodos químicos atuais para a síntese de nanopartículas empregam produtos químicos tóxicos, caros e muitas vezes ineficientes, produzindo resíduos perigosos, que representam um risco considerável para o ambiente. Outra desvantagem dos métodos químicos é a impossibilidade de aplicação dessas nanopartículas na área biomédica. Já os métodos físicos, tais como deposição por pulverização catódica, ablação por laser, ou deposição de aglomerado de feixe são métodos demorados e ineficientes (Dhanasekaran et al., 2011).

Uma alternativa para produção de nanopartículas de baixo custo, ambientalmente amigável, compatível com sistemas vivos e de fácil escalabilidade está amplamente sendo utilizado o método biológico, também conhecido como método biossintético ou química verde, que utiliza moléculas bioativas sintetizadas por bactérias, fungos ou plantas para reduzir os íons de prata e estabilizar as nanopartículas (Dhanasekaran et al., 2011; Kulkarni and Muddapur, 2014).

O método biológico representa um avanço sobre os demais, por ser rentável e utilizar tecnologia limpa. Trata-se de uma alternativa que está se mostrando viável para exploração da síntese de nanomateriais, a exemplo das nanopartículas com propriedades ópticas, químicas, fotoeletroquímicas, eletrônicas e antimicrobianas únicas (Dhanasekaran et al., 2011; Dar et al., 2013; Kulkarni and Muddapur, 2014).

Dentre os sistemas biológicos para produção de nanopartículas de prata, os fungos apresentam inúmeras vantagens sobre bactérias e plantas. Sastry et al. (2003) comentaram que a secreção extracelular das moléculas que atuam na síntese de nanopartículas é uma característica vantajosa dos fungos, considerando que as proteínas secretadas podem ser facilmente processadas o que facilita o isolamento do biocomposto de interesse.

Além disso, é mais fácil escalonar a produção de tais compostos em “nano fábricas” de fungos, pois o cultivo e processamento do micélio são mais simples e adaptável em comparação com fermentações bacterianas, as quais necessitam de equipamentos sofisticados. Outra vantagem de se utilizar fungos é que eles secretam quantidades muito mais elevadas do biocomposto de interesse, aumentando assim significativamente a produtividade de nanopartículas nessa abordagem biossintética (Sastry et al., 2003; Hulkoti and Taranath, 2014).

1.4 Síntese biológica de nanopartículas de prata por fungos

Em trabalho realizado por vários pesquisadores abrangendo mais de 200 gêneros diferentes de fungos, os resultados demonstraram que tais organismos são ótimos candidatos para síntese de nanopartículas metálicas. Os representantes que mais se destacaram foram *Verticillium* e *Fusarium oxysporum*, fungos que produziram nanopartículas de prata de 2-20 nm e de 2-50 nm, respectivamente (Sastry et al., 2003). Sagar and Ashok (2012) relataram a produção de nanopartículas de prata polidispersa, esférica, com tamanho variando de 1 a 20 nm a partir de *A. niger*.

Na última década, vários trabalhos foram publicados relatando a síntese de nanopartículas de prata por fungos: *Cladosporium cladosporioides* (10-100 nm); *F. semitectum* (10-60 nm); *Trichoderma asperellum* (13-18 nm); *T. viride* (5-40nm); *Penicillium fellutanum* (1-100nm); *P. brevicompactum* (23-105 nm); *F. solani* (5-35nm); *F. acuminatum* (5-40 nm); *A. clavatus* (10-25nm); *Verticillium* sp. (25 nm); *Phoma* sp. (75nm); *Phaenerochaete chrysosporium* (50-200nm) (Venkataraman et al., 2011; Prabhu and Poulouse, 2012).

Apesar dos avanços na descoberta de micro-organismos produtores de nanopartículas de prata, o mecanismo exato da síntese dessas moléculas utilizando extratos fúngicos ainda não é bem compreendido. Alguns pesquisadores descobriram que a produção extracelular de AgNPs de alguns fungos é mediada por uma nitrato redutase, entretanto apenas a presença dessa enzima não é suficiente (Figura 2). Duran et al. (2011) estudaram a síntese dessas nanopartículas a partir de extrato bruto originário de *F. oxysporum* e *F. moniliforme*, quando concluiu que também é necessário a participação de uma cadeia transportadora de elétrons para redução dos íons de prata.

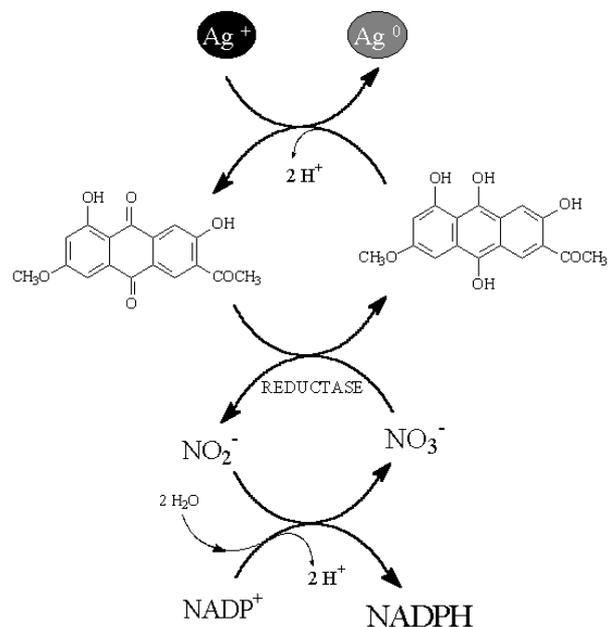


Figura 2 - Mecanismo hipotético da biossíntese de nanopartículas de prata por intermédio de nitrato redutase
 Fonte: Durán et al. (2005)

Além de uma cadeia transportadora de elétrons, é necessário que haja secreção de proteínas para que essas moléculas se liguem às nanopartículas para formação de AgNPs estáveis e monodispersas. Nesta condição, os grupos carbonila dos aminoácidos podem se ligar fortemente à prata e revestir as nanopartículas impedindo a sua aglomeração (Figura 3). Hulkoti and Taranath (2014) relataram que foi possível verificar a presença de resíduos de aminoácidos em nanopartículas de prata produzidas por *P. brevicompactum*.

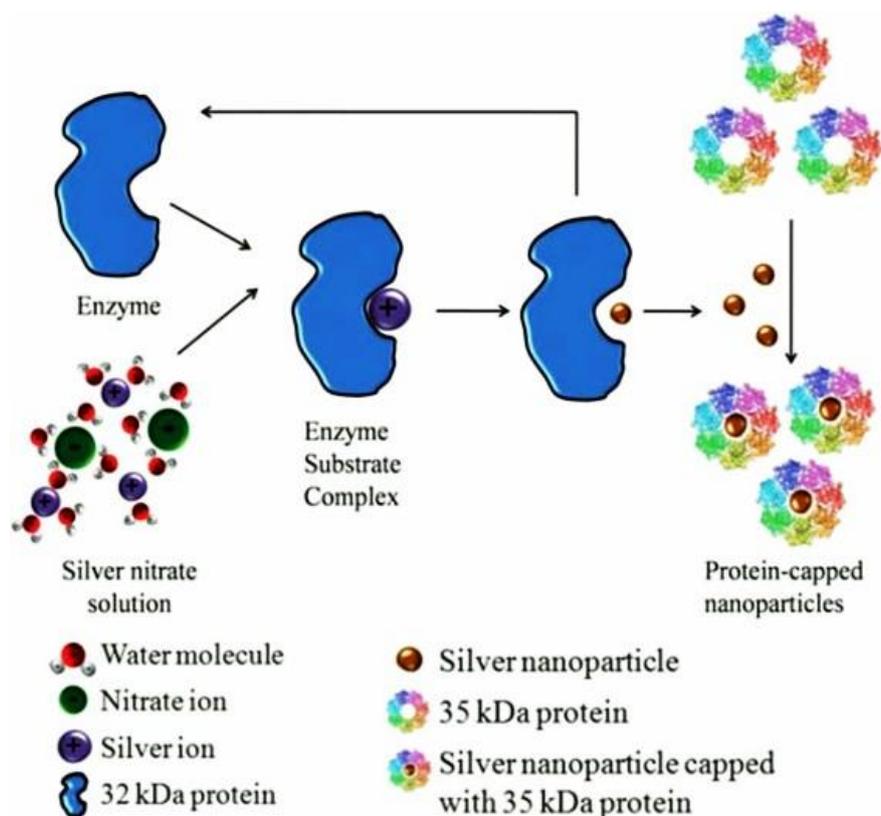


Figura 3 - Mecanismo que mostra o papel das proteínas extracelulares na síntese de nanopartículas de prata
 Fonte: Jain et al. (2010)

1.5 O Gênero *Aspergillus*

Aspergillus estão representados por mais de 200 espécies, distribuídas em todo o mundo, a maioria tem hábito sapróbio e cresce em um grande número de substratos, desde plantas e animais, até resíduos de produtos recalcitrantes. São fungos anamórficos importantes para a saúde pública, como contaminantes alimentares produtoras de toxinas, patógenos humanos e animais. No entanto, pela sua ação benéfica são úteis em processos biotecnológicos tradicionais e modernos (Klich, 2002; Scazzocchio, 2009; Teixeira, 2011).

As espécies desse gênero possuem características morfológicas bem definidas, micélio vegetativo constituído por hifas septadas e ramificadas; estrutura de reprodução constituída por conidióforos originário da célula pé que se expande em uma estrutura no formato de vesícula fértil ou cabeça, de aspecto variado. Nesta vesícula são produzidas hifas na forma de

garrafa ou agulha, denominadas de esterigma, onde se desenvolvem os esporos que são chamados de conídios (Figura 1) (Raper and Fennell, 1977; Klich, 2002; Teixeira, 2011).

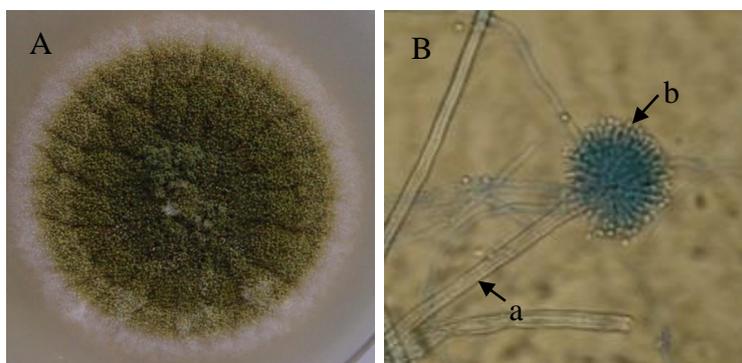


Figura 4 - Estruturas macro e micromorfológicas de *Aspergillus* (forma anamórfica): (A) Colônia em ágar Czapek; (B) estrutura de reprodução (a: conidióforo; b: vesícula com esterigma e conídios)
Fonte: Silva (2017)

Aspergillus é um anamórfico pertencente a família Trichocomaceae, ordem Eurotiales, subclasse Eurotiomycetidae, classe Eurotiomycetes, filo Ascomycota. A maior parte dos *Aspergillus* se reproduzem assexuadamente e através da produção de fiálides e conídios em cadeia, entretanto algumas espécies apresentam teleomorfos e se reproduzem sexuadamente por meio da produção de ascomas (Raper and Fennell, 1977; Klich, 2002; Scazzocchio, 2009). A taxonomia de *Aspergillus* é complexa e encontra-se sempre em evolução, entretanto a identificação desse grupo tem sido tradicionalmente baseada na caracterização morfológica.

Devido ao grande potencial de adaptação fisiológica, muitas espécies são importantes produtoras de moléculas com atividade biológica relevante para indústria. Scazzocchio (2009) afirmou que os *Aspergillus* são grandes produtores de enzimas como hidrolases, lipases e proteases, usadas em uma variedade de indústrias, tais como alimentos, bebidas, detergente e indústrias de aditivos para ração animal.

Teixeira et al. (2011) ressaltaram que os *Aspergillus* reconhecidos como seguros GRAS (*Generally Regarded As Safe*) pela *Food and Drug Administration* (FDA) por não produzirem compostos tóxicos, são úteis na indústria de alimentos pois produzem vários compostos, como enzimas, em particular pectinases, proteases, celulases, biocatalisadores de grande utilidade na fabricação de alimentos e podem ser utilizados em outros processos biológicos.

1.6 Nanomembrana de acetado de celulose

A busca por polímeros nanoestruturados com características antimicrobianas vem crescendo devido ao grande potencial de utilização em dispositivos que requerem um elevado carácter anti-séptico, como por exemplo, para aplicações em feridas na pele (Abdelgawada et al., 2014; Segala et al., 2015). Neste sentido as AgNPs tem sido as mais utilizadas para revestir polímeros, devido às suas propriedades eletrônicas, ópticas, catalíticas e principalmente antimicrobianas (Segala et al., 2015).

As nanofibras eletrofiadas são polímeros que tem grande potencial de aplicação nas indústrias farmacêuticas e cosméticas para a regeneração da pele e órgãos, terapias de administração de fármacos, dentre outros (Nista et al., 2015; Segala et al., 2015).

O processo de eletrofiação é um método simples e barato de produzir nanofibras a partir de soluções poliméricas. A nanofibra é formada em uma placa de metal dentro de um campo elétrico. A solução polimérica é ejetada pelo embolo de uma seringa até a ponta da agulha que está conectada a uma fonte de alta tensão, a gota formada é atraída para uma placa de metal (cobre ou alumínio) aterrada por diferença de potencial (Figura 5). A atração da gota ocorre por um aumento no campo elétrico para um valor crítico onde as forças eletrostáticas superaram a tensão superficial, resultando em um cone oco de fluido, que é ejetado, conhecido como o cone de Taylor. Nesse meio tempo no qual a gota se deslocada o solvente evapora e as fibras secas são depositadas na forma de uma manta fina (Liu et al., 2006; Vondran et al., 2008; Du and Hsieh, 2009; Nista et al., 2012).

A utilização de nanomembranas para o tratamento de feridas na pele proporciona maior conforto para o paciente porque reduz o número de aplicações e dosagem do antibiótico, assim, diminuindo os efeitos colaterais. Nessas infecções as nanomembranas também podem atuar como uma esponja absorvendo os fluidos libertados pela lesão e assegurando a oxigenação através da sua rede porosa de nanofibras (Nista et al., 2013).

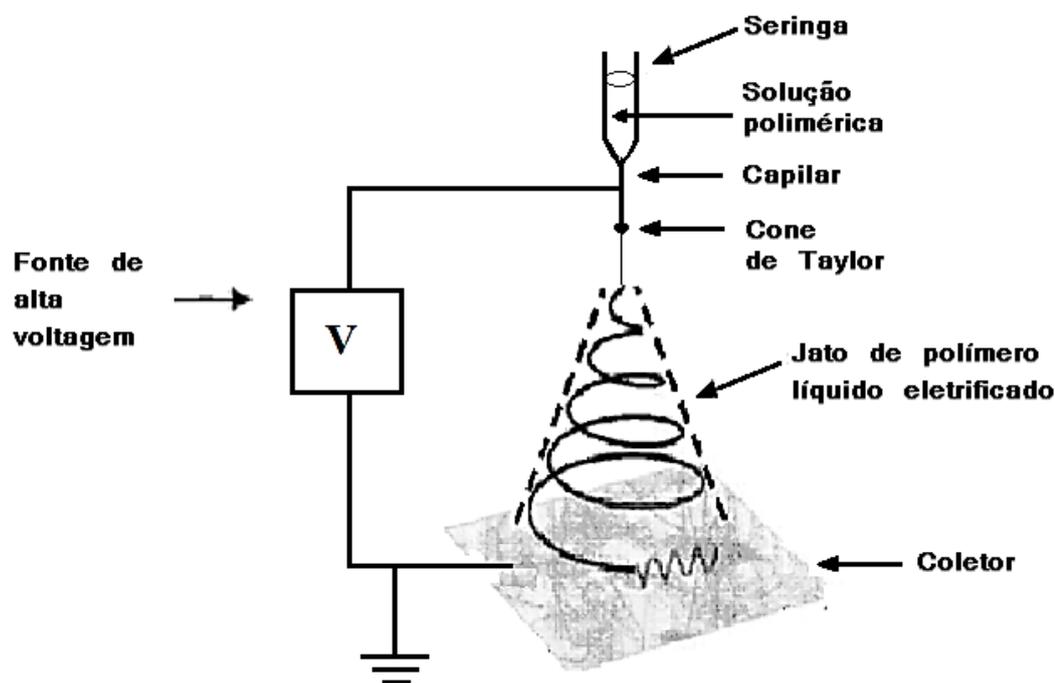


Figura 5 - Esquema simplificado do processo de eletrofiação de membranas nanoestruturadas
 Fonte: Bizarria (2014)

O acetato de celulose é um polímero que apresenta boa tenacidade, alta biocompatibilidade e custo relativamente baixo, além de formar facilmente películas com estrutura porosa, características que o tornam vantajoso para construção de um nanocompósito antiséptico para tratamento de feridas (Nista et al., 2012; Segala et al., 2015).

1.7 Micropartículas de alginato de sódio

A microencapsulação é o processo de envolver substâncias ativas ou outros compostos em um sistema polimérico (cápsulas, esferas, filmes), liberando o seu conteúdo de forma controlada e sob condições específicas. Quando o sistema polimérico resulta em esferas 1 a 1000 μm de tamanho são denominadas micropartículas ou microesferas (Thies, 1995; Kleinubing, 2014).

Os processos de obtenção de sistemas microparticulados podem envolver métodos físico-químicos e mecânicos. Dentre os métodos físico-químicos, destaca-se o processo de coacervação complexa que se baseia na interação eletrostática entre diferentes polímeros de cargas opostas. Esta interação forma complexos insolúveis, que se concentram nas gotas líquidas que sedimentam e se fundem para formar uma fase coacervada. A deposição de tais

coacervados ao redor de um núcleo forma uma barreira, promovendo a encapsulação (Weinbreck et al., 2004; Kleinubing, 2014).

Um dos biopolímeros mais utilizados para síntese de microesferas é o alginato, um polímero aniônico natural, extraído de algas castanhas (*Phaeophyceae*), quimicamente é composto de cadeias lineares de ácido β -D-manurônico (resíduo M) e de ácido α -L-gulurônico (resíduo G) (Figura 6). Quando em presença de policátions, forma micropartículas com capacidade para encapsulamento de vários ativos empregados na área farmacêutica e médica apresentando um grande potencial para aplicação no campo nanotecnologia (Glicksman et al., 1983; Oh et al., 2009; Kleinubing, 2014).

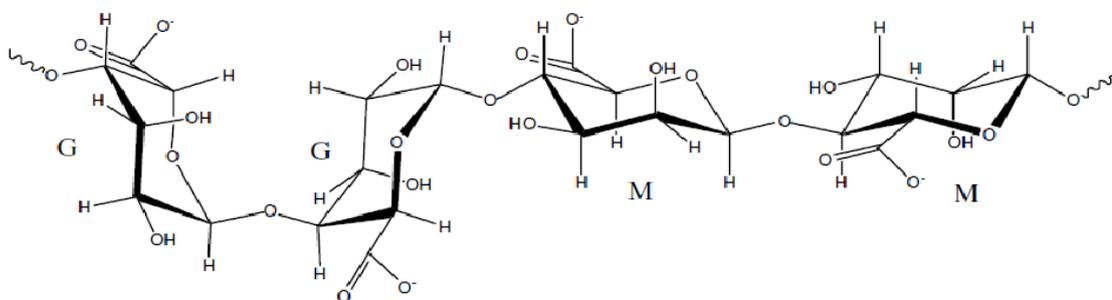


Figura 6 - Estrutura química do alginato de sódio, indicando ácido gulurônico (G) e ácido manurônico (M)
Fonte: Schurks et al. (2002)

A síntese das microesferas ocorre após adição de íons bivalentes de cálcio a uma solução aquosa de alginato de sódio resultando na formação de um hidrogel tridimensional (Lawrie, 2007), conforme esquematizado na figura 7.

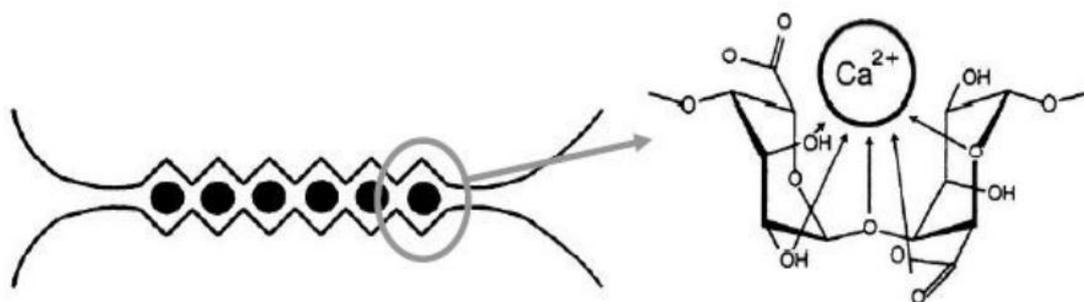


Figura 7 - Esquema das ligações cruzadas do alginato com o cálcio. As esferas em preto representam os íons Ca⁺⁺, enquanto as linhas representam as cadeias de alginato
Fonte: Rodrigues (2008)

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbasi E, Milani M, Fekri Aval S, Kouhi M, Akbarzadeh A, Tayefi Nasrabadi H, et al. Silver nanoparticles: Synthesis methods, bio-applications and properties. *Crit Rev Microbiol* . 2016;42(2):173–80.
- Abdelgawada AM, Hudsona SM, Rojas OJ. Antimicrobial wound dressing nanofiber mats from multicomponente (chitosan/silver-NPs/polyvinyl alcohol) systems. *Carbohydr. Polym*. 2014; v.100, p.166-178.
- Al juraifanir AAA, Ghazwani AA. Biosynthesis of silver nanoparticles by *Aspergillus niger* , *Fusarium oxysporum* and *Alternaria solani*. *African J Biotechnol*. 2015;14(26):2170–4.
- Ammar HAM, T.A. El-Desouky. Green synthesis of nanosilver particles by *Aspergillus terreus* HA1N and *Penicillium expansum* HA2N and its antifungal activity against mycotoxigenic fungi. *J Appl Microbiol*. 2016;121:89–100.
- Andrade PF. Preparação e caracterização de nanopartículas de prata e de nanocompósitos poliméricos antimicrobianos. Tese de doutorado - Instituto de Química da UNICAMP- Universidade Estadual de Campinas. Campinas-SP.2013; 147p.
- Antunes F, Dal'Acqua N, Bergmann C, Giovanela M. Síntese, caracterização e aplicação de nanopartículas de prata como agentes antimicrobianos. *Estud Tecnológicos em Eng* . 2013;9(1):20–6.
- Antunes FS. Síntese, caracterização e avaliação do potencial antimicrobiano de nanopartículas de prata em tintas e vernizes acrílicos à base d'água. Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2013.
- Barabadi H, Honary S, Ebrahimi P, Mohammadi MA, Naghibi F. Microbial mediated preparation , characterization and optimization of gold nanoparticles. *Brazilian J Microbiol*. 2014;45(4):1493–501.
- Bawa R, Bawa SR, Maebius SB, Flynn T, Wei C. Protecting new ideas and inventions in nanomedicine with patents. *Nanomedicine*. 2005; v. 1, n. 2, p. 150-158.
- Bizarria MT, Davila MA, Mei LHI. Non- woven nanofiber chitosan/PEO membranes obtained by electrospinning. *Braz. J. Chem. Eng*. 2014; v.31, n.1, p.57-68.
- Buzea C, Blandino IIP, Robbie K. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases*. 2007; v. 2, n. 4, p17 -172.
- Cavalcante NB. Atividade antibacteriana e antifúngica de nanopartículas de prata produzidas por *Curvularia inaequalis* (Shear) Boedijn. Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais do Semiárido) - Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus Centro, Petrolina - PE, 2014. 79p.

Cavalcanti NB. Nanopartículas de prata produzidas por *Curvularia inaequalis* (Sdhear) Boedijn *Curvularia inaequalis* (Shear) Boedijn. Universidade Federal do Vale o São Francisco; 2014.

Chopra, I. The increasing use of silver-based products as antimicrobial agents: a useful development or a cause for concern? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2007; v. 59 p. 587-590.

Dar MA, Ingle A, Rai M. Enhanced antimicrobial activity of silver nanoparticles synthesized by *Cryphonectria* sp. evaluated singly and in combination with antibiotics. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med*. 2013;9(1):105–10

Dhanasekaran D, Latha S, Saha S, Thajuddin N, Panneerselvam A. Biosynthesis and antimicrobial potential of metal nanoparticles. *Int J Green Nanotechnol Biomed*. 2011;3(1):72–82.

Drexler KE. *Engines of Creation 2.0: The Coming Era of Nanotechnology*. February 2007, 646 p.

Du J, Hsieh Y. *Cellulose* 2009, 19, 247.

Duncan TV. Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: Barrier materials, antimicrobials and sensors. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2011; v. 363, p. 1–24.

Durán N, Marcato PD, Alves OL, Souza GIH De, Esposito E. Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains. *J Nanobiotechnology*. 2005;3:8.

Durán N, Marcato PD, Durán M, Yadav A, Gade A, Rai M. Mechanistic aspects in the biogenic synthesis of extracellular metal nanoparticles by peptides, bacteria, fungi, and plants. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2011;90(5):1609–24.

Durán N, Marcato PD, Souza GIH, Alves OL, Esposito E. Antibacterial effect of silver nanoparticles produced by fungal process on textile fabrics and their effluent treatment. *J Biomed Nanotechnol*. 2007;3(2):203–8.

Durán N, Marcato PD. Biotechnological routes to nanoantimicrobials and industrial: mechanistic aspects, antimicrobial activity, toxicity and industrial implications. In: Rai M, Cioffi N, editors. *Nano-Antimicrobials: Progress and Prospects*. In press. Germany: Springer; 2011.

Durán N, Nakazato G, Seabra AB. Antimicrobial activity of biogenic silver nanoparticles, and silver chloride nanoparticles: an overview and comments. *Appl Microbiol Biotechnol* . 2016;100(15):6555–70.

Elgorban AM, El-Samawaty AE-RM, Yassin MA, Sayed SR, Adil SF, Elhindi KM, et al. Antifungal silver nanoparticles: synthesis, characterization and biological evaluation. *Biotechnol Biotechnol Equip* . 2016;30(1):56–62.

Faria-Tischer PCS, Tischer CA. Nanobiotechnology : platform technology for biomaterials and biological applications the nanostructures. *Biochem Biotechnol Reports*. 2012;1(1):32–53.

Freitas MN, Marchetti JM, Nimesulide PLA. microspheres as a potential sustained release system for the treatment of inflammatory diseases. *INT. J. I. Pharm*. 2005; v. 295, n.1-2, p. 201-211.

Glicksman M. Red seaweed extracts. *Food Hydrocolloids*. 1983; v. 2, p.73.

Gúzman MG, Dille J, Godet S. Synthesis of silver nanoparticles by chemical reduction method and their antibacterial activity. *International Journal of Chemical and Biomolecular Engineering*. 2009 v. 2, p. 3.

Honary S, Barabadi H, Gharaei-fathabad E, Naghibi F. Green Synthesis of Silver Nanoparticles Induced by the Fungus *Penicillium citrinum*. *Trop J Pharm Res*. 2013;12(1):7–11.

Hulkoti NI, Taranath TC. Biosynthesis of nanoparticles using microbes-A review. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* . 2014;121:474–83.

Jain N, Bhargava A, Majumdar S, Tarafdar JC, Panwar J. Extracellular biosynthesis and characterization of silver nanoparticles using *Aspergillus flavus* NJP08: a mechanism perspective. *Nanoscale*. 2011;3(2):635–41.

Kleinubing SA, Seraphim DC, Vieira MGA, Canevesi RLS, Da Silva EA, César CL, et al. Gastro-resistant controlled release of OTC encapsulated in alginate/chitosan matrix coated with acryl-EZE® MP in fluidized bed. *J Appl Polym Sci*. 2014;131(12):1–9.

Kleinubing SA. “Liberação controlada da oxitetraciclina encapsulada em matriz de alginato/quitosana recoberta com Acril-EZE ® MP em leito fluidizado.” Universidade Estadual de Campinas; 2013.

Klich M.A. (2002) Identification of Common *Aspergillus* Species. The Netherlands: CBS.

Kon K, Rai M. Metallic nanoparticles: mechanism of antibacterial action and influencing factors. *J Comp Clin Pathol Res*. 2013;2(1):160–74.

Kulkarni N, Muddapur U. Biosynthesis of Metal Nanoparticles. *J Nanotechnol*. 2014;2014:27–100.

Landsdown ABG. Silver I: its antibacterial properties and mechanism of action. *J.Wound Care*. 2002; v.11, p.125–38.

Lawrie G, Keen I, Drew B, Chandler-Temple A, Rintoul L, Fredericks, P, Grondahl L. Interactions between Alginate and Chitosan Biopolymers Characterized Using FTIR and XPS. *Biomacromolecules*. 2007; v. 8, p. 2533-2541.

Li C, Lu J, Li S, Tong Y, Ye B. Synthesis of magnetic microspheres with sodium alginate and activated carbon for removal of methylene blue. *Materials (Basel)*. 2017;10(1):1–14.

Liu H, Hsieh Y L. *J Polym Sci Part B: Polym Phys* 2002, 40, 2119.

Martinez-Gutierrez F, Olive PL, Banuelos A, Orrantia E, Nino N, Sanchez EM, et al. Synthesis, characterization, and evaluation of antimicrobial and cytotoxic effect of silver and titanium nanoparticles. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med* . 2010;6(5):681–8.

Narayanan KB, Sakthivel N. Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes. *Adv Colloid Interface Sci* . 2010;156(1–2):1–13.

Nista SVG, Peres L, D'Avila MA, Schmidt FL. Nanostructured membranes based on cellulose acetate obtained by electrospinning, Part 1: study of the best solvents and conditions by design of experiments. *J Appl Polym Sci*. 2012;126:E70–8.

Nista SVG, D'Avila MA, Martinez EF, Silva A de SF, Mei LHI. Nanostructured membranes based on cellulose acetate obtained by electrospinning. Part II: controlled release profile and microbiological behavior. *J Appl Polym Sci*. 2013;2:2772–9.

Nista SVG, Bettini J, Lucia Helena Innocentini Mei. Coaxial nanofibers of chitosan-alginate-PEO polycomplex 2 obtained by electrospinning 3. *Carbohydr Polym*. 2015.

Oh JK, Lee DI, Park JM. Biopolymer-based microgels/nanogels for drug delivery Applications. *Progress in Polymer Science*. 2009; v. 34, n.1, p. 1261–1282.

Ostrosky EA, Mizumoto MK, Lima MEL, Kaneko TM, Nishikawa SO, Freitas BR. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Brazilian J Pharmacogn*. 2008;18(2):301–7.

Pereira L, Dias N, Carvalho J, Fernandes S, Santos C, Lima N. Synthesis , characterization and antifungal activity of chemically and fungal-produced silver nanoparticles against *Trichophyton rubrum*. *J Appl Microbiol*. 2014;117:1601–13.

Prabhu S, Poulouse EK. Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. *Int Nano Lett*. 2012;2(32):1–10.

Prabhu S, Poulouse EK. Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. *Int Nano Lett*. 2012;2(1):32.

Rai M, Yadav A, Gade A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnol Adv*. 2009;27(1):76–83.

Raper KB, Fennell DI. *The Genus Aspergillus*. New York, N.Y: Robert E. Krieger Co; 1977. 686 p.

Rodrigues AP. Preparação e caracterização de membranas de quitosana e alginato para aplicação na terapia de lesões. Tese de doutorado apresentado a Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP. 2008.Campinas /SP.

Roy S, Das TK. A Review on Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using *Aspergillus* species. *Adv Sci Eng Med* . 2015;7(9):729–38.

Roy S, Rukherjee T, Chakraborty S, Das TK. Biosynthesis, characterisation & antifungal activity of silver nanoparticles synthesized by the fungus *Aspergillus foetidus* MTCC8876. *Dig J Nanomater Biostructures*. 2013;8(1):197–205.

Sagar G, Ashok B. Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using *Aspergillus niger* and Its Efficacy Against Human Pathogens. *Eur J Exp Biol*. 2012;2(5):1654–8.

Sant'anna LS, Alencar MSM, Ferreira AP. Nanotechnology patenting in Brazil: development, potentialities and reflections for the environment and human health. São Paulo-SP. **Quím. Nova**. 2013; v. 36, n.2.

Santos RMM, Fialho SL. Nanopartículas: Uma alternativa para a administração de biofármacos. *Biotechnol Ciência Desenvolv*. 2006;37:52–9.

Saravanan M. Biosynthesis and In vitro Studies of Silver Bio- nanoparticles Synthesized from *Aspergillus* species and its Antimicrobial Activity against Multi Drug Resistant Clinical Isolates. *World Acad Sci Eng Technol*. 2010;44:738–41.

