

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

FLÁVIA SATIE NOGUTI

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE NANOPARTÍCULAS DE  
PRATA BIOSINTETIZADAS PELO FUNGO *ASPERGILLUS NIGER*

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

TOLEDO

2019

FLÁVIA SATIE NOGUTI

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA BIOSINTETIZADAS PELO FUNGO *ASPERGILLUS NIGER*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial a obtenção do título de Engenheiro de Bioprocessos e Biotecnologia, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientador: Prof. Dr. Renato Eising.

TOLEDO

2019

## TERMO DE APROVAÇÃO

### AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA BIOSINTETIZADAS PELO FUNGO *ASPERGILLUS NIGER*

Por

**FLÁVIA SATIE NOGUTI**

Esse trabalho de conclusão de curso foi apresentado no dia vinte e oito de novembro de dois mil e dezenove, como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel, no Curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Toledo. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo relacionados. Após deliberação, a banca Examinadora considerou o ***trabalho Aprovado***.

---

Prof. Dr. Renato Eising (Orientador)

---

Prof. Dr. Cleverson Busso  
(Membro – Universidade Tecnológica Federal do Paraná)

---

Prof. Dr. Ricardo Schneider  
(Membro – Universidade Tecnológica Federal do Paraná)

## RESUMO

NOGUTI, Flávia Satie. Avaliação da atividade antimicrobiana de nanopartículas de prata biossintetizadas pelo fungo *Aspergillus niger*. 2019 Trabalho de Conclusão de Curso – Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, 2019.

A proposta do trabalho a seguir diz respeito a síntese de nanopartículas de prata através de métodos biológicos, mediada pelo fungo *Aspergillus niger*, já amplamente conhecido pela sua capacidade de promover a redução de alguns metais de maneira esponânea. A biossíntese pode ser dividida em duas etapas, de obtenção das células do fungo e de redução do nitrato de prata. A primeira etapa consistiu no crescimento do fungo em suas condições ideais em meio sólido, seguida pela separação dos esporos e crescimento do fungo em meio líquido, o que resultou no filtrado de células. O filtrado de células foi então usado para a segunda etapa, onde foi feita uma solução com adição de nitrato de prata, que sofreu redução e resultou nas nanopartículas de prata, identificada por uma mudança visível na coloração da solução, de branca turva a tons de marrom. A caracterização das nanopartículas foi feita através de espectroscopia UV-vis e análise em microscopia eletrônica de transmissão, que permitiram observar o formato e o tamanho das nanopartículas obtidas. Para a verificação do efeito bactericida, diferentes colônias de bactérias foram incubadas com a presença de poços contendo diferentes concentrações da suspensão coloidal, resultando na formação de halos conforme a atividade antimicrobiana observada. Os resultados das concentrações obtidos neste trabalho foram parecidos para AgNP1 e AgNP3, apresentando concentrações de prata de  $571,6263 \text{ mgL}^{-1}$  e  $584,3510 \text{ mgL}^{-1}$  respectivamente, enquanto para AgNP2 foi obtida uma concentração de  $406,9420 \text{ mgL}^{-1}$ . Todas as amostras apresentaram bandas entre 400 e 500 nm, como espera-se para nanopartículas de prata, com absorbâncias entre 0,4 e 0,5 abs. O tamanho das nanopartículas biossintetizadas está de acordo com dados observados na literatura, variando de 37,5 a 47,3 nm. Para os testes biológicos, tem-se resultados similares de diâmetro dos halos encontrados no teste de difusão de poços, enquanto a CIM apresentou melhor resultado para a *Clostridium perfringens*, na condição AgNP3, com concentração inibitória mínima de  $36,5220 \text{ mgL}^{-1}$ . Para a CBM, as menores concentrações foram

para a diluição de 12,5% das suspensões, condizendo com os resultados obtidos através da CIM.

**Palavras – chave:** *Aspergillus niger*; Biossíntese; Nanopartículas.

## ABSTRACT

NOGUTI, Flávia Satie. Evaluation of antimicrobial activity of silver nanoparticles biosynthesized by the *Aspergillus niger* fungi. 2019 Final Term – Bioprocess and Biotechnology Engineering. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, 2019.

The following work proposes synthesis of silver nanoparticles through biological methods, mediated through *Aspergillus niger* fungi, an organism widely known for its spontaneous metal reduction capacity. The biosynthesis can be segmented in two major processes, obtention of the fungal cells and silver nitrate reduction. The first process consisted of cultivating the fungus on its optimal conditions, separating the spores originated from the solid culture and growing the fungus in liquid media, resulting in the cell filtrate. The cell filtrate was then used for the second step of this process, adding a silver nitrate solution to the cell filtrate, promoting the nitrate's reduction, originating the silver nanoparticles, observed through a change in the solution's color, from a turbid white to shades of brown. The characterization of the nanoparticles was made through UV-vis spectroscopy and transmission electronic microscopy, methods that allow further analysis of the nanoparticles' shape and size. For the verification of the suspension's anti-bacterial effects, different species of bacteria were submitted to the well plate method, which consists on cultivating the colonies on a Petri plate with wells containing different concentrations of the colloidal suspension, resulting on hollow ring zones around the disks, indicating the anti-microbial activity. In this paper, the obtained results were similar for the AgNP1 and AgNP3 conditions, with silver concentrations equivalent to 571,6263 mgL<sup>-1</sup> and 584,3510 mgL<sup>-1</sup> respectively, while for AgNP2 a concentration of 406,9420 mgL<sup>-1</sup> was obtained. All samples presented bands between 400 and 500 nm on UV-vis spectrophotometry, as expected for silver nanoparticles, with absorbances between 0,4 and 0,5 abs. The biosynthesized nanoparticles' size is compatible with the literature, ranging from 37,5 to 47,3 nm. For the biological tests, there's a similar result on the halo's diameter observed on the well diffusion test, while the MIC presented a better result for *Clostridium perfringens* on AgNP3 conditions, with a minimal inhibitory concentration of 36,5220 mgL<sup>-1</sup>. For MBC, the best concentrations were obtained from the dilutions of 12,5% of the suspensions, matching with the MIC results.

**Key – Words:** *Aspergillus niger*; Biosynthesis; Nanoparticles.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AFM	Microscopia de Forças Atômicas
AgNO <sub>3</sub>	Nitrato de Prata
AgNP	Nanopartícula de Prata
BOD	Incubadora de Demanda Bioquímica de Oxigênio
CIM	Concentração Inibitória Mínima
DMS	Espalhamento Dinâmico de Luz
GC	Glucose-Hidrolisado de Caseína
MH	Mueller-Hinton
M-NP	Nanopartícula Metálica
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Nitrito
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Nitrato
NPs	Nanopartículas
PDA	Ágar Batata Dextrose
SI	Sistema Internacional de Medidas
SPR	Banda de Ressonância de Plasmon de Superfície
TEM	Microscopia de Transmissão Eletrônica
TXRF	Fluorescência de Raios X por Reflexão Total
UV-vis	Espectroscopia de Ultravioleta – Visível



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>11</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>12</b>
2.1 Nanopartículas	12
2.2 Síntese de nanopartículas	14
2.3 <i>Aspergillus niger</i>	18
2.4 Bactérias	20
2.5 Caracterização e propriedades das M-NPs	21
2.6 Atividade antimicrobiana e citotoxicidade das AgNPs	22
<b>3 METODOLOGIA</b>	<b>24</b>
3.1 Material e reagentes	24
3.2 Métodos	25
3.2.1 Preparo dos meios para o cultivo do fungo	25
3.2.2 Preparo das bactérias para a CIM e a CBM	26
3.2.3 Obtenção da biomassa	27
3.2.4 Síntese das Suspensões de AgNPs	28
3.2.8 Caracterização das AgNPs	28
3.2.5 Difusão em poços	29
3.2.6 Verificação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) das AgNPs	30
3.2.7 Verificação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) das AgNPs	31
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>32</b>
4.1 Cultivo do fungo em meio sólido	32
4.2 Biossíntese das AgNPs	33
4.2 Caracterização das AgNPs	35
4.2.1 Espectrofotometria em UV-vis	35
4.2.2 Microscopia de Transmissão Eletrônica	39
4.2.3 Determinação da concentração das AgNPs	42

<b>4.3 Teste de difusão em poços</b>	<b>43</b>
4.3.1 <i>Clostridium perfringens</i> INCQS 00053	43
4.3.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> INCQS 00025	45
4.3.3 <i>Staphylococcus aureus</i> INCQS 00015	46
4.3.4 <i>Escherichia coli</i> INCQS 00033	48
<b>4.4 Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)</b>	<b>49</b>
4.4.1 CIM e CBM para <i>Clostridium perfringens</i> INCQS 00053	50
4.4.2 CIM e CBM para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> INCQS 00025	53
4.4.3 CIM e CBM para <i>Staphylococcus aureus</i> INCQS 00015	56
4.4.3 CIM e CBM para <i>Escherichia coli</i> INCQS 00033	59
4.4.4 Controle CBM	62
<b>5 CONCLUSÃO</b>	<b>63</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>65</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A nanotecnologia é uma importante área de pesquisas atuais, apresentando cada vez mais aplicações em diferentes domínios como a saúde, indústria e tecnologia (SHARMA *et al.*, 2009). A abordagem interdisciplinar desta área, como sugerem Rai e Duran (2011), permite aprimorar os procedimentos ao ampliando a obtenção destes materiais, diminuindo os custos e os impactos ambientais do processo convencional. As nanopartículas metálicas (M-NPs) sintetizadas por maneiras alternativas como a biossíntese se enquadram muito bem neste cenário. Segundo Iravani *et al.* (2013), esta proposta de “síntese verde” normalmente inclui polioxometalatos de valência mista, polissacarídeos, Tollens, métodos biológicos e de radiação que possuem vantagens sobre os métodos convencionais, os quais envolvem reagentes químicos muito mais tóxicos ao meio-ambiente.

De uma maneira geral, o processo de síntese confere às nanopartículas diferentes formas e tamanhos, resultando em diversas aplicações nas mais diferentes áreas tecnológicas (DOPAZO, 2018). Procedimentos feitos com nanopartículas de ouro por Gericke e Pinches (2006), por exemplo, resultaram em diferentes morfologias de nanopartículas (triângulos, hexágonos, esferas e bastões) para diferentes valores de pH (3, 5, 7 e 9) de cultivo do microrganismo. Outros autores como Zewde *et al.* (2016) confirmam propriedades das nanopartículas metálicas em inibir aproximadamente 650 espécies de microrganismos, sendo parte deles organismos resistentes a agentes antibióticos.

O trabalho propõe a síntese de nanopartículas de prata mediada pelo fungo *Aspergillus niger*, e também teve o intuito de verificar a atividade antibacteriana das AgNPs biossintetizadas através do teste de difusão em poços, CIM e CBM. O procedimento foi realizado de maneira extracelular, em uma mistura de filtrado de células do fungo com solução de nitrato de prata, visando uma maneira sustentável de se sintetizar as nanopartículas de prata. Trabalhos como o de Sharma *et al.* (2009) sugerem que uma das maiores problemáticas da síntese de AgNPs pelos métodos convencionais (físicos e químicos) são os resíduos gerados e despejados na natureza. Estudos analisando o risco ambiental sugerem que AgNPs comercializadas em tecidos de meia são encontradas abundantemente nas águas

de lavagem de roupas, as quais posteriormente são levadas ao tratamento de esgoto (BENN; WASTERHOFF, 2008). Os métodos biológicos, portanto, apresentam potencial no ramo de síntese de nanopartículas, produzindo nanopartículas revestidas por proteínas no lugar de reagentes químicos (SHARMA *et al.*, 2009), sugerindo um processo menos abrasivo ao meio-ambiente.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Para um melhor entendimento da biossíntese de nanopartículas de prata este tópico foi dividido em 5 subtópicos, os quais consistem em uma breve explicação sobre as nanopartículas, métodos de síntese, caracterização e especulações sobre a capacidade citotóxica da prata.

### 2.1 Nanopartículas

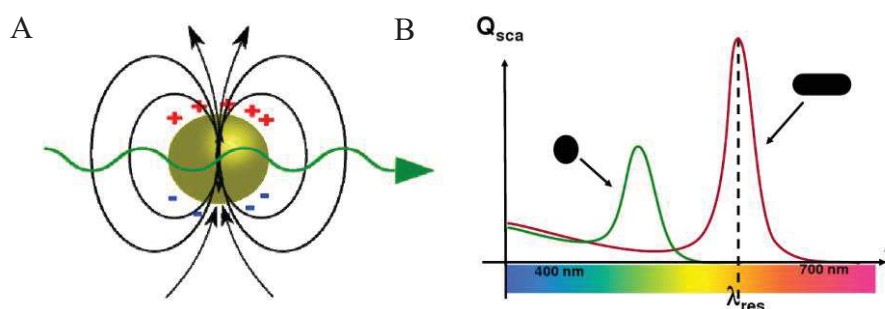
O prefixo nano, segundo o Sistema Internacional de Medidas, SI, é uma ordem de grandeza equivalente a  $10^{-9}$  ou 1/1000000000 metros. A nanotecnologia é um domínio de pesquisa que manipula o formato, síntese e manuseio de estruturas particuladas que se enquadram entre aproximadamente 1-100 nm. A nanobiotecnologia, área da nanotecnologia atrelada às áreas de biotecnologia, vem ganhando cada vez mais importância nas pesquisas, como propõem Sharma *et al.* (2009), principalmente no ramo das nanopartículas metálicas (M-NPs), visando diferentes métodos de síntese menos nocivos ao meio ambiente sem perder as propriedades conferidas pelos métodos convencionais. Como sugerem os autores Iravani *et al.* (2013), uma importante área de pesquisa da nanobiotecnologia é a síntese de M-NPs com diferentes composições químicas, tamanhos e morfologias.

As propriedades das nanopartículas obtidas estão estritamente ligadas ao seu processo de síntese, que as confere diferentes formas e tamanhos, resultando em diferentes aplicações, abrangendo diversas áreas tecnológicas, como na área da medicina, de produtos dermatológicos, implantes (DOPAZO, 2018) e possíveis

tratamentos para o câncer (AURORA; RAJPUT, 2017) ou até mesmo entre as tecnologias eletrônicas, com a implementação das nanopartículas em componentes como condutoras em peças de computador e captadoras de luz em placas solares (HUYNH *et al.*, 2002). Outra área de grande potencial para as nanopartículas, de acordo com Toshima *et al.* (2003), está na indústria e em seu uso como catalisador de reações de oxirredução, devido a sua grande área de superfície por volume ou unidade de massa.

Nanopartículas de metais nobres como o ouro, a prata e platina apresentam uma banda em comum, denominada banda de ressonância de plasmon de superfície (SPR) (Sharma *et al.*, 2009). De acordo com os autores Rai e Duran (2011), este fenômeno ocorre com a absorção de luz, onde os elétrons livres nestes metais são excitados com a energia da luz incidida, causando oscilações coletivas dos elétrons livres, dando origem a banda SPR, a qual pode ser observada no espectrofotômetro, como apresenta a Figura 1.

Figura 1 – A) Em metais nobres, a luz induz oscilações coletivas de elétrons (plasmons). B) A eficiência de espalhamento e o comprimento de onda de ressonância são dependentes do tamanho e forma da partícula além da vizinhança desta



Fonte: TOSHIMA, 2003.