Sastry M, Ahmad A, Islam Khan M, Kumar R. Biosynthesis of metal nanoparticles using fungi and actinomycete. *Curr Sci*. 2003;85(2):162–70.

Scazzocchio C. *Aspergillus*: A Multifaceted Genus. *Encycl Microbiol* . 2009;2:401–21.

Schurks N, Wingender J, Flemming HC, Mayer C. Monomer composition and sequence of alginates from *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2002; v.30, p. 105–111.

Segala K, Vaz S, Nista G, Cordi L, Trindade M, Bizarria M, et al. Silver nanoparticles incorporated into nanostructured biopolymer membranes produced by electrospinning : a study of antimicrobial activity. *Brazilian J Pharm Sci*. 2015;51(4):911–21.

Tarafdar JC, Raliya R. Rapid , Low-Cost , and Ecofriendly Approach for Iron Nanoparticle Synthesis Using *Aspergillus oryzae* TFR9. *J Nanoparticles*. 2013;2013:1–4.

Teixeira MFS, Silva TA, Palheta RA, Carneiro ALB, Atayde HM. Fungos da Amazônia: uma riqueza inexplorada (aplicações biotecnológicas). 1 ed. Manaus: EDUA- Editora da Universidade Federal do Amazonas. 2011; 255 p.

Thies C. How to Make Microcapsules Lecture and Laboratory Manual. St. Louis, Missouri. 1995; p.28-31.

Vigneshwaran N, Ashtaputre NM, Varadarajan P V., Nachane RP, Paralikar KM, Balasubramanya RH. Biological synthesis of silver nanoparticles using the fungus *Aspergillus flavus*. *Mater Lett*. 2007;61(6):1413–8.

Venkataraman D, Kalimuthu K, Sureshbabu RKP, Sangiliyandi G. Metal nanoparticles in Microbiology: Rai M, Duran N, Vol.-XI, Springer. 2011; p. 17-35.

Vondran JL, Sun W, Schauer CLJ. *Appl Polym Sci* 2008, 109, 968

Weinbreck F, Tromp RH, DE Kruif CG. Composition and structure of whey protein/gum arabic coacervates. *Biomacromolecules*. 2004; v.5, n.4, p.1437– 1445.

Xue B, He D, Gao S, Wang D, Yokoyama K, Wang L. Biosynthesis of silver nanoparticles by the fungus *Arthroderma fulvum* and its antifungal activity against genera of *Candida*, *Aspergillus* and *Fusarium*. *Int J Nanomedicine*. 2016;11:1899–906.

Zhang W, Qiao XE, Chen J. Synthesis of silver nanoparticles. Effects of concerned parameters in water/oil microemulsion. *Mater. Sci. Eng*. 2007; B 142: 1-15.

Zhang X, Yan S, Tyagi RD, Surampalli RY. Synthesis of nanoparticles by microorganisms and their application in enhancing microbiological reaction rates. *Chemosphere* . 2011;82(4):489–94.

Zomorodian K, Pourshahid S, Sadatsharifi A, Mehryar P, Pakshir K, Rahimi MJ, et al. Biosynthesis and characterization of silver nanoparticles by *Aspergillus* species. *Biomed Res Int*. 2016;2016:8–13.

CAPÍTULO II
MATERIAL E MÉTODOS

CAPÍTULO II

1. MATERIAL E MÉTODOS

1.1 Reativação dos *Aspergillus*

Os fungos selecionados para biossíntese extracelular de nanopartículas com atividade antimicrobiana foram 20 linhagens do gênero *Aspergillus*, cedidas pela Coleção de Culturas DPUA da Universidade Federal do Amazonas-UFAM. A reativação dos *Aspergillus* foi feita em caldo glicosado 2% (p/v) a 28 °C por sete dias e posteriormente o cultivo foi realizado em CYA [ágar Czapek Dox e extrato de levedura 0,5% (p/v)], em placa de Petri, a 28 °C por sete dias (Klich and Pitt., 1988), a cultura estoque foi preservada sob refrigeração (4 °C).

1.2 Obtenção de culturas monospóricas

Para obtenção de colônias com um único genoma foram feitos cultivos monospóricos de todas as culturas fúngicas viáveis de acordo com a metodologia descrita por Teixeira et al. (1995). Esta técnica consiste na inoculação de uma suspensão de esporos de concentração final baixa (3 esp/10 µL) em ágar água-água a 28 °C, após 12 horas é possível observar a germinação dos esporos, então, transfere-se um único esporo germinado para ágar Czapek Dox (Cz) e posteriormente para CYA.

1.3 Autenticação das características macro e micromorfológicas

As características macro e micromorfológicas das colônias cultivadas nos meios ágar Czapek, ágar CYA e ágar extrato de malte (MEA) foram utilizadas para autenticação de acordo com as chaves de identificação propostas por Raper and Fennel (1977) e Klich and Pitt (1988). Para obtenção de uma cultura única em placa de Petri foi utilizado o método desenvolvido por Pitt (1991), que consiste na inoculação dos esporos previamente imersos numa solução de ágar semi-sólido adicionado de Twenn 0,05% (v/v).

1.4 Identificação molecular das linhagens de *Aspergillus*

As linhagens de *Aspergillus* que apresentaram melhor desempenho na síntese de nanopartículas de prata foram selecionadas para identificação por meio de análises das sequências do DNA ribossomal. Para obtenção da biomassa, os fungos foram cultivados em meio Sabouraud por 72 h a 25 °C, sob agitação de 170 rpm. Após este período a biomassa foi separada dos resíduos metabólicos por meio de filtração à vácuo e congelada a -20 °C até o momento da extração de DNA.

Aproximadamente 200 mg de micélio foi utilizado para extração de DNA (Figura 8) pelo método de fenol-clorofórmio. A região ITS2 (Internal Transcribed Spacer Region) e parte das subunidades 5,8S e 28S do rDNA foram amplificadas por PCR utilizando os iniciadores ITS-3 (5'- GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC - 3') desenvolvido por White et al. (1990) e UNI-R (5'- GGT CCG TGT TTC AAG ACG - 3') desenvolvido por Haynes et al. (1995).

A reação de amplificação foi realizada em termociclador Eppendorf Master Cycle utilizando os seguintes reagentes: 14,2 µL de água ultra pura; 1 µL de DNA; 2,5 µL de tampão da Taq DNA polimerase 10X (Tris-HCl 200 mM, KCl 500 mM); 2,5 µL de MgCl₂ 25 mM; 2,5 µL dNTP 2,5 mM; 1 µL do oligonucleotídeo ITS-3 (5 pmol); 1 µL do oligonucleotídeo UNI-R (5 pmol) e 0,3 µL de Taq DNA polimerase 5 U.

A reação ocorreu com os seguintes ciclos de temperaturas: 1) 95 °C por 5 min, 2) 95 °C por 45 s, 72 °C por 60 s, 72 °C por 60 s (40 vezes), 3) 72 °C por 5 min. Para confirmação da amplificação do DNA, 2 µL da reação foi submetida a uma eletroforese em gel de agarose a 1%.

O produto da reação de PCR foi purificado com PEG (Polietileno Glicol) e o sequenciamento foi realizado no Sequenciador Automático 3500 ABI de marca Applied Biosystem. Após o sequenciamento, as amostras foram conferidas e editadas com o programa Clustal W (BioEdit). E a confirmação das espécies de *Aspergillus* foi realizada por meio da comparação das sequências de DNA no GeneBank do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) usando o programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) com a ferramenta BLASTn (nucleotídeo-nucleotídeo).

1.5 Produção de compostos bioativos para síntese de AgNPs

Os *Aspergillus* foram cultivados em frasco de Erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de meio MGYP (Extrato de malte 0,3%; glicose 1%; extrato de levedura 0,3% e peptona 0,5 % [p/v]), por 96 h, a 28 °C, 200 rpm. Uma solução padronizada de esporos foi utilizada como inóculo de modo que a concentração final no meio foi de 1×10^6 esporos/mL de meio.

Após este período a biomassa foi separada dos resíduos metabólicos por meio de filtração à vácuo e lavada três vezes com água deionizada esterilizada, em seguida foi realizada extração aquosa da biomassa por 72 h, a 28 °C, sob agitação de 200 rpm conforme metodologia descrita por Sastry et al. (2003); Durán et al. (2007) e Vigneshwaran et al. (2007).

1.6 Síntese biológica de AgNPs

Para síntese de nanopartículas de prata foi adicionado ao extrato aquoso recuperado uma solução de AgNO_3 de forma a se obter uma concentração final de 1 mM, a solução foi incubada por 96 h no escuro, à 28 °C, sob agitação de 180 rpm. Dois controles negativos, um contendo água destilada ao invés nitrato de prata e outro contendo apenas a solução de nitrato de prata foram mantidos nas mesmas condições. A verificação da síntese de nanopartículas de prata foi feita pela observação da mudança de coloração da solução e posteriormente confirmada por espectrometria de UV-vis (Vigneshwaran et al., 2007).

1.7 Caracterização das AgNPs

A caracterização das nanopartículas de prata foi realizada no Laboratório de Química Biológica e demais laboratórios multiusuários do Instituto de Química da Universidade de Campinas – UNICAMP, sob a supervisão do Professor Doutor Nelson Durán, como descrito a seguir.

1.7.1 Espectroscopia de Ultravioleta-Visível (UV-vis)

As bandas de absorção das nanopartículas de prata são formadas em decorrência do efeito de ressonância de *plasmon* de superfície (SPR), na qual a oscilação coletiva dos elétrons livres, quando estimulado por um feixe de luz, entram em ressonância com o campo eletromagnético as ondas de luz induzindo a formação de um pico de absorção (Berte, 2013; Cavalcanti, 2014).

Os dados dos espectros de absorção das soluções coloidais são importantes para confirmação da formação das nanopartículas, pois as AgNPs apresentam bandas de absorção na região do Ultravioleta-Visível típicas que dependendo do tamanho e da forma das mesmas podem variar de 370 até 740 nm (Hu et al., 2004; Noguez, 2007; Mansouri and Ghader 2009). Entretanto é mais comum a formação de bandas de absorção em torno de 400 nm.

Neste estudo, as medidas dos espectros de absorção das AgNPS foram realizadas em espectrofotômetro de duplo feixe com resolução de 0,1 nm numa faixa de leitura de 200-800 nm.

1.7.2 Determinação de diâmetro hidrodinâmico das AgNPs e potencial zeta das soluções coloidais

A determinação do potencial zeta das soluções de nanopartículas é um dado interessante pois é uma medida indireta da carga de superfície de uma partícula, quanto maior for o potencial zeta, maior será a repulsão eletrostática entre elas e conseqüentemente mais estável será a dispersão coloidal de nanopartículas. Segundo Skoog & Roler (2002) a estabilidade em solução ocorre quando o potencial zeta é $\zeta \leq -30$ mV ou $\zeta \geq 30$ mV.

O diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas foram medidos no equipamento Nano ZS Zetasizer (Malvern Instruments, Worcestershire®, UK), em um ângulo de detecção da luz espalhada fixo em 173°, temperatura de 25 °C. As amostras foram diluídas dez vezes em uma solução de 10^{-3} mol.L⁻¹ de KCl e as medições realizadas em célula capilar com um caminho ótico de 10 mm. Na mesma ocasião foi determinado também o potencial zeta (ζ) das soluções de AgNPs.

1.7.3 Determinação do diâmetro e da forma das AgNPs por Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

A microscopia eletrônica de transmissão foi utilizada para verificar a forma e o tamanho das nanopartículas, assim como, a presença de uma camada de proteção em volta das mesmas, característica importante para estabilidade das nanopartículas em soluções coloidais.

Para as análises, as amostras foram diluídas e gotejadas em uma grade de cobre de 400 *mesh* e secas à temperatura ambiente. As imagens de microscopia eletrônica de transmissão foram obtidas no equipamento Carl Zeiss CEM 902®, operando com voltagem de aceleração de 80 kV.

1.7.4 Confirmação da presença de prata metálica por difração de Raios-X (DRX)

As amostras liofilizadas foram submetidas a análises de difração de Raios-X um difratômetro Shimadzu, modelo XRD7000, operando com radiação $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,54060 \text{ \AA}$), tensão de 40 kV, corrente de 30 mA, velocidade de varredura 2° min^{-1} e região de 2θ entre 5 e 90° . Essa técnica possibilita a criação de difratogramas referentes à estrutura cristalina da amostra devido a sua distância interatômica. É uma das técnicas mais utilizadas na caracterização de nanomateriais, segundo Oliveira (2011). E os picos formados podem confirmar a presença de prata metálica na solução de nanopartículas de prata.

1.7.5 Espectroscopia de Infra-Vermelho com Transformada de *Fourier* (FTIR)

A espectroscopia de infravermelho permite obter informações sobre grupos químicos funcionais de determinadas ligações, pois a maioria dos compostos químicos apresentam um espectro com picos bem definidos quando irradiados luz emitida na região do infravermelho (Jung, 2008; Berté, 2013).

Os espectros da região do infravermelho, no modo transmitância, foram obtidos em espectrofotômetro FT-IR (Bomem MB Series-B102), na faixa espectral de 4000 a 400 cm^{-1} . Para leitura no equipamento foram confeccionadas pastilhas de brometo de potássio (KBr) contendo 10% (cerca de 1 mg) das amostras de AgNPs previamente liofilizadas, a compactação foi realizada em prensa hidráulica com molde cilíndrico.

1.7.6 Energia Dispersiva de Raios-X (EDX)

A composição elementar das AgNPs liofilizadas foi determinada em Espectrômetro de Microfluorescência de Raios-X (microEDX1300, Shimadzu) em cinco pontos da amostra utilizando tensão de aceleração de 15 e 50 kV e contagem de tempo de 200 segundos.

1.7.7 Espectrometria de Emissão de Plasma (ICP)

A técnica de ICP foi utilizada para determinar a quantidade de prata na solução de AgNPs. A análise foi realizada no espectrômetro de emissão de plasma (PerkinElmer, Optima 8000). A curva de calibração para o elemento analisado (Ag) foi construída a partir de nove soluções de nitrato de prata com concentrações variando de 0,1 a 50 mg/L. A solução de AgNPs foi diluída 10 vezes para leitura no equipamento.

1.8 Determinação da atividade antimicrobiana das AgNPs

A atividade antimicrobiana das nanopartículas de prata foi realizada frente a *Escherichia coli* (CBAM 0001), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *S. epidermidis* (CBAM 0293), *Candida albicans* (DPUA1706) e *Trichosporon beigelii* (DPUA 210) pela técnica de difusão em ágar (Ostrosky et al., 2008). Os cultivos dos micro-organismos teste foram preparados em Ágar Müller-Hinton e ágar Sabouraud, em placa de Petri, para bactérias e leveduras, respectivamente.

Como inóculo foi utilizado 100 µL de uma suspensão celular de concentração semelhante à escala de *McFarland* 0,5. De cada solução de AgNPs foram transferidos 100 µL para poços de 5 mm de diâmetro (Figura 14), incluindo os controles (itraconazol [50 µg/mL] para leveduras e estreptomicina para bactérias [50 µg/mL] e AgNO₃ [1 mM]). As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h para bactérias e 48 h para leveduras. Os halos de inibição foram medidos no reverso da placa com auxílio de uma régua milimétrica.

1.9 Determinação da Concentração Mínima Inibitória

A Determinação da Concentração Mínima Inibitória foi realizada de acordo com a metodologia de microdiluição em caldo, descrita no documento M7-A6 e M27-A2 do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008), frente aos mesmos micro-organismos do item anterior. Foram utilizadas concentrações de 0,12 a 58,95 µg/mL. O teste foi realizado em microplaca de 96 poços contendo meio RPMI (Sigma ®) para leveduras e Caldo Müeller-Hinton para bactérias. Como controle positivo foi utilizado itraconazol (para leveduras) e estreptomicina (para bactérias). Foram realizados também o controle de crescimento dos micro-organismos e os controles de esterilização do meio de cultura e das soluções de nanopartículas de prata.

Para confirmar se houve crescimento dos micro-organismos foi adicionado o revelador *Alamar Blue*®. e a Concentração Mínima Inibitória foi determinada como a menor concentração da solução de nanopartículas de prata onde não ocorreu o crescimento dos micro-organismos.

1.10 Determinação de citotoxicidade *in vitro*

Para o ensaio de citotoxicidade foram utilizados fibroblastos humanos (MRC5) mantidos no meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e Penicilina 1% (p/v). As células foram mantidas em estufa com injeção de 5% de CO₂, a 37 °C.

A citotoxicidade foi avaliada pelo método do *Alamar Blue*® (Ahmed et al.,1994). As células foram inoculadas na concentração de $0,5 \times 10^4$ células por poço, em placas de 96 poços e mantidas a 37 °C, com CO₂ a 5%. Após 24 horas, as células foram tratadas na concentração de 100 µg/mL de AgNPs liofilizadas durante 72 horas. Como controle positivo foi utilizada a doxorrubicina (20 µM ou 34 µg/mL) e como controle negativo DMSO (0,01%, [v/v]). Após adição *Alamar Blue*® (0,4% [v/v]) a fluorescência foi medida a 465 nm e 540 nm no leitor de microplaca (DTX800 Beckman e Coulter). Os experimentos foram realizados em triplicata. As imagens foram capturadas por meio do programa Zen 2 da Carl Zeiss Microscópio GmbH Company® e os dados foram analisados no programa GraphPad prism 6.0.

1.11 Síntese de nanomembrana de acetato de celulose

A eletrofiação das membranas nanoestruturadas foi realizada no Laboratório de Biomateriais da Faculdade de Engenharia Química-FEQ da UNICAMP, sob supervisão da Professora Doutora Lucia Helena Innocentini Mei.

As membranas nanoestruturadas de Acetato de Celulose (NanoMAC) foram preparadas a partir de uma solução de acetato de celulose 15% (p/v) e Dimetil acetamida/acetona (1:2), a solução foi agitada por 2 h para assegurar completa homogeneização.

A NanoMAC foi sintetizada por eletrofiação da solução de acetato de celulose utilizando uma seringa de vidro de 20 mL com agulha de aço de 4 cm de comprimento e 0,8 mm de diâmetro. O polo positivo de uma fonte de alimentação de alta tensão foi conectado à agulha metálica da seringa, enquanto o fio terra foi usado para aterrar o coletor de placas de cobre com dimensões de 30 x 40 cm. A corrente de alimentação foi controlada por uma bomba KD Scientific, Modelo 100 conectada a uma seringa. A distância da agulha ao coletor foi de 10 cm e a tensão aplicada foi de 15 kV com taxa de fluxo de 1 mL.h⁻¹. As amostras de membrana foram recolhidas em folha de alumínio utilizada para revestir a placa de cobre durante as experiências (Nista et al., 2012; Segala et al., 2015).

O revestimento da nanoMAC foi realizado por meio de lento gotejamento da solução de AgNPs em discos de 5 mm da membrana nanoestruturada, até obtenção de 6,73 µg de Ag em cada disco da nanoMAC.

1.12 Morfologia da nanomembrana de acetato de celulose

A estrutura morfológica e uniformidade da membrana de AC foi observada no microscópio eletrônico de varredura modelo JEOL JSM-6360LV, sob vácuo, com aceleração do feixe de 10 kV. As imagens foram obtidas após metalização da amostra com uma fina camada de ouro/paládio e o diâmetro da membrana de AC foi calculado no software *image J*.

1.13 Atividade antimicrobiana da nanomembrana de acetato de celulose adicionada de AgNPs

Para confirmar a ação antimicrobiana das AgNPs incorporadas às membranas nanoestruturadas foi realizada a atividade antimicrobiana pela técnica de difusão em ágar frente a linhagens de *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans* e *T. beigeli* por meio da técnica de difusão em ágar citada por Ostrosky et al, (2008).

Os cultivos dos micro-organismos teste foram preparados em Ágar Müller-Hinton e ágar Sabouraud, em placa de Petri, para bactérias e leveduras, respectivamente. Como inóculo foi utilizado 100 µL de uma suspensão celular de concentração semelhante à escala de *McFarland* 0,5.

Para testar as membranas nanoestruturadas com AgNPs foram recortados círculos da mesma com 5 mm de diâmetro e depositados na superfície do meio já inoculado com o micro-organismo. Como controle foram utilizados: itraconazol [50 µg/mL] para leveduras, estreptomicina para bactérias [50 µg/mL] e AgNO₃ 1 mM. As placas foram incubadas à 37 °C por 24 h para bactérias e 48 h para leveduras, e os halos de inibição foram medidos no reverso da placa com auxílio de uma régua milimétrica.

1.14 Síntese de microesfera de alginato

A síntese das microesferas de alginato foi realizada por coacervação complexa em um único estágio de acordo com a metodologia adaptada de Kleinubing et al. (2014) e Chaodao et al. (2017), utilizando AgNPs mediada por *A. flavo-furcatis*. Na elaboração das microesferas 50 mL de uma solução de alginato de sódio [1,75% (m/v)] foi gotejada lentamente com uma seringa a partir de uma altura de 30 cm em uma solução de cloreto de cálcio 2,0 % (p/v), sob agitação constante.

Após a síntese, as microesferas foram lavadas com água ultra pura e desidratadas em dessecador por 76h. A incorporação das AgNPs nas microesferas foi realizada de duas maneiras: *in situ*, na qual a solução de AgNPs foi utilizada como solvente do alginato de sódio e posteriormente foi realizado o gotejamento para formação das microesferas e *ex situ* onde as microesferas, após a secagem, foram imersas em uma solução de AgNPs até completa absorção e posteriormente foram novamente secas em dessecador por 76 h.

1.15 Caracterização das microesferas de alginato de sódio

As microesferas foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura em um equipamento LEO Electron Microscopy/Oxford (Cambridge, Inglaterra) modelo Leo 440i, utilizando aceleração de 10 kV. As amostras foram posicionadas em fita metálica adesiva de dupla face e colocadas sobre suporte metálico cilíndrico. As imagens foram obtidas após metalização da amostra no equipamento Sputter Coater EMITECH, Modelo: K450 (Kent, Reino Unido) com uma fina camada de ouro/paládio (200 Å).

1.16 Atividade antimicrobiana da microesfera de alginato

Aproximadamente 1 g das microesferas foram utilizadas para realização do ensaio antimicrobiano contra os micro-organismos *E. coli* (CBAM 0001), *S. aureus* (ATCC 25923), *C. albicans* (DPUA1706) e *T. beigeli* (DPUA 210), em triplicata, pela técnica de difusão em ágar (Ostrosky et al., 2008). Os cultivos dos micro-organismos teste foram preparados em Ágar Müller-Hinton e ágar Sabouraud, em placa de Petri, para bactérias e leveduras, respectivamente.

Como inóculo foi utilizado 100 µL de uma suspensão celular de concentração semelhante à escala de McFarland 0,5. De cada solução de AgNPs foram transferidos 100 µL para poços de 5 mm de diâmetro, incluindo os controles (itraconazol [50 µg/mL] para leveduras e estreptomicina para bactérias [50 µg/mL]). As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h para bactérias e 48 h para leveduras. Os halos de inibição foram medidos no reverso da placa com auxílio de uma régua milimétrica.

1.17 Análise estatística

Todos os testes foram realizados em triplicata e os resultados foram submetidos a análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey para os grupos experimentais. A diferença entre a média dos grupos foi considerada significativa quando $p > 0,05$ (*software MiniTab* versão 17.0). Os dados relativos à caracterização das AgNPs pelas técnicas de espectroscopia e espectrometria foram plotados no *software origin* pro 8.5.1 SR2. E os dados da citotoxicidade foram analisados no programa *GraphPad prism* 6.0.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Berté R. Síntese e Caracterização de nanopartículas de prata conjugada com peptídeo antimicrobianos. São Carlos: dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada da Universidade de São Paulo. 2013;102p.
- Cavalcanti NB. Nanopartículas de prata produzidas por *Curvularia inaequalis* (Shear) Boedijn. *Curvularia inaequalis* (Shear) Boedijn. Universidade Federal do Vale do São Francisco; 2014.
- CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 (ISBN 1-56238-486-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.
- CLSI. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras; Norma Aprovada—Segunda Edição. NCCLS document M27-A2 [ISBN 1-56238-469-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos, 2002.
- Durán N, Marcato PD, Souza GIH, Alves OL, Esposito E. Antibacterial effect of silver nanoparticles produced by fungal process on textile fabrics and their effluent treatment. *J Biomed Nanotechnol.* 2007;3(2):203–8.
- Haynes KA, Westerneng TJ, Fell JW, Moens W. Rapid detection and identification of pathogenic fungi by polymerase chain reaction amplification of large subunit ribosomal DNA. *J Med Vet Mycol.* 1995;33(319–325).
- Hu JQ. et al. A simple and effective route for the synthesis of crystalline silver nanorods and nanowires. *Advanced Functional Materials.* 2004; v.14, p.183-189.
- Jung C. Fourier transform infrared spectroscopy as a tool to study structural properties of cytochromes P450 (CYPs). *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* 2008; v. 392, n. 6, p 1031-1058.
- Kleinubing SA, Seraphim DC, Vieira MGA, Canevesi RLS, Da Silva EA, César CL, et al. Gastro-resistant controlled release of OTC encapsulated in alginate/chitosan matrix coated with acryl-EZE® MP in fluidized bed. *J Appl Polym Sci.* 2014;131(12):1–9.
- Klich, MA, Pitt JJ. A Laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs. Australia: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization. 1988; 115pp.
- Li C, Lu J, Li S, Tong Y, Ye B. Synthesis of magnetic microspheres with sodium alginate and activated carbon for removal of methylene blue. *Materials (Basel).* 2017;10(1):1–14.
- Mansouri SS, Ghader S. Experimental study on effect of different parameters on size and shape of triangular silver nanoparticles prepared by a simple and rapid method in aqueous solution. *Arabian Journal of Chemistry.* 2009; v.2, p.47-53.

Mariano MS, Oliveira JE De, Assis OBG. Investigação do potencial Zeta e do tamanho de nanopartículas em suspensões poliméricas coloidais. 2011. p. 1.

Nista SVG, Peres L, D'Avila MA, Schmidt FL. Nanostructured Membranes Based on Cellulose Acetate Obtained by Electrospinning , Part 1 : Study of the Best Solvents and Conditions by Design of Experiments. J Appl Polym Sci. 2012;126:E70–8.

Noguez C. Surface plasmons on metal nanoparticles the influence of shape and physical environment. Journal of Physical Chemistry C. 2007; n. 111, p.3806-3819.

Ostrosky EA, Mizumoto MK, Lima MEL, Kaneko TM, Nishikawa SO, Freitas BR. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. Brazilian J Pharmacogn. 2008;18(2):301–7.

Pitt JI. A laboratory guide to common *Penicillium* species. North Wales: CSIRO-Division of Food Processing. 1991; 187pp.

Raper KB, Fennell DI. The Genus *Aspergillus*. New York, N.Y: Robert E. Krieger Co; 1977. 686 p.

Scazzocchio C. *Aspergillus*: A Multifaceted Genus. Encycl Microbiol . 2009;2:401–21.

Sastry M, Ahmad A, Islam Khan M, Kumar R. Biosynthesis of metal nanoparticles using fungi and actinomycete. Curr Sci. 2003;85(2):162–70.

Segala K, Vaz S, Nista G, Cordi L, Trindade M, Bizarria M, et al. Silver nanoparticles incorporated into nanostructured biopolymer membranes produced by electrospinning : a study of antimicrobial activity. Brazilian J Pharm Sci. 2015;51(4):911–21.

Skoog DA, Holler FJNTA. Princípios da análise instrumental. 5 ed. Porto Alegre. 2002. Teixeira MF et al. Fungos Filamentosos e Leveduras. Catálogo da Coleção de Cultura-DPUA. 2aed. Imprensa Universitária Campus Universitário. Manaus: UA, 1995;33 pp.

Vigneshwaran N, Ashtaputre NM, Varadarajan P V., Nachane RP, Paralikar KM, Balasubramanya RH. Biological synthesis of silver nanoparticles using the fungus *Aspergillus flavus*. Mater Lett. 2007;61(6):1413–8.

White T J, Bruns T, Lee S TJW. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M A, Gelfand D H, Sninsky J J WTJ, editor. PCR protocols: a guide to methods and applications. New York, N.Y: Academic Press, Inc; 1990. p. 315–22.

CAPÍTULO III

RESULTADOS

BIOSSÍNTESE DE NANOPARTÍCULA DE PRATA PARA DESENVOLVIMENTO DE ANTIMICROBIANOS UTILIZANDO A DIVERSIDADE DE *ASPERGILLUS* NATIVOS DA AMAZÔNIA BRASILEIRA

Taciana Silva¹, Néilly Silva-Vinhote¹, Larissa Paiva¹, Larissa Silva¹, Luiz Vieira², Bianca Souza¹, Nelson Durán^{3,4,5}, José Pereira², Maria Teixeira¹

¹ Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM.

² Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM

³ Instituto de Química da Universidade de Campinas, Campinas, SP.

⁴ Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano-CNPEM), Campinas, SP.

⁵ Laboratório de Síntese de Nanoestruturas e Interação com Biosistemas (NanoBioss), Universidade de Campinas, SP

RESUMO

Neste estudo foi avaliado o potencial de linhagens de *Aspergillus* na síntese extracelular de nanopartículas de prata com propriedades antimicrobianas. As 20 linhagens de *Aspergillus* foram subcultivadas em caldo glicosado 2% (p/v) a 28°C por sete dias. Após cultivo monospórico foram avaliadas as características morfológicas das culturas em ágar Czapek, CYA [ágar Czapek Dox e extrato de levedura 0,5% (p/v)], e ágar extrato de malte (MEA) para autenticação das linhagens. A identificação molecular foi realizada utilizando sequências da região ITS do rDNA. A produção de biomassa foi feita por fermentação submersa em 200 mL de extrato de MGY, a 28 °C, 180 rpm. E como inóculo foi adicionado no meio 10⁶ esp/mL de meio. Após 96h, no extrato micelial recuperado da lavagem da biomassa foi adicionado solução de AgNO₃ até concentração final de 1 mM. A reação de síntese das nanopartículas de prata foi realizada ausência de luz, a 25 °C, 180 rpm. Para confirmação da síntese de AgNPs foi realizada varredura no espectrofotômetro de Uv-vis (200 a 800 nm). *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Candida albicans* e *Trichosporon beigelii* foram os micro-organismos teste utilizados na atividade antimicrobiana das AgNPs pela técnica de difusão em ágar. As técnicas utilizadas na autenticação dos *Aspergillus* foram eficientes, e os testes moleculares classificaram as linhagens nos grupos niger e flavus. Da totalidade de *Aspergillus*, 70% foram mediadores da síntese de AgNPs, sendo que desse quantitativo, 60% são grupo flavus e 10% do grupo niger. As linhagens mais eficientes na produção de AgNPs foram *A. flavo-furcatis* DPUA 1451 e *A. oryzae* DPUA 1624. Todas as AgNPs inibiram o crescimento de pelo menos um dos micro-organismos teste. Os *Aspergillus* isolados de substratos do bioma Amazônico são promissores para utilização em processos de síntese biológica de AgNPs com propriedades antimicrobianas relevantes, demonstrando grande potencial para utilização na área médica, farmacêutica e cosmética.

Palavras chave: fungos, síntese biológica, nanopartícula de prata.

INTRODUÇÃO

Uma das áreas mais promissoras da nanotecnologia, a nanobiotecnologia que emergiu da interação entre nanociência e biotecnologia já está sendo uma ferramenta utilizada na fabricação de nanoestruturas funcionais associando tecnologias biossintéticas ambientalmente amigáveis para síntese de bionanomateriais (Niemeyer, 2006; Zhang et al., 2007; Rai et al., 2009).

A nanobiotecnologia proporciona a fabricação de vários tipos de matérias, como exemplo as nanopartículas de prata (AgNPs) que tem aplicações na indústria de eletrônicos, alimentos, farmacêutica, medicina, cosméticos, entre outras (Zoromodian et al., 2016; Zhang et al., 2016).

A síntese de nanopartículas pode ser realizada por meio de métodos físicos, químicos e biológicos. Os métodos apresentam baixo rendimento, alto consumo de energia, contaminação por solvente e falta de distribuição uniforme (Kruis et al., 2000; Tien et al., 2008; Zhang et al., 2016). Já os químicos utilizam como agentes redutores solventes orgânicos e inorgânicos tais como citrato, boro-hidreto, tio-glicerol e 2-mercaptoetanol que são tóxicos e perigosos para o ambiente (Mallick et al., 2004; Abbasi et al., 2016; Zhang et al., 2016).

Para superar as deficiências dos métodos físicos e químicos surgiu o método biológico; a síntese de nanopartículas mediada por seres vivos mostrou-se uma abordagem simples, econômica, confiável e ambientalmente amigável. Diversos sistemas biológicos incluindo bactérias, fungos, extrato de plantas e pequenas biomoléculas como vitaminas e aminoácidos emergiram como método alternativo para síntese química de AgNPs (Kalishwaralal et al., 2008; Gurunathan et al., 2014; Zhang et al., 2016).

A síntese de nanopartículas está entre as áreas científicas mais interessantes da pesquisa, e há uma crescente atenção para sintetizar nanopartículas usando métodos ambientalmente amigáveis (química verde) (Abbasi et al., 2016).

Nesse enfoque, os fungos filamentosos despontam como potenciais bio-fábricas para produção de nanopartículas metálicas em função do crescimento rápido, cultivo em larga escala, secreção de proteínas com elevado poder redutor e produção de biomoléculas que estabilizam as nanopartículas (Durán et al., 2011; Tarafdar and Raliya, 2013; Phanjom and Ahmed, 2015).

O gênero *Aspergillus* é composto por mais de 200 espécies de fungos e devido ao grande potencial de adaptação fisiológica, muitas espécies são importantes produtoras de

moléculas com atividade biológica relevante para indústria. Pelo menos 27 enzimas diferentes produzidas por espécies do gênero estão sendo comercializadas (Scazzocchio, 2009). Essa capacidade de produzir e secretar uma ampla gama de moléculas bioativas faz dos *Aspergillus*, não toxigênicos, ótimos candidatos para síntese biológica de nanopartículas de prata (Vahabi et al., 2011).

Embora citações da literatura mostrem diversas espécies de *Aspergillus* na síntese de nanopartículas, são raros os estudos sobre o potencial dos fungos de ecossistemas Amazônicos na mediação da biossíntese de AgNPs. Dessa forma nesta pesquisa foi avaliado o potencial dos *Aspergillus* da Amazônia brasileira como fonte de moléculas mediadoras da síntese de nanopartículas de prata com atividade antimicrobiana.

MATERIAL E MÉTODOS

Reativação dos *Aspergillus*

Os fungos selecionados para biossíntese extracelular de nanopartículas com atividade antimicrobiana foram 20 linhagens do gênero *Aspergillus*, cedidas pela Coleção de Culturas DPUA da Universidade Federal do Amazonas-UFAM (Tabela 1). A reativação dos *Aspergillus* foi feita em caldo glicosado 2% (p/v) a 28 °C por sete dias e posteriormente o cultivo foi realizado em CYA [ágar Czapek Dox e extrato de levedura 0,5% (p/v)], em placa de Petri, a 28°C por sete dias (Klick e Pitt., 1988), a cultura estoque foi preservada sob refrigeração (4 °C).

Tabela 1. Linhagens de *Aspergillus* do acervo da Coleção de Culturas DPUA selecionadas.

Código DPUA	Fungo
398	<i>Aspergillus niger</i>
399	<i>Aspergillus niger</i>
478	<i>Aspergillus pulverulentus</i>
542	<i>Aspergillus japonicus</i>
613	<i>Aspergillus japonicus</i>
1451	<i>Aspergillus flavo-furcatis</i>
1455	<i>Aspergillus pulverulentus</i>
1461	<i>Aspergillus flavo-furcatis</i>
1465	<i>Aspergillus flavo-furcatis</i>
1473	<i>Aspergillus awamorii</i>
1493	<i>Aspergillus flavo-furcatis</i>
1539	<i>Aspergillus flavo-furcatis</i>
1540	<i>Aspergillus flavo-furcatis</i>
1608	<i>Aspergillus flavo-furcatis</i>
1622	<i>Aspergillus flavo-furcatis</i>
1623	<i>Aspergillus flavo-furcatis</i>
1624	<i>Aspergillus oryzae</i>
1631	<i>Aspergillus flavo-furcatis</i>
1727	<i>Aspergillus japonicus</i>
T3D1	<i>Aspergillus</i> sp.

Obtenção de culturas monospóricas

Para obtenção de colônias monospóricas os *Aspergillus* foram cultivados em ágar-água, a 28 °C. Após 12 h um único esporo germinado foi transferido para ágar Czapek (Cz) (Teixeira et al., 1995).

Autenticação das linhagens de *Aspergillus* macro e micromorfológicas

A confirmação das características macromorfológicas das linhagens de *Aspergillus* foi realizada nos cultivos em Czapek, CYA e ágar extrato de malte (MEA) de acordo com a Raper and Fennell (1977) Klick and Pitt (1988).

Identificação molecular das linhagens de *Aspergillus*

As 20 linhagens de *Aspergillus* foram identificadas pelas análises das sequências de DNA ribossomal. Os fungos foram cultivados em ágar Sabouraud por 72 h, a 28 °C, á 150 rpm. Após este período a biomassa foi separada do sobrenadante por filtração à vácuo e congelada a -20 °C até o momento da extração de DNA.

Aproximadamente 200 mg de micélio foi utilizado para extração de DNA pelo método de fenol-clorofórmio. A região ITS2 (*Internal Transcribed Spacer Region*) e parte das subunidades 5,8S e 28S do rDNA foram amplificadas por PCR utilizando os iniciadores ITS-3 (5'-GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC-3') desenvolvido por White et al. (1990) e UNI-R (5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG-3') desenvolvido por Haynes et al. (1995).

A reação foi realizada em termociclador MyGenie 96 ThermalBlock da Bioneer utilizando os seguintes reagentes: 14,2 µL de água Milli-Q; 1 µL das células desnaturadas/DNA; 2,5 µL de tampão da Taq DNA polimerase 10X (Tris-HCl 200 mM, KCl 500 mM); 2,5 µL de MgCl₂ 25 mM; 2,5 µL dNTP 2,5 mM; 1 µL do oligonucleotídeo ITS-3 (5 pmol); 1 µL do oligonucleotídeo UNI-R (5 pmol) e 0,3 µL de Taq DNA polimerase 5 U. As condições da amplificação foram: 95 °C por 5 min, 95 °C por 45 s, 72 °C por 60 s, 72 °C por 60 s (40 vezes) 72 °C por 5 min. Para confirmação da amplificação do DNA, 2 µL da reação foi submetida a uma eletroforese em gel de agarose a 1% (p/v).

O produto da reação de PCR foi purificado com PEG e a reação de sequenciamento foi realizada no sequenciador Automático 3500 ABI de marca Applied Biosystem nas mesmas condições do ciclo anterior utilizando o kit BigDye® Terminator v 3.1. Em seguida as amostras foram conferidas e editadas com o programa ClustalW (BioEdit versão 7.2.5.0). A confirmação a nível de espécie foi realizada por comparação das sequências de DNA no GeneBank do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) usando o programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) com a ferramenta BLASTn (nucleotídeo-nucleotídeo).

Produção de compostos bioativos

Os *Aspergillus* foram cultivados em frasco Erlenmeyer de 500 mL, contendo 200 mL de meio MGYD (Extrato de malte 0,3%; glicose 1%; extrato de levedura 0,3% e peptona 0,5% [p/v]), a 28 °C, 180 rpm. Uma suspensão 1 x 10⁶ esporos/mL de meio foi utilizada como inóculo.

Após 96 h a biomassa foi separada do sobrenadante por filtração à vácuo. Em seguida a biomassa foi lavada três vezes com água deionizada esterilizada e acondicionada em frascos erlenmeyer contendo 200 mL água ultra pura. A obtenção do extrato aquoso foi realizada por 72 h, a 28 °C, a 180 rpm (Sastry et al., 2003; Durán et al., 2007; Vigneshwaran et al., 2007).

Síntese biológica de AgNPs

No extrato aquoso recuperado foi adicionada a solução de nitrato de prata (AgNO_3) 1 M para obtenção da concentração final de 1 mM. A reação e os controles (extrato aquoso com água destilada e AgNO_3 1 mM) foram incubados por 96 h, na ausência de luz, a 25 °C, 180 rpm. A observação da mudança de coloração da reação indicou a síntese de nanopartículas de prata. A confirmação foi realizada por espectrometria de UV-vis em espectrofotômetro de duplo feixe com resolução de 0,1 nm numa faixa de leitura de 200-800 nm (Vigneshwaran et al., 2007).

Determinação de diâmetro hidrodinâmico das AgNPs e potencial zeta das soluções coloidais.

O diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas foi medido no equipamento Nano ZS Zetasizer (Malvern Instruments, Worcestershire, UK), em um ângulo de detecção da luz espalhada fixo em 173°, temperatura de 25 °C. As amostras foram diluídas 10 vezes em uma solução de 10^{-3} mol.L⁻¹ de KCl e as medições realizadas em célula capilar com um caminho ótico de 10 mm. Na mesma ocasião foi determinado também o potencial zeta (ζ) das soluções de AgNPs.

Determinação da atividade antimicrobiana das AgNPs

A atividade antimicrobiana das nanopartículas de prata foi realizada frente a *Escherichia coli* (CBAM 0001), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *S. epidermidis* (CBAM 0293), *Candida albicans* (DPUA1706) e *Trichosporon beigelii* (DPUA 210), em triplicata, por difusão em ágar (Ostrosky et al., 2008).

Os cultivos dos micro-organismos teste foram preparados em Ágar Müller-Hinton e ágar Sabouraud, em placa de Petri, para bactérias e leveduras, respectivamente. Como inóculo foi utilizado 100 µL de uma suspensão celular de concentração semelhante à escala de Mc Farland 0,5. De cada solução de AgNPs foram transferidos 100 µL para poços de 5 mm de diâmetro, incluindo os controles (itraconazol [50 µg/mL] para leveduras e estreptomicina para bactérias [50 µg/mL] e AgNO₃ 1 mM). As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h para bactérias e 48 h para leveduras. Os halos de inibição foram medidos no reverso da placa com auxílio de uma régua milimétrica.

RESULTADOS

Características macro e micromorfológicas

Das 20 linhagens de *Aspergillus* reativadas, 100% apresentaram as características morfológicas típicas das espécies e as estruturas vegetativas e de reprodução de acordo com as citações de Raper e Fennell (1977) e Klick e Pitt (1988) (Figuras 1 e 2, Tabela 2).

A técnica de obtenção de culturas monospóricas proporciona a redução das variações morfo-fisiológicas, bioquímicas e genéticas evitando a pleomorfização e formação de setores nas culturas (Poloni et al., 2008). Todas as linhagens de *Aspergillus* do grupo flavus (100%) expressaram as características típicas das espécies no cultivo monospórico, entretanto duas linhagens (20%) de *Aspergillus* do grupo niger apresentaram grande variação morfológica, característica que inviabilizou as análises posteriores das mesmas, sendo dessa forma substituídas por outras duas linhagens de *Aspergillus* do grupo flavus.

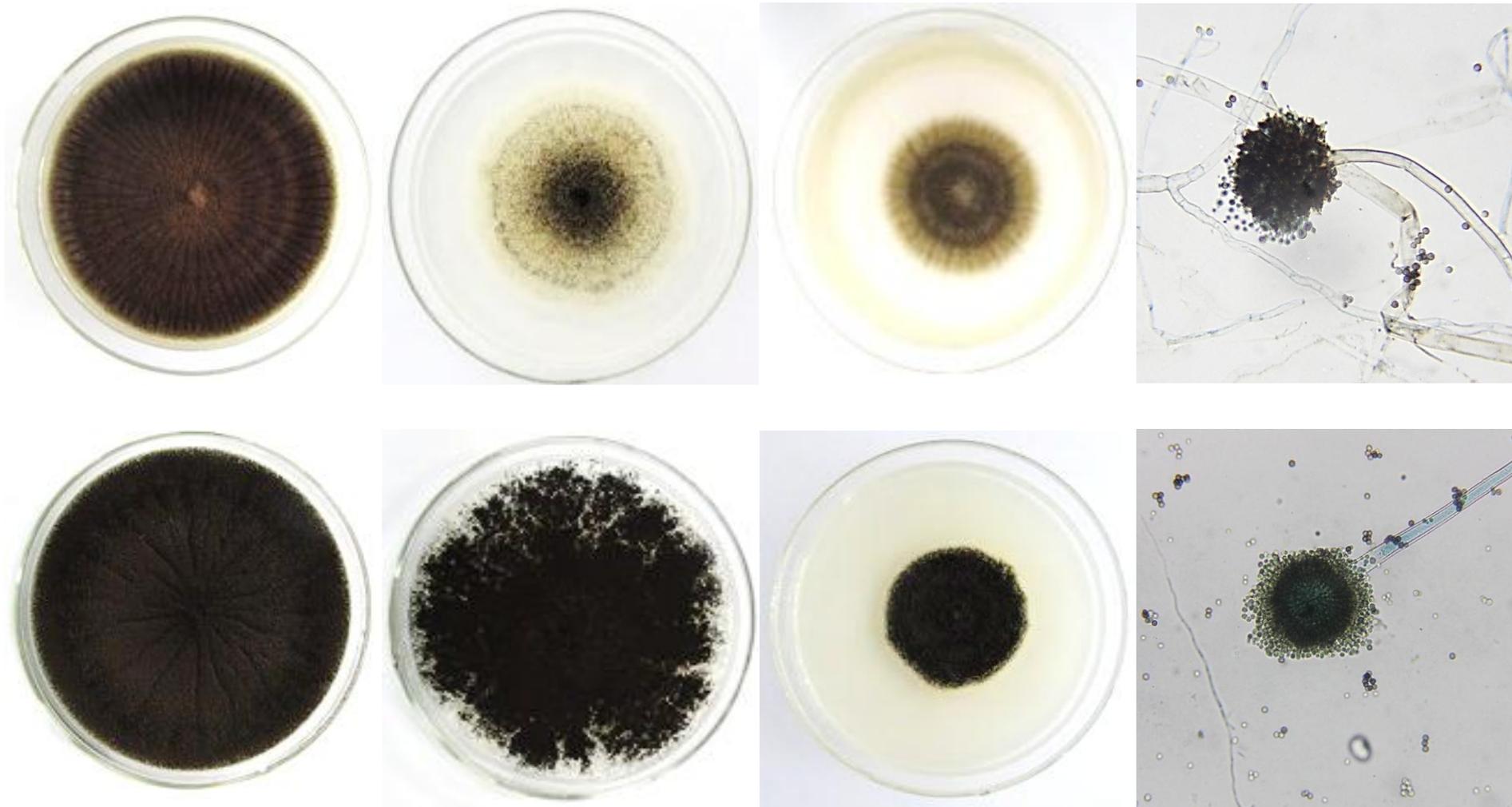


Figura 1. *Aspergillus* do grupo niger cultivados a 28 °C por 7-10 dias em ágar CYA, CZ e Malte, respectivamente. Microestrutura reprodutiva corada com azul de lactofenol (400X).

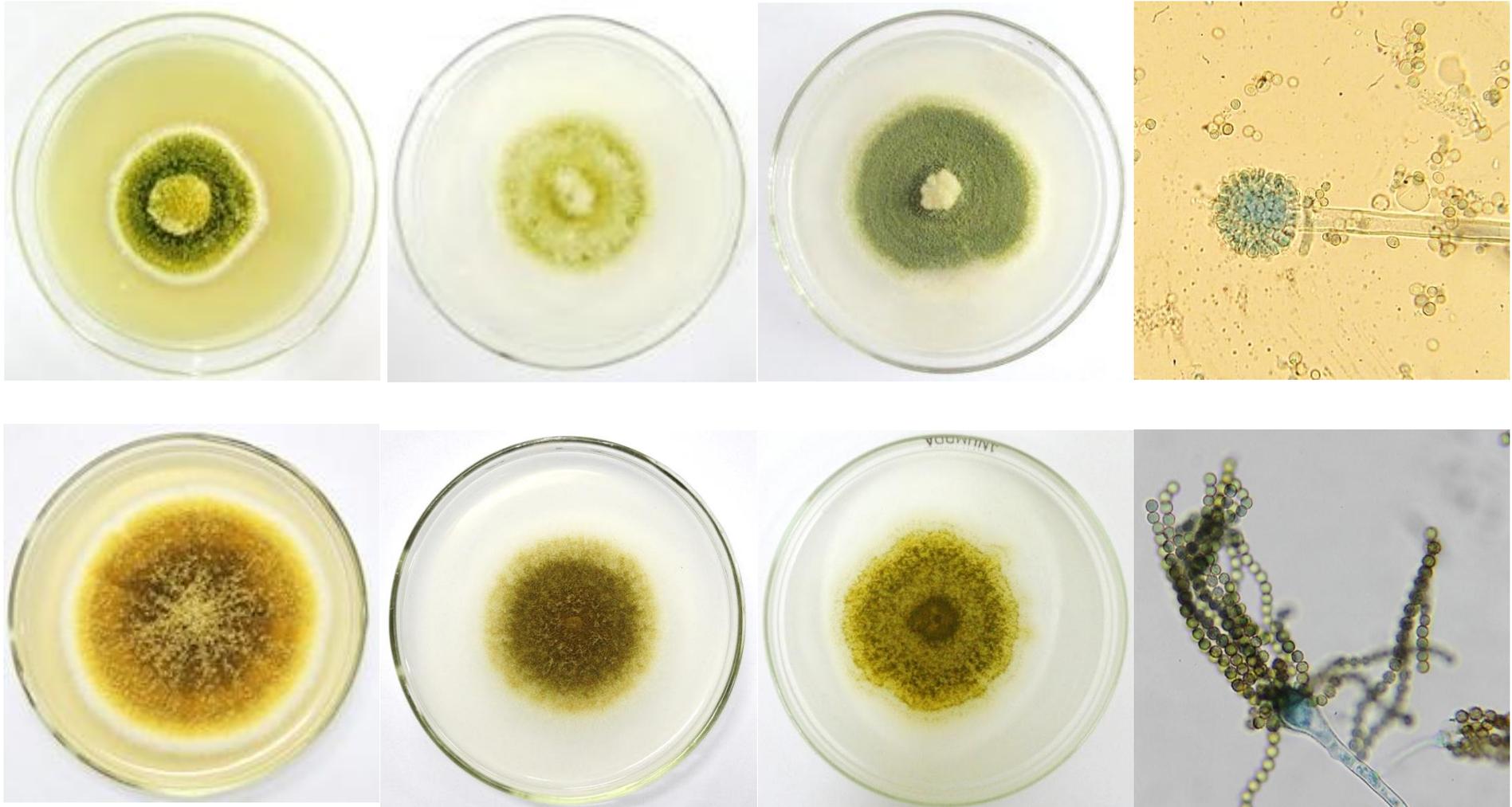


Figura 2. *Aspergillus* do grupo flavus cultivados a 28 °C por 7-10 dias em ágar CYA, CZ e Malte, respectivamente. Microestrutura reprodutiva corada com azul de lactofenol (400X).

Tabela 2. Características macro e micromorfológicas de *Aspergillus* do grupo niger e flavus em meio CZ segundo Raper e Fennell (1977) observadas nas linhagens autenticadas.

Código DPUA	Espécie	Características macroscópicas	Características microscópicas
398 e 399	<i>Aspergillus niger</i>	Diâmetro da colônia de 2,5 a 3,0 cm; micélio branco a amarelo claro, reverso incolor ou amarelo claro, pouco ou nenhum exudado (quando presente incolor).	Cabeças conidiais largas inicialmente globosas tornando-se posteriormente radiada (700 a 800 µm de diâmetro); Conidióforo de 1,5 µm a 3,0 mm; esterígma bisseriado; conídios com cristais.
478 e 1455	<i>Aspergillus pulverulentus</i>	Diâmetro da colônia de 3,0 a 4,0 cm; micélio floculento alto, esporulação abundante no centro de coloração preto acinzentado; reverso branco; pouco exudado.	Cabeças conidiais largas e negras, globosa a radiada (600 a 700 µm de diâmetro); conidióforos de 7 a 8 mm; esterígma bisseriado; conídios com ornamentação em forma de estrias.
542, 613 e 1727	<i>Aspergillus japonicus</i>	Diâmetro da colônia de 5,0 a 6,0 cm (crescimento rápido); micélio denso, branco, irregular, enrugado, com tons de roxo-marron ou roxo-preto; esclerócio claro; reverso branco a amarelo esverdeado.	Cabeças conidiais variáveis, pequenas radiadas ou colunar (600 a 700 µm de diâmetro); Conidióforos de 500 a 700 µm; vesículas globosas e esterígma uniseriado.
1473	<i>Aspergillus awamorii</i>	Diâmetro da colônia de 5 a 7 cm (crescimento rápido); micélio enrugado, branco, flocoso, rígido.	Cabeças conidiais globosas, radiada ou colunar (100-300 µm de diâmetro); conidióforos com parede grossa (2 µm) de 200 µm a 3 mm de comprimento; esterígma bisseriado. Conídios globoso a subgloboso com diâmetro de 3,5 a 6 µm.
1451, 1461, 1465, 1493, 1539, 1540, 1608, 1622, 1623 e 1631	<i>Aspergillus flavo-furcatis</i>	Diâmetro da colônia de 6,0 a 7,0 cm; coloração verde oliva escuro a marron oliva quando jovem; micélio denso, algodinoso; margens um pouco irregulares; exudado incolor depois marron; reverso incolor ou com tons claros.	Cabeças conidiais globosas a radiada (300-500 µm de diâmetro); conidióforos eretos de 1 a 4 mm de comprimento; vesículas em forma de balão a subglobosa (variando de 15 a 50 µm de diâmetro; esterígma bisseriado (ocasionalmete bisseriado); conídios piriformes a cilíndricos (6 a 8 µm de tamanho).
1624	<i>Aspergillus oryzae</i>	Diâmetro da colônia de 5,0 a 6,0 cm (crescimento rápido); micélio denso, aéreo, algodinoso com tons de verde claro depois oliva ou verde amarelado-citrino, reverso branco.	Cabeças conidiais radiadas (150 a 300 µm); conidióforos de 1 a 5 µm; vesículas subglobosas; esterígma uni ou bisseriado; conídios piriformes ou elíptico quando jovens e globoso a subgloboso quando maduros.

As características morfológicas comumente expresas no gênero *Aspergillus* são: conidióforo com a base em forma de “T” ou “L” conhecida como célula pé; e formações de vesículas globosas nas extremidades dos conidióforos, na qual as células conidiogênicas são formadas (metula ou/e fiálide) (Raper e Fennell, 1977; Teixeira et al. (org), 2011). E apesar da identificação das espécies de *Aspergillus* ser mais complexa, tradicionalmente baseada em uma série de características macro e micromorfológicas, esse método é confiável uma vez que as estruturas reprodutivas do gênero são observadas com facilidade nos meios de cultura indicados na literatura especializada.

Autores ressaltam a importância da identificação baseada em características morfológicas como ferramenta primária e essencial para identificação das espécies de *Aspergillus*. Nos laboratórios que realizam exames micológicos, por exemplo, a identificação morfológica ainda é o principal método utilizado por pesquisadores/técnicos (Mcclenny, 2005; Diba, et al 2007; Bandh, 2012). Simões et al. (2013) e Silva et al. (2015) também comentaram que a metodologia clássica está sendo de grande valor para a identificação de espécies quando integrada à abordagem polifásica.

Identificação molecular das linhagens de *Aspergillus*

A comparação das sequências de rDNA das 20 culturas reativadas com as depositadas no GeneBank usando o programa BLAST confirmou que 100% das linhagens são do gênero *Aspergillus*. Também foi possível diferenciar as linhagens pertencentes ao grupo flavus (12) e as do grupo niger (8) confirmando a identificação morfológica conforme a classificação de Raper e Fennell (1977) (Figura 3).

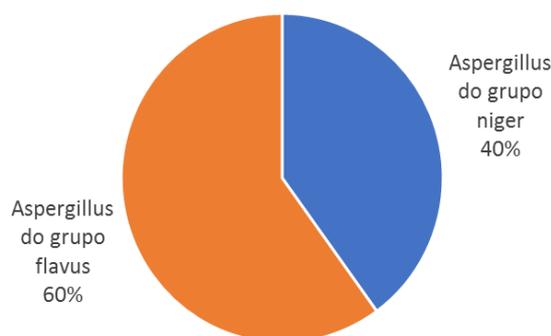


Figura 3. Classificação das linhagens de *Aspergillus* de acordo com a comparação das sequências de rDNA com as sequências depositadas no banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

As sequências obtidas do rDNA (ITS2 e parte das subunidades 5,8S e 28S) não foram muito eficientes para diferenciação a nível de espécie dentro dos grupos de *Aspergillus niger* e *flavus*. Apenas duas (*A. niger* DPUA 398 e DPUA 399) das oito linhagens do grupo *niger* foram identificadas com sucesso e uma (*A. oryzae* DPUA 1624) das 12 das linhagens do grupo *flavus* foram identificadas de acordo com a classificação de Raper e Fennell (1977) (Tabela 3).

Tabela 3. Comparação de sequências com o banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

Código DPUA	Identificação morfológica	Identificação Molecular (Resultado BLASTn)	Similaridade	Número de acesso
398	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>	99%	KX664417.1
399	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>	99%	KM386440.2
1624	<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	99%	KT964480.1

A região ITS é constituída por uma sequência de RNA não funcional (ITS1 e ITS2) situada entre os RNAs ribossômicos estruturais (18S, 5,8S e 28S) e tem sido fortemente utilizada, desde o início da década de 1990, em métodos moleculares e estudos ecológicos de fungos, devido ao alto grau de variabilidade interespecífica (Bruns et al., 1991; Liew et al., 1998; Das and Deb, 2015; Zhao et al., 2015).

Recentemente, a região ITS foi considerada pela Subcomissão Internacional de Código de Barras Fúngico como região padrão para identificação de espécies de fungos devido, em grande parte, a presença de um banco de dados rico e atualizado necessário para análise de dados (Schoch et al., 2012; Das and Deb, 2015; Filippis et al., 2017).

Apesar da grande versatilidade da região ITS, o sequenciamento dessa região nem sempre é suficiente para discriminar as espécies de um grupo taxonômico. Rodrigues et al. (2011) analisaram a sequência de 32 isolados de *Aspergillus* da seção *flavi* e concluíram que a identificação molecular usando uma única sequência de DNA não conseguiu discriminar claramente entre espécies muito próximas na seção de *Aspergillus flavi*. Em outra investigação realizada por Silva et al. (2015) utilizando abordagem polifásica para identificação de 35 isolados de *Aspergillus* da seção *flavi* também afirmaram que a região ITS não foi suficientemente poderosa para a discriminação dos isolados avaliados.

Os dados apresentados nesta pesquisa reforçam a importância da identificação morfológica e a necessidade de conciliar a taxonomia clássica com outros métodos de identificação para obtenção de um resultado confiável.

Síntese biológica de AgNPs

Nesta pesquisa, quando foram avaliadas as 20 linhagens de *Aspergillus* do grupo niger e flavus constatou-se por meio de observação visual que 75% (15) dos extratos aquosos das biomassas reduziram os íons de prata (Tabela 4). A biorredução da prata pode ser detectada pela mudança de coloração da solução após a adição do nitrato de prata (Figura 4). A alteração da cor da solução demonstrou que os íons de prata reagiram com alguma molécula sintetizada pelos fungos possivelmente promovendo a redução dos íons de prata, sugerindo a formação de nanopartículas de prata (Selvakumar and Suriyaraj, 2013).

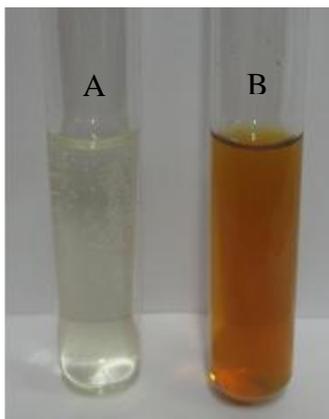


Figura 4. (A) Extrato aquoso da biomassa dos *Aspergillus*. (B): Reação do extrato aquoso da biomassa de *Aspergillus* após adição AgNO_3 [1 mol.L^{-1}] demonstrando a mudança de coloração para amarelo escuro após 96 h de reação.

O processo de redução dos íons de prata para formação de nanopartículas ainda não foi totalmente desvendado, entretanto Duran et al. (2011) num estudo realizado com *Fusarium oxysporum* e *F. moniliforme* concluíram que a produção extracelular de AgNPs é mediada por uma nitrato redutase, sendo necessário também a participação de uma cadeia transportadora de elétrons para redução completa dos íons de prata.

Todos os extratos aquosos da biomassa das linhagens de *Aspergillus* do grupo flavus (100%), analisadas neste estudo, na reação com nitrato, reduziu os íons de prata, confirmando o potencial dos representantes desse grupo de fungos na síntese biológica de nanopartículas de

prata. Quanto às soluções aquosas dos *Aspergillus* do grupo niger apenas três linhagens (37,5%) reduziram os íons de prata. Provavelmente estes resultados estão relacionados à fisiologia dos fungos, aos nutrientes e às condições de cultivo a que foram submetidos experimentalmente.

Tabela 4. Mudança de coloração dos extratos aquosos após reação com AgNO_3 [1 mol.L^{-1}] (96 h de incubação).

	Código DPUA	Fungo	Mudança de coloração dos extratos aquosos dos fungos
Aspergillus do grupo niger	398	<i>Aspergillus niger</i>	Amarelo escuro
	399	<i>Aspergillus niger</i>	N/D*
	478	<i>Aspergillus pulverulentus</i>	Amarelo escuro
	542	<i>Aspergillus japonicus</i>	N/D*
	613	<i>Aspergillus japonicus</i>	N/D*
	1455	<i>Aspergillus pulverulentus</i>	Amarelo
	1473	<i>Aspergillus awamorii</i>	N/D*
	1727	<i>Aspergillus japonicus</i>	N/D*
Aspergillus do grupo flavus	1451	<i>Aspergillus flavo-furcatis</i>	Marrom
	1461	<i>Aspergillus flavo-furcatis</i>	Marrom acinzentado
	1465	<i>Aspergillus flavo-furcatis</i>	Marrom acinzentado
	1493	<i>Aspergillus flavo-furcatis</i>	Amarelo escuro
	1539	<i>Aspergillus flavo-furcatis</i>	Amarelo claro
	1540	<i>Aspergillus flavo-furcatis</i>	Marrom acinzentado
	1608	<i>Aspergillus flavo-furcatis</i>	Marrom acinzentado
	1622	<i>Aspergillus flavo-furcatis</i>	Marrom acinzentado
	1623	<i>Aspergillus flavo-furcatis</i>	Marrom acinzentado
	1624	<i>Aspergillus oryzae</i>	Marrom
	1631	<i>Aspergillus flavo-furcatis</i>	Cinza Amarronzado
T3D1	<i>Aspergillus sp.</i>	Amarelo escuro	

* N/D: Não detectado mudança de cor para tons amarelos ou marrons

Caracterização das AgNPs

Espectros de UV-vis

Na tabela 5 encontram-se os dados da leitura em UV-vis das soluções aquosas das 20 linhagens de *Aspergillus* após reação com nitrato de prata. As suspensões apresentaram

bandas plasmônicas com pico de absorvância na faixa de 401 a 463 nm. Vários estudos comprovaram que as nanopartículas de prata formam bandas de absorção com picos na faixa de 400 nm e, dependendo do formato e do tamanho das mesmas podem apresentar picos desde 370 nm (para formatos em bastão) até 600 nm (para formatos em cubos e triangulares). Entretanto, o intervalo mais citado na literatura está entre 400-430 nm para nanopartículas com formato esférico (Norguez, 2007; Gonzáles et al., 2007; Mansouri and Garder, 2009).

Os parâmetros dos espectros de UV-vis do extrato micelial após adição de AgNO_3 [1 mol.L^{-1}] confirmaram que houve formação de nanopartículas de prata em 14 (70%) das soluções testadas, desse quantitativo, 60% são originária de *Aspergillus* do grupo flavus e 10% do grupo niger.

Zomorodian et al. (2016) em um estudo realizado com quatro espécies de *Aspergillus*, dentre elas *A. niger* e *A. flavus* confirmaram que ambas foram capazes de mediar a síntese extracelular de AgNPs.

Tabela 5. Parâmetros dos espectros de UV-vis do extrato aquosos da biomassa dos *Aspergillus* + AgNO_3 [1 mol.L^{-1}] obtidos após 96 h de reação

Código DPUA	Fungo	Ponto central da banda plasmônica (nm)	Pico de Absorvância (a.u.)
398	<i>Aspergillus niger</i>	433	0,65
399	<i>Aspergillus niger</i>	-	-
478	<i>Aspergillus pulverulentus</i>	-	-
542	<i>Aspergillus japonicus</i>	-	-
613	<i>Aspergillus japonicus</i>	-	-
1451	<i>Aspergillus flavo-furcatis</i>	450	7,31
1455	<i>Aspergillus pulverulentus</i>	405	0,271
1461	<i>Aspergillus flavo-furcatis</i>	463	2,56
1465	<i>Aspergillus flavo-furcatis</i>	455.9	4,94
1473	<i>Aspergillus awamorii</i>	-	-
1493	<i>Aspergillus flavo-furcatis</i>	426	3,42
1539	<i>Aspergillus flavo-furcatis</i>	420.9	1,03
1540	<i>Aspergillus flavo-furcatis</i>	424.9	5,26
1608	<i>Aspergillus flavo-furcatis</i>	432	6,41
1622	<i>Aspergillus flavo-furcatis</i>	432	6,16
1623	<i>Aspergillus flavo-furcatis</i>	455.9	4,66
1624	<i>Aspergillus oryzae</i>	447	6,71
1631	<i>Aspergillus flavo-furcatis</i>	428.9	2,09
1727	<i>Aspergillus japonicus</i>	-	-
T3D1	<i>Aspergillus</i> sp.	401	1,375

(-) negativo

O padrão dos espectros das soluções de nanopartículas (Figuras 5 e 6) mostram a presença das bandas plasmônicas típicas de nanopartículas de prata. Essas bandas são formadas segundo Berter (2013) em decorrência do efeito de ressonância de *plasmon* de superfície (SPR) pela oscilação coletiva dos elétrons livres quando estimulado por um feixe de luz.