A prata coloidal, por apresentar características específicas distintas como boa condutividade, estabilidade química, boa atividade catalítica e atividade bacteriostática e bactericida, mostrou-se alvo válido de estudos (FRATTINI *et al.*, 2005). Além de ser um metal mais acessível e barato, comparado ao ouro e à platina, a síntese de AgNPs, de maneira geral, é consideravelmente simples.

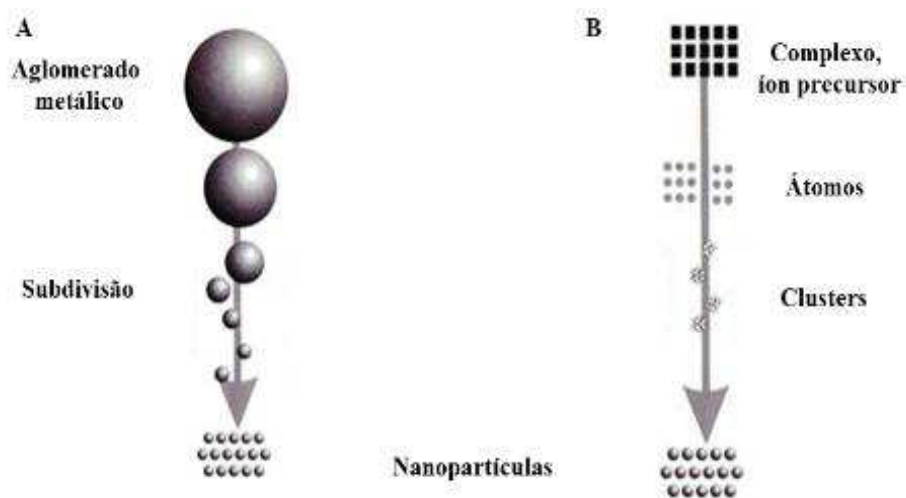
Segundo Kapoor *et al.* (1994) inicialmente, a redução de diversos complexos com íons de prata ( $\text{Ag}^+$ ) resulta na formação de átomos de prata ( $\text{Ag}^0$ ), seguida de sua aglomeração e por fim formação da prata coloidal. Enquanto os métodos mais usados físicos e químicos dependem amplamente dos agentes estabilizantes e redutores incluídos no processo, a biossíntese de nanopartículas envolve três fatores determinantes para síntese em si, os quais devem ser avaliados baseando-se nas perspectivas da “química verde”, que visa um processo pouco impactante ambientalmente. Dentre estes fatores são incluídos: a seleção do meio solvente, seleção de um agente redutor benigno ambientalmente (fungos e bactérias) e seleção de substâncias não tóxicas para a estabilização das AgNPs. Através desta abordagem, autores como Sharma *et al.* (2009) sugerem que além da síntese mediada por microrganismos, a síntese através de polímeros e nanopartículas em  $\text{TiO}_2$  também se enquadram nesta síntese verde.

## 2.2 Síntese de nanopartículas

Dentre os métodos convencionais mais usados para a síntese das M-NPs estão os métodos físico e químico (Figura 2), os quais consistem nos processos *top-down* e *bottom-up* respectivamente.

Os métodos físicos tem como base os princípios de evaporação e condensação por aplicação de calor ou irradiação de laser, onde o vapor depositará as M-NPs nas paredes do equipamento. Este método, porém, confere alto custo ao processo, com a aplicação de grandes quantidades de energia para manter a temperatura certa no sistema.

Figura 2 – A) Síntese de M-NPs pelo método físico. B) Síntese de M-NPs pelo método químico.



Fonte: TOSHIMA, 2003.

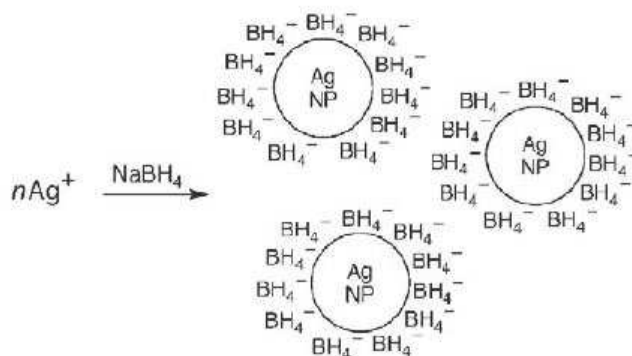
O método químico tem como base a organização de pequenos constituintes (átomos ou moléculas) em um aglomerado maior, normalmente envolvendo um processo de redução química do sal metálico mediado por agentes redutores orgânicos ou inorgânicos, com a presença de um estabilizante. O aglomerado maior formado por este método caracterizará os colóides de partículas metálicas.

Dentre os métodos *bottom-up* e *top-down* mais utilizados segundo Zewde *et al.* (2016) estão a evaporação-condensação, método eletroquímico, redução fotoinduzida, microemulsão, redução química convencional, ablação à laser e síntese por microondas.

Para os métodos físicos e químicos há ainda a necessidade de estabilização das nanopartículas, pois estas em seu estado livre são termodinamicamente instáveis devido a sua alta energia de superfície e ao movimento Browniano (ZEWDE *et al.*, 2016). De modo geral, as forças de Van der Waals são as responsáveis pela interação entre as partículas coloidais. Quando esta interação entre as nanopartículas é dominada por forças atrativas, as partículas coloidais vão se juntar até que ocorra a estabilização da partícula. No entanto, quando estas interações são mais repulsivas, as nanopartículas não apresentarão este comportamento, se estabilizando na forma dispersa. Um exemplo de estabilização da suspensão de nanopartículas é a formação de uma camada de proteção criada

pelo excesso de ânions de borohidreto ( $\text{BH}_4^-$ ) ao redor das nanopartículas, como apresenta a Figura 3.

Figura 3 – Nanopartículas de prata estabilizadas por forças repulsivas geradas por ânions de borohidreto.



Fonte: SOLOMON *et al.*, 2007.

Quando a síntese das nanopartículas é feita através de uma rota biológica (rotas metabólicas), o organismo vivo utilizado no processo se enquadra como o agente redutor e/ou o agente estabilizante (ZEWDE *et al.*, 2016). Esta síntese se enquadra na biossíntese de nanopartículas e na nanobiotecnologia, onde o microrganismo utilizado dispensa o uso de reagentes e altas aplicações de energia no sistema, tornando este método mais barato e ambientalmente viável para a síntese. Além disso, como sugere Moharekar *et al.* (2014), a possibilidade de manipulação genética dos microrganismos faz deste método o mais promissor, conferindo alta maleabilidade no manuseio dos organismos além de possíveis melhoramentos na produção. Apesar do método biológico de síntese apresentar diversas vantagens sobre os métodos químicos e físicos, ainda deve-se especular a produção em massa das M-NPs produzidas pelo mesmo, visto que esta área ainda está emergindo, sem muitos estudos e desenvolvimento para a produção em larga escala.

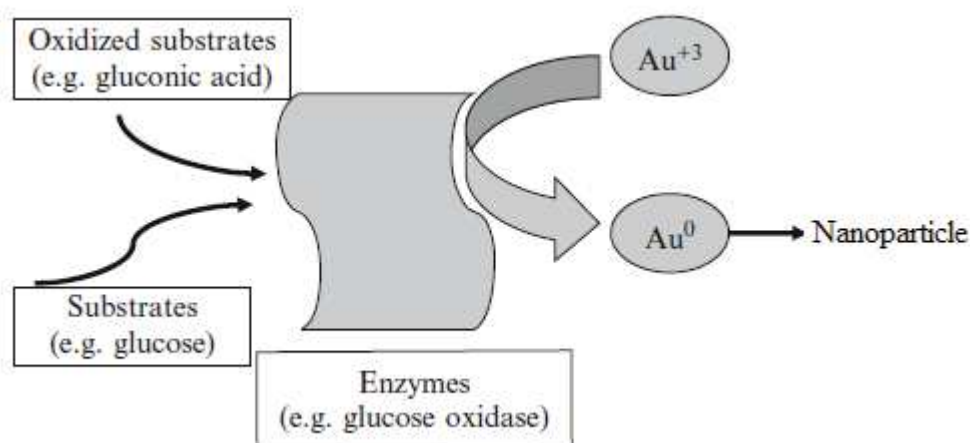
Para a biossíntese de M-NPs existem diversos métodos diferentes empregados, com o uso de tipos variados de substratos e microrganismos. A síntese



microbial de M-NPs, segundo Palomo e Filice (2016), pode ocorrer tanto dentro como fora da célula, produzindo nanopartículas idênticas aquelas produzidas quimicamente. A localização, forma e tamanho das M-NPs dependem da espécie de microrganismo utilizado (BOROUMAND *et al.*, 2015). Organismos como a *Shewanella oneidensis* e *Lactobacillus sp.*, por exemplo, possuem a capacidade de interagir com a solução de nitrato de prata para a formação de nanopartículas. Outras pesquisas como a de Kumar *et al.* (2016) mostram a biossíntese das nanopartículas metálicas através de plantas. Existem, enfim, vários microrganismos com a capacidade de absorver/acumular metais e secretar uma grande quantidade de enzimas, que estão envolvidas na redução enzimática de íons metálicos (HUANG, MOREHART, 1990).

Como dito anteriormente, a biossíntese de M-NPs se baseia em diferentes tipos de substratos e microrganismos, porém segue o mesmo princípio de síntese, envolvendo o microrganismo selecionado, geralmente uma enzima para a redução do sal e o substrato ótimo para o trabalho da enzima. A Figura 4 representa a biossíntese de nanopartículas de ouro utilizando o fungo *Aspergillus niger* e glucose como substrato.

Figura 4 – Ilustração esquemática do processo de síntese enzimática de partículas de ouro por *Aspergillus niger*.



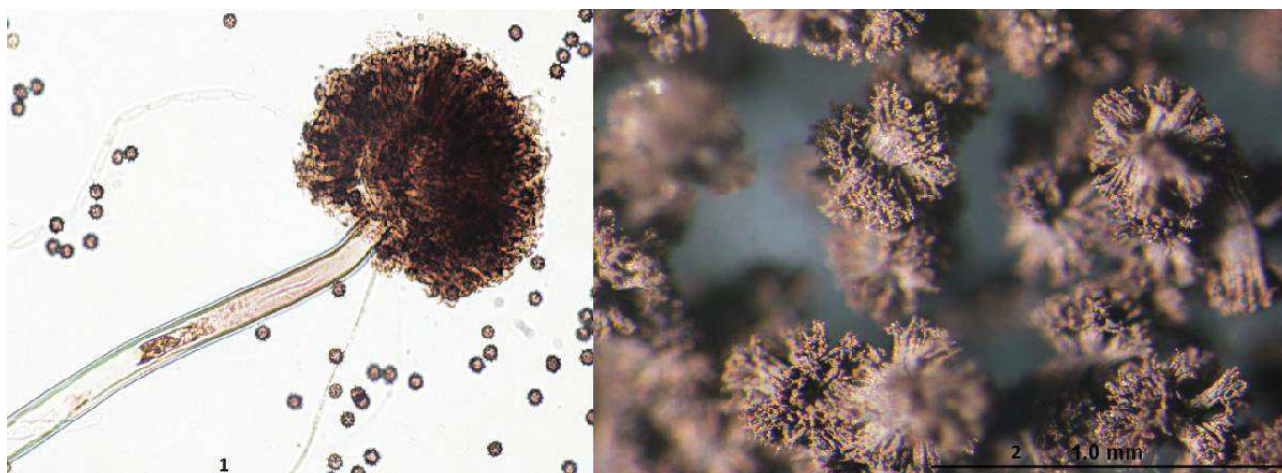
Fonte: Xie *et al.*, 2007.

No caso apresentado na Figura 4 a redução do ouro acontece através da enzima glucose oxidase. Conforme Xie *et al.* (2007), a exposição dos micélios livres do fungo *A. niger* a íons de ouro resultou na síntese de nanopartículas de ouro de vários tamanhos e formas, possivelmente mediada pela enzima glucose oxidase. No caso da prata e do fungo selecionado (*Aspergillus niger*) para este trabalho, a redução da prata acontece pela presença de uma enzima chamada nitrato redutase, que realiza a redução química do íon nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) ao nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), fornecendo elétrons para os íons prata. A nitrato redutase existe naturalmente no fungo e é responsável por metabolizar o nitrogênio, inserindo o mesmo nas vias metabólicas do microrganismo, sendo esta redução um processo que ocorre de maneira espontânea.

### **2.3 *Aspergillus niger***

O fungo *Aspergillus niger* é facilmente encontrado, sendo bem distribuído geograficamente pela sua facilidade de colonizar diversos tipos de substratos. Além de fácil crescimento este fungo é também um ascomycota, caracterizado pela produção de esporos, forma de resistência que permite a sobrevivência do fungo em ambientes precários, tornando o fungo difícil de ser eliminado. O *Aspergillus niger* pode ser isolado do solo, plantas decaídas, frutas em decomposição e até mesmo sementes e grãos. Sua colônia é caracterizada primeiramente pela formação das hifas, que possuem tons de amarelo a branco e posteriormente pela formação de conídios (esporos) com uma cor bem verde escura, tendo um crescimento relativamente rápido, que dura em torno de 5 dias. A Figura 5 mostra a estereoscopia, com aproximação de 10 mm e microscopia do fungo.

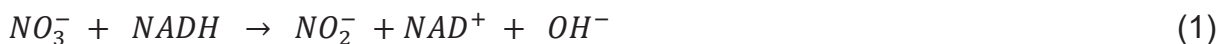
Figura 5 –Imagens da microscopia do fungo *Aspergillus niger* (imagem 1) e estereoscopia do fungo *Aspergillus niger* (imagem 2).



Fonte: [www.inspq.qc.ca](http://www.inspq.qc.ca).

Por sua tolerância e capacidade de bioacumular metais, facilidade de escalonamento da produção e utilização de biomassa, fungos tem atraído o interesse no meio acadêmico para a produção biológica de M-NPs (BOROUMAND *et al.*, 2015). Além disso, geralmente são de fácil proliferação e obtenção, o que os torna ainda mais viáveis para a biossíntese.

O *Aspergillus niger* é um fungo já conhecido industrialmente, sendo utilizado extensivamente nas indústrias para a produção de ácidos orgânicos, particularmente o ácido cítrico (UNKLES *et al.*, 1989; GHASEM, 2007) e produção de enzimas como amilases, pectinases e proteases (GODFREY *et al.*, 1996). De modo geral, o gênero *Aspergillus sp.* é muito importante para a biotecnologia pelo seu acúmulo de vastas substâncias, como ácidos, metabólitos secundários e enzimas extracelulares (MACHIDA, GOMI, 2010). No caso das M-NPs a síntese é feita de maneira extracelular, em uma mistura de filtrado de células do fungo e nitrato de prata, através de uma enzima chamada nitrato redutase, responsável pela redução do nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) ao nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), como sugere a Equação (1). Segundo Campbell (1999) a reação de redução ocorre no fungo de maneira espontânea, ou seja, com  $\Delta G$  negativo, não sendo necessário o estresse do fungo para sua ocorrência, como apresenta a Equação (2).



$$\Delta G = -34.2 \text{ kcal/mol } (-143 \text{ kJ/mol}); \Delta E = 0.74 \text{ V} \quad (2)$$

## 2.4 Bactérias

Para os presente trabalho foram utilizadas quatro cepas de bactérias, sendo 2 bactérias Gram-positivas e duas Gram-negativas: *Clostridium perfringens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

A bactéria *Clostridium perfringens* é Gram-positiva em forma de bacilo conhecida por causar enterite necrótica em seres humanos, podendo ser classificada em 5 grupos de A a E (AMIMOTO *et al.*, 2007). O gênero clostridium, de maneira geral, é um gênero importante clinicamente devido às toxinas que produz, sendo responsável por diversas infecções endógenas. É de interesse científico, portanto, encontrar outras formas de combater a mesma.