Todas as soluções de AgNPs dos *Aspergillus* do grupo flavus (100%) apresentaram a banda plasmônica típica das nanopartículas de prata (Figura 5A), confirmando assim a mediação da síntese de AgNPs.

A figura 5 mostra que as bandas de maior intensidade e com pico mais estreito, características desejáveis, são observadas nos espectros de Uv-vis das AgNPs produzidas pelos *Aspergillus* DPUA 1451, 1540, 1608, 1622, e 1624. Segundo Zomorodian et al. (2016) a intensidade do pico está relacionada com a quantidade de AgNPs produzidas, afirmativa que revela *A. flavo-furcatis* DPUA 1451 e *A. oryzae* DPUA 1624 como as linhagens mais eficientes na produção de AgNPs.

Das oito linhagens de *Aspergillus* do grupo niger apenas dois apresentaram as bandas plasmônicas típicas das AgNPs (Figura 6). Os espectros de absorção de Uv-vis das AgNPs produzidas pelos fungos DPUA 398 e 1455 demonstraram que os mesmos têm potencial para sintetizar nanopartículas de prata, entretanto, em intensidade menor do que os fungos do grupo flavus analisados neste estudo. Roy e Das (2015) em uma revisão sobre espécies de *Aspergillus* produtores de AgNPs destacaram 40 linhagens de *Aspergillus* produtoras de AgNPs, destas apenas sete eram do grupo niger e 20 do grupo flavus, demonstrando que os *Aspergillus* deste último grupo são melhores mediadores na síntese biológica de AgNPs.

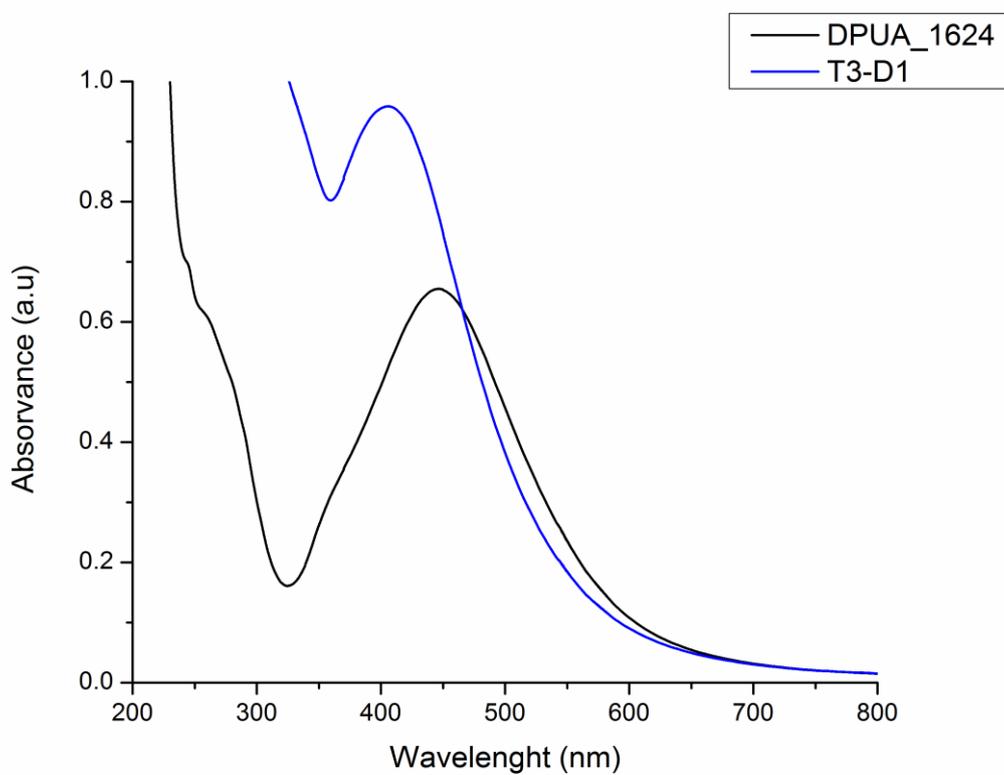
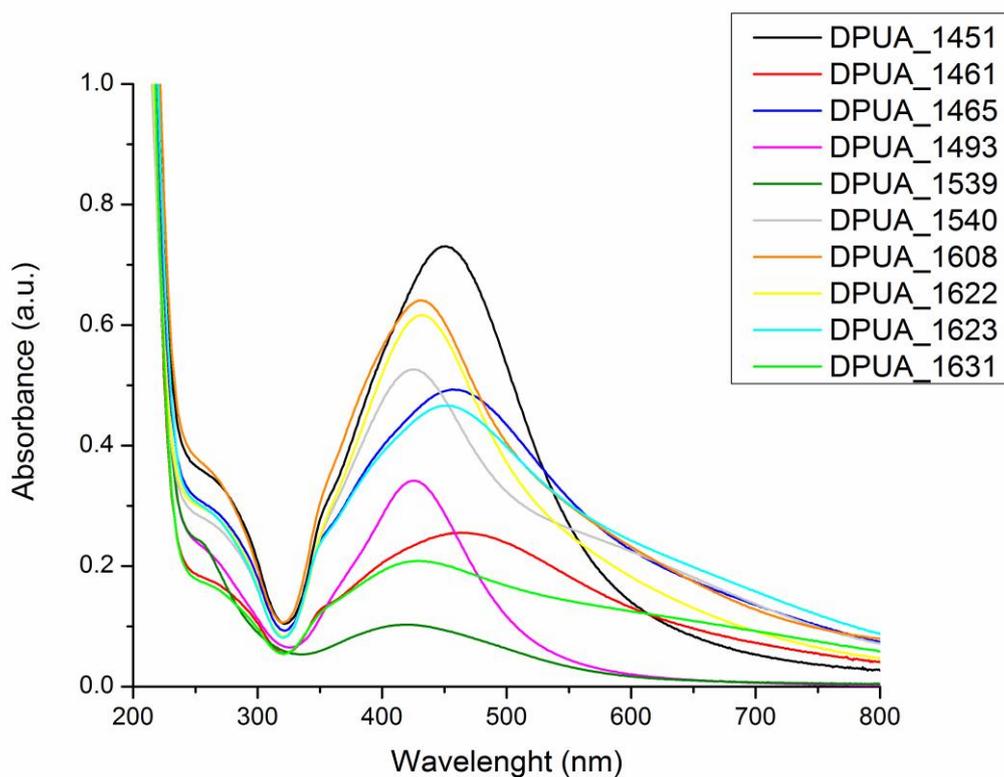


Figura 5. Espectros de absorção das nanopartículas de prata sintetizadas a partir dos extratos aquosos da biomassa de *Aspergillus flavo-furcatis* (A) e *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus sp.* (B), medidos após 96 h de reação.

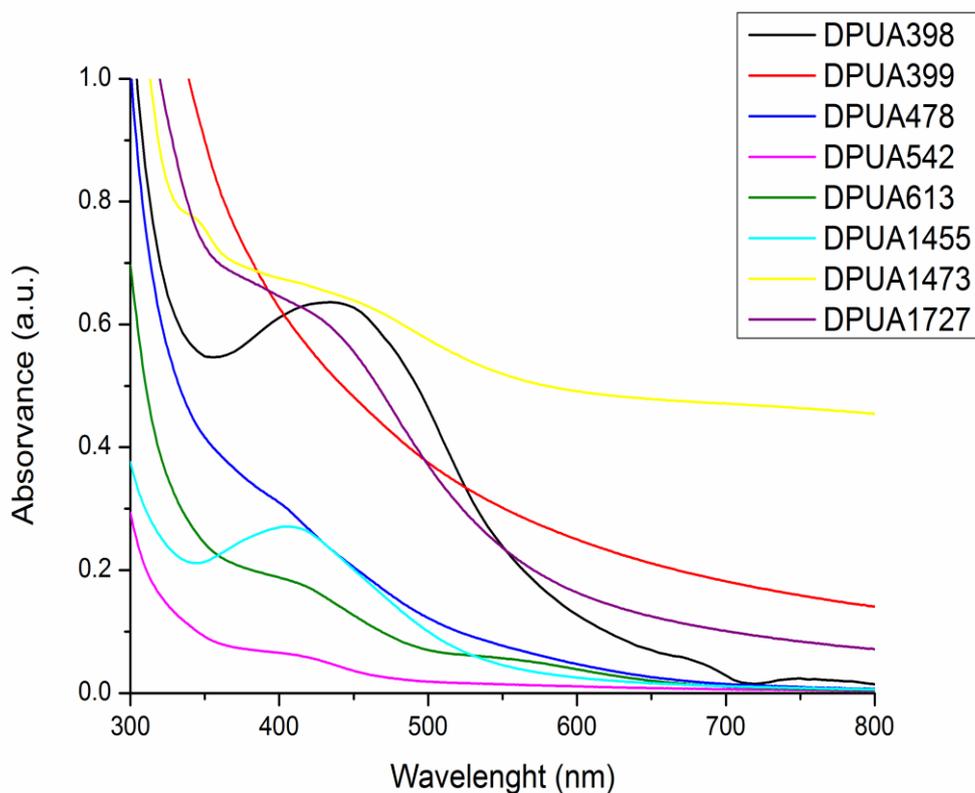


Figura 6. Espectros de UV-vis do extrato aquoso da biomassa de *Aspergillus* do grupo niger adicionado de AgNO_3 após 96 h de reação.

Diâmetro hidrodinâmico das AgNPs e potencial zeta das soluções coloidais

A determinação do diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas de prata sintetizadas pelos *Aspergillus* mostrou que as suspensões possuem moléculas com diâmetro médio entre 49 e 86 nm e que são, na maioria, monodispersas, com índice de polidispersividade (Pdi) menor que 0,3 (Tabela 6).

O potencial zeta das soluções de AgNPs mediada por *Aspergillus* foi negativo variando de -0,98 e -28,7. Segundo Andrade (2013) a estabilização eletrostática ocorre quando o potencial zeta é $\zeta \leq -30$ mV ou $\zeta \geq 30$ nm.

Tabela 6. Parâmetros físico-químicos das nanopartículas de prata obtidos por DLS (Espalhamento dinâmico de luz).

Código DPUA	Fungo	Tamanho (nm)	Polidispersividade (Pdi)	Potencial Zeta (mv)
1451	<i>Aspergillus flavo-furcatis</i>	52,82	0,245	-18,80
1455	<i>Aspergillus pulverulentus</i>	83,90	0,436	-20,20
1461	<i>Aspergillus flavo-furcatis</i>	81,35	0,209	-10,30
1465	<i>Aspergillus flavo-furcatis</i>	76,67	0,227	-13,80
1493	<i>Aspergillus flavo-furcatis</i>	49,64	0,218	-1,03
1539	<i>Aspergillus flavo-furcatis</i>	78,69	0,226	-0,98
1540	<i>Aspergillus flavo-furcatis</i>	72,22	0,263	-9,65
1608	<i>Aspergillus flavo-furcatis</i>	72,02	0,279	-19,30
1622	<i>Aspergillus flavo-furcatis</i>	67,83	0,252	-19,50
1623	<i>Aspergillus flavo-furcatis</i>	86,25	0,270	-14,30
1624	<i>Aspergillus oryzae</i>	57,88	0,217	-28,70
1727	<i>Aspergillus japonicus</i>	53,65	0,305	-
T3D1	<i>Aspergillus sp.</i>	66,73	0,248	-23,50

Atividade antimicrobiana das AgNPs – método de difusão em ágar

Onze soluções de AgNPs mediadas pelo extrato aquoso de *Aspergillus* do grupo flavus e niger foram selecionadas para o teste antimicrobiano frente aos micro-organismos *Escherichia coli* (CBAM 0001), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *S. epidermidis* (CBAM 0293), *Candida albicans* (DPUA1706) e *Trichosporon beigelii* (DPUA 210). Apenas cinco suspensões (45,45%) de AgNPs inibiram o crescimento de *E. coli*, enquanto nove suspensões (81,82%) foram eficazes para inibir o crescimento de *S. aureus* e *S. epidermidis*.

Apesar da *E. coli* ser menos suscetível às AgNPs testadas, duas suspensões mediadas por *Aspergillus* do grupo flavus (DPUA 1451 e 1493) se destacaram na inibição dessa bactéria produzindo halos significativos de 15,67 e 16,00 mm, respectivamente. Enquanto as AgNPs mediadas por *Aspergillus* do grupo niger (DPUA 398) foi mais eficaz contra *S. epidermidis*, com halo de inibição significativo de 32,33 mm. A atividade antimicrobiana das AgNPs de *Aspergillus* DPUA 1493 foi mais eficiente para *S. aureus* produzindo halo significativo de 22,33 mm (Tabela 7).

Nesta pesquisa as AgNPs de menor tamanho foram mais eficientes como antibacteriano (DPUA 1451 e 1493), pois as mesmas têm maior área superficial e

consequentemente maior interação com a célula alvo amplificando o efeito bactericida (Rai et al., 2009; Martinez-Gutierrez et al., 2010; Ammar and El-Desouky, 2016).

A relação entre o tamanho das nanopartículas e sua ação antimicrobiana já foi observada por muitos autores. Rai et al. (2009) comentaram que o tamanho das nanopartículas é um fator que influencia fortemente sua eficácia como antimicrobiano, pois quanto menor for a nanopartícula maior será sua área de superfície e consequentemente maior será sua interação com a célula alvo amplificando o efeito bactericida.

Tabela 7. Atividade antibacteriana das AgNPs sintetizadas a partir do extrato aquoso da biomassa dos *Aspergillus*.

Linhagem de <i>Aspergillus</i>	Fungo	Micro-organismos teste (halos em mm)		
		<i>Escherichia coli</i> (CBAM 0001)	<i>Staphylococcus aureus</i> (CBAM 0001)	<i>S. epidermidis</i> (CBAM 0293)
DPUA 0398	<i>A. niger</i>	0,00	20,67±1,53 ^{a,b}	32,33±0,58 ^a
DPUA 1451	<i>A. flavo-furcatis</i>	15,67±0,58 ^a	14,33±0,58 ^e	17,00±0,00 ^e
DPUA 1455	<i>A. pulverulentus</i>	14,00±1,00 ^b	17,33±1,16 ^d	21,67±0,58 ^b
DPUA 1461	<i>A. flavo-furcatis</i>	0,00	19,67±0,58 ^{b,c}	11,67±0,58 ^d
DPUA 1465	<i>A. flavo-furcatis</i>	0,00	12,00 0,00 ^f	11,00±0,00 ^d
DPUA 1493	<i>A. flavo-furcatis</i>	16,00±0,00 ^a	22,33±0,58 ^a	17,00±1,73 ^e
DPUA 1539	<i>A. flavo-furcatis</i>	15,00±0,00 ^{a,b}	18,00±1,73 ^{c,d}	21,67±1,16 ^b
DPUA 1608	<i>A. flavo-furcatis</i>	0,00	0,00	11,67±0,58 ^d
DPUA 1623	<i>A. flavo-furcatis</i>	10,00±0,00 ^c	12,67±0,58 ^{e,f}	17,33±0,58 ^e
DPUA 1624	<i>A. oryzae</i>	0,00	0,00	0,00
DPUA 1631	<i>A. flavo-furcatis</i>	0,00	14,67±0,58 ^e	0,00

Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (p < 0,05).

Todas as soluções de AgNPs mediadas por *Aspergillus* apresentaram ação antagonica contra ao menos uma das leveduras (Tabela 8). Dez suspensões (90,91%) de AgNPs inibiram o crescimento de *C. albicans* (Figura 7A) enquanto que oito suspensões inibiram o crescimento de *T. beigelli*. A suspensão de AgNPs mediada por *Aspergillus* do grupo flavus (DPUA 1461) foi mais eficaz contra *C. albicans* produzindo halo de inibição de 26,67 mm, enquanto a suspensão de AgNPs mediada por outro *Aspergillus* do grupo flavus (DPUA 1623) foi mais eficaz contra *T. beigeli* produzindo halo de inibição de 35,33 mm.

Tabela 8. Atividade antifúngica das AgNPs sintetizada a partir do extrato aquoso da biomassa de *Aspergillus*.

Linhagem de <i>Aspergillus</i>	Fungo	Micro-organismos teste (halos em mm)	
		<i>Candida albicans</i> (DPUA1706)	<i>Trichosporon beigelii</i> (DPUA 210)
DPUA 0398	<i>A. niger</i>	16,67±11,55 ^{c,d,e}	26,67±1,52 ^{b,c}
DPUA 1451	<i>A. flavo-furcatis</i>	20,67±0,58 ^{b,c}	0,00
DPUA 1455	<i>A. pulverulentus</i>	0,00	25,33±0,58 ^c
DPUA 1461	<i>A. flavo-furcatis</i>	26,67±2,89 ^a	30,00±4,36 ^b
DPUA 1465	<i>A. flavo-furcatis</i>	21,66±1,53 ^b	28,33±1,53 ^{b,c}
DPUA 1493	<i>A. flavo-furcatis</i>	15,00±0,00 ^{d,e}	19,00±0,00 ^d
DPUA 1539	<i>A. flavo-furcatis</i>	18,00±1,00 ^{b,c,d}	27,33±0,58 ^{b,c}
DPUA 1608	<i>A. flavo-furcatis</i>	12,33±0,58 ^e	20,00±1,00 ^d
DPUA 1623	<i>A. flavo-furcatis</i>	20,33±0,58 ^{b,c}	35,33±0,58 ^a
DPUA 1624	<i>A. oryzae</i>	21,00±3,60 ^{b,c}	0,00
DPUA 1631	<i>A. flavo-furcatis</i>	20,33±0,58 ^{b,c}	0,00

Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (p < 0,05).

Entretanto a relação de menor tamanho da AgNPs com ação antifúngica não foi observada frente às leveduras testadas. As duas AgNPs que apresentaram melhor desempenho foram justamente as que possuíam partículas de maior tamanho (DPUA 1461 = 81,35 nm e DPUA 1623 = 86,25 nm).

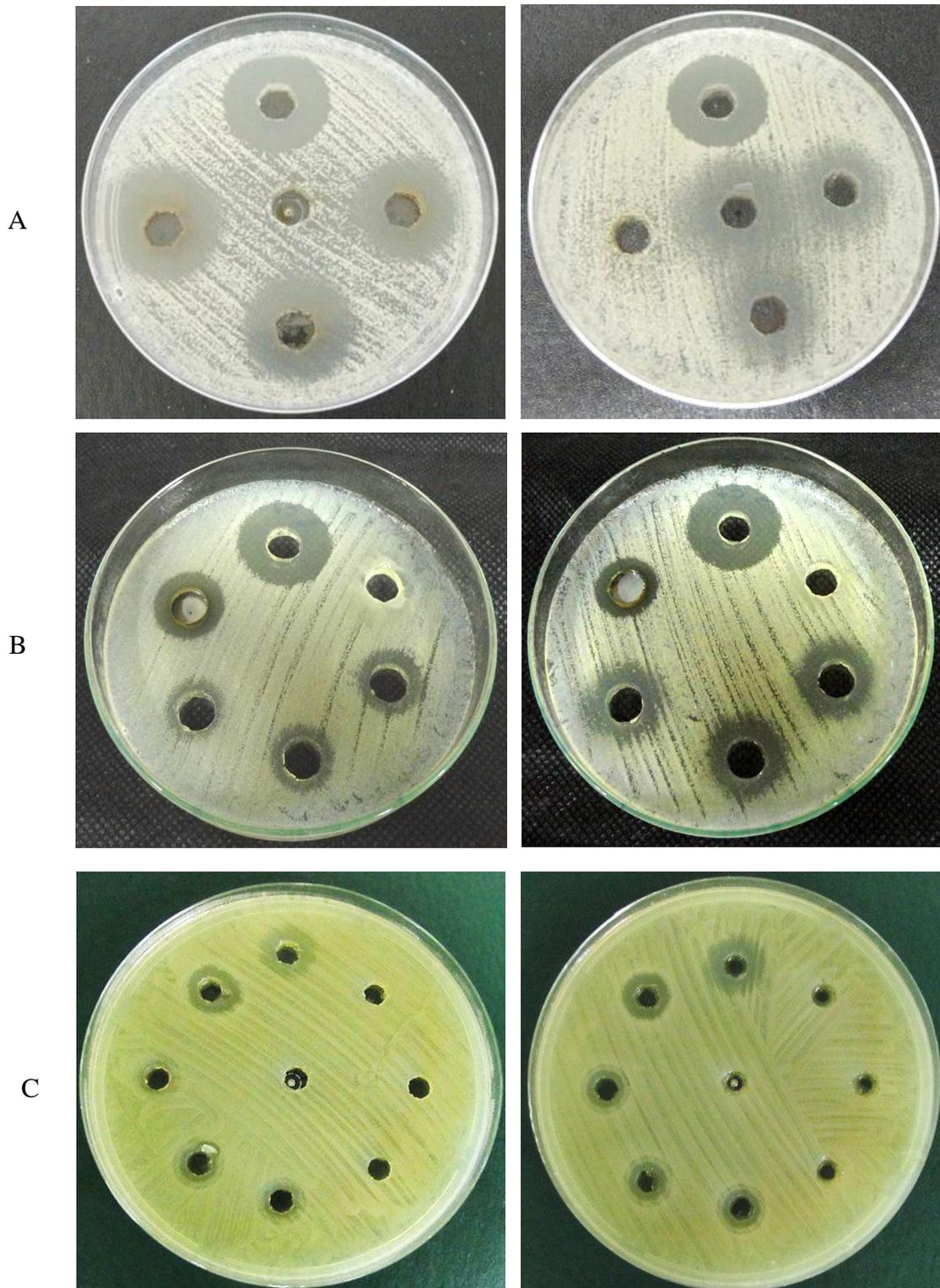


Figura 7. Atividade antimicrobiana das AgNPs biossintetizada por *Aspergillus* (A) AgNPs versus *C. albicans*; (B) AgNPs versus *S. aureus* (C) AgNPs X *E. coli*.

CONCLUSÃO

As sequências resultantes da amplificação da região ITS2 (Internal Transcribed Spacer Region 2) e parte das subunidades 5,8S e 28S do rDNA foram eficientes para confirmação do gênero *Aspergillus* e para classificação das linhagens nos grupos niger e flavus. Entretanto, para identificação a nível de espécie essa região do rDNA não foi eficaz.

Os *Aspergillus* do bioma Amazônico são promissores para utilização em processos de síntese biológica de nanopartículas de prata, pois secretam moléculas que reduzem e promovem a nucleação dos íons de prata dando origem às AgNPs.

Dos *Aspergillus* selecionados, para as análises de biorredução da prata e síntese de nanopartículas, as linhagens de maior eficiência, nas condições de fermentação empregadas, foram as classificadas no grupo flavus: *A. flavo-furcatis* e *A. oryzae*.

As suspensões de AgNPs com moléculas de menor tamanho foram mais eficientes contra bactérias enquanto que as AgNPs de maior tamanho foram mais eficientes na inibição de leveduras.

As AgNPs produzidas por *Aspergillus* apresentaram propriedades antimicrobianas relevantes, demonstrando grande potencial para utilização na área médica, farmacêutica e cosmética devido à elevada eficiência.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbasi E, Milani M, Fekri Aval S, Kouhi M, Akbarzadeh A, Tayefi Nasrabadi H, et al. Silver nanoparticles: Synthesis methods, bio-applications and properties. *Crit Rev Microbiol*. 2016;42(2):173–80.
- Ammar HAM, T.A. El-Desouky. Green synthesis of nanosilver particles by *Aspergillus terreus* HA1N and *Penicillium expansum* HA2N and its antifungal activity against mycotoxigenic fungi. *J Appl Microbiol*. 2016;121:89–100.
- Andrade PF. Preparação e caracterização de nanopartículas de prata e de nanocompósitos poliméricos antimicrobianos. Tese de doutorado - Instituto de Química da UNICAMP- Universidade Estadual de Campinas. Campinas-SP, 147p. 2013.
- Bandh SA, Kamili AN; Ganai BA. Identification of some *Aspergillus* species isolated from Dal Lake, Kashmir by traditional approach of morphological observation and culture. *African Journal of Microbiology Research*. 2012 ;Vol. 6(29), pp. 5824-5827.
- Bruns TD, White TJ, Taylor JW. Fungal molecular systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 22: pp. 525-564 (1991)
- Das S, Deb B. DNA barcoding of fungi using Ribosomal ITS Marker for genetic diversity analysis : A Review. *Int J Pure App Biosci*. 2015;3(3):160–7.
- Diba K. et al. Identification of *Aspergillus* species using morphological characters. *Pak. J. Med. Sci.*2007; 23: 867-872.
- Durán N, Marcato PD, Durán M, Yadav A, Gade A, Rai M. Mechanistic aspects in the biogenic synthesis of extracellular metal nanoparticles by peptides, bacteria, fungi, and plants. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2011;90(5):1609–24.
- Durán N, Marcato PD, Souza GIH, Alves OL, Esposito E. Antibacterial effect of silver nanoparticles produced by fungal process on textile fabrics and their effluent treatment. *J Biomed Nanotechnol*. 2007;3(2):203–8.
- Durán N, Marcato PD. Biotechnological routes to nanoantimicrobials and industrial: mechanistic aspects, antimicrobial activity, toxicity and industrial implications. In: Rai M, Cioffi N, editors. *Nano-Antimicrobials: Progress and Prospects*. In press. Germany: Springer; 2011.
- Filippisa F, Laiolaa M, Blaiotta GDE. Different amplicon targets for sequencing-based studies of fungal diversity. *Appl Environ Microbiol*. 2017.
- González AM, Presa M, Latorre MG, Lurá MC. Detección de metabolitos fúngicos con actividad tóxica mediante bioensayo sobre *Artemia salina*. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 24, p. 59-61, 2007.

Gurunathan S, Han J, Park JH, Kim JH. A green chemistry approach for synthesizing biocompatible gold nanoparticles. *Nanoscale Res. Lett.* 2014, 9, 248.

Haynes KA, Westerneng TJ, Fell JW, Moens W. Rapid detection and identification of pathogenic fungi by polymerase chain reaction amplification of large subunit ribosomal DNA. *J Med Vet Mycol.* 1995;33(319–325).

Kalishwaralal K, Deepak V, Ramkumarpandian S, Nellaiah H, Sangiliyandi G. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles by the culture supernatant of *Bacillus licheniformis*. *Mater. Lett.* 2008, 62, 4411–4413.

Klich, MA, Pitt JI. A Laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs. Australia: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization. 1988. 115pp.

Kruis FE, Fissan H, Rellinghaus B. Sintering and evaporation characteristics of gas-phase synthesis of size-selected PbS nanoparticles. *Mater. Sci. Eng. B* 2000, 69, 329–334.

Lie, EY, MacLean DJ, Irwin JAG. Specific PCR based detection of *Phytophthora medicaginis* using the intergenic spacer region of the ribosomal DNA. *Mycological Research*, Vol.102, pp. 73-80, ISSN 0953-7562 (1998).

Mallick K, Witcomb MJ, Scurrrell MS. Polymer stabilized silver nanoparticles: A photochemical synthesis route. *J. Mater. Sci.* 2004, 39, 4459–4463.

Mansouri SS, Ghader S. Experimental study on effect of different parameters on size and shape of triangular silver nanoparticles prepared by a simple and rapid method in aqueous solution. *Arabian Journal of Chemistry*. v.2, p.47-53, 2009.

Martinez-Gutierrez F, Olive PL, Banuelos A, Orrantia E, Nino N, Sanchez EM, et al. Synthesis, characterization, and evaluation of antimicrobial and cytotoxic effect of silver and titanium nanoparticles. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med.* 2010;6(5):681–8.

Niemeyer CM. Nanobiotechnology. *Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine*. 2006.

Noguez C. Surface plasmons on metal nanoparticles the influence of shape and physical environment. *Journal of Physical Chemistry C*, n. 111, p.3806-3819, 2007.

Ostrosky EA, Mizumoto MK, Lima MEL, Kaneko TM, Nishikawa SO, Freitas BR. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Brazilian J Pharmacogn.* 2008;18(2):301–7.

Phanjom P, Ahmed G. Biosynthesis of Silver Nanoparticles by *Aspergillus oryzae* (MTCC No . 1846) and Its Characterizations. *Nanosci Nanotechnol.* 2015;5(1):14–21.

Rai M, Yadav A, Gade A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnol Adv.* 2009;27(1):76–83.

Raj KS, Asha KK. Nanotechnology in agriculture, *Trendz in Biotech*, 2: 27-28. 2009.

Raper KB, Fennell DI. *The Genus Aspergillus*. New York, N.Y: Robert E. Krieger Co; 1977. 686 p.

Rodrigues P, Santos C, Venâncio A, Lima N. Species identification of *Aspergillus* section *Flavi* isolates from Portuguese almonds using phenotypic, including MALDI-TOF ICMS, and molecular approaches. *J Appl Microbiol.* 2011;111(4):877–92.

Roy S, Das TK. A Review on Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using *Aspergillus* species. *Adv Sci Eng Med.* 2015;7(9):729–38.

Roy S, Rukherjee T, Chakraborty S, Das TK. Biosynthesis, characterisation & antifungal activity of silver nanoparticles synthesized by the fungus *Aspergillus foetidus* MTCC8876. *Dig J Nanomater Biostructures.* 2013;8(1):197–205.

Sastry M, Ahmad A, Islam Khan M, Kumar R. Biosynthesis of metal nanoparticles using fungi and actinomycete. *Curr Sci.* 2003;85(2):162–70.

Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, Chen W (2012) Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi *PNAS* 109: 6241–6246. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109/-/DCSupplemental>.

Selvakumar R, Suriyaraj SP. Silver nanoparticle impregnated bio-based activated carbon with enhanced antimicrobial activity. *Int J Nanosci.* 2013;12(4):1–8.

Silva FC, Chalfoun SM, Batista LR, Santos C, Lima N. Use of a polyphasic approach including MALDI-TOF MS for identification of *Aspergillus* section *Flavi* strains isolated from food commodities in Brazil. *Ann Microbiol.* 2015;65(4):2119–29.

Simões MF, Pereira L, Santos C, Lima N (2013) Polyphasic identification and preservation of fungal diversity: concepts and applications. In: Malik A, Grohmann E, Alves M (eds) *Management of microbial resources in the environment*, Chapter 5, ISBN 978-94-007-5930-5, 410. Springer, The Netherlands, pp 91–116.

Tarafdar JC, Raliya R. Rapid, Low-Cost, and Ecofriendly Approach for Iron Nanoparticle Synthesis Using *Aspergillus oryzae* TFR9. *J Nanoparticles.* 2013;2013:1–4.

Teixeira MFS, Silva TA.; Palheta RA, Carneiro ALB, Atayde HM, *Fungos da Amazônia: uma riqueza inexplorada (aplicações biotecnológicas)*. 1 ed. Manaus: EDUA- Editora da Universidade Federal do Amazonas. 255 p. 2011.

Tien DC, Liao CY, Huang JC, Tseng KH, Lung JK, Tsung TT, Kao WS, Tsai TH, Cheng TW, Yu BS. et al. Novel technique for preparing a nano-silver water suspension by the arc-discharge method. *Rev. Adv. Mater. Sci.* 2008, 18, 750–756.

Vahabi K, Mansoori GA, Karimi S. Biosynthesis of Silver Nanoparticles by Fungus *Trichoderma Reesei*. *Insciences J.* 2011;1(1):65–79.

Vigneshwaran N, Ashtaputre NM, Varadarajan P V., Nachane RP, Paralikar KM, Balasubramanya RH. Biological synthesis of silver nanoparticles using the fungus *Aspergillus flavus*. *Mater Lett.* 2007;61(6):1413–8.

White T J, Bruns T, Lee S TJW. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M A, Gelfand D H, Sninsky J J WTJ, editor. PCR protocols: a guide to methods and applications. New York, N.Y: Academic Press, Inc; 1990. p. 315–22.

Zhang W, Giao XE, Chen J. Synthesis of silver nanoparticles. Effects of concerned parameters in water/oil microemulsion. Mater. Sci. Eng. B 142: 1-15.2007.

Zhang X-F, Liu Z-G, Shen W, Gurunathan S. Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. Int J Mol Sci 2016;17(9):1534.

Zhao Y, Tsang C, Xiao M, Cheng J, Xu Y, Lau SKP, et al. Intra-Genomic Internal Transcribed Spacer Region Sequence Heterogeneity and Molecular Diagnosis in Clinical Microbiology. Int J Mol Sci. 2015;16:25067–79.

Zomorodian K, Pourshahid S, Sadatsharifi A, Mehryar P, Pakshir K, Rahimi MJ, et al. Biosynthesis and characterization of silver nanoparticles by *Aspergillus* species. Biomed Res Int. 2016;2016:8–13.

ARTIGO 2 - Publicado noj African Journal Biotechnology - Vol. 16(27), pp. 1490-1500, 5 July, 2017.

BIOSSÍNTESE DE NANOPARTÍCULA DE PRATA E IMPREGNAÇÃO EM MEMBRANA DE ACETATO DE CELULOSE PARA USO NA TERAPIA ANTI-LEVEDURA

Taciana A. Silva¹, Patricia F. A.², Karen Segala^{2,3}, Silvia V. G. Nista⁴, Lucia H. I. Meí⁴, Nelson Durán^{2,5,6}, Maria F. S. Teixeira¹

¹ Parasitology Department, Federal University of Amazonas, Manaus, AM, Brazil.

² Chemistry Institute, University of Campinas, 13083-970, Campinas, SP, Brazil

³ Chemistry Department, Federal University of Amazonas, Manaus-AM. Brasil.

⁴ Department of Polymer Technology, University of Campinas, 13083-970, Campinas, SP, Brazil

⁵ Brazilian Nanotechnology National Laboratory (LNNano-CNPEM), Campinas, SP, Brazil

⁶ Laboratory of Nanomaterials Synthesis and Biological Interactions (NanoBioss), Chemistry Institute, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil

RESUMO

Neste estudo foram avaliadas a síntese de AgNPs mediada por *Aspergillus oryzae* DPUA 1624 e a atividade antimicrobiana dessas moléculas incorporadas em nanomembranas de acetato de celulose (NanoMAC). A síntese das AgNPs foi confirmada por espectroscopia de UV-visível e a caracterização foi realizada por espalhamento dinâmico de luz, microscopia eletrônica de transmissão, difração de raios-X, energia dispersiva de raios-X e métodos de espectrometria e espectroscopia avançados. A síntese da membrana foi feita por eletrofição e a espessura foi analisada no microscópio eletrônico de varredura. Posteriormente, as AgNPs foram adicionadas à NanoMAC e o efeito antimicrobiano foi avaliado pelo método de difusão em ágar frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*. O extrato aquoso de *A. oryzae* mediou a síntese de AgNPs arredondadas, principalmente, e algumas triangulares com diâmetro médio de 61 nm e potencial zeta de -28,7 mv apresentando atividade antifúngica frente a *C. albicans*. A NanoMAC revestida com AgNPs apresentou incremento na ação antifúngica de 24,22% quando testadas frente a *C. albicans*. Este estudo demonstrou que *A. oryzae* é capaz de mediar a síntese de AgNPs com ação anti-levedura e que a adição AgNPs em nanomembranas de acetato de celulose resultou no desenvolvimento de um nanocompósito com ação antimicrobiana mais eficiente.

Palavras-chave: nanopartículas de prata, *Aspergillus oryzae*, nanofibras de celulose, antilevedura.

*Corresponding author. E-mail: mteixeira@ufam.edu.br

INTRODUÇÃO

Nanopartículas de prata (AgNPs) são nanoformas que expressam maior potencial antimicrobiano em função da forma e do tamanho reduzido. As características das AgNPs proporcionam maior interação com receptores biológicos, intensificam a relação com a superfície da célula microbiana e, em consequência, aumentam a eficácia bioativa (Tarafdar and Raliya, 2013; Pereira et al., 2014). Por causa da excelente ação antimicrobiana, as AgNPs são amplamente utilizadas na área médica, tecnológica e na agricultura (Ingale and Chaudhari, 2013; Pereira et al., 2014; Moghaddam et al., 2015; Siddiqi and Husen, 2016).

O mercado mundial de produtos nanotecnológicos está em constante evolução, com registro anual de crescimento de aproximadamente 25%, tendo previsão de aumento significativo para 3 trilhões até 2020. Dentre os produtos nanotecnológicos destacam-se os derivados das AgNPs. As propriedades antimicrobianas das AgNPs tem possibilitado o uso dessas moléculas em uma grande diversidade de produtos de consumo, incluindo plásticos, sabões, pastas, alimentos e produtos têxteis, elevando bastante a taxa de comercialização desses nanoderivados (Tran, Nguyen and Le, 2013).

A solução coloidal de AgNPs pode ser combinada com diversas matrizes poliméricas com a finalidade de prolongar a liberação de antimicrobianos e aumentar sua biocompatibilidade. As nanofibras eletrofiadas, por exemplo, são polímeros que tem grande potencial de aplicação nas indústrias farmacêuticas e cosméticas para a regeneração da pele e órgãos, terapias de administração de fármacos, dentre outros (Nista et al., 2015; Segala et al., 2015).

A busca por polímeros nanoestruturados com características antimicrobianas vem crescendo devido ao grande potencial de utilização em dispositivos que requerem um elevado carácter anti-séptico, como por exemplo, para aplicações em feridas na pele (Abdelgawada et al., 2013; Segala et al., 2015). Neste sentido as AgNPs tem sido as mais utilizadas para revestir polímeros, devido às suas propriedades eletrônicas, ópticas, catalíticas e principalmente antimicrobianas (Segala et al., 2015).

A utilização de nanomembranas para o tratamento de feridas na pele proporciona maior conforto para o paciente porque reduz o número de aplicações e dosagem do antibiótico, assim diminuindo os efeitos colaterais. Nessas infecções, as nanomembranas também podem atuar como uma esponja absorvendo os fluidos libertados pela lesão e assegurando a oxigenação através da sua rede porosa de nanofibras (Nista et al., 2013).

O acetato de celulose é um polímero que apresenta boa tenacidade, alta biocompatibilidade e custo relativamente baixo, além de formar facilmente películas com estrutura porosa, características que o tornam vantajoso para construção de um nanocomposito antisséptico para tratamento de feridas (Nista et al., 2012; Segala et al., 2015).

Apesar da versatilidade de combinação das AgNPs com polímeros para aplicação em diversas áreas da saúde o método de síntese química gera resíduos tóxicos que poluem o meio ambiente e perturbam o ecossistema (Zhang et al., 2011; Dhanasekaran et al., 2011; Durán and Marcato, 2011; Kulkarni and Muddapur, 2014, Meva et al., 2016). Por isso, nos últimos anos há uma demanda crescente para o desenvolvimento de processo mediado por recursos microbianos devido ao baixo custo e a produção de moléculas não tóxicas e de reduzido impacto ambiental (Mishra and Singh, 2015; Moghaddam et al., 2015; Siddiqi and Husen, 2016).

Nesse enfoque, os fungos filamentosos despontam como potenciais bio-fábricas para produção de nanopartículas metálicas em função do crescimento rápido, cultivo em larga escala, secreção de proteínas com elevado poder redutor e produção de biomoléculas que estabilizam as nanopartículas (Durán et al., 2011; Tarafdar and Raliya, 2013; Phanjom and Ahmed, 2015).

Certas espécies de fungos são sistemas alternativos seguros para intermediar a síntese de AgNPs em função da alta tolerância e capacidade de absorção de metais (Siddiqi and Husen, 2016). *Aspergillus*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Cladosporium*, *Pleurotus*, *Penicillium* e *Verticillium* são fungos que mediam a síntese extracelular de AgNPs, processo preferido ao intracelular, por ser menos trabalhoso e dispendioso economicamente (Sastry et al., 2003; Roy et al., 2013; Siddiqi and Husen, 2016).

Embora citações da literatura mostrem diversas espécies de *Aspergillus* na síntese de nanopartículas, são raros os estudos sobre o potencial dos fungos de ecossistemas amazônicos na mediação da biossíntese de AgNPs. Por outro lado a interação de AgNPs biológicas com nanomembranas de acetato de celulose também é uma investigação inédita, pois a maioria das pesquisas que buscam o desenvolvimento de polímeros antissépticos utilizam AgNPs obtidas por síntese química.

Essa investigação mostra a capacidade de *Aspergillus oryzae* DPUA 1624 mediar a síntese de AgNPs com potencial antimicrobiano, assim como, o incremento da ação antilevedura dessas moléculas quando incorporadas em nanomembranas de acetato de celulose (NanoMAC).

MATERIAL E MÉTODOS

Autenticação morfológica e molecular de *Aspergillus oryzae*

A linhagem de *A. oryzae* DPUA 1624 foi cedida pela Coleção de Culturas DPUA da Universidade Federal do Amazonas-UFAM. A reativação da cultura foi feita em caldo glicosado 2% (p/v) a 28 °C por sete dias e posteriormente o cultivo foi realizado em CYA [ágar Czapek Dox e extrato de levedura 0,5% (p/v)], em placa de Petri, a 28 °C por sete dias (Klick e Pitt., 1988), a cultura estoque foi preservada sob refrigeração (4 °C). As características macro e micromorfológicas das colônias cultivadas em CYA foram utilizadas para autenticação de acordo as chaves de identificação propostas por Raper and Fennel (1977) e Klich and Pitt (1988).

A autenticação molecular foi realizada a partir do sequenciamento parcial do rDNA. Aproximadamente 200 mg de micélio previamente cultivado em meio Sabouraud por 72 h a 28 °C, sob agitação de 170 rpm, foi utilizado para extração de DNA pelo método de fenol-clorofórmio. A região ITS2 (Internal Transcribed Spacer Region) e parte das subunidade 5,8S e 28S do rDNA foram amplificadas por PCR utilizando os iniciadores ITS-3 (5'-GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC-3') desenvolvido por White et al. (1990) e UNI-R (5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG-3') desenvolvido por Haynes et al. (1995). As sequencias de rDNA foram obtidas em sequenciador automático 3500 ABI Applied Biosystem e a confirmação da espécie de *Aspergillus* foi realizada por meio da comparação das sequencias de DNA no GeneBank utilizando a ferramenta BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) do NCBI (Nacional Center for Biotechnology Information).

Produção da Biomassa

O fungo foi cultivado em 200 mL de meio MGYP (extrato de malte 0,3%; glicose 1%; extrato de levedura 0,3% e peptona 0,5% [p/v]) em shaker (180 rpm) a 25° C por 96 h, utilizando como inóculo uma suspensão celular de 10⁶ esporos/mL de meio. A biomassa foi separada por filtração utilizando papel de filtro Whatman n.1 e lavada três vezes com água ultrapura para remover resíduos do meio. A massa micelial foi colocada em frasco Erlenmeyer contendo 200 mL de água ultrapura e a extração das biomoléculas ocorreu por 96 h, a 28 °C, a 200 rpm. A biomassa foi filtrada e o extrato aquoso foi recuperado e usado para

biossíntese de nanopartículas de prata (Sastry et al., 2003; Durán et al., 2007; Vigneshwaran et al., 2007).

Síntese de nanopartículas utilizando filtrado celular

Para biossíntese de AgNPs, 200 mL do extrato aquoso foram misturados com solução de nitrato de prata (1 mol.L^{-1}) até obtenção de concentração final de 1 mmol.L^{-1} de AgNO_3 . A reação foi realizada a $28 \text{ }^\circ\text{C}$, a 200 rpm por 96 h. O filtrado celular (sem o nitrato de prata) foi utilizado como controle positivo e uma solução de 1 mmol.L^{-1} de AgNO_3 foi utilizada como controle negativo. A verificação da síntese de nanopartículas de prata foi realizada pela observação da mudança de coloração da solução e posteriormente confirmada pela presença de banda plasmônica na região de 400 nm (Vigneshwaran et al., 2007; Zomorodian et al., 2016). As medidas dos espectros de absorção foram realizadas em espectrofotômetro de UV-vis (Cary 60, Agilent) com resolução de 1 nm numa faixa de leitura de 200-800 nm.

Caracterização das nanopartículas de prata

Potencial zeta e tamanho das AgNPS

O diâmetro médio das AgNPs e a distribuição de tamanho assim como a carga superficial adquirida (potencial zeta) foram medidos no equipamento Nano ZS Zetasizer (Malvern Instruments, Worcestershire, UK), a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ em cubeta de poliestireno com um caminho ótico de 10 mm.

Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

A distribuição do tamanho e a variação morfológica das AgNPs sintetizados por *A. oryzae* foram determinadas a partir de imagens em alta resolução em Microscópio Eletrônico de Transmissão-TEM (equipamento Carl Zeiss CEM 902) operando com voltagem de aceleração de 80 KeV. Para obtenção das imagens, uma gota da solução de nanopartículas (diluída 10 vezes) foi depositada sobre uma grade de cobre revestida de carbono (malha de 400) e seca a temperatura ambiente. As imagens foram processadas no software *image J*, o

cálculo do diâmetro das AgNPs a partir da área obtida foi realizado segundo a fórmula $D = \sqrt{\left(\frac{A}{\pi}\right)}$ e a análise estatística foi feita no *origin* (versão 8.5.1.315).

Difração de Raios-X (XRD)

A natureza cristalina das AgNPs liofilizadas foi determinada por difratometria em um aparelho de difração de raios-X da Shimadzu (modelo XRD7000- operando com radiação $\text{CuK}\alpha$) utilizando os seguintes parâmetros: tensão de 40 kV, corrente de 30 mA, velocidade de varredura 2° min^{-1} com ângulo de 2θ entre 5 e 90° .

Espectroscopia de Infra-Vermelho com Transformada de *Fourier* (FTIR)

Os dados dos espectros da região do infravermelho foram obtidos em espectrofotômetro FTIR (Agilent Cary 630 com diamond ATR accessory), no modo ATR (reflexão total atenuada) na faixa espectral de 4000 a 400 cm^{-1} . As AgNPs foram analisadas depositando uma gota da suspensão coloidal sobre janela de seleneto de zinco (ZnSe).

Energia dispersiva de raios-X (EDX) e Espectrometria de emissão de plasma (ICP)

A composição elementar das AgNPs liofilizadas foi determinada em Espectrômetro de Microfluorescência de Raios-X (microEDX1300, Shimadzu) em cinco pontos da amostra utilizando tensão de aceleração de 15 e 50 kV e contagem de tempo de 200 segundos.

A técnica de ICP foi utilizada para determinar a quantidade de prata na solução de AgNPs. A análise foi realizada no espectrômetro de emissão de plasma (PerkinElmer, Optima 8000). A curva de calibração para o elemento analisado (Ag) foi construída a partir de nove soluções de nitrato de prata com concentrações variando de $0,1$ a 50 mg/L . A solução de AgNPs foi diluída 10 vezes para leitura no equipamento.

Síntese de nanomembrana de acetato de celulose (NanoMAC)

A solução de polímero de acetato de celulose (CA) foi preparada misturando 15% de acetato de celulose em dimetilacetamida (DMAc) / acetona (1: 2). Esta solução foi agitada durante aproximadamente 2 horas para assegurar a sua homogeneização completa (Nista et al., 2012).

A NanoMAC foi preparada por eletrofição da solução de acetato de celulose à temperatura ambiente (25 °C) e 50% de umidade, utilizando uma seringa de vidro de 20 mL equipada com uma agulha metálica de 4 cm de comprimento e 0,8 mm de diâmetro. O pólo positivo de uma fonte de alimentação de alta tensão foi conectado à agulha metálica da seringa, enquanto o fio terra foi usado para aterrar o coletor de chapa de cobre que tinha dimensões de 30 x 40 cm. O fluxo de alimentação foi controlado por uma bomba KD Scientific, Modelo 100 (Campinas, Brasil) conectada a uma seringa. A distância da agulha ao coletor foi de 10 cm. A tensão aplicada foi de 15 kV, e a taxa de fluxo foi de 1 mL.h⁻¹. As amostras de membrana foram coletadas em folha de alumínio usada para revestir a placa de cobre durante as experiências (Nista et al., 2012; Segala et al., 2015).

A estrutura morfológica e uniformidade da NanoMAC foi observada no microscópio eletrônico de varredura modelo JEOL JSM-6360LV, sob vácuo, com aceleração do feixe de 10 kV. As imagens foram obtidas após metalização da amostra com uma fina camada de ouro/paládio e o diâmetro da nanomembrana foi calculado no software *image J*.

O revestimento da nanoMAC foi realizado por meio de lento gotejamento da solução de AgNPs em discos de 5 mm da membrana nanoestruturada, até obtenção de 6.73 µg de Ag em cada disco da nanoMAC.

Atividade antimicrobiana das AgNPs

A atividade antimicrobiana das nanopartículas de prata foi investigada contra *Escherichia coli* (CBAM 0001), *Staphylococcus aureus* (ATCC 2592)3 e *Candida albicans* (DPUA 1706) pela técnica de difusão por perfuração em ágar (Ostrosky et al., 2008). O teste utilizando as bactérias foi realizado em Ágar Müller-Hinton (inóculo contendo 10⁸ CFU/mL) e a levedura em ágar Sabouraud (inóculo contendo 10⁶ CFU/mL), em placa de Petri, a 37 °C, em triplicata. Uma alíquota de 100 µL da solução de AgNPs [134,5 µg/mL] foi transferida para poços de 8 mm de diâmetro. Como controles positivos foram utilizados 100 µL de

estreptomicina [50 µg/mL] para bactérias, e itraconazol [50 µg/mL] para levedura, e como controle negativo foi utilizado 100 µL do extrato aquoso da massa micelial.

Atividade Antimicrobiana da NanoMAC revestida de AgNPs

A atividade antimicrobiana da NanoMAC revestida de AgNPs foi investigada contra *C. albicans* (DPUA 1706) (inóculo de 10^6 CFU/mL) pela técnica de difusão em ágar (Ostrosky et al., 2008) em placa de Petri contendo ágar Sabouraud. Discos 5 mm da NanoMAC revestida com suspensão de AgNPs para obtenção de 6.73 µg de Ag por discos foram utilizados no teste. O cultivo foi realizado a 37 °C por 48 h e foi utilizado itraconazol [6,73 µg/mL] e AgNPs [6,73 µg/mL] combinada com itraconazol [6,73 µg/mL] como controles.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Autenticação morfológica e molecular de *Aspergillus oryzae*

As características macro e microscópicas da cultura utilizada na pesquisa confirmaram que o fungo pertence a espécie *A. oryzae* segundo as chaves de identificação propostas por Raper and Fennel (1977) e Klick and Pitt (1988). A autenticação molecular por meio das sequencias rDNA do fungo estudado apresentou 99% de similaridade (Score 1554; Evaluate 0) com sequencias da mesma região oriundas de *A. oryzae* (Nº de acesso KT964480.1). A sequência amplificada foi depositada no GenBank (Nº de Acesso SUB2433246).

Biossíntese de AgNPs

A síntese de AgNPs mediada por *A. oryzae* foi observada pela alteração da coloração do extrato micelial aquoso de amarelo para marrom (Figura 1A). Não houve formação de agregados e nem mudança na intensidade de coloração após 96 h, dados que indicam a manutenção das partículas em dispersão na solução. A mudança de cor foi devido ao efeito de ressonâncias plasmônica de superfície localizada (LSPR) e redução da AgNO_3 (Li et al., 2012). LSPR se refere à oscilação coletiva dos elétrons livres nas nanopartículas metálicas ao interagir com a radiação eletromagnética (Cao et al., 2011; Gonzáles et al., 2014; Al Juraifani and Ghazwani, 2015).

Na figura 1B o espectro de absorção da solução das AgNPs mostra uma banda de SPR com pico de absorvância a 446 nm, confirmando a presença de AgNPs, após 96 h de incubação. Dados semelhantes foram citados para AgNPs de *A. tubingensis*, nessa mesma faixa de absorvância (Rodrigues et al., 2013).

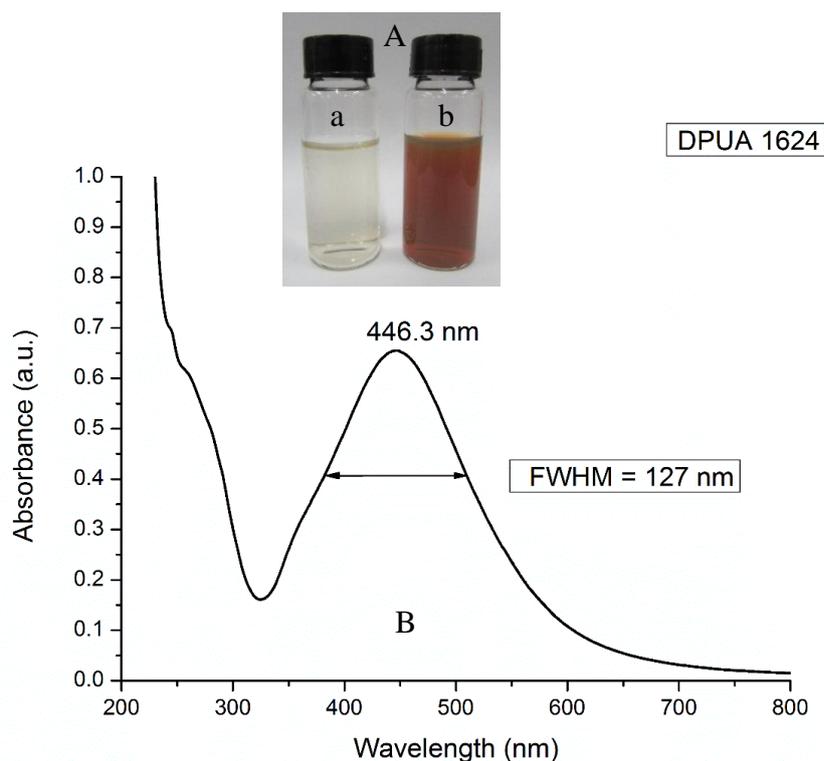


Figura 1. (A) Extrato aquoso da biomassa de *Aspergillus oryzae* DPUA 1624: (a) sem AgNO_3 ; (b) com AgNO_3 (1 mol.L^{-1}); (B) Espectro de absorção de UV-vis das AgNPs após 96 h de reação.

Caracterização das AgNPs

Potencial zeta e tamanho das AgNPs

O potencial zeta (ζ) indica o grau de repulsão entre partículas em dispersão com cargas iguais por meio da mobilidade eletroforética e o seu valor pode estar relacionado com a estabilidade de dispersões coloidais (Phanjom and Ahmed, 2015). O potencial zeta das AgNPs mediada por *A. oryzae* foi de $-28,7 \text{ mv}$, sugerindo que AgNPs tem uma elevada repulsão eletrostática, característica que contribui para sua estabilização pois, segundo Roy et al. (2013), partículas em suspensão com grande potencial zeta negativo ou positivo tendem a se repelir e não formam agregados.

A técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) permite a determinação do tamanho das partículas através da medição das mudanças aleatórias na intensidade de luz dispersa a partir de uma solução ou suspensão (Fatima et al., 2015). O diâmetro hidrodinâmico médio das AgNPs de *A. oryzae* medido por DLS foi $57,88 \text{ nm}$ (Figura 2) e o

índice de polidispersividade (PDI) foi 0,217, confirmando que houve formação de partículas dentro da dimensão de nanoescala (1-100 nm) e que a solução é monodispersa pois está dentro do intervalo definido de 0.01 a 0.7 para partículas monodispersas (Honary et al., 2013; Tarafdar and Raliya, 2013).

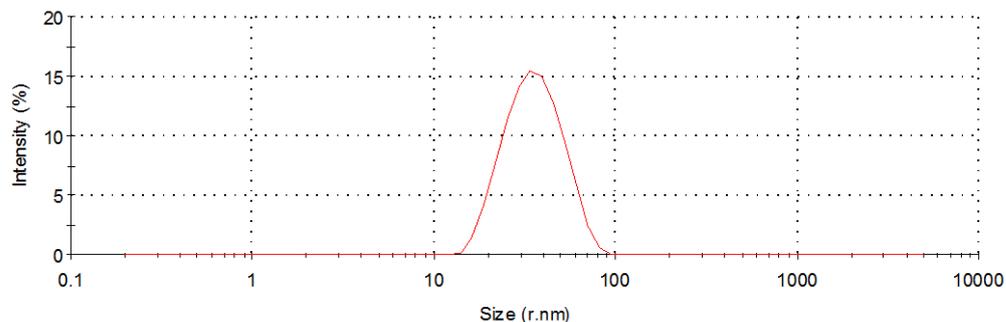


Figura 2. Diâmetro hidrodinâmico das AgNPs biossintetizadas pelo extrato aquoso da biomassa de *Aspergillus oryzae*.

Análises de Microscopia Eletrônica de Transmissão

As imagens de microscopia eletrônica de transmissão (Figura 3A) mostraram que as AgNPs sintetizadas por *A. oryzae* tem predominantemente forma arredondada e em menor frequência triangular, com tamanho médio de $61,15 \pm 11,45$ nm. AgNPs de forma e tamanho variável são comuns nos sistemas biológicos, porém as de forma triangular são de eficiência antimicrobiana superior aquelas de forma arredondada (Pal et al., 2007; Rai, Yadav and Gade, 2009; Roy et al., 2013).

Além disso, na figura 3B está o histograma referente a distribuição dessas AgNPs, no qual é possível observar que a faixa onde encontram-se a maioria das AgNPs é de 50 a 60 nm. Na literatura já foram reportadas nanopartículas mediadas por espécies do gênero *Aspergillus* com tamanho mínimo de 1 e máximo de 140 nm (Sagar and Ashok, 2012; Klalil, 2013; Roy and Das, 2015). E para *A. oryzae* há relato da síntese de AgNPs na faixa de 5-50 nm e 25-76 nm (Binupriya et al., 2010; Pereira et al., 2014).

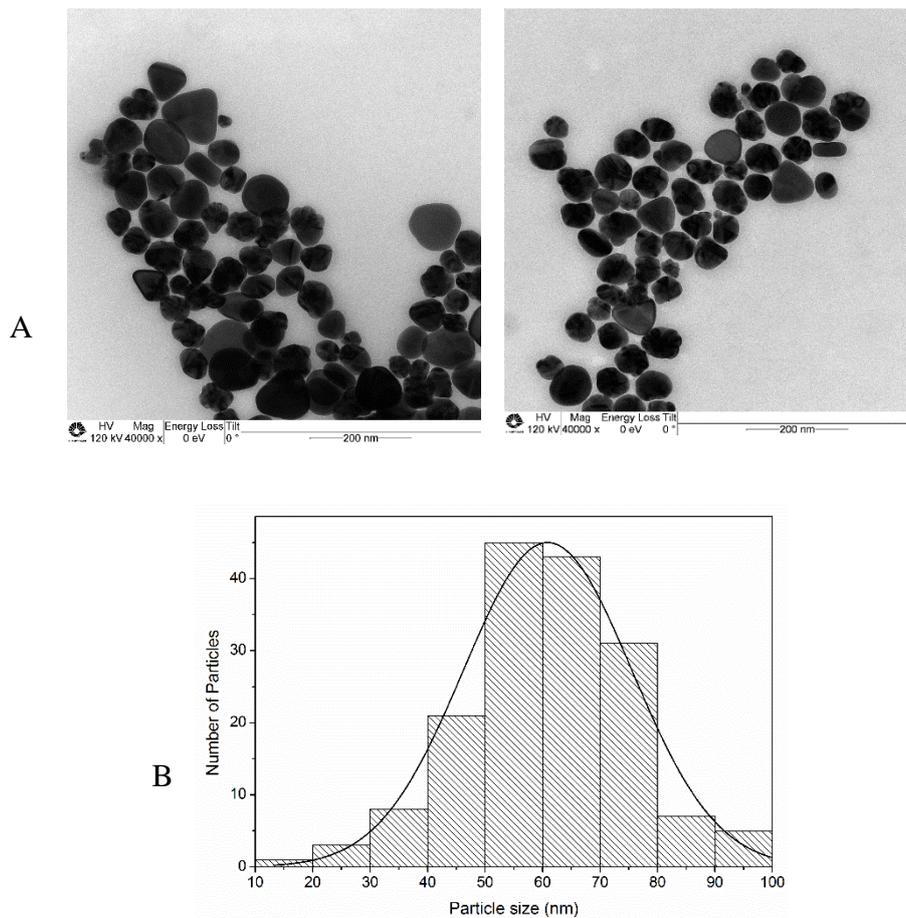


Figura 3. (A) Imagem de microscopia eletrônica de transmissão das AgNPs biossintetizada pelo extrato aquoso da biomassa de *Aspergillus oryzae*. (B) Histograma de distribuição das AgNPs em função do diâmetro.

Análise de difração de raios-X

Os padrões XRD das AgNPs mostraram a natureza cristalina da amostra e confirmaram a presença de prata pura na solução de nanopartículas analisada. Na figura 4 é possível observar cinco bandas distintas em $37,97^\circ$, $44,29^\circ$, $64,66^\circ$, $77,46^\circ$ e $81,44^\circ$ correspondentes aos planos (111), (200), (220), (311) e (222). Esses planos correspondem às faces cúbicas centradas (fcc) de nanopartículas de Ag° (Crystal Structure Database-ICSD/Code 64,994) com um parâmetro de rede de $a = 4,077 \text{ \AA}$. A presença desses cinco planos cristalinos confirma a formação de prata metálica na suspensão de AgNPs.

A ausência das bandas de faces centradas cúbicas em $27,9^\circ$, $32,3^\circ$, $46,3^\circ$, $55,0^\circ$, $57,6^\circ$, $67,6^\circ$, $74,6^\circ$, $76,9^\circ$, e $85,7^\circ$ que correspondem as facetas típicas do XRD padrão de nanopartículas AgCl (111), (200), (220), (311), (222), (400), (331), (420) e (422) (Crystal

Structure Database-ICSD / Code 64734) mostram que não houve formação de nanopartículas híbridas de Ag/AgCl como produto final da reação (Durán et al., 2016). Os picos não atribuídos a $2\theta = 28^\circ$, 32° e 36° na figura 4 estão relacionados às fases orgânicas cristalinas e amorfas (Awaad et al., 2013). Esses resultados confirmam que as moléculas de *A. oryzae* são redutores eficientes de íons de prata.

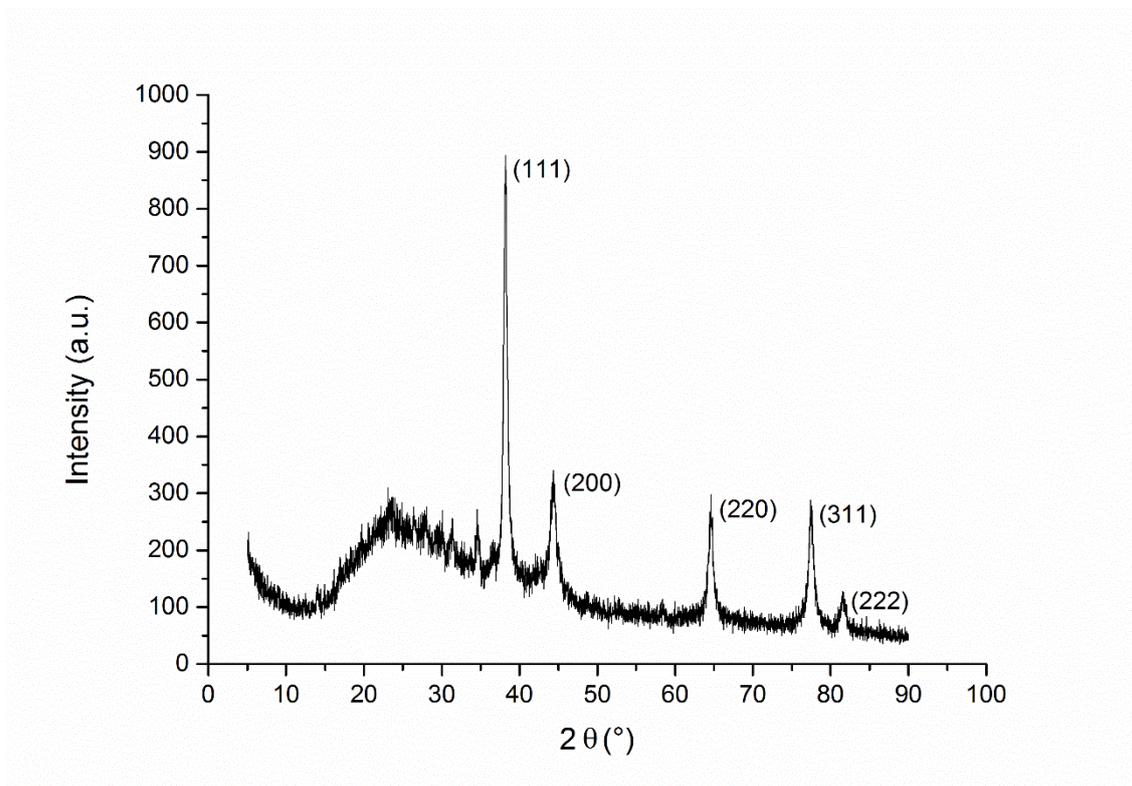


Figura 4. Padrão de XRD das AgNPs liofilizada biossintetizada pelo extrato aquoso da biomassa de *Aspergillus oryzae*.