A *Staphylococcus aureus* é uma bactéria Gram-positiva em forma de coco, conhecida por produzir diversas substâncias responsáveis pela sua patogenicidade em humanos e animais (ALLEN *et al.*, 2002). O surgimento de colônias resistentes a derivados de penicilina (e.g. metilicina), as chamadas methicilin resistant *S. aureus* (MRSA), tornaram a necessidade de encontrar formas alternativas para o combate a estas bactérias em meio clínico.

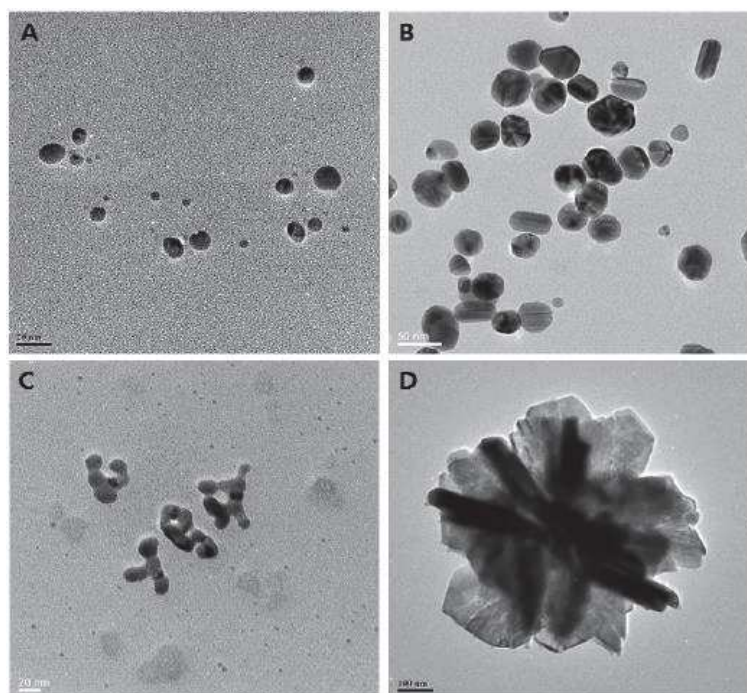
A *Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria Gram-negativa com formado de bacilo responsável por diversas infecções nosocomiais (e.g. Pneumonia), sendo sua importância clínica caracterizada pela expressão de múltipla resistência a antibióticos (NEVES *et al.* 2011).

A *Escherichia coli* é uma bactéria anaeróbica facultativa Gram-negativa em forma de bacilo. É um microrganismo vastamente conhecido pelo homem, rotulado o como a bactéria anaeróbica facultativa mais abundante no intestino humano (DONNENBERG, 2002).

## 2.5 Caracterização e propriedades das M-NPs

As propriedades físico-químicas das nanopartículas são de grande importância para seu comportamento, biodistribuição, segurança e eficiência sendo estritamente dependentes dos reagentes e métodos envolvidos na síntese. Segundo Zhang *et al.* (2016) a caracterização pode ser feita por técnicas analíticas como a espectroscopia UV-vis, microscopia de transmissão eletrônica (TEM), espalhamento dinâmico de luz (DMS), difratometria por raio-X (XRD), microscopia de forças atômicas (AFM), entre outras. Como pode ser observado na Figura 6, algumas destas caracterizações permitem a observação de diversas formas de M-NPs, onde através da revelação por TEM de uma biossíntese de AgNPs mediada por *Bacillus sp.* apresentou distintos formatos para diferentes colônias de bactérias.

Figura 6 – Diferentes formatos de AgNPs obtidas por biossíntese com diversas culturas de diferentes espécies de *Bacillus*. (A) Esférica; (B) Formas mistas; (C) Aglomerados; (D) Formato de flor.



Fonte: Zhang *et al.*, 2016.

A espectroscopia de UV-vis fornece de maneira rápida e simples informações qualitativas e quantitativas sobre substâncias com ligações  $\pi$  ( $\pi$ ), neste caso,

quanto mais ligações conjugadas, maior será o comprimento de onda absorvida. Zhang *et al.* (2016) afirmam que em AgNPs, a banda de condução e de valência são bem próximas, permitindo o movimento livre dos elétrons. Na espectroscopia, a absorção observada depende do tamanho da partícula e o meio em que a suspensão se encontra. Como mencionado anteriormente, as AgNPs apresentam bandas características observadas no espectrofotômetro devido as bandas de plasmon de superfície. Para as AgNPs biossintetizadas, há ainda uma banda em torno de 300 nm, que representa a composição proteica estabilizante presente na suspensão.

A caracterização das nanopartículas por microscopia de transmissão eletrônica (TEM) é de extrema importância, pois a mesma tem a finalidade de obter quantitativamente as medidas das partículas, a distribuição de tamanhos e a morfologia apresentada pelas M-NPs através de imagens de alta resolução. O método, porém, apresenta algumas desvantagens, apontadas pelos autores William e Carter (2009), como possíveis danos a alíquotas poliméricas, minerais e cerâmicas causados pela irradiação eletrônica e as limitações ocasionadas pela finura da alíquota a ser analisada.

## **2.6 Atividade antimicrobiana e citotoxicidade das AgNPs**

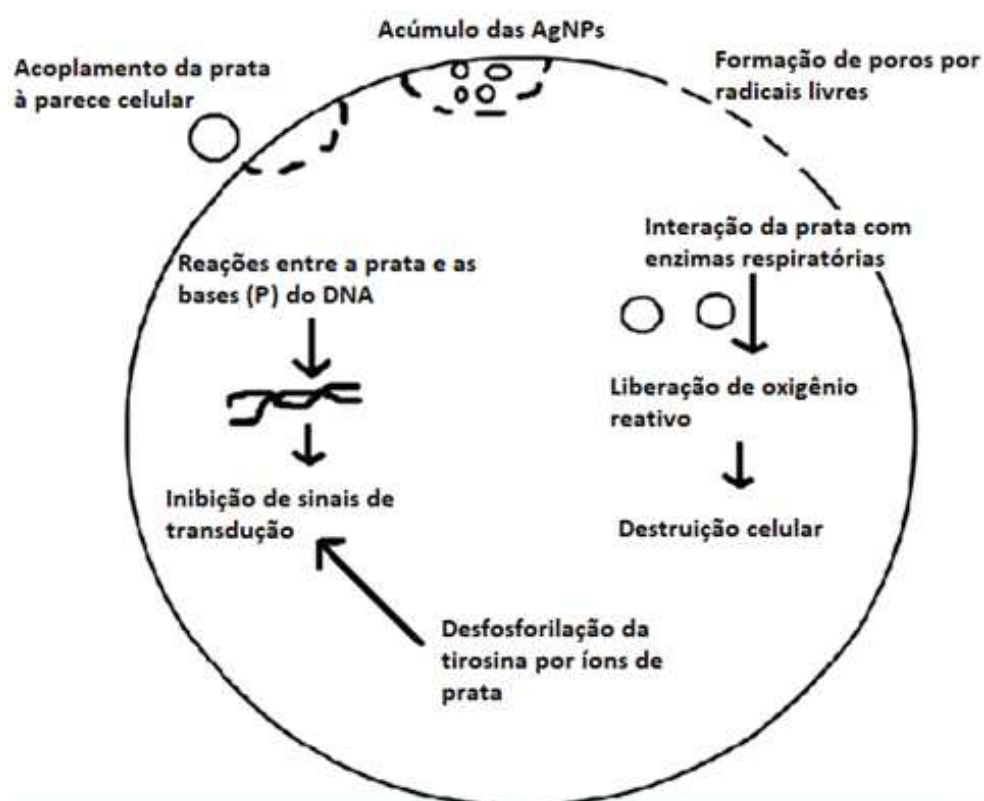
Dentre as propriedades mais importantes relacionadas as nanopartículas de prata estão a sua capacidade antimicrobiana. Estudos realizados por Amin *et al.* (2009) indicam que as nanopartículas de prata apresentam atividade bactericida superior em *E.coli* comparada com as nanopartículas de ouro, sendo nanopartículas de geometria triangular melhores do que as esféricas com tamanhos menores. O mecanismo exato exercido pelas nanopartículas de prata para causar efeitos antimicrobiais ainda não é totalmente certo. Existem, no entanto, teorias de sua ação nos microrganismos (PRABHU, POULOSE, 2012).

As AgNPs tem a habilidade de se acoplar e penetrar na parede da bactéria, levando a mudanças estruturais (criação de poros) da membrana, alterando sua permeabilidade, levando a célula a morte. Há também a possibilidade de formação de radicais livres pelas AgNPs os quais interagem com enzimas respiratórias da

célula levando a mesma à morte e por fim, a liberação de oxigênio reativo formado por interações com a prata, levando a célula à morte por disfunções das enzimas respiratórias. A Figura 7 apresenta de maneira esquematizada os possíveis mecanismos de ação das AgNPs nas células dos microrganismos.

Autores como De Lima *et al.* (2012) e Kim *et al.* (2009), apresentaram trabalhos especulando a citotoxicidade das AgNPs, que também podem ser notadas de maneira branda em células de mamíferos. Os experimentos de citotoxicidade conduzidos em células animais tiveram foco em (i) AgNPs não encapsuladas, (ii) AgNPs encapsuladas por métodos químicos e (iii) AgNPs encapsuladas por métodos biológicos (proteínas). Os resultados obtidos, no entanto, além de revelarem toxicidade branda se demonstraram dependentes de muitas variáveis, como Kim *et al.* (2009) apontam, dependendo do tamanho das AgNPs (aproximadamente 5, 20 e 50 nm), morfologia e a viabilidade da célula a ser submetida ao stress com nanopartículas.

Figura 7 – Esquema de possíveis mecanismos de ação das AgNPs nos microrganismos.



A avaliação da atividade antimicrobiana das AgNPs pode ser feita através do teste de difusão em ágar por discos, que consiste na aplicação de 10 µL da solução de agente antimicrobiano em discos de papel de filtro de aproximadamente 6 mm de diâmetro (KARAMAN *et al.*, 2003), podendo também ser analisada como sugere Miranda *et al.* (2015), através da adaptação do método de difusão em ágar, onde se faz uso de um *swab* para inocular a bactéria em ágar Mueller-Hinton com posterior deposição de alíquotas de 60 µL da solução em poços de 6 mm perfurados no ágar.

Há ainda o método de determinação da concentração inibitória mínima (CIM), feita através de microdiluição em placas, proposta por Matthew *et al.* (2006), a qual sugere uma série de microdiluições envolvendo as bactérias a serem analisadas com diferentes concentrações de AgNPs. Este método permite a identificação da menor concentração necessária de AgNPs capaz de impedir o crescimento microbiano. Este método pode ser complementado ainda através do *spot test* e da realização da curva de crescimento das bactérias a serem analisadas. Onde a bactéria é inoculada com a CIM das AgNPs, sendo controlado o tempo de crescimento e a concentração de células de crescimento (determinada pela absorbância em espectrofotômetro) para a obtenção da curva de crescimento da bactéria.

### **3 METODOLOGIA**

Neste tópico serão apresentadas as metodologias dotadas para a realização dos experimentos, juntamente com o material utilizado e descrição breve do procedimento.

#### **3.1 Material e reagentes**

Nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub>) (Proquímios, 99%), Tween 20 (Proquímios), soro fisiológico (LBS, dosagem 0,9%), Glucose (Vetec, 99,5%), Ágar Batata Dextrose (PDA) (HIMEDA) e Caseína hidrolisada (Sigma-Aldrich, 96%). Para a determinação



da CIM foi utilizada Resazurina 0,04% diluída em água destilada. Água destilada esterilizada foi utilizada em todos os processos. Todas as vidrarias usadas no processo foram propriamente esterilizados em autoclave e lavadas com ácido nítrico antes e após seu uso.

As vidrarias e acessórios utilizadas foram:

- Placas de Petri;
- Placas para microdiluição;
- Erlenmeyers de volumes variados;
- Balões Volumétricos de tamanhos variados;
- Ponteiras de tamanhos variados;
- *Swab*;
- Tubos de *falcon* de 50 mL;
- Espectrofotômetro UV-vis (GenesysAnalítica, Genesys 10-s);
- Centrífuga (Daiki, 533118);
- Incubadora de Demanda Bioquímica de Oxigênio (BOD) (ethiktechnology, NE-11818);
- Incubadora refrigeradora com agitação orbital (Thoth equipamentos, série 23140).

## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Preparo dos meios para o cultivo do fungo

Para o cultivo do fungo em placas de Petri foi usado o meio ágar batata dextrose (PDA) e após a obtenção dos esporos em meio sólido, foi feito o cultivo em meio líquido, em meio glucose-caseína hidrolisada (GC).

Para o meio PDA foram dissolvidos 39 g de ágar em pó em 1000 mL de água destilada. Após a dissolução, o meio foi autoclavado por cerca de 20 minutos para sua total esterilização, sendo posteriormente transferido para as placas de Petri. Todos os procedimentos envolvendo o meio autoclavado foram feitos em ambiente

estéril para evitar a contaminação indesejada por outros microrganismos presentes no ar.

Para o preparo do meio GC foram dissolvidos 0,4% (g/v) de hidrolisado de caseína e 0,5% (g/v) de glucose em água destilada. Após a completa dissolução, o meio foi autoclavado por 20 minutos para a sua esterilização. Todos os procedimentos envolvendo o meio autoclavado foram feitos em ambiente estéril, e seu manuseio teve início após seu resfriamento à temperatura ambiente.

### 3.2.2 Preparo das bactérias para a CIM e a CBM

Para a realização da CIM e da CBM foi necessário o preparo prévio das bactérias rotuladas de acordo com a Friocruz Rio de Janeiro *Pseudomonas aeruginosa* INCQS 00025, *Clostridium perfringens* INCQS 00053, *Staphylococcus aureus* INCQS 00015 e *Escherichia coli* INCQS 00033 em ágar Mueller-Hinton um dia antes dos testes.

Para o preparo das bactérias em ágar Mueller-Hinton (MH) foram diluídos 38 gramas de meio em 1000 mL de água destilada. Após a dissolução completa o meio foi autoclavado por 20 minutos a 120 °C. Foram então feitas as placas de Petri com o meio e inoculadas as colônias de bactéria em câmara de fluxo. As placas foram utilizadas após 24h de incubação em BOD.