Análises de Espectroscopia de Infra-Vermelho com Transformada de *Fourier*

Os modos vibracionais presentes nas AgNPs biossintetizadas foram analisadas por FTIR. O espectro obtido apresenta quatro picos distintos: 3288 , 2101 , 1994 e 1633 cm^{-1} (Figura 5). O pico 3288 está relacionado com energia de vibração das amidas primária e secundária das proteínas. E o pico 1633 cm^{-1} está relacionado com a energia de vibração da carbonila e é atribuído a ligação amida I da proteína (El-Aziz et al., 2012). A presença de grupos carbonila e amidas primária reforçam a indicação de que as proteínas presentes no extrato aquoso da biomassa de *A. oryzae* estão ligadas às AgNPs. Vários estudos comprovam que as proteínas podem se ligar as nanopartículas de prata por meio de grupos amina livre, conferindo estabilização as mesmas (Phanjom and Ahmed, 2015).

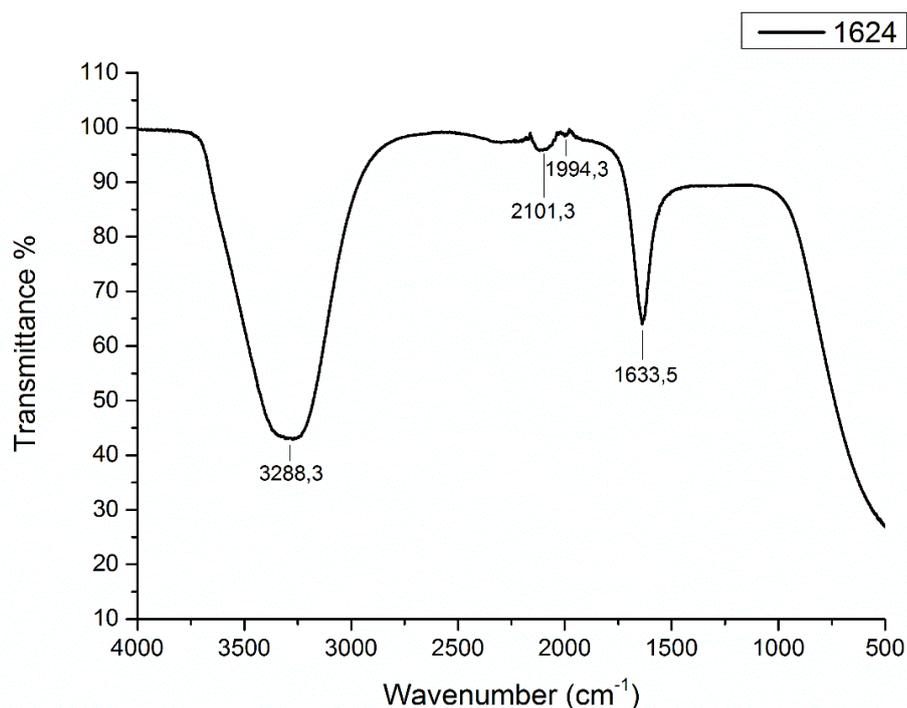


Figura 5. Espectro de FTIR da solução de AgNPs biossintetizada pelo extrato aquoso da biomassa de *Aspergillus oryzae*.

Energia dispersiva de raios-X e Espectrometria de emissão de plasma

A análise de dispersão de energia por raios-X (EDX) revelou um forte sinal na região próxima de 3 KeV que corresponde ao pico do elemento prata (Pereira et al., 2014; Elgorban et al., 2016). No espectro de EDX observa-se um pico em 2,98 keV e outro em 3,17 keV que correspondem às energias de ligação de AgLa e AgLb1, respectivamente (Figura 6). Os dois picos destacados compõem o perfil de absorção óptica do elemento prata indicando que as AgNPs mediadas por *A. oryzae* são de elevada pureza.

Análises de espectrometria de emissão de plasma determinaram que a concentração da solução de AgNPs obtida após a biossíntese por *A. oryzae* foi de 134,5 µg/mL.

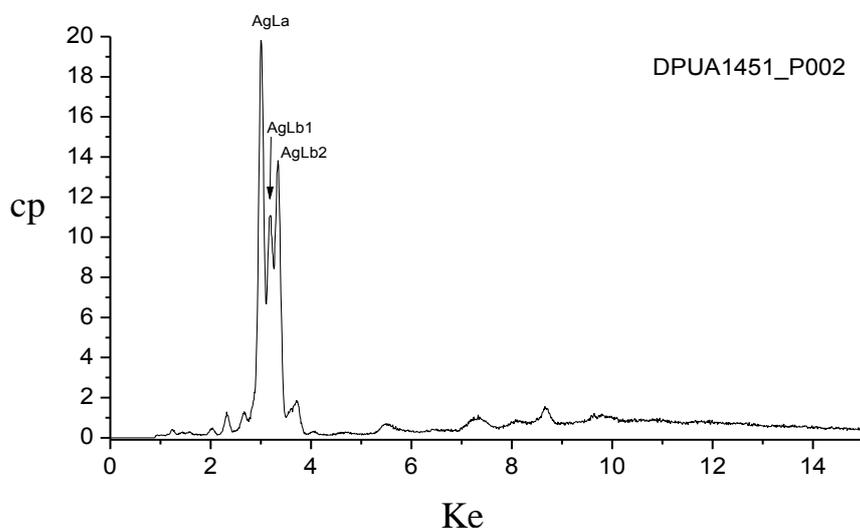


Figura 6. Espectro de Energia Dispersiva de Raios-X (EDX) da solução de AgNPs biossintetizada pelo extrato aquoso da biomassa de *Aspergillus oryzae*.

Atividade antimicrobiana das AgNPs em dispersão e incorporada em NanoMAC

A atividade antimicrobiana das AgNPs foi investigada contra *E. coli* CBAM 0001, *S. aureus* ATCC 25923 e *C. albicans* DPUA 1706 utilizando a técnica de difusão por perfuração em ágar. Os resultados mostraram que as bactérias *E. coli* e *S. aureus* são resistentes às AgNPs testadas na concentração de 134 $\mu\text{g/mL}$ enquanto que *C. albicans* é suscetível. O crescimento da levedura foi completamente inibido pelas AgNPs na placa de ágar Sabouraud, nas condições experimentais formando halo de inibição de 23,6 mm (Figura 7).

Xue et al. (2016) também obtiveram resultados parecidos com AgNPs produzidas por *Arthroderma fulvum* que apresentaram atividade antifúngica contra vários fungos incluindo *C. albicans*.

As AgNPs mostram propriedades antimicrobianas eficientes em comparação com outros sais devido à sua grande área de superfície, o que proporciona um melhor contato com os micro-organismos (Ray et al., 2009; Kon and Rai, 2013).

Entretanto, segundo Segala et al. (2015) a ação antimicrobiana das AgNPs depende de muitos outros fatores tais como a cristalinidade, geometria, tamanho, oxidação superficial,

estado aglomerado no meio biológico, carga superficial, grupos presentes na superfície das nanopartículas, e muitos outros. Dessa forma pode-se inferir que as propriedades das AgNPs produzidas por *A. oryzae* DPUA 1624 possibilitaram uma maior interação com as células das leveduras permitindo que as mesmas penetrassem através da membrana plasmática levando a célula à morte.



Figura 7. Atividade antimicrobiana das AgNPs biossintetizada pelo extrato aquoso da biomassa de *Aspergillus oryzae* contra *Candida albicans*: (a), (b) e (c) halos de inibição formados pelas AgNPs [134 $\mu\text{g/mL}$], (d) 1 mmol L^{-1} de AgNO_3 , (e) itraconazol (50 $\mu\text{g/mL}$).

Quanto a citotoxicidade das AgNPs, apesar de muitos estudos demonstrarem a ação citotóxica e genotóxica dessas moléculas em células humanas e de animais ainda faltam dados consistentes e confiáveis. Muitos relatórios são contraditórios e, portanto, não há um consenso geral sobre a ação dessas moléculas nos organismos e no meio ambiente (Rai et al., 2017). Acredita-se que a citotoxicidade das AgNPs depende de vários fatores como tamanho, formato, estabilidade e principalmente da dose administrada e tempo de exposição (Tran et al., 2013; Rai et al., 2017).

Os efeitos antimicrobianos das AgNPs são bastante conhecidos, apesar do seu mecanismo de ação em células de leveduras ainda não está completamente desvendado. Kim et al. (2009) observaram que as AgNPs interagem com as células de *C. albicans* causando significativas mudanças em suas membranas o que resulta na formação de “pits” e finalmente, a formação de poros e a morte celular subsequente. Os autores acreditam ainda que as AgNPs rompem a barreira de permeabilidade da membrana de *C. albicans* por meio do desarranjo da bicamada lipídica, causando a fuga de íons e outros materiais, bem como a formação de poros que dissipa o potencial elétrico da membrana.

As AgNPs biossintetizadas pelo extrato micelial de *A. oryzae* podem ser avaliadas como eficaz agente para utilização em aplicações clínicas, especialmente para tratamento de infecções causadas por *C. albicans*.

As leveduras se destacam como principal agente etiológicos de doença fúngica, principalmente dermatomicoses, infecção de pele que vem aumentando consideravelmente nas últimas décadas. Uma das causas que vem favorecendo a maior incidência dessas doenças é a pressão seletiva decorrente do uso de medicamentos. O que significa que há uma motivação considerável para encontrar agentes antifúngicos contra leveduras (Sidrim and Rocha, 2010; Xue et al., 2016).

Considerando a necessidade de desenvolver novas estratégia para combater infecções de pele causadas por leveduras, foi realizado também o teste antimicrobiano das AgNPs incorporadas em membrana formulada com acetato de celulose (15%) e DMAc:Acetone (1:2) (nanoMAC). A nanoMAC contém nanofibras com diâmetro médio de 410,76 nm depositadas aleatoriamente formando um tecido fino e homogêneo sem formação de *beads* (Figura 7A).

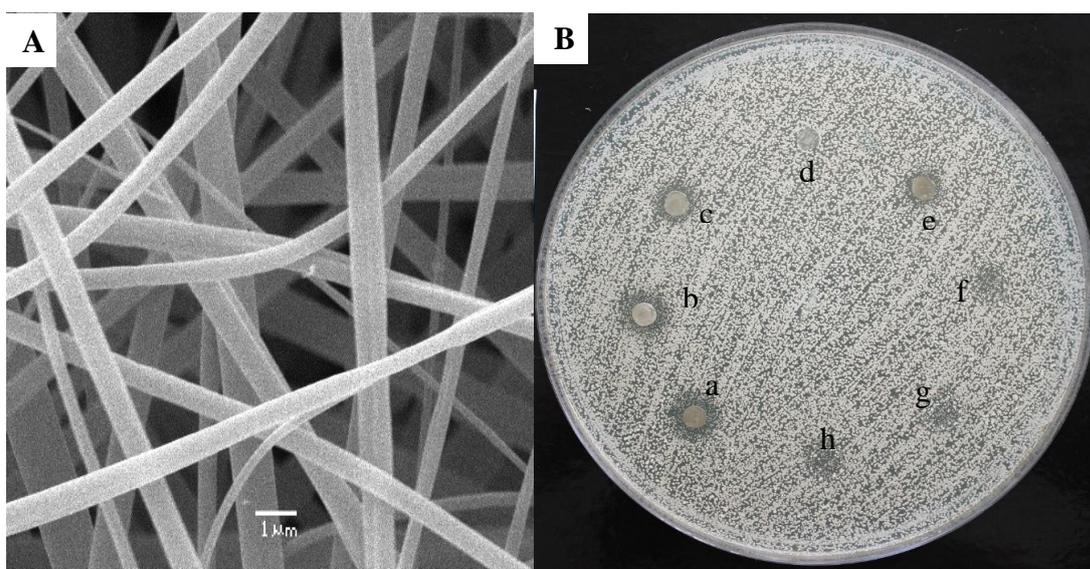


Figura 8. (A) Imagem em microscópio eletrônico de varredura de membrana de acetato de celulose (nanoMAC); (B) Atividade antimicrobiana de AgNPs impregnadas na nanoMAC contra *Candida albicans*: a), b) e c) nanoMAC com AgNPs (6,73 μ g); d) nanoMAC sem AgNPs; e) nanoMAC com itraconazol + AgNP (6,73 μ g cada); f), g) e h) suspensão de AgNPs (6,73 μ g).

De acordo com os resultados obtidos é possível observar na tabela 1 que a utilização da nanoMAC incorporadas com AgNPs permitiu um incremento de 24,22% na ação antifúngica frente a *C. albicans*, comparada a ação das AgNPs em dispersão na solução coloidal. Esse resultado é relevante pois demonstra que AgNPs obtidas pelo método de síntese

biológica quando incorporadas em membranas de acetato de celulose eletrofiadas podem ter ação potencializada contra leveduras do gênero *Candida*.

Tabela 1. Atividade antifúngica das suspensões de AgNPs sintetizadas a partir do extrato aquoso da biomassa de *Aspergillus oryzae*.

Micro-organismos teste		Atividade Antimicrobiana [Halo (mm)]		
		AgNPs [134 µg/mL] ^a	AgNPs (6.73 µg) ^a	NanoMAC impregnated with AgNPs (6.73 µg)
Bactéria	<i>Escherichia coli</i> CBAM 0001	Resistente	(nd)	(nd)
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Resistente	(nd)	(nd)
Levedura	<i>Candida albicans</i> DPUA 1706	23,60±3,82	9,66±0,44	12,00±0,67

(^a) AgNPs em dispersão coloidal

Nd: não disponível

Dessa forma a nanoMAC revestida por AgNPs biológicas demonstra um grande potencial para utilização na área médica e farmacêutica destacando-se como nanocompósitos sustentáveis com ação antilevedura.

CONCLUSÃO

O fungo *A. oryzae* DPUA 1624 produz moléculas capazes de reduzir os íons de Ag e dessa forma mediar a síntese de nanopartículas de prata estáveis, monodispersas e com propriedades antimicrobianas. Esse resultado fornece uma alternativa viável e ecoamigável para produção de antifúngicos baseados em AgNPs sem gerar resíduos poluentes. A incorporação de AgNPs em membranas nanoestruturas de acetato de celulose aumenta a ação antilevedura das AgNPs, resultando no desenvolvimento de um nanocompósito com propriedades antifúngicas ampliadas podendo ser utilizado em diversas áreas médicas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio científico dos servidores e alunos do laboratório de química biológica e da central analítica do Instituto de Química assim como do laboratório de biomateriais da Faculdade de Engenharia Química da Universidade de Campinas - UNICAMP e da Coleção de Culturas DPUA da Universidade Federal do Amazonas-UFAM. Os autores agradecem também o apoio financeiro e infraestrutura do BIONORTE (Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal), do Laboratory of Nanomaterials Synthesis and Biological Interactions (NanoBioss), do Brazilian Nanotechnology National Laboratory (LNNano-CNPq) do Instituto Nacional de C,T&I em Materiais Complexos Funcionais (INOMAT-MCTI/CNPq) e o financiamento do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/CT-Amazônia) e Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdelgawad AM, Hudson SM, Rojas OJ (2013). Antimicrobial wound dressing nanofiber mats from multicomponent (chitosan/silver-NPs/polyvinyl alcohol) systems. *Carbohydr Polym* . <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.12.043>
- Al juraifanir AAA, Ghazwani AA (2015). Biosynthesis of silver nanoparticles by *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum* and *Alternaria solani*. *African J Biotechnol*. 14(26):2170–2174.
- Binupriya AR, Sathishkumar M, Yun SI (2010). Myco-crystallization of silver ions to nanosized particles by live and dead cell filtrates of *Aspergillus oryzae* var. *wiridis* and its bacterial activity toward *Staphylococcus aureus* KCCM 12256. *Ind Eng Chem Res*. 49:852–858.
- Cao W, Huang T, Xu X-HN, Elsayed-Ali HE (2011). Localized surface plasmon resonance of single silver nanoparticles studied by dark-field optical microscopy and spectroscopy. *J Appl Phys*. 109(34310):1–6.
- Dhanasekaran D, Latha S, Saha S, Thajuddin N, Panneerselvam A (2011). Biosynthesis and antimicrobial potential of metal nanoparticles. *Int J Green Nanotechnol Biomed*. 3(1):72–82.
- Durán N, Marcato PD (2011). Biotechnological routes to nanoantimicrobials and industrial: mechanistic aspects, antimicrobial activity, toxicity and industrial implications. In: Rai M, Cioffi N, editors. *Nano-Antimicrobials: Progress and Prospects*. In press. Germany: Springer.
- Durán N, Marcato PD, Durán M, Yadav A, Gade A, Rai M (2011). Mechanistic aspects in the biogenic synthesis of extracellular metal nanoparticles by peptides, bacteria, fungi, and plants. *Appl Microbiol Biotechnol*. 90(5):1609–1624.
- Durán N, Marcato PD, Souza GIH, Alves OL, Esposito E (2007). Antibacterial effect of silver nanoparticles produced by fungal process on textile fabrics and their effluent treatment. *J Biomed Nanotechnol*. 3(2):203–208.
- Durán N, Nakazato G, Seabra AB (2016). Antimicrobial activity of biogenic silver nanoparticles, and silver chloride nanoparticles: an overview and comments. *Appl Microbiol Biotechnol*. 100(15):6555–6570.
- El-Aziz ARMA, Al-Othman MR, Alsohaibani SA, Mahmoud MA, Sayed SRM (2012). Extracellular biosynthesis and characterization of silver nanoparticles using *Aspergillus niger* isolated from Saudi Arabia (strain KSU-12). *Dig J Nanomater Biostructures*. 7(4):1491–1499.
- Elgorban AM, El-Samawaty AE-RM, Yassin MA, Sayed SR, Adil SF, Elhindi KM, et al (2016). Antifungal silver nanoparticles: synthesis, characterization and biological evaluation. *Biotechnol Biotechnol Equip*. 30(1):56–62.
- Fatima F, Bajpai P, Pathak N, Singh S, Priya S, Verma SR (2015). Antimicrobial and immunomodulatory efficacy of extracellularly synthesized silver and gold nanoparticles by a novel phosphate solubilizing fungus *Bipolaris tetramera*. *BMC Microbiol*. 15(52):1–10.

- González AL, Noguez C, Beránek J, Barnard AS (2014). Size, shape, stability, and color of plasmonic silver nanoparticles. *J Phys Chem C*. 118(17):9128–9136.
- Haynes KA, Westerneng TJ, Fell JW, Moens W (1995). Rapid detection and identification of pathogenic fungi by polymerase chain reaction amplification of large subunit ribosomal DNA. *J Med Vet Mycol*. 33:319–325.
- Ingale AG, Chaudhari AN (2013). Biogenic synthesis of nanoparticles and potential applications: an eco- friendly approach. *J Nanomed Nanotechnol*. 4(2):10–7.
- Jaidev LR, Narasimha G (2010). Fungal mediated biosynthesis of silver nanoparticles, characterization and antimicrobial activity. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 81(2):430–433.
- Khalil NM (2013). Biogenic silver nanoparticles by *Aspergillus terreus* as a powerful nanoweapon against *Aspergillus fumigatus*. *African J Microbiol Res*. 7(50):5645–5651.
- Kim K-J, Sung WS, Suh BK, Moon S-K, Choi J-S, Kim JG, et al (2009). Antifungal activity and mode of action of silver nano-particles on *Candida albicans*. *Biomaterials*. 22(2):235–242.
- Klich MA, Pitt JI (1988). A Laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs. Australia: North Ryde, N.S.W.: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation, Division of Food Processing. 116pp.
- Kon K, Rai M (2013). Metallic nanoparticles: mechanism of antibacterial action and influencing factors. *J Comp Clin Pathol Res*. 2(1):160–174.
- Meva FE, Marcelle LS, Cecile OE, Agnes AN, Djiopang YS, Fanny AEM, et al (2016). Unexplored vegetal green synthesis of silver nanoparticles: A preliminary study with *Corchorus olitorus* Linn and *Ipomea batatas* (L.) Lam. *African J Biotechnol*. 15(10):341–349.
- Mishra S, Singh HB (2015). Biosynthesized silver nanoparticles as a nanoweapon against phytopathogens: exploring their scope and potential in agriculture. *Appl Microbiol Biotechnol*. 99(3):1097–1107.
- Moghaddam AB, Namvar F, Moniri M, Tahir PM, Azizi S, Mohamad R (2015). Nanoparticles biosynthesized by fungi and yeast: A review of their preparation, properties, and medical applications. *Molecules*. 20(9):16540–16565.
- Nista SVG, Peres L, D'Avila MA, Schmidt FL (2012). Nanostructured membranes based on cellulose acetate obtained by electrospinning, Part 1 : study of the best solvents and conditions by design of experiments. *J Appl Polym Sci*. 126:E70–78.
- Nista SVG, Bettini J, Lucia Helena Innocentini Mei (2015). Coaxial Nanofibers of Chitosan-Alginate-PEO polycomplex 2 obtained by electrospinning 3. *Carbohydr Polym* .
- Nista SVG, D'Avila MA, Martinez EF, Silva A de SF, Mei LHI (2013). Nanostructured membranes based on cellulose acetate obtained by electrospinning, Part II: Controlled release profile and microbiological behavior. *J Appl Polym Sci*. 2:2772–2779.

- Ostrosky EA, Mizumoto MK, Lima MEL, Kaneko TM, Nishikawa SO, Freitas BR (2008). Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Brazilian J Pharmacogn.* 18(2):301–3077.
- Pal S, Tak YK, Song JM (2007). Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 73(6):1712–20.
- Pereira L, Dias N, Carvalho J, Fernandes S, Santos C, Lima N (2014). Synthesis, characterization and antifungal activity of chemically and fungal-produced silver nanoparticles against *Trichophyton rubrum*. *J Appl Microbiol.* 117:1601–1613.
- Rai M, Yadav A, Gade A (2009). Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnol Adv.* 27(1):76–83.
- Rodrigues, AG (2013). Aplicação de fungos de manguezais na obtenção de nanopartículas de prata com ação antimicrobiana. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 106 pp.
- Roy S, Das TK (2015). A review on biosynthesis of silver nanoparticles using *Aspergillus* species. *Adv Sci Eng Med.* 7(9):729–738.
- Roy S, Rukherjee T, Chakraborty S, Das TK (2013). Biosynthesis, characterisation & antifungal activity of silver nanoparticles synthesized by the fungus *Aspergillus foetidus* MTCC8876. *Dig J Nanomater Biostructures.* 8(1):197–205.
- Sagar G, Ashok B (2012). Green synthesis of silver nanoparticles using *Aspergillus niger* and its efficacy against human pathogens. *Eur J Exp Biol.* 2(5):1654–1658.
- Sastry M, Ahmad A, Islam Khan M, Kumar R (2003). Biosynthesis of metal nanoparticles using fungi and actinomycete. *Curr Sci.* 85(2):162–170.
- Segala K, Vaz S, Nista G, Cordi L, Trindade M, Bizarria M, et al (2015). Silver nanoparticles incorporated into nanostructured biopolymer membranes produced by electrospinning : a study of antimicrobial activity. *Brazilian J Pharm Sci.* 51(4):911–921.
- Siddiqi KS, Husen A (2016). Fabrication of metal nanoparticles from fungi and metal salts: scope and application. *Nanoscale Res Lett.* 11(98):1–15.
- Sidrim JJ., Rocha MFG (2010). *Micologia médica á luz de autores contemporâneos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 388pp.
- Sonar H, Nagaonkar D, Ingle AP, Rai M (2017). Mycosynthesized silver nanoparticles as potent growth inhibitory agents against selected waterborne human pathogens. *Clean-soil, air, walter.* 45(9999):1–6.
- Tarafdar JC, Raliya R (2013). Rapid, low-cost, and ecofriendly approach for iron nanoparticle synthesis using *Aspergillus oryzae* TFR9. *J Nanoparticles.* 2013:1–4.

Vigneshwaran N, Ashtaputre NM, Varadarajan PV, Nachane RP, Paralikar KM, Balasubramanya RH (2007). Biological synthesis of silver nanoparticles using the fungus *Aspergillus flavus*. *Mater Lett.* 61(6):1413–1418.

White T J, Bruns T, Lee S TJW (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M A, Gelfand D H, Sninsky J J WTJ, editor. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. New York, N.Y: Academic Press, Inc. p. 315–322.

Xue B, He D, Gao S, Wang D, Yokoyama K, Wang L (2016). Biosynthesis of silver nanoparticles by the fungus *Arthroderma fulvum* and its antifungal activity against genera of *Candida*, *Aspergillus* and *Fusarium*. *Int J Nanomedicine.* 11:1899–1906.

Zhang X, Yan S, Tyagi RD, Surampalli RY (2011). Synthesis of nanoparticles by microorganisms and their application in enhancing microbiological reaction rates. *Chemosphere.* 82(4):489–494.

Zomorodian K, Pourshahid S, Sadatsharifi A, Mehryar P, Pakshir K, Rahimi MJ et al. (2016). Biosynthesis and characterization of silver nanoparticles by *Aspergillus* species. *Biomed Res Int.* 8–13.

BIOSSÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA E IMOBILIZAÇÃO EM MICROESFERAS DE ALGINATO

Taciana A. Silva¹, Karen Segala², Yan M. Silva², Nelly M. S. Vinhote¹, Leilane B. Souza³,
Marne C. Vasconcellos³, Nelson Durán^{4,5,6}, Maria F. S. Teixeira¹

¹Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM.

²Departamento de Química da Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM

³Faculdade de Ciências Farmaceuticas da Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM

⁴Instituto de Química da Universidade de Campinas, Campinas, SP.

⁵Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano-CNPEM), Campinas, SP.

⁶Laboratório de Síntese de Nanoestruturas e Interação com Biosistemas (NanoBioss), Instituto de Química, Universidade de Campinas, Campinas, SP

Resumo

Neste estudo foi avaliado o potencial de *Aspergillus flavo-furcatis* na síntese extracelular de nanopartículas de prata e a atividade antimicrobiana da suspensão coloidal de AgNPs imobilizada em matriz polimérica de alginato. Após cultivo em meio CYA a produção de biomassa foi feita por fermentação submersa em 200 mL de extrato de MGYB, a 28 °C, 180 rpm. E como inóculo foi adicionado 10⁶ esp/mL de meio. Após 96 h, no extrato micelial recuperado da lavagem da biomassa foi adicionada solução de AgNO₃ até concentração final de 1 mM. A síntese das AgNPs foi confirmada por espectroscopia de UV-visível e a caracterização foi realizada por espalhamento dinâmico de luz, microscopia eletrônica de transmissão, difração de raios-X, energia dispersiva de raios-X e métodos de espectrometria e espectroscopia avançados. *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Candida albicans* e *Trichosporon beigellii* foram os micro-organismos teste utilizados na atividade antimicrobiana das AgNPs. O teste de citotoxicidade foi realizado frente a fibroblastos humanos (MRC5) pelo método de *Alamar Blue*® utilizando 100 µg/mL de AgNPs liofilizadas. As microesferas de alginato foram sintetizadas por coacervação complexa com incorporação de AgNPs pelo método *in situ* e *ex situ* e caracterizadas em microscópio eletrônico de varredura. O extrato aquoso de *A. flavo-furcatis* mediou a síntese de AgNPs arredondadas, em sua maioria, triangulares e hexagonais com diâmetro médio de 80,17 nm, apresentando atividade antifúngica frente a *C. albicans* e *E. coli*. A CMI para *T. beigellii* e *C. albicans* foi 0,11 µg/mL e 0,22 µg/mL, respectivamente. Já para bactérias foram obtidos os seguintes CMIs: 1,73 µg/mL para *E. coli*; 1,53 µg/mL para *S. aureus* e 0,87 µg/mL para *S. epidermidis*. A viabilidade celular da linhagem MRC5 frente às AgNPs foi igual a 100% confirmando que as mesmas não são tóxicas para essa linhagem. As microesferas apresentam tamanho aproximado de 950 µm com formato circular e presença de fissuras na superfície das produzidas pelo método *ex situ*. Os maiores halos de inibição das microesferas foram: 26,333±0,58 mm para *S. aureus*; 26,00±1,15 mm para *E. coli*; 31,33±0,57 mm para *C. albicans* e 21,0±1,0 mm para *T. beigellii*. A incorporação de AgNPs em microesferas de alginato potencializou o efeito antimicrobiano dessas moléculas, principalmente o efeito anti-levadura, possibilitando a utilização desse bionanocompósito para finalidades assépticas na área médica, cosmética, farmacêutica e ambiental.

Palavras-chave: *Aspergillus*, nanopartículas de prata, antimicrobiano, bionanocompósito.

INTRODUÇÃO

As nanopartículas de prata (AgNPs) se destacam na área biomédica e farmacêutica pois funcionam como excelentes antimicrobianos, apresentam boas propriedades anti-inflamatórias e são eficientes transportadores de fármacos. As propriedades antimicrobianas desses biofármacos são comprovadas contra diversos micro-organismos patogênicos incluindo bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, fungos e vírus (Petica, 2008; Gúzman et al., 2009; Rai et al., 2009; Antunes et al., 2013).

A forte atividade antimicrobiana das AgNPs, muitas vezes mais eficientes do que os íons de prata, está associada a área de superfície extremamente grande, que proporciona um melhor contato com os micro-organismos (Rai et al., 2009). O mecanismo de ação antimicrobiano das nanopartículas de prata ainda não está bem elucidado, entretanto, estudos revelam que os íons metálicos presentes na superfície das AgNPs reage com os grupos tiol e sulfidril presente nas proteínas, diminuindo a permeabilidade da membrana, podendo provocar a morte celular (Rai et al., 2009; Prabhu and Poulouse, 2012; Andrade, 2013).

Devido a excelente atividade antimicrobiana as AgNPs tem sido utilizada para tratar infecções e prevenir colonização bacteriana em superfícies de próteses, cateteres e materiais odontológicos e, também no tratamento da água e na fabricação de tintas com propriedades antibacterianas (Gúzman et al., 2009; Durán et al., 2011; Antunes et al., 2013). Tran et al. (2013) calcularam a comercialização de mais de US\$ 3 bilhões em produtos contendo AgNPs até 2024.

Nesse contexto há uma crescente atenção para sintetizar nanopartículas usando métodos ambientalmente amigáveis (química verde) (Abbasi et al., 2016). A síntese de nanopartículas mediada por bactérias, fungos e vegetais é um processo inovador, seguro, de alto rendimento, baixo custo, ecológico e não tóxico comparado aos procedimentos físico-químicos (Zomorodian et al., 2016).

Dentre os organismos utilizados na síntese biológica de AgNPs os fungos são excelentes vias em comparação a outros seres devido à elevada secreção de proteínas extracelulares capazes de reduzir íons metálicos mais rapidamente, facilidade de manuseio, e resistência da massa micelial à pressão e agitação (Barabadi et al., 2014; Magdi et al., 2014;).

Apesar da atividade antimicrobiana das AgNPs ser bastante conhecida são poucos os estudos sobre a imobilização de AgNPs biossintetizadas em sistemas poliméricos. A imobilização de fármacos em sistemas poliméricos do tipo microencapsulação está sendo um

dos mecanismos de liberação controlada empregada na industrial para carrear fármacos ativos a sítios específicos no corpo humano (Freitas and Marchetti, 2005).

Dentre os sistemas matriciais biopolímeros utilizados em processos de microencapsulamento o alginato de sódio predomina, pois apresentam um amplo leque de aplicações nas áreas médica e farmacêutica, considerando que são de fácil degradação hidrolítica e enzimática, biocompatíveis e atóxicos (Kleinubing, 2013).

Deste modo, o objetivo desta investigação foi sintetizar AgNPs utilizando *Aspergillus flavo-furcatis* e imobilizar a suspensão coloidal de AgNPs em matriz polimérica de alginato de sódio para obtenção de microesferas com propriedades antimicrobianas.

MATERIAL E MÉTODO

Micro-organismo

Aspergillus flavo-furcatis DPUA 1451 Bat. & H. Maia (1955) foi a linhagem anamórfica utilizada nesta pesquisa, cedida pela Coleção de Culturas DPUA da Universidade Federal do Amazonas-UFAM. Para realização dos testes citados a seguir *A. flavo-furcatis* foi cultivado em CYA [(ágar Czapek Dox e extrato de levedura 0,5% (p/v)], por 7 dias a 28 °C.

Cultivo em meio líquido

Este experimento foi realizado com a finalidade de verificar a influência do tipo de inóculo na mediação da síntese de AgNPs. A fermentação submersa foi realizada em frasco Erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de meio MGYP (Extrato de malte 0,3%; glicose 1%; extrato de levedura 0,3% e peptona 0,5% [p/v]). Nesse meio, separadamente, foi inoculado 10 *plugs* miceliais de 5 cm de diâmetro (Plug) ou suspensão de esporos de maneira a se obter a concentração de 1×10^6 esporos/mL de meio (Esp). A fermentação foi conduzida a 28 °C, 180 rpm.

Após 96 h a biomassa foi separada do sobrenadante por filtração à vácuo. Em seguida a biomassa foi lavada três vezes com água deionizada esterilizada e acondicionada em frascos Erlenmeyer contendo 200 mL água ultra pura. A obtenção do extrato aquoso foi realizada por 72 h, a 28 °C, a 180 rpm (Sastry et al., 2003; Durán et al., 2007; Vigneshwaran et al., 2007). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Síntese biológica de AgNPs

No extrato aquoso recuperado foi adicionada a solução de nitrato de prata (AgNO_3) 1 M para obtenção da concentração final de 1 mM. A reação e os controles (extrato aquoso com água destilada e AgNO_3 1 mM) foram incubados por 96 h, na ausência de luz, a 25 °C, 180 rpm. A observação da mudança de coloração da reação indicou a síntese de nanopartículas de prata. A confirmação foi realizada por espectrometria de UV-vis em espectrofotômetro de duplo feixe com resolução de 0,1 nm numa faixa de leitura de 200-800 nm (Vigneshwaran et al., 2007; Silva et al., 2017).

Caracterização das AgNPs

Determinação de diâmetro hidrodinâmico das AgNPs e potencial zeta das suspensões coloidais

O diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas foram medidos no equipamento Nano ZS Zetasizer (Malvern Instruments, Worcestershire, UK), em um ângulo de detecção da luz espalhada fixo em 173°, temperatura de 25 °C. As amostras foram diluídas 10 vezes em uma solução de 10^{-3} mol.L⁻¹ de KCl e as medições realizadas em célula capilar com um caminho ótico de 10 mm. Na mesma ocasião foi determinado também o potencial zeta (ζ) das soluções de AgNPs.

Determinação do diâmetro e da forma das AgNPs por Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

A microscopia eletrônica de transmissão foi utilizada para verificar a forma e o tamanho das nanopartículas, assim como, a presença de uma camada de proteção em volta das mesmas, característica importante para estabilidade das nanopartículas em soluções coloidais.

Para as análises as amostras foram diluídas e gotejadas em uma grade de cobre revestida de carbono (malha de 400 *mesh*) e secas à temperatura ambiente. As imagens de microscopia eletrônica de transmissão foram obtidas no equipamento Carl Zeiss CEM 902, operando com voltagem de aceleração de 80 kV.

Confirmação da presença de prata metálica por difração de Raios-X (DRX)

As amostras liofilizadas foram submetidas a análises de difração de Raios-X num difratômetro Shimadzu, modelo XRD7000, operando com radiação $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,54060 \text{ \AA}$), tensão de 40 kV, corrente de 30 mA, velocidade de varredura 2° min^{-1} e região de 2θ entre 5 e 90° . Essa técnica possibilita a criação de difratogramas referentes à estrutura cristalina da amostra devido a sua distância interatômica. É umas das técnicas mais utilizadas na caracterização de nanomateriais (Oliveira, 2011; Silva et al., 2017).

Espectroscopia de Infra-Vermelho com Transformada de *Fourier* (FTIR)

Os espectros da região do infravermelho, no modo transmitância, foram obtidos em espectrofotômetro FT-IR (espectrometro Bomem MB Series-B102), na faixa espectral de 4000 a 400 cm^{-1} . Para leitura no equipamento foram confeccionadas pastilhas de brometo de potássio (KBr) contendo 10% (cerca de 1 mg) das amostras de AgNPs previamente liofilizadas, a compactação foi realizada em prensa hidráulica com molde cilíndrico.

Energia Dispersiva de Raios-X (EDX)

A composição elementar das AgNPs liofilizadas foi determinada em Espectrômetro de Microfluorescência de Raios-X (micro EDX1300, Shimadzu) em cinco pontos da amostra utilizando tensão de aceleração de 15 e 50 kV e contagem de tempo de 200 segundos.

Espectrometria de Emissão de Plasma (ICP)

A técnica de ICP foi utilizada para determinar a quantidade de prata na solução de AgNPs. A análise foi realizada no espectrômetro de emissão de plasma (PerkinElmer, Optima 8000). A curva de calibração para o elemento analisado (Ag) foi construída a partir de venosoluções de nitrato de prata com concentrações variando de 0,1 a 50 mg/L. A solução de AgNPs foi diluída 10 vezes para leitura no equipamento.

Determinação da atividade antimicrobiana das AgNPs

A atividade antimicrobiana das nanopartículas de prata foi realizada frente a *Escherichia coli* (CBAM 0001), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Candida albicans* (DPUA1706) pela técnica de difusão em ágar (Ostrosky et al., 2008). Os cultivos dos micro-organismos teste foram preparados em Ágar Müller-Hinton e ágar Sabouraud, em placa de Petri, para bactérias e leveduras, respectivamente. Como inóculo foi utilizado 100 µL de uma suspensão celular na concentração de 10⁸ CFU/mL para bactérias e 10⁶ CFU/mL para leveduras. De cada solução de AgNPs foram transferidos 100 µL para poços de 8 mm de diâmetro, incluindo os controles itraconazol [50 µg/mL] para leveduras, estreptomicina para bactérias [50 µg/mL] e AgNO₃ [1 mM]. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h para bactérias e 48 h para leveduras. Os halos de inibição foram medidos no reverso da placa com auxílio de uma régua milimétrica.

Determinação da Concentração Mínima Inibitória

A Determinação da Concentração Mínima Inibitória foi realizada de acordo com a metodologia de microdiluição em caldo, descrita no documento M7-A6 e M27-A2 do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) frente a *Escherichia coli* (CBAM 0001), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *S. epidermidis* (CBAM 0293), *Candida albicans* (DPUA1706) e *Trichosporon beigelii* (DPUA 210). O teste foi realizado em triplicata em microplaca de 96 poços contendo meio RPMI (Sigma ®) para crescimento da leveduras (5 X 10⁵ UFC/mL) e caldo Müeller-Hinton para bactérias (5 X 10³ UFC/mL). Concentrações de 0,12 a 58,95 µg/mL de AgNPs foram utilizadas para a inibição dos micro-organismos. E como controle positivo foi utilizado itraconazol (100 µg/mL) para leveduras e estreptomicina (100 µg/mL) para bactérias. Os controles de crescimento dos micro-organismos e esterilização do meio de cultura e das suspensões de AgNPs também foram realizados.

A Concentração Mínima Inibitória foi determinada visualmente após 24 h de incubação a 37 °C para bactérias e 48 h para leveduras utilizando-se o revelador *Alamar Blue*® (10% v/v).

Determinação de citotoxicidade *in vitro*

Para o ensaio de citotoxicidade foram utilizados fibroblastos humanos (MRC5) mantidos no meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e Penicilina 1% (p/v). As células foram mantidas em estufa com injeção de 5% de CO₂, a 37 °C. A citotoxicidade foi avaliada pelo método do *Alamar Blue* (Ahmed et al., 1994). As células foram inoculadas na concentração de 0,5 x 10⁴ células por poço, em placas de 96 poços e mantidas a 37 °C, com 5% de CO₂. Após 24 horas, as células foram tratadas na concentração de 100 µg/mL de AgNPs liofilizadas durante 72 horas. Como controle positivo foi utilizada a doxorrubicina (20 µM ou 34 µg/mL) e como controle negativo DMSO (0,01%, v/v). Após adição do *Alamar Blue*® (0,4% v/v) a fluorescência foi medida a 465 nm e 540 nm no leitor de microplaca (DTX800 Beckman e Coulter). Os experimentos foram realizados em triplicata. As imagens foram capturadas por meio do programa Zen 2 da Carl Zeiss Microscópio GmbH Company® e os dados foram analisados no programa GraphPad prism 6.0.

Síntese de microesfera de alginato

A síntese das microesferas de alginato foi realizada por coacervação complexa em um único estágio de acordo com a metodologia adaptada de Kleinubing et al. (2014) e Chaodao et al. (2017), utilizando AgNPs mediada por *A. flavo-furcatis*. Na elaboração das microesferas 50 mL de uma solução de alginato de sódio 1,75% (m/v) foi gotejada lentamente com uma seringa a partir de uma altura de 30 cm em uma solução de cloreto de cálcio 2,0% (m/v), sob agitação constante. Após a síntese, as microesferas foram lavadas com água ultra pura e desidratadas em dessecador por 76 h. A incorporação das AgNPs nas microesferas foi realizada *in situ*, na qual a solução de AgNPs foi utilizada como solvente do alginato de sódio, e *ex situ* onde as microesferas foram imersas em uma solução de AgNPs até completa absorção.

Caracterização das microesferas de alginato de sódio

As microesferas foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura em um equipamento LEO Electron Microscopy/Oxford (Cambridge, Inglaterra) modelo Leo 440i,

utilizando aceleração de 10 kV. As amostras foram posicionadas em fita metálica adesiva de dupla face e colocadas sobre suporte metálico cilíndrico. As imagens foram obtidas após metalização da amostra no equipamento Sputter Coater EMITECH, Modelo: K450 (Kent, Reino Unido) com uma fina camada de ouro/paládio (200 Å).

Atividade antimicrobiana da microesfera de alginato

Aproximadamente um grama das microesferas foram utilizadas para realização do ensaio antimicrobiano contra os micro-organismos *Escherichia coli* (CBAM 0001), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Candida albicans* (DPUA1706) e *Trichosporon beigeli* (DPUA 210). em triplicata pela técnica de difusão em ágar (Ostrosky et al., 2008). Os cultivos dos micro-organismos teste foram preparados em Ágar Müller-Hinton e ágar Sabouraud, em placa de Petri, para bactérias e leveduras, respectivamente. Como inóculo foi utilizado 100 µL de uma suspensão celular de concentração semelhante à escala de *McFarland* 0,5. Foram utilizados como controles itraconazol (50 µg/mL) para leveduras e estreptomicina (50 µg/mL) para bactérias. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h para bactérias e 48 h para leveduras. Os halos de inibição foram medidos no reverso da placa com auxílio de uma régua milimétrica.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Biossíntese de AgNPs

A síntese de AgNPs mediada por *A. flavo-furcatis* foi verificada pela alteração da coloração do extrato micelial aquoso de amarelo para marrom (Figura 1). Não houve formação de agregados e nem mudança na intensidade de coloração após 96 h, dados que indicam a manutenção das partículas em dispersão na solução. A mudança de cor foi devido ao efeito de ressonância plasmônica de superfície localizada (LSPR) e redução da AgNO_3 (Li et al., 2012). LSPR se refere à oscilação coletiva dos elétrons livres nas nanopartículas metálicas ao interagir com a radiação eletromagnética (Cao et al., 2011; Gonzáles et al., 2014; Al Juraifani and Ghazwani, 2015).

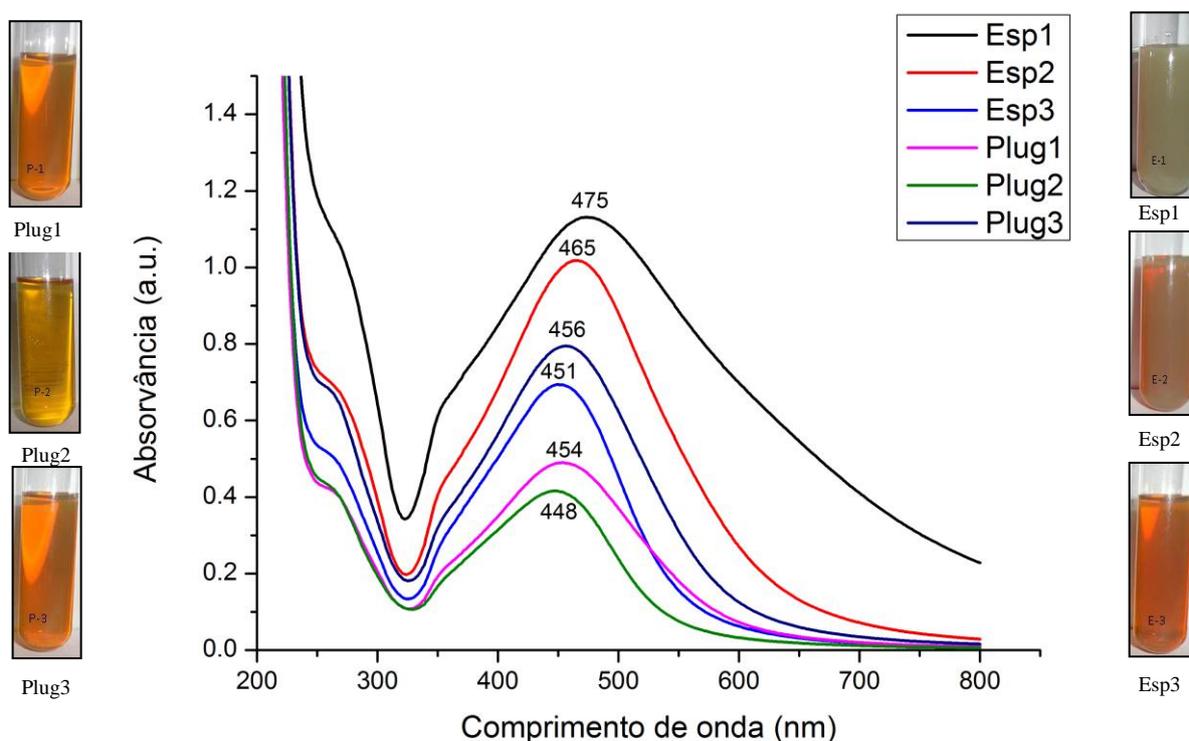


Figura 1. Espectro de absorção de UV-Vis das AgNPs biossintetizadas pelo extrato aquoso da biomassa de *Aspergillus flavo-furcatis* DPUA 1451 após 96 h de reação.

O perfil dos espectros de absorção das AgNPs obtidas após inóculo de esporo (Esp) foi significativamente diferente do perfil das AgNPs obtidas após inóculo de disco micelial (Plug) (ESP: Abs = 0,96; comprimento de onda = 530,33 nm e Plug: Abs 0,57; comprimento de onda = 452 nm) provavelmente devido a interações diferenciadas entre os íons de prata e as moléculas presentes nos diferentes extratos miceliais. Este resultado indica que o tipo de inóculo utilizado para produção da biomassa micelial influencia a síntese de AgNPs. Banerjee and Das (2013) estudando a interação das AgNPs com proteínas concluíram que o perfil da banda plasmônica de superfície assim como o tamanho e as propriedades de agregação das mesmas depende do tipo e da concentração de proteínas.

Caracterização das AgNPs

Determinação de diâmetro hidrodinâmico das AgNPs e potencial zeta das soluções coloidais.

O potencial zeta das AgNPs mediada por *A. flavo-furcatis* variou -22,8 a -29,7 mv (Tabela 1), sugerindo que AgNPs tem uma elevada repulsão eletrostática, característica que contribui para sua estabilização pois, segundo Roy et al. (2013), partículas em suspensão com grande potencial zeta negativo ou positivo tendem a se repelir e não formam agregados.

O diâmetro hidrodinâmico das AgNPs de *A. flavo-furcatis* medido por DLS variou de 61,99 a 124,4 nm (Tabela 1) confirmando que houve formação de partículas dentro da dimensão de nanoescala (1-100 nm) na maioria das suspensões. O índice de polidispersividade (PDI) variou de 0,251 a 0,295 confirmando que as suspensões de AgNPs são monodispersas pois está dentro do intervalo definido de 0,01 a 0,7 para partículas monodispersas (Honary et al., 2013; Tarafdar and Raliya, 2013).

Tabela 1. Diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta das suspensões de AgNPs.

Amostras	Size (nm)	PDI	Potencial Zeta (mv)
AgNP-Esp-1	124,4	0,295	-22,8
AgNP- Esp-2	81,71	0,266	-29,7
AgNP- Esp-3	71,13	0,283	-24,8
AgNP-PLUG-1	71,14	0,257	-26,6
AgNP- PLUG-2	61,99	0,251	-28,5
AgNP- PLUG-3	70,65	0,270	-29,3

Análises de Microscopia Eletrônica de Transmissão

As imagens de microscopia eletrônica de transmissão (Figura 2) mostraram que as AgNPs sintetizadas por *A. flavo-furcatis* tem predominantemente forma arredondada e em menor frequência triangular, com tamanho médio de 80,17 nm. Além disso, foi observada a formação de uma fina camada em volta das nanopartículas que pode está contribuindo para a estabilidade das mesmas.

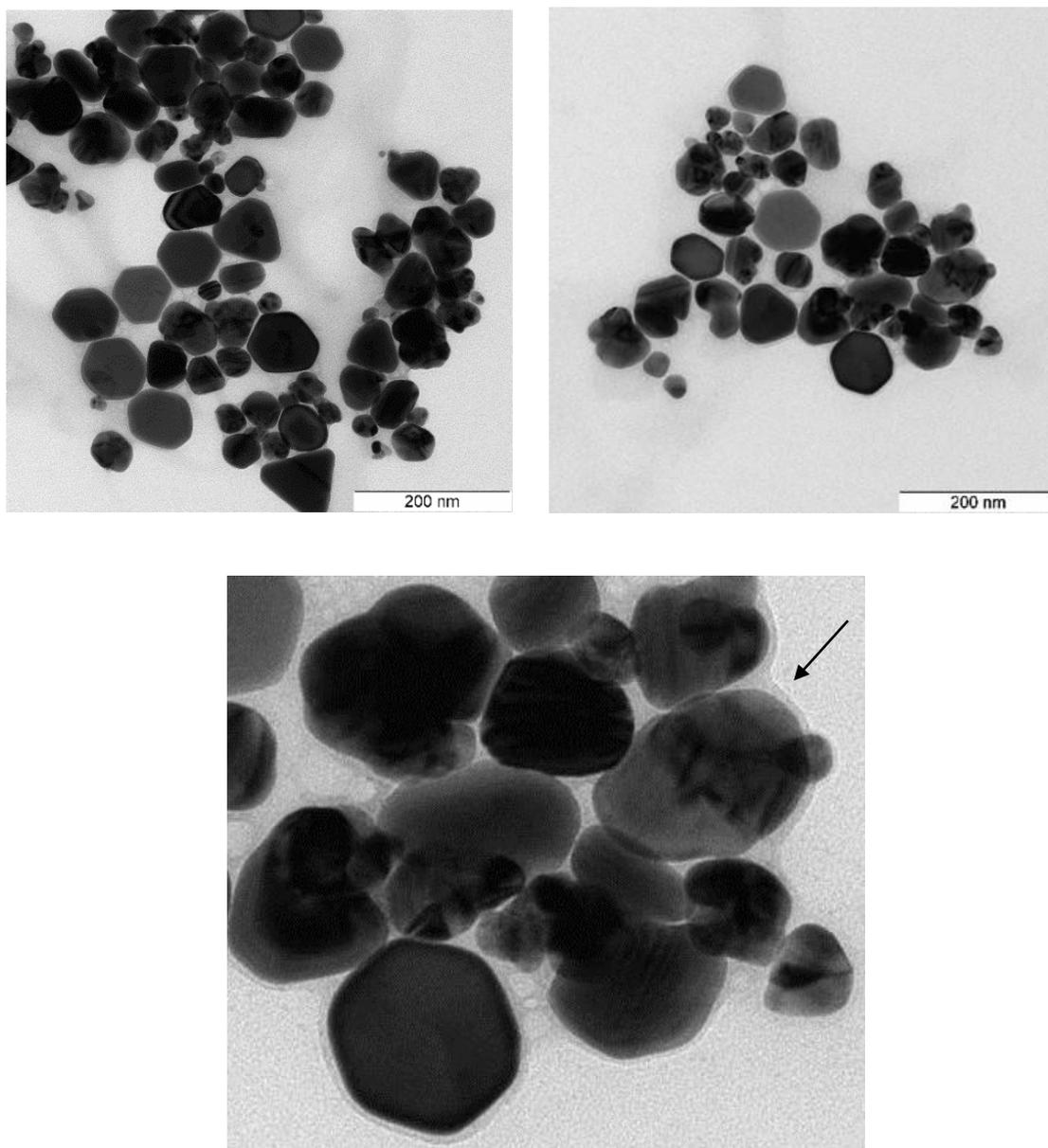


Figura 2. Microscopia eletrônica de transmissão das AgNPs biossintetizada pelo extrato aquoso da biomassa de *Aspergillus flavo-furcatis*. Seta destacando a formação de uma camada em volta das nanopartículas.

Na literatura já foram reportadas nanopartículas mediadas por espécies do gênero *Aspergillus* com tamanho mínimo de 1 e máximo de 140 nm (Sagar and Ashok, 2012; Klalil, 2013; Roy and Das, 2015). Entretanto, a mediação da síntese de AgNPs por *A. flavo-furcatis* ainda não foi relatada na literatura.

Análise de difração de raios-X (DRX)

O padrão DRX obtido das AgNPs sintetizadas mostra a natureza cristalina da amostra e confirma a presença de prata pura na solução de nanopartículas analisada. É possível observar no espectro de difração de raios-X (Figura 3), a formação de cinco picos distintos a $37,97^\circ$, $44,29^\circ$, $64,66^\circ$, $77,46^\circ$ e $81,44^\circ$ correspondente aos (111), (200), (220), (311) e (222) plano de face cúbica centrada (fcc). Esses planos correspondem às faces cúbicas centradas (fcc) da nanopartículas de Ag° (Crystal Structure Database-ICSD/Code 64,994). A presença destes cinco planos cristalinos confirma a formação de prata metálica na suspensão de AgNPs.

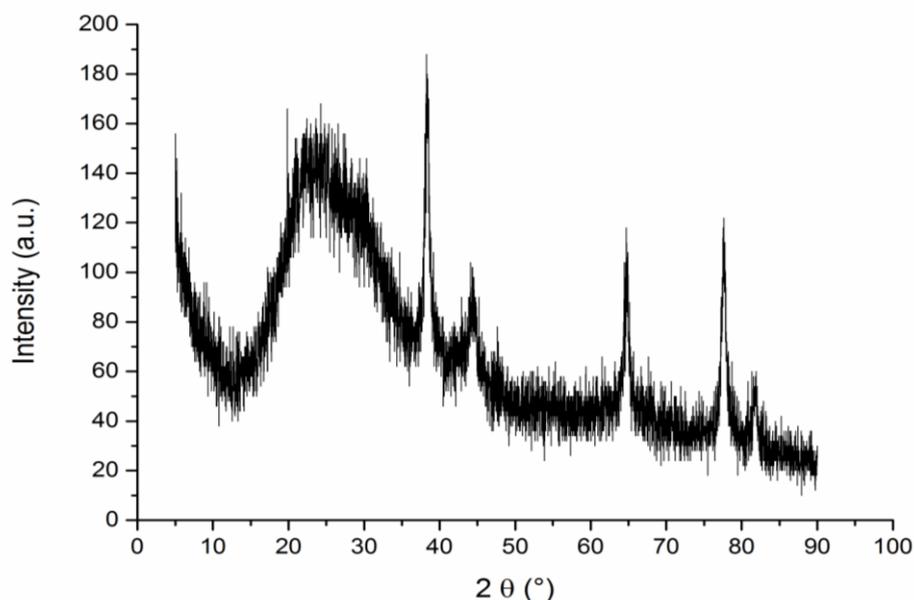


Figura 3. Padrão de DRX de AgNPs biossintetizadas pelo extrato aquoso da biomassa de *Aspergillus flavo-furcatis*.

Análises de Espectroscopia de Infra-Vermelho com Transformada de *Fourier* (FTIR)

Os modos vibracionais presentes nas AgNPs biosintetizadas por *A. flavo-furcatis* foram analisadas por FTIR. O espectro obtido apresentou 11 picos distintos (Figura 4), destes o pico 3405 cm^{-1} está relacionado com energia de vibração de amidas primária e secundária de proteínas. E o pico 1650 está relacionado com a energia de vibração da carbonila e, é atribuído a ligação amida I da proteína. Esses resultados corroboram com estudos de Saravanan (2010), El-Aziz and Arm (2012), Phanjom and Ahmed (2015). A análise espectral revelou a presença de grupos funcionais de aminoácidos e proteínas, presentes no extrato aquoso da biomassa de *A. flavo-furcatis* que podem estar participando da biossíntese de AgNPs.

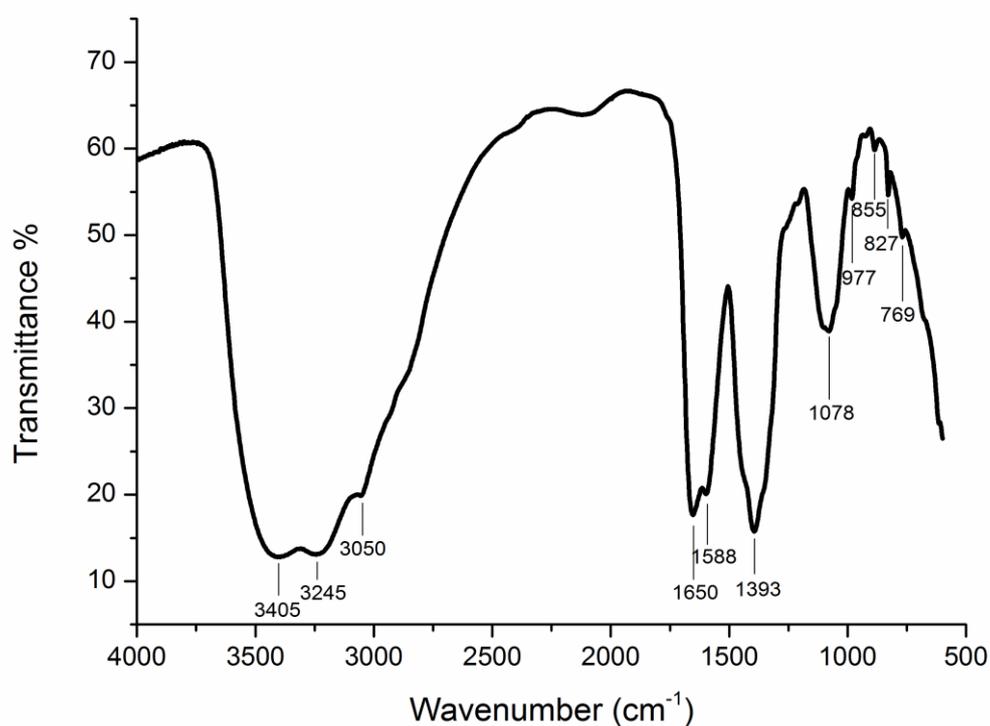


Figura 4. Espectros de FTIR de AgNPs biosintetizadas pelo extrato aquoso da biomassa de *Aspergillus flavo-furcatis*.

Energia dispersiva de raios-X (EDX)

A análise do espectro de EDX revelou um forte sinal na região próxima de 3,0 KeV que corresponde ao pico do elemento prata (Pereira et al., 2014; Elgorban et al., 2016). Na figura 5 foi possível observar três picos: 3,00 keV, 3.19 keV e 3,37 Kev que correspondem às energias de ligação de AgLa, AgLb1 e AgLb2, respectivamente. Os três picos destacados compõem o perfil de absorção óptica do elemento prata indicando que as AgNPs mediadas por *A. flavo-furcatis* são de elevada pureza.

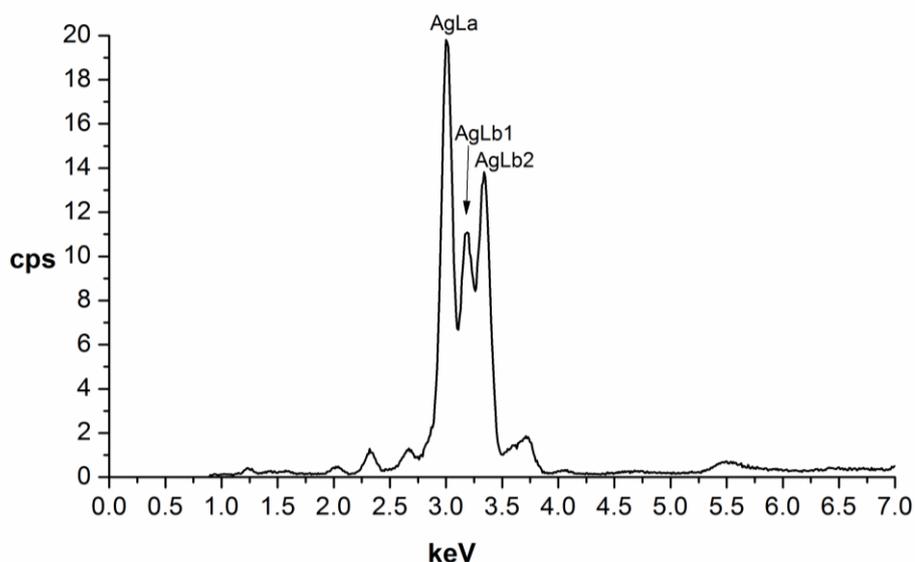


Figura 5. Espectro de FTIR das AgNPs biossintetizadas pelo extrato aquoso da biomassa de *Aspergillus flavo-furcatis*.

Espectrometria de Emissão de Plasma (ICP-OES)

As análises de espectrometria de emissão de plasma determinaram que a concentração das suspensões de AgNPs obtida após a biossíntese por *A. flavo-furcatis* foram variáveis, entretanto não houve diferença significativa quando analisada no teste T (intervalo de confiança 95%). As AgNPs obtidas com inóculo de esporos (1×10^6 esporos/mL de meio) apresentaram uma concentração média de prata igual a $11,45 \pm 1,1$ mg/mL enquanto que a concentração média das AgNPs obtidas quando utilizado o inóculo de *plugs* (10 *plugs* de 5 cm de diâmetro) foi igual a $13,53 \pm 0,94$ mg/mL (Tabela 2).

Tabela 2. Concentração de prata das suspensões de AgNPs biossintetizadas pelo extrato aquoso da biomassa de *Aspergillus flavo-furcatis*.

Suspensões de nanopartículas	Concentração de Ag [µg/mL]
AgNP-Esp-1	10,22
AgNP- Esp-2	11,79
AgNP- Esp-3	12,34
AgNP-PLUG-1	13,87
AgNP- PLUG-2	14,25
AgNP- PLUG-3	12,47

Atividade antimicrobiana das AgNPs

No teste preliminar pelo método de difusão em ágar foram avaliadas AgNPs oriundas da síntese do extrato micelial obtido no bioprocesso utilizando como inóculo: suspensão de esporos (Esp-1, Esp-2 e Esp-3) e disco micelial (Plug-1, Plug-2, Plug-3). *S. aureus* apresentou resistência a todas as AgNPs testadas, entretanto a *E. coli* e *C. albicans* foram suscetíveis a maioria das AgNPs biossintetizadas por *A. flavo-furcatis*.

Tabela 3. Atividade antimicrobiana das AgNPs biossintetizadas pelo extrato aquoso da biomassa de *Aspergillus flavo-furcatis*.

Nanopartículas de Prata	Micro-organismos teste (halos em mm)		
	<i>Escherichia coli</i> (CBAM 0001)	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	<i>Candida albicans</i> (DPUA 1706)
AgNP-Esp-1	0,00	0,00	28,00±1,00 ^a
AgNP- Esp-2	12,20±0,27 ^d	0,00	24,47±0,50 ^b
AgNP- Esp-3	15,00±0,50 ^c	0,00	18,70±0,00 ^c
AgNP-PLUG-1	18,80±0,29 ^b	0,00	18,70±0,25 ^c
AgNP- PLUG-2	21,00±0,00 ^a	0,00	16,30±0,25 ^d
AgNP- PLUG-3	18,73±0,25 ^b	0,00	17,70±0,25 ^{c,d}

Médias seguidas de letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey (p < 0,05).

As AgNPs mais efetivas para inibição do crescimento de *C. albicans* foi AgNPs-Esp1 promovendo halo de 28,00 mm porém esse efeito não foi observado nas bactérias testadas. Para *E. coli* a AgNPs mais efetiva foi AgNP-PLUG-2, promovendo halo de inibição de 21,00 mm (Tabela 3).

Nenhuma das AgNPs inibiu o crescimento de *S. aureus*, provavelmente pelo tamanho superior das AgNPs produzidas por *Aspergillus* associada à difícil interação dessas moléculas com a parede celular de bactérias Gram positivas. Fayaz et al. (2010) estudando a interação de AgNPs em bactérias concluíram que tais moléculas apresentaram um efeito menos significativo em bactérias Gram positivas do que em Gram negativas, devido a presença de uma camada grossa de peptidoglicano (~20-80 nm) que forma uma estrutura rígida tridimensional. Esta estrutura dificulta a ancoragem e a penetração das AgNPs.