Após a obtenção das colônias isoladas, as mesmas foram cultivadas em meio MH líquido por um período de 6 horas. O preparo do meio MH líquido consistiu na dissolução de 21 gramas de meio em 1000 mL de água destilada. O meio foi então distribuído em tubos de Falcon de 50 mL (aproximadamente 10 mL de meio em cada tubo) e posteriormente esterilizado em autoclave. A incubação das bactérias não excedeu de 6 horas na incubadora refrigeradora com agitação orbital (35 °C, 150 rpm).

Para todas as bactérias presentes no experimento foi realizado o ajuste em escala 0,5 McFarlad após as 6 horas de incubação com sua imediata utilização para os testes de difusão em poços e CIM.

### 3.2.3 Obtenção da biomassa

O fungo utilizado para os procedimentos foi obtido através da Fiocruz, sendo rotulado de acordo com o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), sendo o *Aspergillus niger* INCQS 40371 fornecido liofilizado, conforme a Figura 8.

Figura 8 – Fungo *Aspergillus niger* INCQS 40371 fornecido pela Fiocruz.



Fonte: Elaborada pelo autor.

As cepas do fungo *Aspergillus niger* foram primeiramente cultivadas em meio sólido PDA, em incubadoras de demanda bioquímica e de oxigênio (BOD) por aproximadamente 7 dias sob temperatura de 27 °C. A ocupação do fungo por toda a placa deve ser observada para se prosseguir com o experimento, apresentando esporos verde-escuro, quase pretos por toda sua extensão.

Para a separação dos esporos, a colônia da placa foi inundada com aproximadamente 20 mL de soro fisiológico misturado a uma gota de Tween 20. Este procedimento foi feito dentro da câmara de fluxo para evitar contaminações. Para a inoculação em meio líquido, foram utilizados 1, 1,5 e 2 mL da solução de esporos, originando AgNP1, AgNP2 e AgNP3 respectivamente, sendo os mesmos inoculados em Erlenmeyers de 250 mL contendo o meio GC e incubados na incubadora refrigeradora com agitação orbital (Thoth equipamentos, série 23140), à

27°C e 150 rpm constantes por 72 horas. O crescimento do mesmo é caracterizado pelo aparecimento de estruturas esbranquiçadas. Todos os inóculos em meio líquido (AgNP1, AgNP2 e AgNP3) foram feitos em triplicata, assim como todas as etapas seguintes, partindo da mesma colônia, com manuseio em ambiente estéril.

### 3.2.4 Síntese das Suspensões de AgNPs

A biomassa obtida no crescimento do fungo em meio líquido foi apenas utilizada para a obtenção do filtrado de células, sendo peneirada para a separação de hifas e esporos do fungo e colocada em Erlenmeyers com 100 mL de água destilada, que foram agitados na Incubadora de Demanda Bioquímica de Oxigênio (BOD) (ethiktechnology, NE-11818) à temperatura de 27,0 °C por 48 horas. Para o filtrado de células, a mistura da biomassa com água destilada passou por uma filtração utilizando papel Whatman nº1. Após sua secagem, a biomassa foi descartada, mantendo apenas o filtrado de células para os próximos procedimentos.

Para a suspensão de AgNPs, 50 mL de filtrado de células foram misturados a 10 mL de nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ )  $10 \text{ mmolL}^{-1}$ . Estas soluções foram incubadas novamente em Incubadora refrigeradora com agitação orbital (Thoth equipamentos, série 23140) à temperatura de 28 °C, sem agitação fora do alcance da luz para evitar a reação de redução fotoquímica da prata, por aproximadamente 24 horas. A mudança de cor da suspensão de branca turva para tons de marrom, como sugere Moharekar *et al.* (2014), indica a síntese das AgNPs.

### 3.2.8 Caracterização das AgNPs

Para a caracterização das nanopartículas foram realizados três metodologias: Microscopia de transmissão eletrônica (TEM), Fluorescência de Raios X por Reflexão Total (TXRF) e Espectrofotometria por UV-vis.

Para a análise de Espectrofotometria por UV-vis os experimentos AgNP1, AgNP2 e AgNP3 foram realizados em duplicata, sendo as leituras realizadas no espectrofotômetro UV-vis (GenesysAnalitica, Genesys 10-s) através de cubetas de

quartzo de 2 mL. Para a análise, foi feita a leitura de absorvância das amostras, sendo utilizada água destilada como branco para todos os experimentos, entre os comprimentos de onda de 300 nm a 800 nm. Os dados foram então passados para o programa Origin para a montagem dos gráficos.

A análise de Fluorescência de Raios X por Reflexão Total (TXRF) foi realizada para a prata, de acordo com Ribeiro *et al.* (2019), sendo utilizado o espectrômetro de bancada S2 PICOFOX, Bruker AXS Microanalysis GmbH para a leitura das amostras. Os experimentos foram primeiramente preparados em tubos Eppendorf de 2 mL, contendo 900  $\mu\text{L}$  da amostra com uma solução padrão de Gálio (*i.e.*  $C_{\text{Ga}} = 100 \text{ mgL}^{-1}$ ). Cinco microlitros das amostras preparadas foram então depositadas no centro de discos de quartzo, os quais foram posteriormente secos em cabine de fluxo laminar à temperatura ambiente.

Por fim, a análise de Microscopia de Transmissão Eletrônica (TEM), realizada de acordo com Reolon (2019) em microscópio eletrônico de transmissão (JEM – 1011), no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME-UFSC). As amostras AgNP1 e AgNP3 foram preparadas através do gotejamento de 4  $\mu\text{L}$  das suspensões em grades de cobre recobertas com filme carbono de 200 mesh por oito vezes, com sua posterior leitura no aparelho.

### 3.2.5 Difusão em poços

Para as três diferentes amostras de suspensão obtidas na biossíntese (AgNP1, AgNP2 e AgNP3), foi feita a verificação da atividade bactericida em colônias de *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* através do método de difusão em poços.

A difusão em poços foi feita através da inoculação de maneira homogênea das bactérias em ágar Mueller-Hinton ajustadas em escala 0,5 McFarlad pela placa com o auxílio de um swab. As placas foram então divididas em 3 áreas, cada uma com um poço contendo 10  $\mu\text{L}$  de uma das suspensões biossintetizadas. A verificação de halos confirma a atividade das suspensões biossintetizadas.

### 3.2.6 Verificação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) das AgNPs

Para a CIM foram utilizadas as bactérias previamente preparadas e ajustadas em escala 0,5 McFarlad. Para as 4 bactérias avaliadas foram necessárias 4 placas de microdiluição. O mapeamento dos poços foi realizado conforme a Figura 9.

Figura 9 – Esquema da distribuição dos poços na microplaca para a determinação da CIM.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
B	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
C	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
D	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
E	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
F	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
G	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
H	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Legenda	
●	NP1
●	NP2
●	NP3
●	Controle (bactéria)
●	Controle (nanopartículas)
●	Controle (Meio de cultivo)

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para todos os poços da microplaca 100 µL do meio líquido MH foram pipetados, seguida pela pipetagem de 100 µL das suspensões coloidais AgNP1, AgNP2 e AgNP1 apenas na coluna 1. Foram então realizadas as diluições seriadas das suspensões em meio MH, com a diluição inicial (coluna 1) de 50% até 0,0244% (coluna 12). Após terminada a diluição e a homogeneização da suspensão com o meio foeram pipetados 20 µL da bactéria diluída a  $2 \cdot 10^6$  UFC/mL em todas as 12 colunas dos poços entre A a G. Para os poços da coluna H1 e H2 foram pipetados 100 µL de AgNP1, para H3 e H4 100 µL de AgNP2 e para H5 e H6 100 µL de AgNP3. De H7 a H12 foram pipetados mais 100 µL de meio líquido MH, sendo assim, todos os poços presentes nas linhas G e H consistiram no controle.

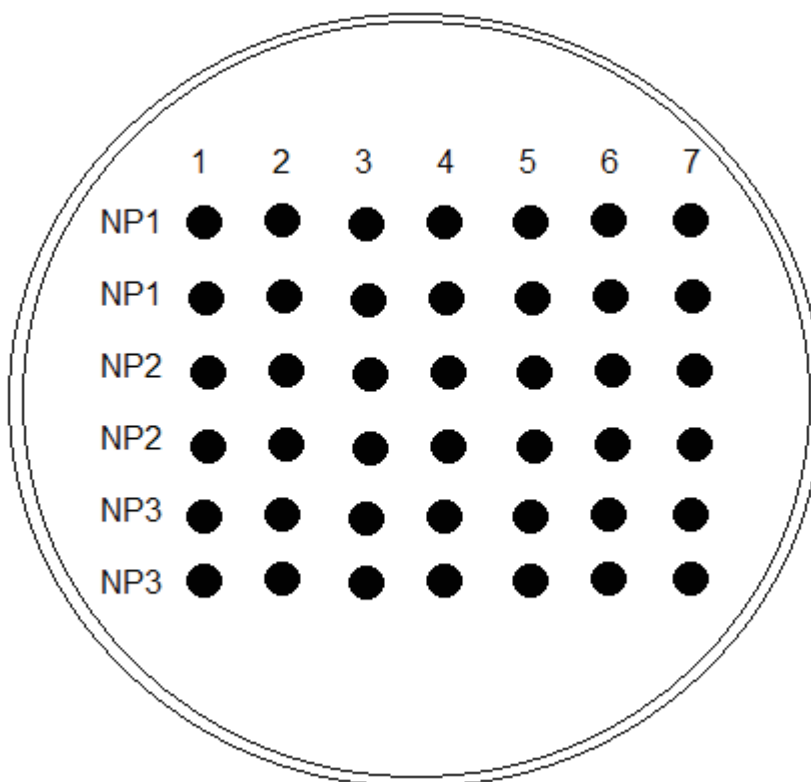
Após a pipetagem, as placas foram incubadas por pelo menos 24h em BOD a 35 °C na ausência de luz. Depois de incubadas foram adicionados 5 µL do corante Resarzurina diluído em água destilada, sendo possível a observação da CIM 2 horas

após sua adição. A Resazurina é um corante capaz de ser metabolizado pelas bactérias, tornando-se rosa após sua quebra, indicando a atividade da célula em poços com mudança de coloração de azul para rosa e sua inatividade quando há a permanência da cor azul nos poços.

### 3.2.7 Verificação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) das AgNPs

A verificação da CBM é realizada após as 24 horas de incubação das placas de microdiluição, sendo realizada em placas de Petri com meio MH sólido e com auxílio de papel milimetrado, podendo ser analisada pela presença (teste positivo para a diluição) ou ausência (negativo para a diluição) de colônias após a incubação. Para cada 10 mm são depositados 5  $\mu$ L do poço da placa de microdiluição. Para este experimento a distribuição dos pontos está apresentada conforme a Figura 10.

Figura 10 – Distribuição dos pontos da CIM para a CBM.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Como pode ser observado na Figura 10, apenas os poços das colunas 1 a 7 da placa de microdiluição são utilizados para CBM. Os outros pontos (de 8 a 12) da placa são descartados devido a baixíssimas concentrações da solução a ser testada, tornando improvável a sua capacidade antimicrobiana.

Neste experimento, para cada placa de Petri de CBM foi utilizada uma bactéria, sendo o controle de todas as bactérias realizado em uma placa à parte.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No tópico seguinte serão apresentados os resultados dos experimentos obtidos pelas metodologias apresentadas no tópico 3.

### 4.1 Cultivo do fungo em meio sólido

O fungo cultivado em meio sólido PDA apresentou bom crescimento, tomando todo o conteúdo da placa em aproximadamente 7 dias de cultivo. A Figura 11 apresenta a colônia cultivada, a qual foi utilizada para os experimentos.

Figura 11 – Placa de Petri com a ocupação completa do fungo *Aspergillus niger* INCQS 40371.



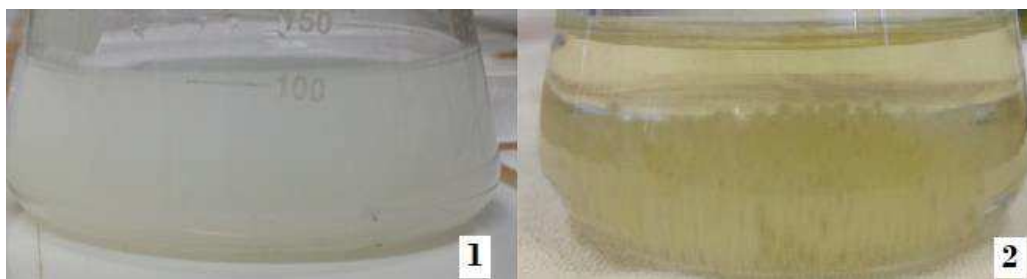
Fonte: Elaborada pelo autor.



## 4.2 Biossíntese das AgNPs

Todos os procedimentos para a biossíntese de nanopartículas de prata foram realizados em duplicata, partindo da mesma colônia obtida em meio PDA sólido. Para o cultivo em meio líquido GC, foram inoculadas diferentes quantidades de esporos, 1,0, 1,5 e 2,0 mL, originando exemplares AgNP1, AgNP2 e AgNP3, respectivamente. Após 3 dias em incubadora refrigeradora com agitação orbital, pôde-se observar crescimento em todos os exemplares, podendo claramente notar a diferença de perfil no mesmo dia do inóculo e 72h após a inoculação. A Figura 12 apresenta a diferença apresentada de maneira geral entre o dia do inóculo e 3 dias após o inóculo do fungo.

Figura 12 – Fungo *Aspergillus niger* em cultura líquida: (1) Data em que o fungo foi inoculado e (2) Observação de crescimento após 72h.



Fonte: Elaborada pelo autor.

O perfil da biomassa formada nos experimentos é similar ao da biomassa apresentada por Nida e Namra (2016) em coloração e textura, com divergências apenas no tamanho da biomassa, obtida por maior tempo de crescimento do fungo (120 horas).

As biomassas obtidas por AgNP1, AgNP2 e AgNP3 não apresentaram grandes variações em massa, como sugere a Tabela 1.

Tabela 1 – Massa seca da biomassa obtida pelo cultivo do fungo *Aspergillus niger* em meio líquido GC.

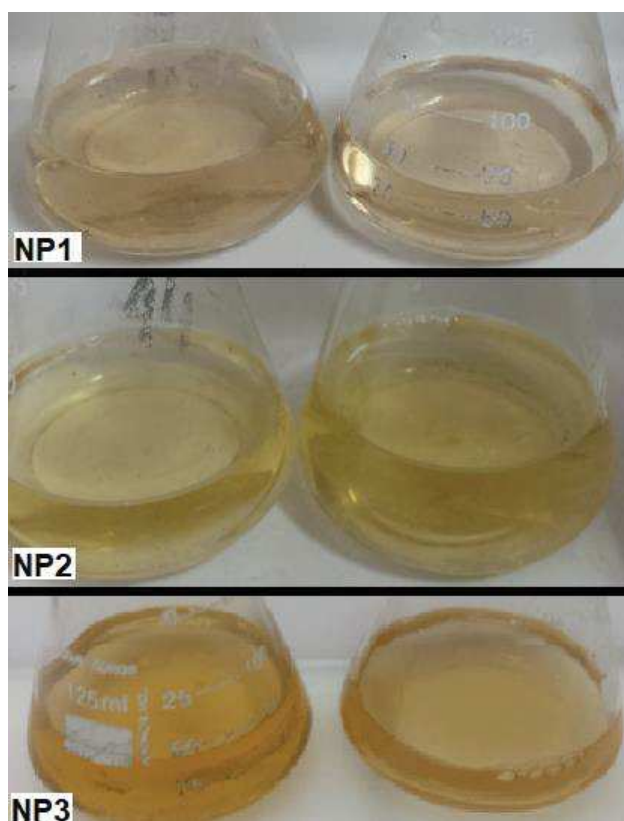
Suspensão AgNP	AgNP1	AgNP2	AgNP3
Biomassa (g)	8,702	9,411	10,331

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tal resultado sugere que em mesmas condições de temperatura, pH e mesmo meio (neste caso GC) diferentes concentrações de esporos geraram concentrações parecidas de biomassa.

Após a incubação do filtrado de células com o nitrato de prata, pode-se observar a mudança de coloração das suspensões de branca turva para tons de marrom, como era esperado. Tem-se porém que AgNP1, AgNP2 e AgNP3 apresentaram coloração diferente, como mostra a Figura 13.

Figura 13 – Suspensão de AgNPs dos experimentos AgNP1, AgNP2 e AgNP3.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Tem-se que AgNP2 e AgNP3 apresentaram coloração mais amarelada, enquanto AgNP1 coloração mais amarronzada. Como Nida e Namra (2016) indicam, a biossíntese de AgNPs, diferente da síntese por métodos físico-químicos, pode apresentar coloração diferenciada de suspensão, variando de marrom para amarela. Isto indica que não ocorreu a reação fotoquímica da prata, geralmente indicada por uma coloração rosada na suspensão.

Comparando-se os resultados obtidos neste trabalho e no trabalho proposto por Nida e Namra (2016), pode-se dizer que ocorreu a síntese de nanopartículas de prata, podendo ser percebida a mudança de cor da suspensão.

## **4.2 Caracterização das AgNPs**

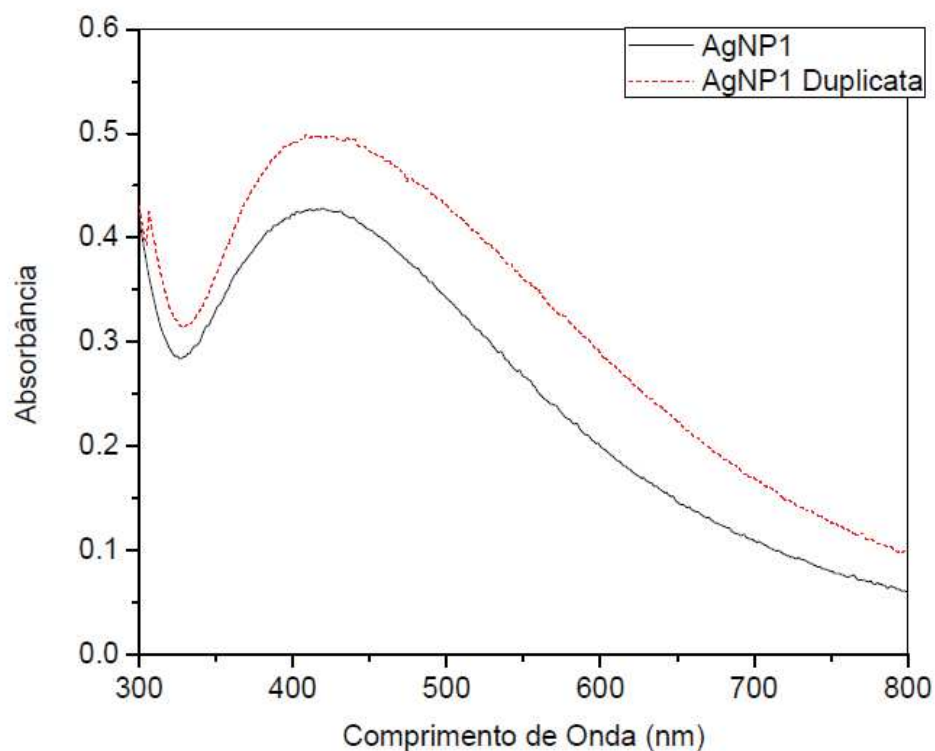
Para a caracterização das AgNPs foram realizados os testes TXRF, Espectrofotometria de Uv-vis e TEM, como seguem os subtópicos.

### **4.2.1 Espectrofotometria em UV-vis**

Para a caracterização de nanopartículas de prata, tem-se a verificação da banda SPR, a qual pode ser observada nas Figura 17, Figura 18 e Figura 19 para AgNP1, AgNP2 e AgNP3, respectivamente.

As amostras AgNP1 visualmente apresentaram coloração parecida, tendo apenas uma pequena diferença de volume de água entre os dois frascos. A espectrofotometria apresentada na Figura 14 permite melhor análise das duas suspensões.

Figura 14 – Espectrofotometria do experimento AgNP1 e sua duplicata.

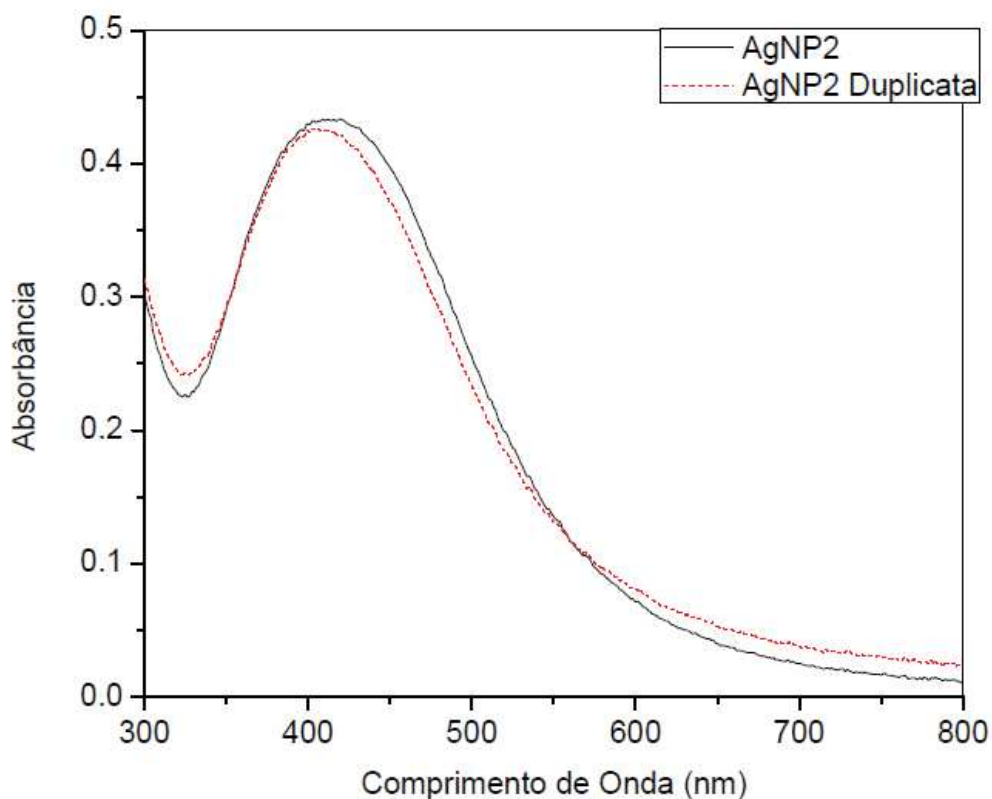


Fonte: Elaborada pelo autor.

O experimento AgNP1 apresentou uma banda entre os 400 e 500 nm, confirmando a presença de AgNPs, com absorvância máxima em aproximadamente 0,429 abs para AgNP1 e 0,500 abs para AgNP1 Duplicata. Como se espera das nanopartículas de prata biossintetizadas, tem-se uma banda em torno de 300 nm, caracterizada pela presença de proteínas do fungo.

Da mesma forma que o experimento AgNP1, AgNP2 também apresentou amostras com coloração similar e, como pode ser observado na Figura 15, os espectros resultantes da duplicata também se apresentaram similares.

Figura 15 - Espectrofotometria do experimento AgNP2 e sua duplicata.

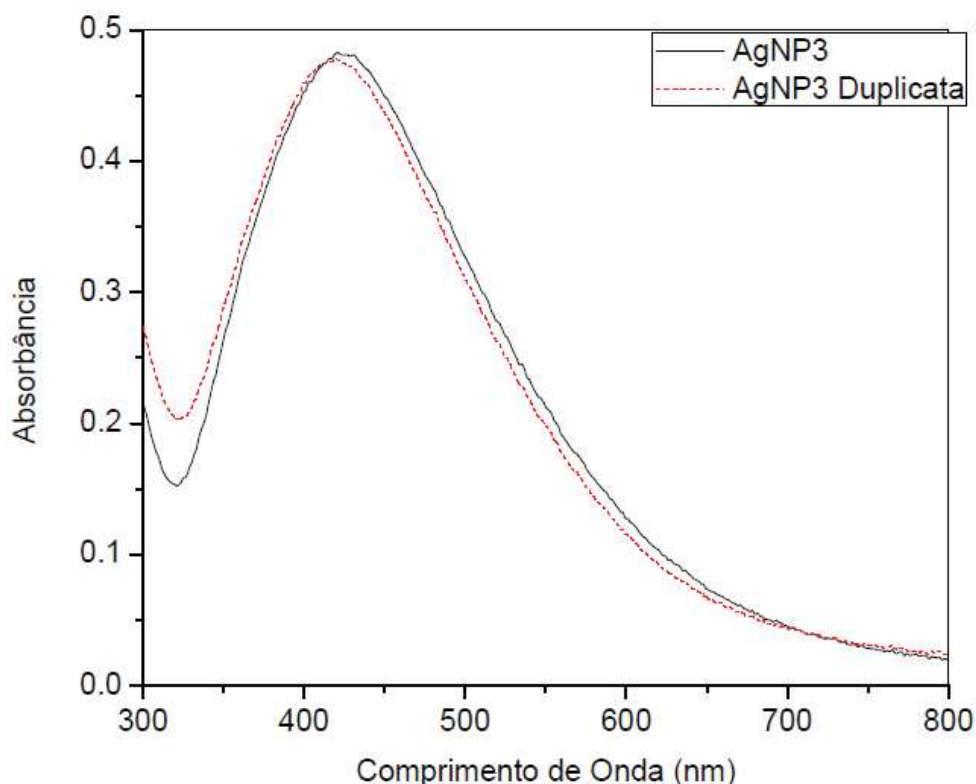


Fonte: Elaborada pelo autor.

O experimento AgNP2 e sua duplicata apresentaram espectros com perfil similar, apresentando uma banda entre 400 e 500 nm em ambos os casos, com absorvância máxima de aproximadamente 0,431 abs para AgNP2 e 0,427 abs para AgNP2 Duplicata.

Por último, tem-se a leitura espectrofotométrica do experimento AgNP3, apresentado pela Figura 16.

Figura 16 - Espectrofotometria do experimento AgNP3 e sua duplicata.



Fonte: Elaborada pelo autor.

O experimento AgNP3 também apresentou banda entre os 400 e 500 nm, como esperado com um  $\lambda$  máximo similar em sua duplicata, sendo para AgNP3 de aproximadamente 0,481 abs e 0,478 abs para AgNP3 Duplicata.

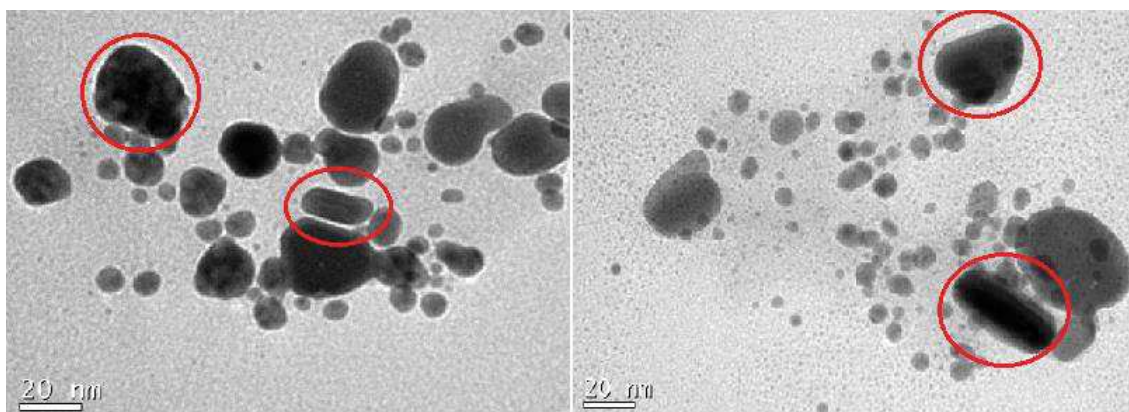
Os resultados obtidos para AgNP1, AgNP2 e AgNP3 foram então comparados com os estudos realizados por Jain *et al.* (2011), realizados utilizando-se o fungo *Aspergillus flavus* NJP08 como mediador da biossíntese.

No método proposto por Jain *et al.* (2011) foi utilizada uma solução de  $1,0 \text{ mmolL}^{-1}$  de  $\text{AgNO}_3$ , sendo as análises de espectrofotometria por UV-vis realizadas de 0h a 72h. A banda formada para seu trabalho em 24h foi observada em 420 nm, com absorbância de aproximadamente 0,52 abs, sugerindo que o fungo *Aspergillus flavus* NJP08 apresenta similaridade na caracterização por espectroscopia de UV-vis com o fungo *Aspergillus niger* 40371 presente neste trabalho.

#### 4.2.2 Microscopia de Transmissão Eletrônica

Para a obtenção de informações mais específicas sobre a morfologia e diâmetro das nanopartículas sintetizadas, foi realizada a microscopia de transmissão eletrônica (TEM) nas amostras AgNP1 (Figura 17) e AgNP3 (Figura 18). A microscopia de transmissão eletrônica não foi realizada em AgNP2 devido a falta de tempo.

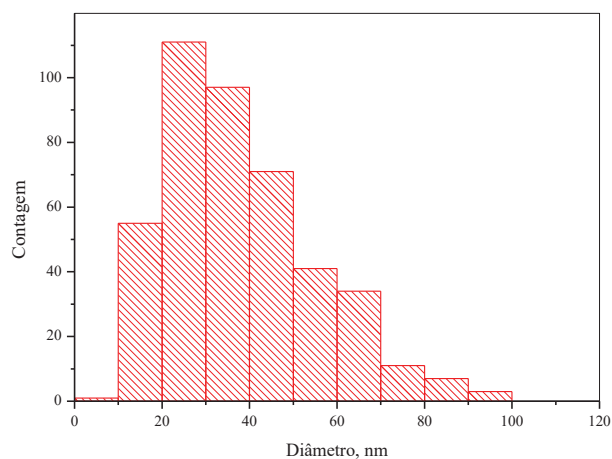
Figura 17 - Microscopia eletrônica de transmissão da amostra AgNP1.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Como pode se observado na Figura 21, a TEM revelou três formas diferentes nesta amostra, morfologia triangular, bastão e esfera. Para a contagem das nanopartículas, no entanto, foram apenas levadas em consideração as nanopartículas esféricas, sendo o resultado apresentado pelo histograma da Figura 18.