Concentração Mínima Inibitória das AgNPs

A Concentração Mínima Inibitória determinada neste estudo foi considerada como a menor concentração da solução de AgNPs onde não ocorreu o crescimento dos micro-organismos teste.

A CMI das seis suspensões de AgNPs variou de 5,11 a 0,11 µg/mL. Dentre estes valores, as amostras de AgNPs que expressaram a menor CMI para *T. beigeli* e *C. albicans* foi 0,11 µg/mL e 0,22 µg/mL, respectivamente. Já para bactérias foram obtidos os seguintes CMIs: 1,73 µg/mL para *E.coli*; 1,53 µg/mL para *S. aureus* e 0,87 µg/mL para *S. epidermidis*. Resultados semelhantes foram obtidos por Monteiro et al. (2011) com AgNPs coloidal frente a duas linhagens de *C. albicans* (MIC = 0,8-1.6 µg/mL) e por Xue et al. (2016) com AgNPs mediadas por *Arthroderma fulvum* (CMI=0,5 µg/mL).

Tabela 4. Concentração mínima inibitória (CMI) das suspensões de AgNPs biossintetizadas pelo extrato aquoso da biomassa de *Aspergillus flavo-furcatis*.

Micro-organismos teste	CMI AgNPs-E1 (µg/mL)	CMI AgNPs-E2 (µg/mL)	CMI AgNPs-E3 (µg/mL)	CMI AgNPs-P1 (µg/mL)	CMI AgNPs-P2 (µg/mL)	CMI AgNPs-P3 (µg/mL)
<i>E. coli</i> (CBAM 0001)	5,11±0,00 ^b	5,89±0,00 ^a	3,09±0,00 ^c	1,73±0,00 ^e	1,78±0,00 ^d	3,12±0,00 ^c
<i>S. aureus</i> (CBAM0001)	5,11±0,00 ^b	5,89±0,00 ^a	3,09±0,00 ^c	1,73±0,00 ^d	0,89±0,00 ^f	1,56±0,00 ^e
<i>S.epidermidis</i> (CBAM 0293)	2,56±0,00 ^b	2,95±0,00 ^a	1,54±0,00 ^c	0,87±0,00 ^d	0,89±0,00 ^d	1,56±0,00 ^c
<i>C. albicans</i> (DPUA 1706)	1,28±0,00 ^b	1,47±0,00 ^a	0,77±0,00 ^c	0,22±0,00 ^e	0,22±0,00 ^e	0,39±0,00 ^d
<i>T. beigeli</i> (DPUA 210)	2,56±0,00 ^a	1,47±0,00 ^b	0,77±0,00 ^c	0,11±0,00 ^e	0,11±0,00 ^e	0,39±0,00 ^d

Médias seguidas de letras distintas, na mesma linha, diferem entre si pelo teste de Games-Howell (p=0,05).

Estes dados revelam que as AgNPs produzidas por *A. flavo-furcatis* são mais eficientes como antifúngico, pois, nas condições do experimento *in vitro* foi necessária uma quantidade menor de AgNPs para inibir o crescimento das leveduras quando comparado com inibição das bactérias.

Além disso, foi observada uma relação entre tamanho da AgNPs e concentração de prata com a atividade antimicrobiana, pois as duas dispersões de AgNPs (AgNPs-Plug1 e AgNPs-Plug2) que apresentaram menor tamanho e maior concentração de prata foram as mais eficientes como antimicrobiano (Tabela 4). Dessa forma quanto menor o tamanho das AgNPs e maior a concentração de Ag mais efetiva é a ação antimicrobiana. Esse resultado corrobora com a pesquisa de Martinez-Gutierrez et al. (2010) na qual a diminuição do tamanho das AgNPs de 29 para 20-25 nm aumentou consideravelmente a atividade antimicrobiana. Ammar and El-Desouky (2015) também concluíram que AgNPs com maior nível de concentração de Ag e menor tamanho têm maior potencial para efeitos inibitórios.

Citotoxicidade das AgNPs

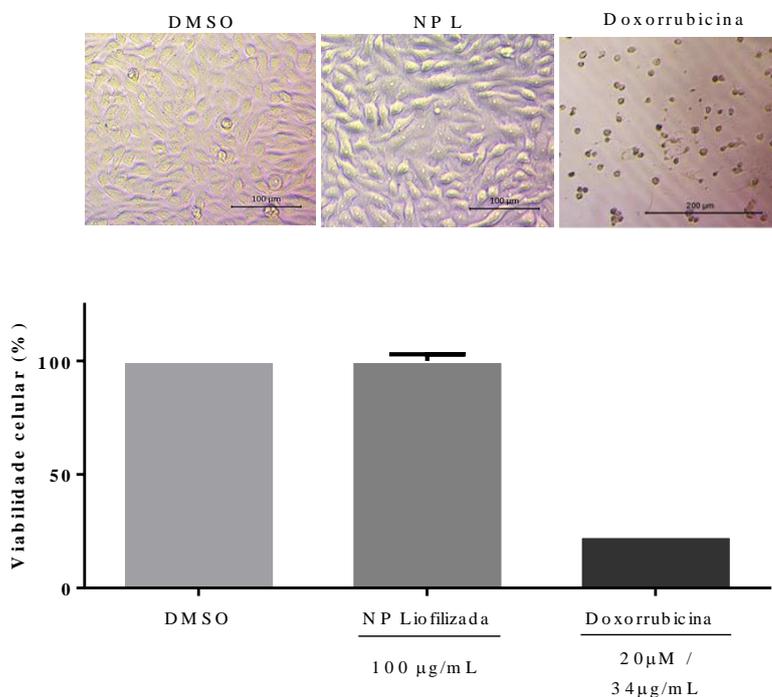


Figura 6. Citotoxicidade das AgNPs biosintetizadas pelo extrato aquoso da biomassa de *Aspergillus flavo-furcatis* contra fibroblastos humanos MRC5 após 72 h de tratamento.

No teste de citotoxicidade após 72 h de tratamento com as AgNPs (100 µg/mL) a viabilidade celular da linhagem MRC5 foi igual a 100% e as células não apresentaram nenhuma mudança morfológicas em comparação com o controle negativo (Dimethyl Sulfoxide [DMSO]). O Controle positivo (doxorubicina) apresentou 23% de viabilidade celular quando testado na concentração de 34 µg/ mL (Figura 6). Esses resultados mostram que a suspensão de AgNPs biossintetizada por *A. flavo-furcatis* DPUA 1451 não é tóxica segundo metodologia de Ahmed et al. (1994).

Morfologia da microesfera de alginato

As imagens obtidas no MEV (Figura 7) mostram a morfologia das microesferas de alginato contendo AgNPs obtidas após síntese por coacervação complexa em cloreto de cálcio.

As microesferas apresentam tamanho aproximado de 950 µm com formato circular, topografia ligeiramente irregular e presença de fissuras em sua superfície. Observa-se claramente que a topografia das microesferas obtidas pelo método *ex situ* de incorporação de AgNPs (7B) apresenta fissuras maiores e mais profundas do que as microesferas obtidas pelo método *in situ* (7A).

A presença de fissuras na forma de canal nas microesferas também foi observada por Zhang et al. (2011) e Kleinubing et al. (2014), os quais destacaram que os canais formados em partículas ou micropartículas podem servir como facilitadores de liberação rápida de drogas (efeito “burst”) para o meio externo. Provavelmente o método de incorporação das AgNPs nas microesferas (*ex situ*) contribuiu para formação de fissuras mais profundas, pois nesse método as microesferas absorveram a solução de AgNPs até sua capacidade máxima condição que pode ter alterado sua estrutura.

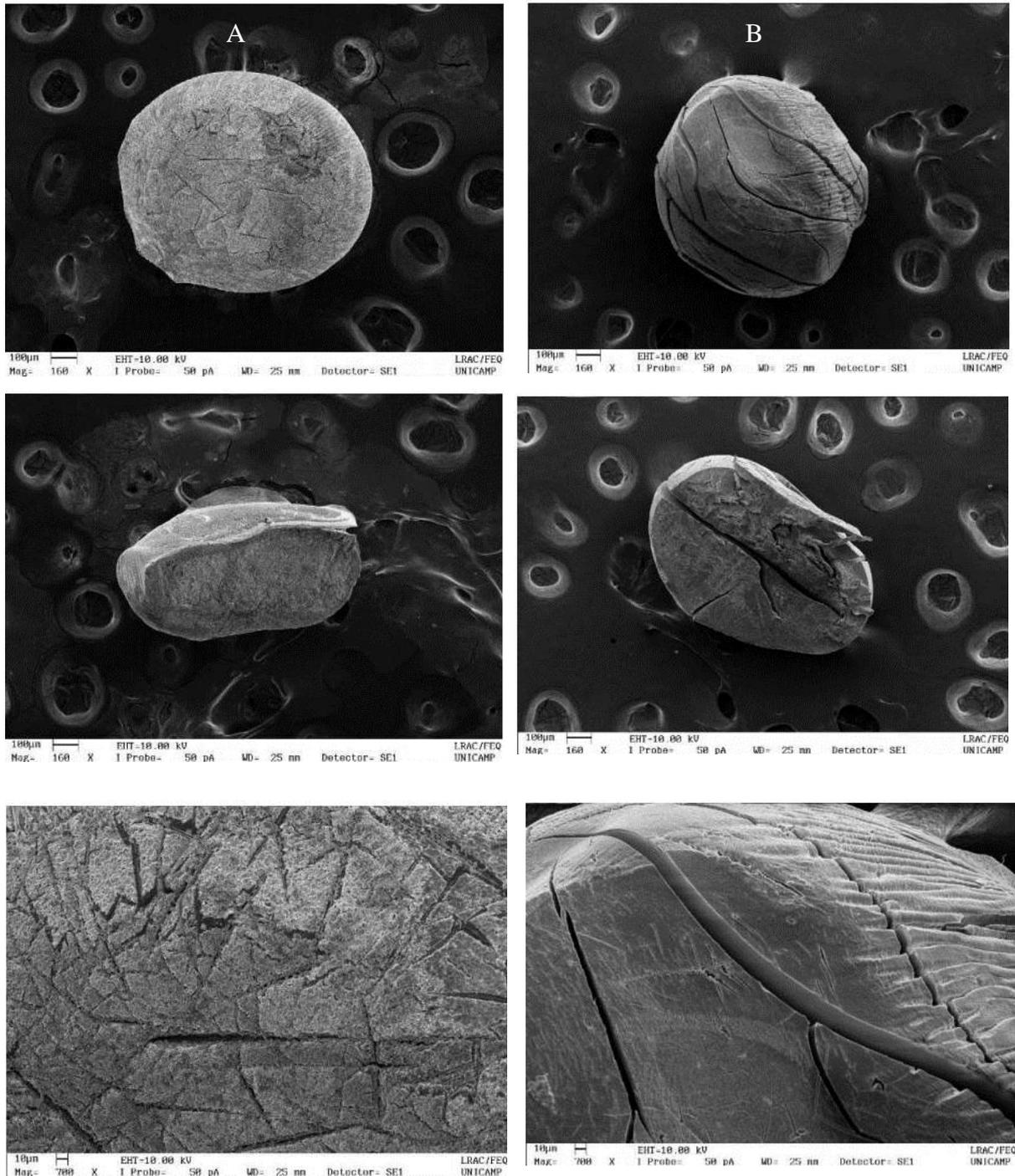


Figura 7. Micrografia eletrônica das microsferas de alginato obtidas em Microscópio Eletrônico de Varredura (LEO Electron Microscopy/Oxford) com aumento de 100 e 10 µm. (A) microsfera incorporada com AgNPs pelo método *in situ*; (B) microsfera incorporada com AgNPs pelo método *ex situ*.

Atividade antimicrobiana das microesferas de alginato

O resultado da atividade antimicrobiana das microesferas de alginato incorporadas com AgNPs pelo método *in situ* e *ex situ* frente a quatro micro-organismos teste está apresentado na tabela 5. Todas as microesferas inibiram o crescimento dos micro-organismos testados com exceção das microesferas produzidas pelo método *ex situ* (M.E.E.) frente a *T. beigeli*. As microesferas incorporadas com AgNPs pelo método *in situ* (M.E.I.) foram significativamente ($p < 0,05$) mais eficientes na inibição dos micro-organismos testados.

Tabela 5. Atividade antimicrobiana das AgNPs biossintetizadas pelo extrato aquoso da biomassa de *Aspergillus flavo-furcatis* imobilizadas com alginato de cálcio

Microesferas de Alginato	Micro-organismos teste (halos em mm)			
	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	<i>Escherichia coli</i> (CBAM 0001)	<i>Candida albicans</i> (DPUA1706)	<i>Trichosporon beigeli</i> (DPUA 210)
M.E.I.	26,33±0,58 ^a	26,00±1,15 ^a	31,33±0,57 ^a	21,0±1,0 ^a
M.E.E.	20,33±0,58 ^b	13,67±1,15 ^b	20,00±0,00 ^b	0,00 ^b

M.E.I. = microesferas produzidas pelo método *in situ*

M.E.E. = microesferas produzidas pelo método *ex situ*

Médias seguidas de letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os maiores halos de inibição obtidos frente as M.E.I. foram: 26,34 mm para *S. aureus*; 26,00 mm para *E. coli*; 31,33 mm para *C. albicans* e 21,00 mm para *T. beigeli* (Figuras 8 e 9). As microesferas de alginato incorporadas com AgNPs foram mais eficientes na inibição das leveduras testadas quando comparadas com as bactérias.

A imobilização das AgNPs biossintetizadas por *A. flavo-furcatis* em matrizes de alginato de sódio potencializou o efeito antimicrobiano dessas moléculas nos testes *in vitro* pelo método de difusão em ágar.

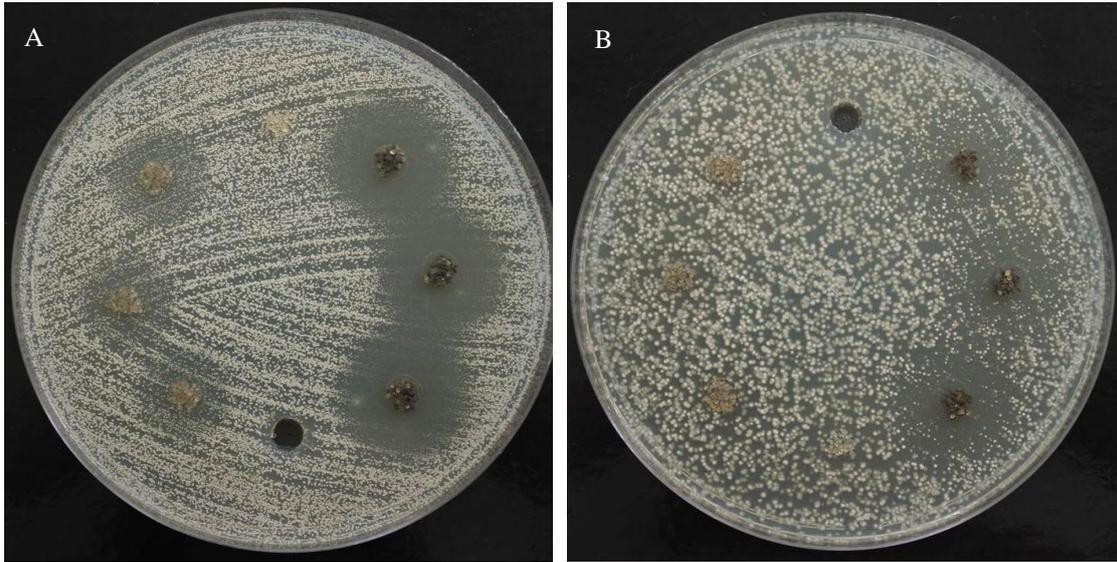


Figura 8. Atividade antifúngica das microsferas: (A) *Candida albicans* e (B) *Trichosporon beigelli*. M.E.E. a direita e M.E.I. a esquerda das placas de Petri.

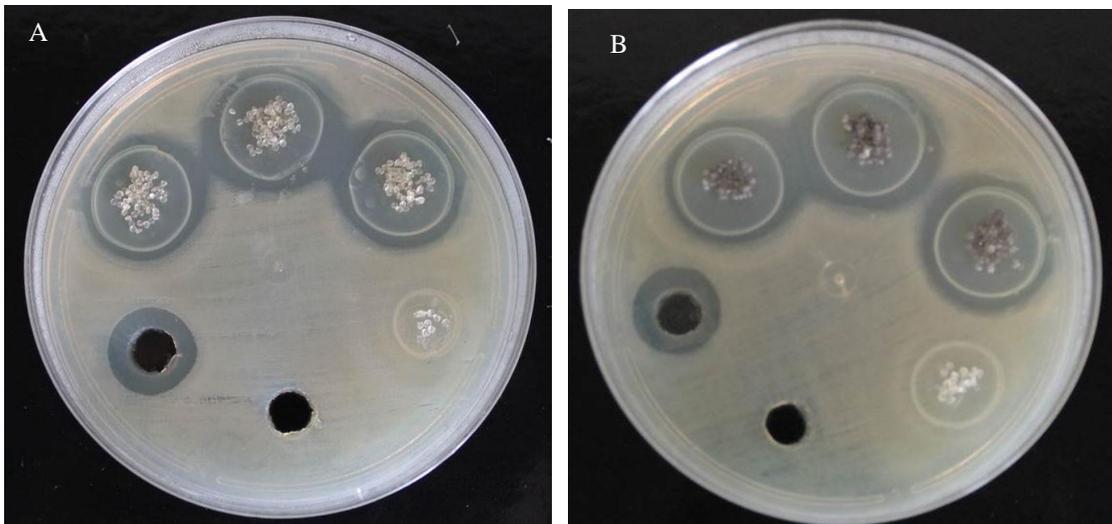


Figura 9. Atividade antibacteriana das microsferas frente a *Escherichia coli*: (A) M.E.E e (B) M.E.I.

CONCLUSÃO

A linhagem de *Aspergillus flavo-furcatis* selecionada (DPUA 1451) é capaz de reduzir os íons de Ag e dessa forma mediar a síntese de nanopartículas de prata estáveis, monodispersas, com propriedades antimicrobianas e não tóxicas quando testadas *in vitro*. A incorporação de AgNPs em microesferas de alginato potencializou o efeito antimicrobiano dessas moléculas, principalmente o efeito anti-levedura, possibilitando a utilização desse bionanocompósito para finalidades assépticas na área médica, cosmética, farmacéutica e ambiental.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbasi E, Milani M, Fekri Aval S, Kouhi M, Akbarzadeh A, Tayefi Nasrabadi H, et al. Silver nanoparticles: Synthesis methods, bio-applications and properties. *Crit Rev Microbiol* . 2016;42(2):173–80.
- Ahmed SA, Gogal RM, Walsh J. E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes : an alternative to [³H] thymidine incorporation assay. *Journal of Immunological Methods*. 1994; v. 1759, n. 703, p. 211–24.
- Al juraifanir AAA, Ghazwani AA. Biosynthesis of silver nanoparticles by *Aspergillus niger* , *Fusarium oxysporum* and *Alternaria solani*. *African J Biotechnol*. 2015;14(26):2170–4.
- Ammar HAM, T.A. El-Desouky. Green synthesis of nanosilver particles by *Aspergillus terreus* HA1N and *Penicillium expansum* HA2N and its antifungal activity against mycotoxigenic fungi. *J Appl Microbiol*. 2016;121:89–100.
- Andrade PF. Preparação e caracterização de nanopartículas de prata e de nanocompósitos poliméricos antimicrobianos. Tese de doutorado - Instituto de Química da UNICAMP- Universidade Estadual de Campinas. Campinas-SP, 147p. 2013.
- Antunes FS. Síntese, caracterização e avaliação do potencial antimicrobiano de nanopartículas de prata em tintas e vernizes acrílicos à base d'água. Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2013.
- Banerjee V, Das KP. Interaction of silver nanoparticles with proteins: A characteristic protein concentration dependent profile of SPR signal. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* . 2013;111:71–9.
- Barabadi H, Honary S, Ebrahimi P, Mohammadi MA, Naghibi F. Microbial mediated preparation , characterization and optimization of gold nanoparticles. *Brazilian J Microbiol*. 2014;45(4):1493–501.
- CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 (ISBN 1-56238-486-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.
- CLSI. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras; Norma Aprovada—Segunda Edição. NCCLS document M27-A2 [ISBN 1-56238-469-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos, 2002.
- Durán N, Marcato PD, Durán M, Yadav A, Gade A, Rai M. Mechanistic aspects in the biogenic synthesis of extracellular metal nanoparticles by peptides, bacteria, fungi, and plants. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2011;90(5):1609–24.

- Durán N, Marcato PD, Souza GIH, Alves OL, Esposito E. Antibacterial effect of silver nanoparticles produced by fungal process on textile fabrics and their effluent treatment. *J Biomed Nanotechnol.* 2007;3(2):203–8.
- Durán N, Nakazato G, Seabra AB. Antimicrobial activity of biogenic silver nanoparticles, and silver chloride nanoparticles: an overview and comments. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2016;100(15):6555–70.
- El-Aziz ARMA, Al-Othman MR, Alsohaibani SA, Mahmoud MA, Sayed SRM (2012). Extracellular biosynthesis and characterization of silver nanoparticles using *Aspergillus niger* isolated from Saudi Arabia (strain KSU-12). *Dig J Nanomater Biostructures.* 7(4):1491–1499.
- Elgorban AM, El-Samawaty AE-RM, Yassin MA, Sayed SR, Adil SF, Elhindi KM, et al. Antifungal silver nanoparticles: synthesis, characterization and biological evaluation. *Biotechnol Biotechnol Equip.* 2016;30(1):56–62.
- Fayaz AM, Balaji K, Girilal M, Yadav R, Kalaichelvan PT, Venketesan R. Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med.* 2010;6(1):103–9.
- Freitas MN, Marchetti J. M. Nimesulide PLA microspheres as a potential sustained release system for the treatment of inflammatory diseases. *INT. J. I. Pharm.* 2005; v. 295, n.1-2, p. 201-211.
- González AL, Noguez C, Beránek J, Barnard AS (2014). Size, shape, stability, and color of plasmonic silver nanoparticles. *J Phys Chem C.* 118(17):9128–9136.
- Gúzman MG, Dille J, Godet S. Synthesis of silver nanoparticles by chemical reduction method and their antibacterial activity. *International Journal of Chemical and Biomolecular Engineering.* 2009; v. 2, p. 3.
- Honary S, Barabadi H, Gharaei-fathabad E, Naghibi F. Green Synthesis of Silver Nanoparticles Induced by the Fungus *Penicillium citrinum*. *Trop J Pharm Res.* 2013;12(1):7–11.
- Kleinubing SA, Seraphim DC, Vieira MGA, Canevesi RLS, Da Silva EA, César CL, et al. Gastro-resistant controlled release of OTC encapsulated in alginate/chitosan matrix coated with acryl-EZE® MP in fluidized bed. *J Appl Polym Sci.* 2014;131(12):1–9.
- Kleinubing SA. “Liberação controlada da oxitetraciclina encapsulada em matriz de alginato/quitosana recoberta com Acril-EZE ® MP em leito fluidizado.” Universidade Estadual de Campinas; 2013.
- Li C, Lu J, Li S, Tong Y, Ye B. Synthesis of magnetic microspheres with sodium alginate and activated carbon for removal of methylene blue. *Materials (Basel).* 2017;10(1):1–14.
- Martinez-Gutierrez F, Olive PL, Banuelos A, Orrantia E, Nino N, Sanchez EM, et al. Synthesis, characterization, and evaluation of antimicrobial and cytotoxic effect of silver and titanium nanoparticles. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med.* 2010;6(5):681–8.

Ostrosky EA, Mizumoto MK, Lima MEL, Kaneko TM, Nishikawa SO, Freitas BR. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Brazilian J Pharmacogn.* 2008;18(2):301–7.

Pereira L, Dias N, Carvalho J, Fernandes S, Santos C, Lima N. Synthesis , characterization and antifungal activity of chemically and fungal-produced silver nanoparticles against *Trichophyton rubrum*. *J Appl Microbiol.* 2014;117:1601–13.

Petica A.; Gavrilu, S.; Lungu, M.; Buruntea, N.; Panzaru, C. Colloidal silver solutions with antimicrobial properties. *Materials Science and Engineering B.* v.152, p.22-27, 2008.

Prabhu S, Poulose EK. Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. *Int Nano Lett.* 2012;2(32):1–10.

Rai M, Yadav A, Gade A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnol Adv.* 2009;27(1):76–83.

Roy S, Das TK. A Review on Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using *Aspergillus* species. *Adv Sci Eng Med .* 2015;7(9):729–38.

Roy S, Rukherjee T, Chakraborty S, Das TK. Biosynthesis, characterisation & antifungal activity of silver nanoparticles synthesized by the fungus *Aspergillus foetidus* MTCC8876. *Dig J Nanomater Biostructures.* 2013;8(1):197–205.

Sagar G, Ashok B. Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using *Aspergillus niger* and Its Efficacy Against Human Pathogens. *Eur J Exp Biol.* 2012;2(5):1654–8.

Saravanan M. Biosynthesis and In vitro Studies of Silver Bio- nanoparticles Synthesized from *Aspergillus* species and its Antimicrobial Activity against Multi Drug Resistant Clinical Isolates. *World Acad Sci Eng Technol.* 2010;44:738–41.

Sastry M, Ahmad A, Islam Khan M, Kumar R. Biosynthesis of metal nanoparticles using fungi and actinomycete. *Curr Sci.* 2003;85(2):162–70.

Silva, Taciana A, Andrade, Patrícia F, Segala K, Silva, Larissa SC, Silva, Larissa P, Nista, Silvia VG, et al. Silver nanoparticles biosynthesis and impregnation in cellulose acetate membrane for anti-yeast therapy. *African J Biotechnol .* 2017;16(27):1490–500.

Tarafdar JC, Raliya R. Rapid , Low-Cost , and Ecofriendly Approach for Iron Nanoparticle Synthesis Using *Aspergillus oryzae* TFR9. *J Nanoparticles.* 2013;2013:1–4.

Tran QH, Nguyen VQ, Le A-T. Silver nanoparticles : synthesis , properties , toxicology, applications and perspectives. *Adv Nat Sci Nanosci Nanotechnol.* 2013; 4:1–20.

Vigneshwaran N, Ashtaputre NM, Varadarajan P V., Nachane RP, Paralikar KM, Balasubramanya RH. Biological synthesis of silver nanoparticles using the fungus *Aspergillus flavus*. *Mater Lett.* 2007;61(6):1413–8.

Xue B, He D, Gao S, Wang D, Yokoyama K, Wang L. Biosynthesis of silver nanoparticles by the fungus *Arthroderma fulvum* and its antifungal activity against genera of *Candida*, *Aspergillus* and *Fusarium*. *Int J Nanomedicine*. 2016;11:1899–906.

Zhang X, Yan S, Tyagi RD, Surampalli RY. Synthesis of nanoparticles by microorganisms and their application in enhancing microbiological reaction rates. *Chemosphere* . 2011;82(4):489–94.

Zomorodian K, Pourshahid S, Sadatsharifi A, Mehryar P, Pakshir K, Rahimi MJ, et al. Biosynthesis and characterization of silver nanoparticles by *Aspergillus* species. *Biomed Res Int*. 2016;2016:8–13.

CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados desta pesquisa conduziram às seguintes conclusões:

- As sequências resultantes da amplificação da região ITS2 (Internal Transcribed Spacer Region 2) e parte das subunidades 5,8S e 28S do rDNA foram eficientes para classificação das linhagens nos grupos niger e flavus e identificação a nível de gênero, entretanto para identificação ao nível de espécie essa região do rDNA não foi eficaz.
- Os *Aspergillus* do bioma Amazônico são promissores para utilização em processos de síntese biológica de nanopartículas de prata, pois secretam moléculas que reduzem e promovem a nucleação dos íons de prata dando origem às AgNPs.
- Dos *Aspergillus* selecionados, para as análises de biorredução da prata e síntese de nanopartículas, as linhagens de maior eficiência, nas condições de fermentação empregadas, foram as classificadas no grupo flavus: *Aspergillus flavo-furcatis* e *A. oryzae*.
- A linhagem de *Aspergillus flavo-furcatis* (DPUA 1451) é capaz de reduzir os íons de prata e dessa forma mediar a síntese de nanopartículas de prata estáveis, monodispersas, com propriedades antimicrobianas e não tóxicas quando testadas *in vitro*.
- As suspensões de AgNPs com moléculas de menor tamanho foram mais eficientes contra bactérias enquanto que as AgNPs de maior tamanho foram mais eficientes na inibição de leveduras.
- As AgNPs produzidas por *Aspergillus* apresentam propriedades antimicrobianas relevantes, demonstrando grande potencial para utilização na área médica, farmacêutica e cosmética devido a elevada eficiência e baixo grau de toxicidade.
- A incorporação de AgNPs em membranas nanoestruturas de acetato de celulose aumenta a ação antilevedura das AgNPs, resultando no desenvolvimento de um

nanocompósito com propriedades antifúngicas ampliadas podendo ser utilizado em diversas áreas médicas.

- A incorporação de AgNPs em microesferas de alginato potencializou o efeito antimicrobiano dessas moléculas, principalmente o efeito anti-levedura, possibilitando a utilização desse bionanocompósito para finalidades assépticas na área médica, cosmética, farmacéutica e ambiental.

ANEXOS

Autorização para pesquisa concedida pelo CNPq



Ministério da
Ciência, Tecnologia
e Inovação



Processo	01300.624876/2556-19
Autorização	010720/2014-6
Data da Autuação pelo CNPq	05/12/2014
Data da Autorização	23/12/2014
Validade da Autorização	36 meses
Instituição	Universidade Federal do Amazonas
CNPJ	04.378.626/0001-97
Finalidade	Pesquisa Científica
Projeto	Síntese biogênica associada a processos biotecnológicos para obtenção de nanopartículas com atividade antimicrobiana
Coordenador (a)	Maria Francisca Simas Teixeira
Material Biológico envolvido	Fungi e Eubacteria
Origem do material	Ex situ
Localização da área de coleta	Coleção de Culturas da UFAM
Remessa e/ou Transporte	Não
Sigilo	Reconhecido

Full Length Research Paper

Silver nanoparticles biosynthesis and impregnation in cellulose acetate membrane for anti-yeast therapy

Taciana A. Silva¹, Patrícia F. Andrade², Karen Segala^{2,3}, Larissa S. C. Silva¹, Larissa P. Silva¹, Sílvia V. G. Nista⁴, Lucia H. I. Mei⁴, Nelson Durán^{2,5,6} and Maria F. S. Teixeira^{1*}

¹Parasitology Department, Federal University of Amazonas, Manaus, AM, Brazil. ²Chemistry Institute, University of Campinas, 13083-970, Campinas, SP, Brazil. ³Chemistry Department, Federal University of Amazonas, Manaus-AM, Brazil.

⁴Department of Polymer Technology, University of Campinas, 13083-970, Campinas, SP, Brazil.

⁵Brazilian Nanotechnology National Laboratory (LNNano-CNPq), Campinas, SP, Brazil.

⁶Laboratory of Nanomaterials Synthesis and Biological Interactions (NanoBioSS), Chemistry Institute, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil.

Received 5 April, 2017; Accepted 15 June, 2017

Silver nanoparticles (AgNPs) are nanoforms that express higher antimicrobial potential due to their shape and reduced size. The use of fungi to mediate the synthesis of AgNPs has increased the interest of scientists because of their rapid growth, large-scale cultivation and secretion of non-toxic molecules. The aim of this study was to synthesize AgNPs mediated by *Aspergillus oryzae* DPUA 1624 and evaluate the antimicrobial activity of these molecules incorporated in cellulose acetate nanomembranes (NanoMAC). The synthesis of AgNPs was confirmed by UV-visible spectroscopy and the characterization was performed by dynamic light scattering, transmission electron microscopy, X-ray diffraction, X-ray dispersive energy and advanced spectroscopy and spectroscopy methods. The synthesis of the membrane was done by electro-spinning and its thickness was analyzed in scanning electron microscope. The AgNPs were added to NanoMAC and the antimicrobial effect was evaluated by agar diffusion method against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*. The aqueous extract of *A. oryzae* mediated the synthesis of AgNPs with rounded and some triangular shapes. The diameter and zeta potential of these particles were 61.15 ± 11.45 nm and -28.7 mv, respectively. The NanoMAC with AgNPs showed an increase in antifungal activity of 24.22% when tested against *C. albicans*. This study demonstrated that *A. oryzae* is able to mediate AgNP synthesis with anti-yeast action and the impregnation of AgNPs in acetate cellulose nanomembranes resulted in the development of a more efficient antimicrobial nanocomposite.

Key words: Silver nanoparticles, *Aspergillus oryzae*, cellulose nanofibers, anti-yeast.