Figura 18 - Histograma do tamanho médio do diâmetro das nanopartículas apresentadas na amostra AgNP1, com tamanho médio de nanopartículas de 37,5 nm.

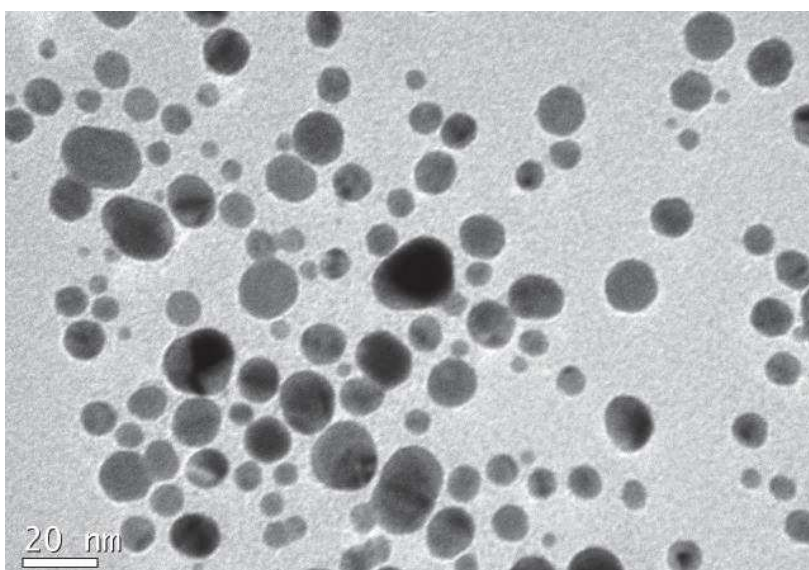


Fonte: Elaborada pelo autor.

O diâmetro médio apresentado para as nanopartículas presentes na amostra AgNP1 foi de 37,5 nm, com uma maior concentração de nanopartículas esféricas de diâmetro entre 20 a 40 nm.

A TEM para a amostra AgNP3 está apresentara na Figura 19, a qual segue abaixo.

Figura 19 - Microscopia eletrônica de transmissão da amostra AgNP3.

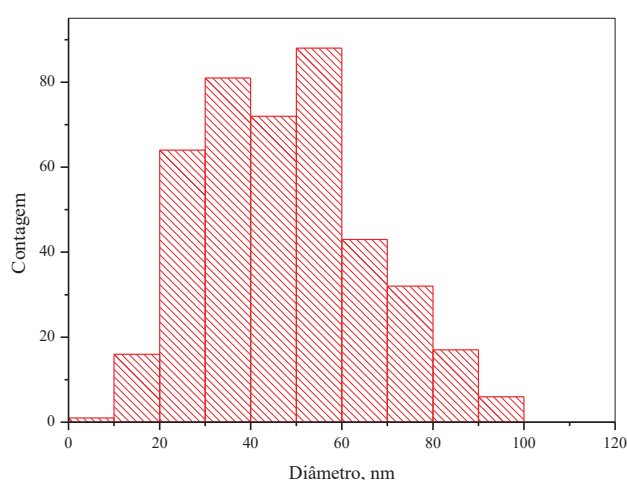


Fonte: Elaborada pelo autor.



Para se obter uma média de diâmetro das nanopartículas foi utilizado o programa ImageJ, programa para a medição do diâmetro de partículas. O diâmetro de aproximadamente 200 nanopartículas foi medido com o programa, originando o histograma apresentado na Figura 20.

Figura 20 – Histograma do tamanho médio das nanopartículas apresentadas na amostra AgNP3 com tamanho médio de nanopartículas de 47,3 nm..



Fonte: Elaborada pelo autor.

Analisando o histograma, tem-se que o diâmetro médio das nanopartículas na amostra AgNP3 é de 47,3 nm, porém apresentando grande quantidade de nanopartículas com tamanhos entre 30 e 60 nm.

Como pôde ser observado através das figuras 17, 18, 19 e 20, a amostra AgNP1 apresentou maior variedade de morfologias, enquanto a AgNP3 resultou em mais partículas esféricas.

As análises TEM e o diâmetro médio das nanopartículas biossintetizadas pelo fungo *Aspergillus niger* INCQS 40371 foram também comparadas com o trabalho de Jain *et al.* (2011), o qual apresentou o diâmetro médio das nanopartículas biossintetizadas pelo fungo *Aspergillus flavus* NJP08 de 10 a 25 nm, com aproximadamente 80% das nanopartículas se enquadrando nestas dimensões.

Comparando os resultados obtidos com resultados da literatura tem-se que as nanopartículas biossintetizadas pelos fungos *Aspergillus niger* INCQS 40371 e *Aspergillus flavus* NJP08 apresentaram tamanhos diferentes, com aproximadamente 10 nm de diferença entre as mesmas. Sendo as nanopartículas biossintetizadas pelo fungo *Aspergillus niger* INCQS 40371 de maior tamanho.

#### 4.2.3 Determinação da concentração das AgNPs

Para a determinação da concentração de prata nas amostras foi realizada o método de Fluorescência de Raios X por Reflexão Total (TXRF), de acordo com as metodologias propostas por Ribeiro *et al.* (2019). Tem-se que AgNP1 e AgNP3 apresentaram uma média de concentração de prata similar de aproximadamente 575 mg L<sup>-1</sup>, enquanto AgNP2 apresentou aproximadamente 400 mg L<sup>-1</sup>, como apresenta a Tabela 2.

Tabela 2 – Concentração de prata encontrada nas amostras AgNP1, AgNP2 e AgNP3 através do método TXRF.

Amostras	AgNP1	AgNP2	AgNP3
Média (mmol L <sup>-1</sup> )	5,2997	3,7729	5,4147
Média (mg L <sup>-1</sup> )	571,6263	406,9420	584,3510
Desvio Padrão (mg L <sup>-1</sup> )	19,1462	4,8749	22,7036

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para as amostras AgNP1 e AgNP3 a concentração de prata presente na amostra equivale a aproximadamente 50% da concentração de AgNO<sub>3</sub> inicial (i.e. C<sub>AgNO<sub>3</sub></sub>= 10 mmolL<sup>-1</sup>), enquanto para AgNP2 a concentração de prata equivale a aproximadamente 38% da concentração de AgNO<sub>3</sub> adicionada inicialmente sugerindo possibilidade de melhoramento da conversão do nitrato de prata pelo fungo utilizado neste trabalho (*A. niger* INCQS 40371).

### 4.3 Teste de difusão em poços

Para o teste de difusão em poços, apenas os experimentos AgNP1, AgNP2 e AgNP3 com maior pico da banda SPR observados em Espectrofotometria de UV-vis foram utilizados nos discos de difusão. Para uma visualização geral dos resultados encontrados no teste de difusão em poços, tem-se a Tabela 3, apresentando dados obtidos no trabalho comparados à literatura.

Tabela 3 – Resultados do teste de difusão em poços para todas as bactérias analisadas e comparação dos resultados com dados da literatura.

Bactérias AgNPs	Halo para <i>Clostridium</i> <i>perfringens</i> (mm)	Halo para <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> (mm)	Halo para <i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> (mm)	Halo para <i>Escherichia coli</i> (mm)
AgNP1 (100%)	14,0	14,0	17,0	18,0
AgNP1 (50%)	13,5	13,0	16,5	17,0
AgNP2 (100%)	14,0	14,0	21,0	17,5
AgNP2 (50%)	13,5	13,0	16,0	17,5
AgNP3 (100%)	14,0	14,0	20,0	19,5
AgNP3 (50%)	14,0	13,5	18,0	18,0
a*	-	12,0	12,33	13,0
b*	10,5	-	-	-

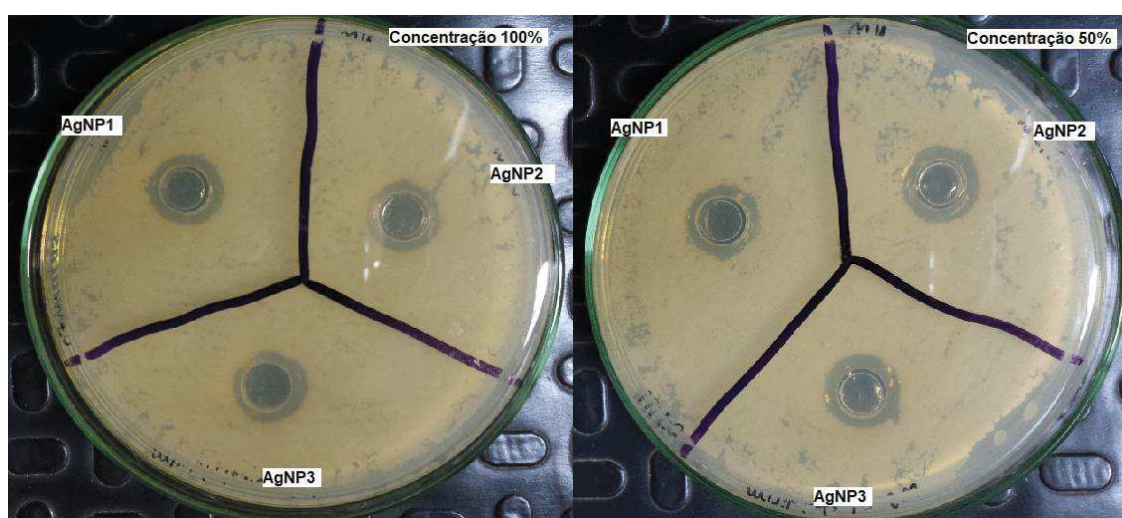
a\* Mudara *et al.* (2017) – 20% AgNPs biossintetizadas por *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, AgNO<sup>3</sup> inicial de 0,1 gL<sup>-1</sup>

b\* Borsari *et al.* (2019) – AgNPs biossintetizadas com extrato de lúpulo concentração de AgNO<sub>3</sub> de 1 mmolL<sup>-1</sup>.

#### 4.3.1 *Clostridium perfringens* INCQS 00053

O teste de verificação de atividade das suspensões foi feito em duplicata para a *Clostridium perfringens* INCQS 00053, proveniente da Fiocruz, através do método de difusão poços com concentração de 100% para AgNPs e diluída em 50%. Como observado na Figura 21, todas as 3 AgNPs biossintetizadas (AgNP1, AgNP2 e AgNP3) apresentaram atividade bactericida para as duas concentrações.

Figura 21 – Teste de difusão em poços de AgNP1, Ag NP2 e AgNP3 para *Clostridium perfringens* INCQS 00053 nas concentrações de 100% (figura da esquerda) e 50% (figura da direita) para as AgNPs.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Os experimentos foram realizados em duplicata, sendo assim, para AgNP1, AgNP2 e AgNP3 foi realizada uma média dos diâmetros dos halos, fornecendo os resultados apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Média do diâmetro dos halos das duplicatas para os experimentos AgNP1, AgNP2 e AgNP3 nas concentrações de 100% e 50% para a bactéria *Clostridium perfringens* INCQS00053.

Amostras	AgNP1	AgNP2	AgNP3
Média do diâmetro dos halos em concentração 100% (mm)	14,0	14,0	14,0
Média do diâmetro dos halos em concentração 50%(mm)	13,5	13,5	14,0

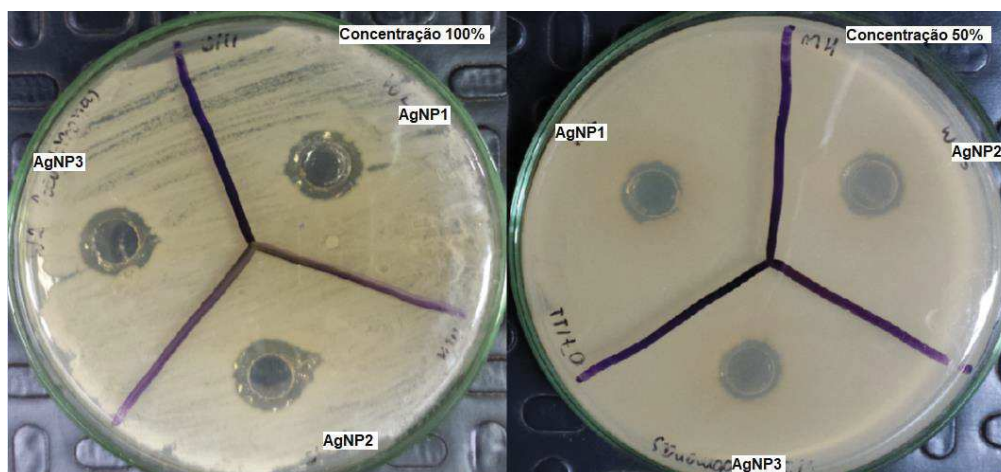
Fonte: Elaborada pelo autor.

Os resultados obtidos neste trabalho foram comparados com o trabalho de Borsari *et al.* (2019), onde a biossíntese das nanopartículas de prata foi realizada através de extrato de lúpulo. A concentração de  $\text{AgNO}_3$  utilizada em seu trabalho foi de  $1 \text{ mmolL}^{-1}$ , obtendo halo de 10,5 mm de diâmetro para a bactéria *Clostridium perfringens*. A diferença entre os dados encontrados na literatura e o presente trabalho demonstram que as nanopartículas biossintetizadas pelo fungo *A.niger* apresentaram halos de maior diâmetro, sendo o menor halo para a *C.perfringens* de 13,5 mm, totalizando uma diferença de 3 mm de diâmetro entre os mesmos.

#### 4.3.2 *Pseudomonas aeruginosa* INCQS 00025

A cepa utilizada é proveniente da Fiocruz, sendo a mesma a *Pseudomonas aeruginosa* INCQS 00025, também realizada em duplicata consistiu também na técnica de difusão em discos, sendo fornecidas as médias dos diâmetros encontrados neste trabalho. A Figura 22 apresenta a formação dos halos das três condições em concentração de 100% e 50%.

Figura 22 - Teste de difusão em poços de AgNP1, Ag NP2 e AgNP3 para *Pseudomonas aeruginosa* INCQS 00025 nas concentrações de 100% (figura da esquerda) e 50% (figura da direita) para as AgNPs.



Fonte: Elaborada pelo autor.

A Tabela 5 apresenta as medidas do diâmetro dos halos para as concentrações de 100% e 50% de prata.

Tabela 5 – Média do diâmetro dos halos das duplicatas para os experimentos AgNP1, AgNP2 e AgNP3 nas concentrações de 100% e 50% para a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* INCQS 00025.

Amostras	AgNP1	AgNP2	AgNP3
Média do diâmetro dos halos em concentração 100% (mm)	14,0	14,0	14,0
Média do diâmetro dos halos em concentração 50%(mm)	13,0	13,0	13,5

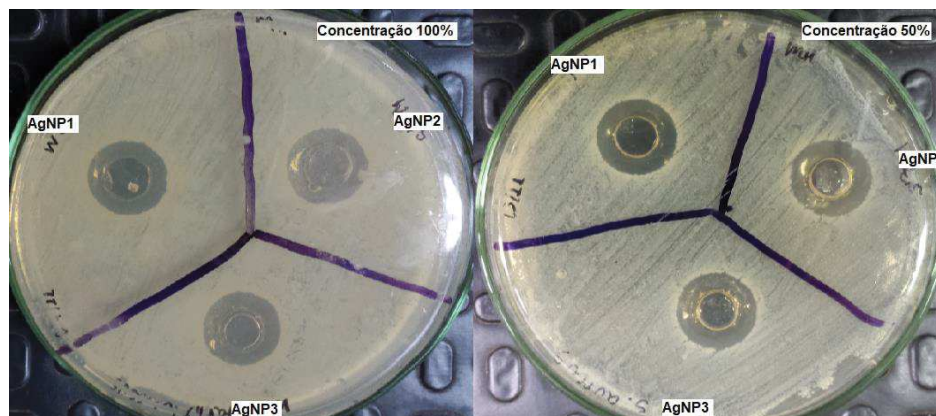
Fonte: Elaborada pelo autor.

Os resultados obtidos neste trabalho foram comparados com o trabalho apresentado por Mudara *et al.* (2017), onde amostras de AgNPs biossintetizadas pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 foram testadas para a atividade bactericida por disco difusão para 7 bactérias distintas. Para a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 o diâmetro médio encontrado por Mudara *et al.* (2017) foi de aproximadamente 13,00 mm, 1,00 mm de diferença entre os experimentos AgNP1, AgNP2 e AgNP3 realizados neste trabalho.

#### 4.3.3 *Staphylococcus aureus* INCQS 00015

Como apresentado na Figura 23, pode-se observar que todos os três experimentos AgNP1, AgNP2 e AgNP3 apresentaram a formação de halos para a *S. aureus* INCQS 00015, fornecida pela Fiocruz.

Figura 23 - Teste de difusão em poços de AgNP1, Ag NP2 e AgNP3 para *Staphylococcus aureus* INCQS 00015 nas concentrações de 100% (figura da esquerda) e 50% (figura da direita) para as AgNPs.



Fonte: Elaborada pelo autor.

A média dos diâmetros dos halos para a *Staphylococcus aureus* está apresentada na Tabela 6.

Tabela 6 – Média do diâmetro dos halos das suplicatas para os experimentos AgNP1, AgNP2 e AgNP3 nas concentrações de 100% e 50% para a bactéria *Staphylococcus aureus* INCQS 00015.

Amostras	AgNP1	AgNP2	AgNP3
Média do diâmetro dos halos em concentração 100% (mm)	17,0	21,0	20,0
Média do diâmetro dos halos em concentração 50%(mm)	16,5	16,0	18,0

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os resultados obtidos neste trabalho para a *Staphylococcus aureus* INCQS 00015 foram comparados com o trabalho apresentado por Mudara *et al.* (2017), onde amostras de AgNPs biossintetizadas pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 foram testadas para a atividade bactericida por disco difusão para 7 bactérias distintas.

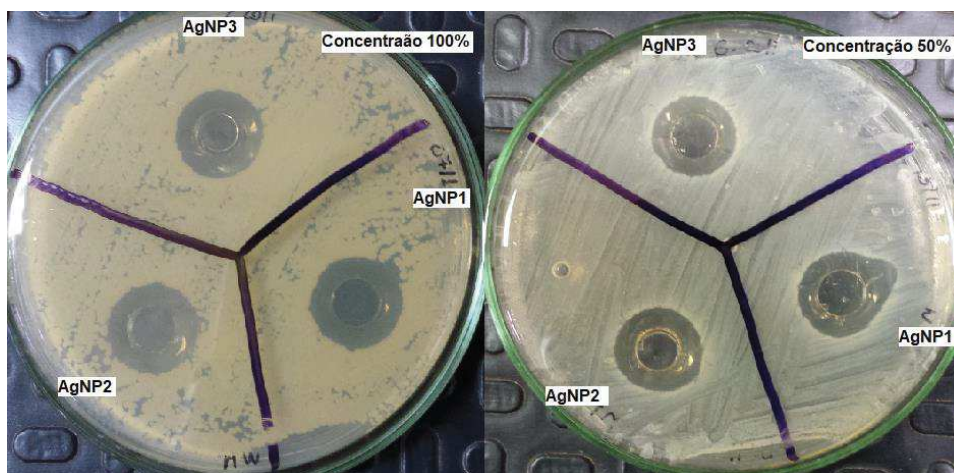
De acordo com Mudara *et al.* (2017), para a cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 apresentou halo de diâmetro de 12,33 mm para as AgNPs sintetizadas pela bactéria, enquanto o diâmetro do halo encontrado para as amostras biossintetizadas pelo fungo *Aspergillus niger* INCQS 40371, AgNP1, AgNP2 e

AgNP3 neste trabalho foi de 17,0, 21,0 e 20,0 mm, respectivamente. Pode-se notar uma diferença significativa em ambos os trabalhos, sendo AgNP1 a menor inibição por difusão em poços obtida, havendo ainda uma diferença de 4,67 mm de diâmetro entre os trabalhos.

#### 4.3.4 *Escherichia coli* INCQS 00033

Para o teste de verificação de atividade bactericida através do método de difusão em poços, foi utilizada uma colônia fornecida pela Fiocruz, *Escherichia coli* INCQS 00033. Os resultados podem ser observados na Figura 24.

Figura 24 - Teste de difusão em poços de AgNP1, Ag NP2 e AgNP3 para *Escherichia coli* INCQS 00033 nas concentrações de 100% (figura da esquerda) e 50% (figura da direita) para as AgNPs.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Tem-se, por fim, a Tabela 7 apresentando a média dos diâmetros dos halos para *E.coli*.



Tabela 7 – Média do diâmetro dos halos das duplicatas para os experimentos AgNP1, AgNP2 e AgNP3 nas concentrações de 100% e 50% para a *Escherichia coli* INCQS 00033.

Amostras	AgNP1	AgNP2	AgNP3
Média do diâmetro dos halos em concentração 100% (mm)	18,0	17,5	19,5
Média do diâmetro dos halos em concentração 50%(mm)	17,0	17,5	18,0

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os resultados para a *Pseudomonas aeruginosa* INCQS 00033 obtidos neste trabalho foram comparados com o trabalho apresentado por Mudara *et al.* (2017), onde amostras de AgNPs biossintetizadas pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Para Mudara *et al.* (2017), o diâmetro do halo encontrado foi de aproximadamente 12,00 mm para a sua suspensão, enquanto os diâmetros encontrados neste trabalho foram de 18,00 mm para AgNP1, 17,50 mm para AgNP2 e 19,50 mm para AgNP3, sendo assim, halos com diâmetro pelo menos 6,00 mm maiores do que os encontrados no trabalho de Mudara *et al.* (2017).

#### 4.4 Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Os experimentos realizados para CIM e CBM foram feitos com as amostras de maior banda SPR observada em espectrofotometria, além das bactérias utilizadas estarem ajustadas em escala de McFarlad 0,5. A Tabela 8 apresenta os resultados para CIM e CBM obtidos neste trabalho, bem como comparações com dados da literatura.

Tabela 8 – Resultados dos testes CIM e CBM para as 4 bactérias comparados a resultados obtidos na literatura.

<b>Bactérias</b> <b>AgNPs</b>	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>
AgNP1 CIM (mgL <sup>-1</sup> )	142,9066	71,4533	71,4533	71,4533
AgNP1 CBM (mgL <sup>-1</sup> )	142,9066	71,4533	71,4533	142,9066
AgNP2 CIM (mgL <sup>-1</sup> )	50,8678	50,8678	50,8678	50,8678
AgNP2 CBM (mgL <sup>-1</sup> )	50,8678	50,8678	50,8678	101,7355
AgNP3 CIM (mgL <sup>-1</sup> )	36,5220	73,0439	73,0439	146,0878
AgNP3 CBM (mgL <sup>-1</sup> )	73,0439	73,0439	73,0439	146,0878
<sup>1</sup> Gosh et al. (2013) CIM (mgL <sup>-1</sup> )	65,0	-	-	-
<sup>1</sup> Gosh et al. (2013) CBM (mgL <sup>-1</sup> )	-	-	-	-
<sup>2</sup> Bruniera et al. (2014) CIM (mgL <sup>-1</sup> )	-	1,8	1,8	7,8
<sup>2</sup> Bruniera et al. (2014) CBM (mgL <sup>-1</sup> )	-	1,8	1,8	7,8

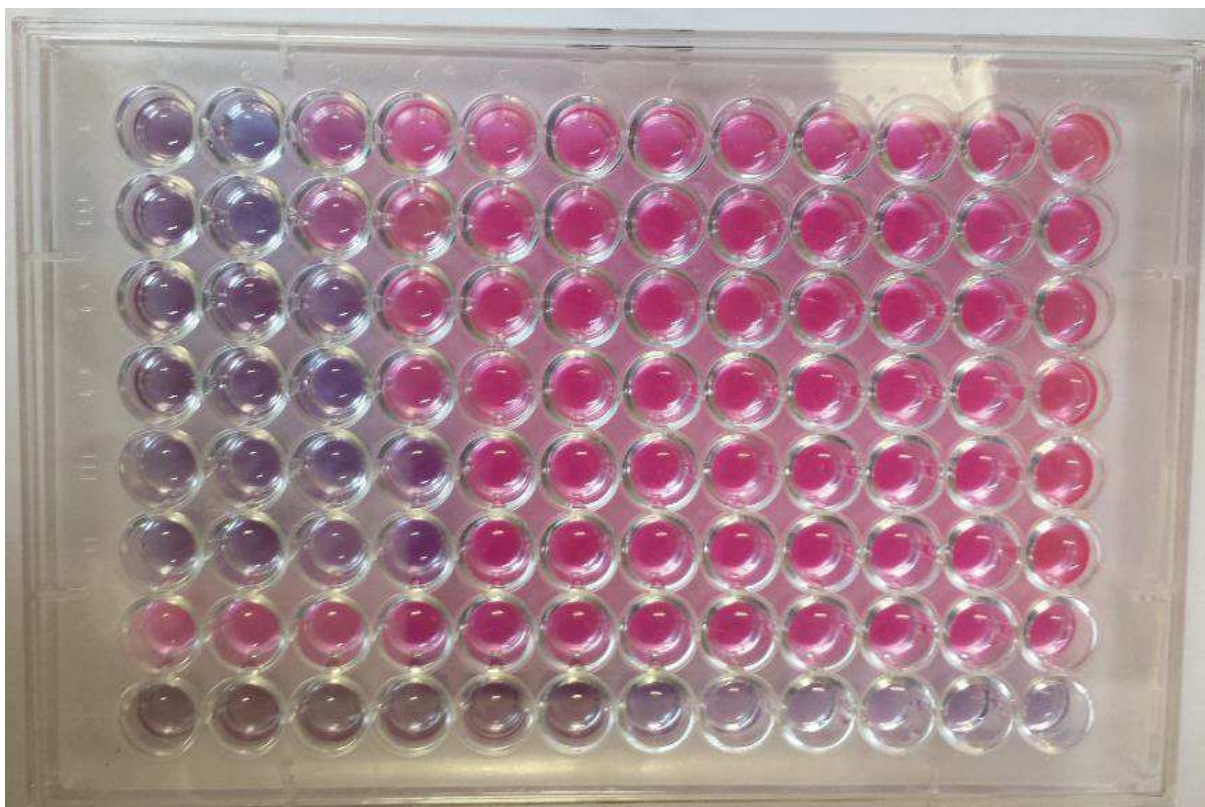
<sup>1</sup> Nanopartículas de prata sintetizadas por método químico.

<sup>2</sup> Nanopartículas de prata sintetizadas por método químico.

#### 4.4.1 CIM e CBM para *Clostridium perfringens* INCQS 00053

Como apresentado na Figura 25, tem-se que para a *Clostridium perfringens* a Concentração Inibitória Mínima foi diferente para as três amostras AgNP1, AgNP2 e AgNP3, sugerindo que as pequenas diferenças de concentração de prata encontradas através do método TXRF apresentaram também diferenças na atividade da prata sobre o microrganismo.

Figura 25 – Teste de Concentração Inibitória Mínima para a bactéria *Clostridium perfringens* INCQS 00053 para as amostras AgNP1 (linhas “A” e “B”), AgNP2 (linhas “C” e “D”) e AgNP3 (linhas “E” e “F”) com controle da bactéria na linha “G”, controle de AgNP1 em “H1” e “H2”, AgNP2 em “H3” e H4” e AgNP3 em “H5” e “H6”; controle do meio de “H7” a “H12”.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Como pode-se observar na placa de microdiluições, tem-se que para todos os 3 experimentos a CIM foi na coluna “D”, indicada pela coloração rosa (mudança de coloração da resazurina de azul para rosa). Pode-se observar também que em alguns pontos da placa há presença de coloração lilás, evento que pode ser solucionado pela observação de corpo de fundo nos poços, indicando o crescimento ou não da bactéria. No caso da *Clostridium perfringens* AgNP1 (linhas “A” e B”) a CIM resultante foi em 25% da concentração de prata. Para AgNP2 (linhas “C” e “D”) a CIM foi de 12,5% da concentração da prata e, por fim, para AgNP3 a CIM foi de 6,25% da concentração da prata. Para a visualização exata da CIM das AgNP1, AdNP2 e AgNP3 para a *Clostridium perfringens* INCQS 00053 tem-se a Tabela 9.

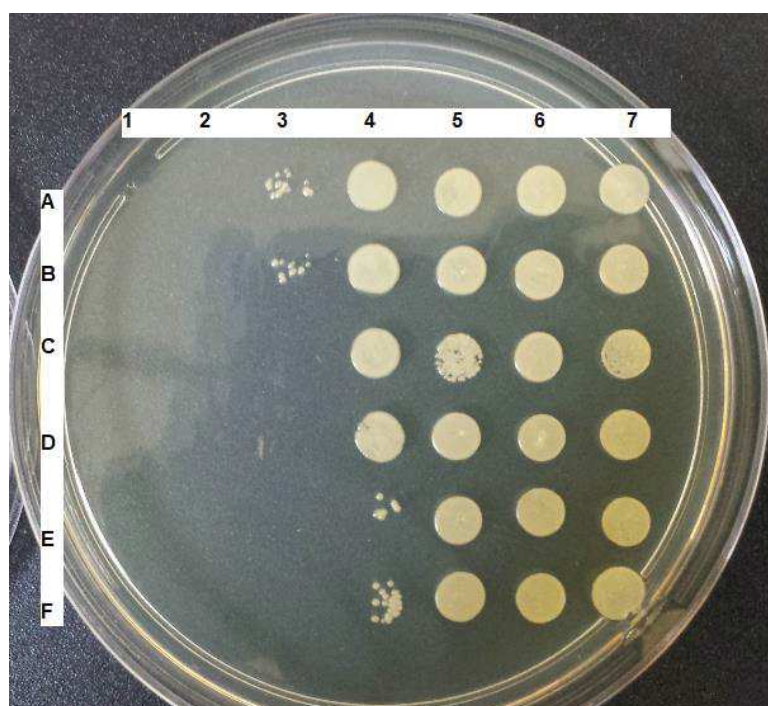
Tabela 9 – Teste CIM em placa de microdiluição para *Clostridium perfringens* INCQS 00053 nas amostras AgNP1, AgNP2 e AgNP3.

Amostra	AgNP1	AgNP2	AgNP3
CIM (%)	25,00	12,50	6,25
CIM (mmolL <sup>-1</sup> )	1,3249	0,4716	0,3384
CIM (mgL <sup>-1</sup> )	142,9066	50,8678	36,5220

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para a CBM, tem-se a Figura 26, confirmando a ausência de crescimento para as amostras em pelo menos 25% para AgNP1, 12,5 para AgNP2 e 6,25 para AgNP3.

Figura 26 – Teste CBM para a bactéria *Clostridium perfringens* INCQS 00053 para as amostras AgNP1 (linhas “A” e “B”), AgNP2 (linhas “C” e “D”) e AgNP3 (linhas “E” e “F”), sendo as diluições decrescentes, iniciando com 50% na coluna “1” e finalizando com 0,781% na coluna “7”.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Como pode-se observar comparando a Figura 25 com a Figura 26, tem-se que a CIM apresentou resultado positivo concentrações maiores, enquanto a CBM para concentrações menores, como segue na Tabela 10.

Tabela 10 - Teste CBM para *Clostridium perfringens* INCQS 00053 nas amostras AgNP1, AgNP2 e AgNP3.

Amostra	AgNP1	AgNP2	AgNP3
CBM (%)	25,00	12,50	12,50
CBM (mmolL <sup>-1</sup> )	1,3249	0,4716	0,6768
CBM (mgL <sup>-1</sup> )	142,9066	50,8678	73,0439

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os resultados da CIM para a cepa *Clostridium perfringens* INCQS 00053 observados no presente trabalho foram comparados com o trabalho de Ghosh *et al.* (2013), afim de obter um parâmetro para a atividade inibitória da prata das amostras biossintetizadas. No trabalho proposto por Ghosh *et al.* (2013) foi realizada a CIM utilizando AgNPs sintetizadas por métodos convencionais, obtendo uma CIM de 65,0 mgL<sup>-1</sup>. As amostras do presente trabalho AgNP2 e AgNP3 apresentaram CIM menor quando comparadas a este trabalho, indicando a boa atividade antimicrobiana destas amostras biossintetizadas obtidas para a *Clostridium perfringens*.

#### 4.4.2 CIM e CBM para *Pseudomonas aeruginosa* INCQS 00025

A Figura 27 a seguir apresenta a placa de microdiluição para o teste CIM da *Pseudomonas aeruginosa* para as amostras AgNP1, AgNP2 e AgNP3.

Figura 27 – Teste de Concentração Inibitória Mínima para a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* INCQS 00025 para as amostras AgNP1 (linhas “A e “B”), AgNP2 (linhas “C” e “D”) e AgNP3 (linhas “E” e “F”) com controle da bactéria na linha “G”, controle de AgNP1 em “H1” e “H2”, AgNP2 em “H3” e H4” e AgNP3 em “H5” e “H6”; controle do meio de “H7” a “H12”.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Pode-se observar através da mudança de coloração de azul para rosa que as três amostras apresentaram a mesma CIM para a *Pseudomonas aeruginosa*, tendo-se para AgNP1, AgNP2 e AgNP3 inibição da bactéria com até 12,5% de concentração de prata. Como consta na Tabela 11, as concentrações exatas de inibição para os três experimentos pela prata são de  $0,06625 \text{ mmol L}^{-1}$  nos três casos.

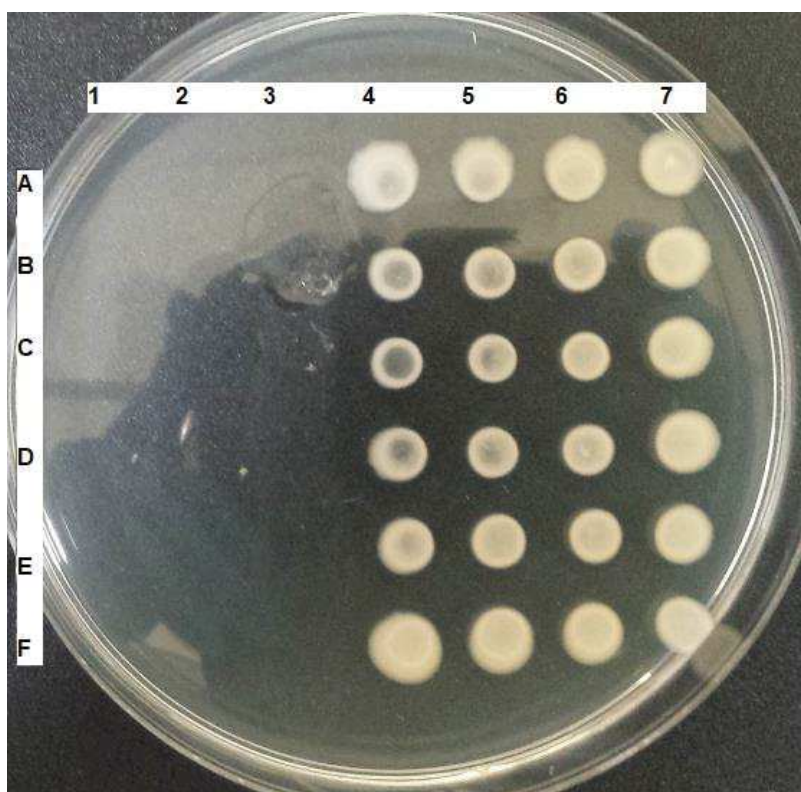
Tabela 11 – Teste CIM em placa de microdiluição para *Pseudomonas aeruginosa* INCQS 00025 nas amostras AgNP1, AgNP2 e AgNP3.

Amostra	AgNP1	AgNP2	AgNP3
CIM (%)	12,50	12,50	12,50
CIM (mmolL <sup>-1</sup> )	0,6625	0,4716	0,6768
CIM (mgL <sup>-1</sup> )	71,4533	50,8678	73,0439

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para a CBM tem-se a Figura 28, apresentando exatamente os mesmos resultados encontrados no teste CIM.

Figura 28 – Teste CBM para a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* INCQS 00025 para as amostras AgNP1 (linhas “A” e “B”), AgNP2 (linhas “C” e “D”) e AgNP3 (linhas “E” e “F”), sendo as diluições decrescentes, iniciando com 50% na coluna “1” e finalizando com 0,781% na coluna “7”.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Os resultados exatos para a CBM seguem na Tabela 12, onde AgNP1, AgNP2 e AgNP3 apresentam resultado negativo para o crescimento da bactéria em até 12,5% de sua concentração.

Tabela 12 - Teste CBM para *Pseudomonas aeruginosa* INCQS 00025 nas amostras AgNP1, AgNP2 e AgNP3.

Amostra	AgNP1	AgNP2	AgNP3
CBM (%)	12,50	12,50	12,50
CBM (mmolL <sup>-1</sup> )	0,6625	0,4716	0,6768
CBM (mgL <sup>-1</sup> )	71,4533	50,8678	73,0439

Fonte: Elaborada pelo autor.

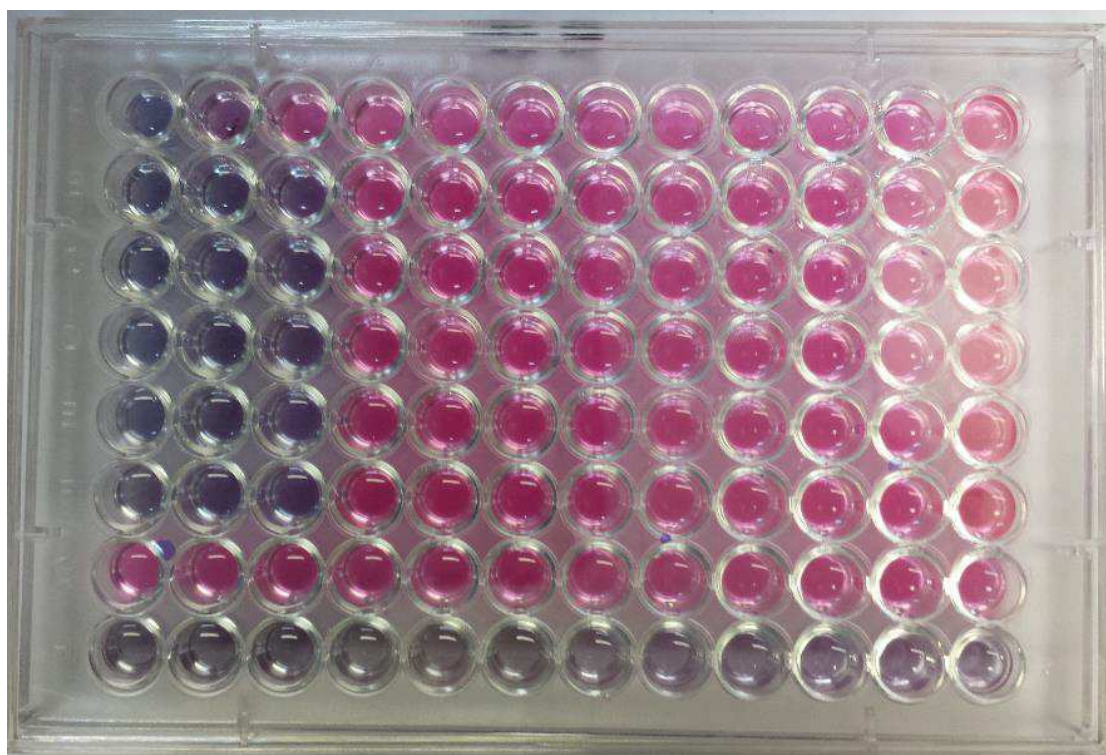
Tem-se no presente trabalho que para a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* INCQS 00053 AgNP1 apresentou tanto para a CIM quanto para a CBM valores de de 71,4533 mgL<sup>-1</sup>, AgNP2 50,8678 mgL<sup>-1</sup> e AgNP3 73,0439 mgL<sup>-1</sup>, os quais ainda se apresentam altos quando comparados com trabalhos como os de Bruniera *et al.*(2014), no qual foram testadas amostras de AgNPs sintetizadas por método químico para a cepa *P.aeruginosa* ATCC 27853, com CIM e CBM de aproximadamente 1,8 mgL<sup>-1</sup>.

#### 4.4.3 CIM e CBM para *Staphylococcus aureus* INCQS 00015

Para o teste CIM realizado para a *Staphylococcus aureus* INCQS 00015 pode-se observar um erro de pipetação na amostra AgNP1, na linha “A”, porém há inibição da bactéria pela amostra na linha “B”, indicando resultado positivo inibição até esta concentração de AgNP1 pela CIM. A Figura 29 apresenta os resultados obtidos.



Figura 29 – Teste de Concentração Inibitória Mínima para a bactéria *Staphylococcus aureus* INCQS 00015 para as amostras AgNP1 (linhas “A e “B”), AgNP2 (linhas “C” e “D”) e AgNP3 (linhas “E” e “F”) com controle da bactéria na linha “G”, controle de AgNP1 em “H1” e “H2”, AgNP2 em “H3” e H4” e AgNP3 em “H5” e “H6”; controle do meio de “H7” a “H12”.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Através da observação de mudança de cor e observação de corpo de fundo nos poços, pode-se afirmar que para a bactéria *Staphylococcus aureus* a CIM obtida em AgNP1, AgNP2 e AgNP3 foi em 12,5% da concentração da prata, sendo os valores exatos da concentração apresentados na Tabela 13.

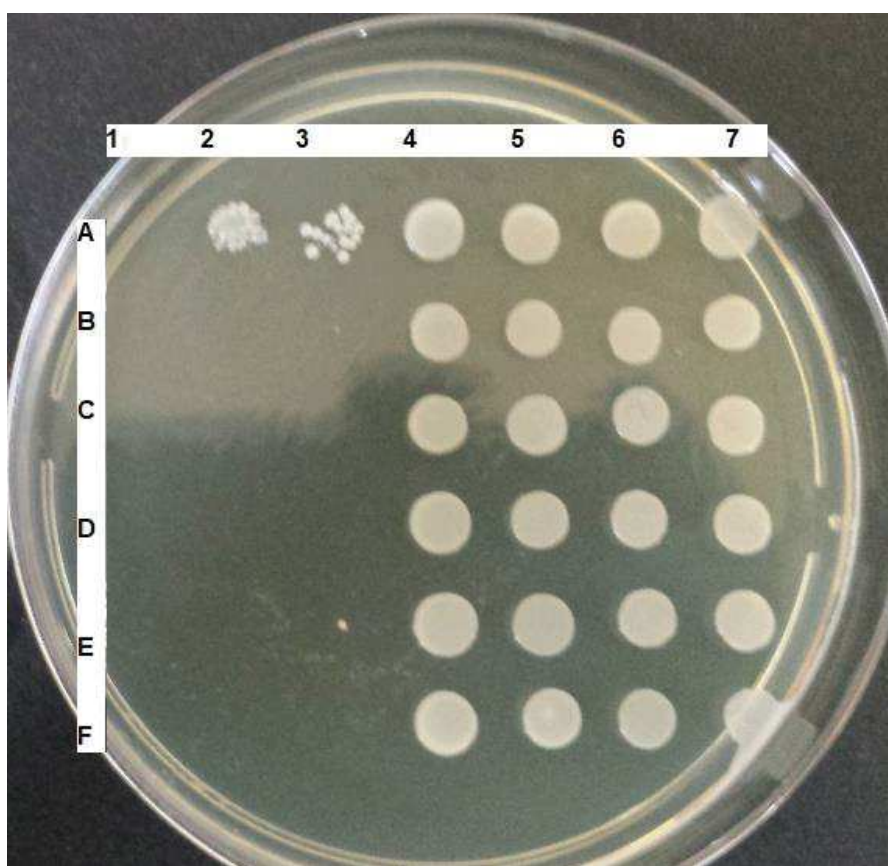
Tabela 13 – Teste CIM em placa de microdiluição para *Staphylococcus aureus* INCQS 00015 nas amostras AgNP1, AgNP2 e AgNP3.

Amostra	AgNP1	AgNP2	AgNP3
CIM (%)	12,50	12,50	12,50
CIM (mmolL <sup>-1</sup> )	0,6625	0,4716	0,6768
CIM (mgL <sup>-1</sup> )	71,4533	50,8678	73,0439

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para complementar o teste CIM, tem-se na Figura 30 o teste de CBM, confirmando o erro de pipetagem presente na CIM, linha "A" e resultado negativo para crescimento da bactéria nos poços de 12,5% de concentração para as AgNPs.

Figura 30 – Teste CBM para a bactéria *Staphylococcus aureus* INCQS 00015 para as amostras AgNP1 (linhas "A" e "B"), AgNP2 (linhas "C" e "D") e AgNP3 (linhas "E" e "F"), sendo as diluições decrescentes, iniciando com 50% na coluna "1" e finalizando com 0,781% na coluna "7".



Fonte: Elaborada pelo autor.

Do teste CBM tem-se a Tabela 14, apresentando inibição igual para todas as amostras.

Tabela 14 - Teste CBM para *Staphylococcus aureus* INCQS 00015 nas amostras AgNP1, AgNP2 e AgNP3.

Amostra	AgNP1	AgNP2	AgNP3
CBM (%)	12,50	12,50	12,50
CBM (mmolL <sup>-1</sup> )	0,6625	0,4716	0,6768
CBM (mgL <sup>-1</sup> )	71,4533	50,8678	73,0439

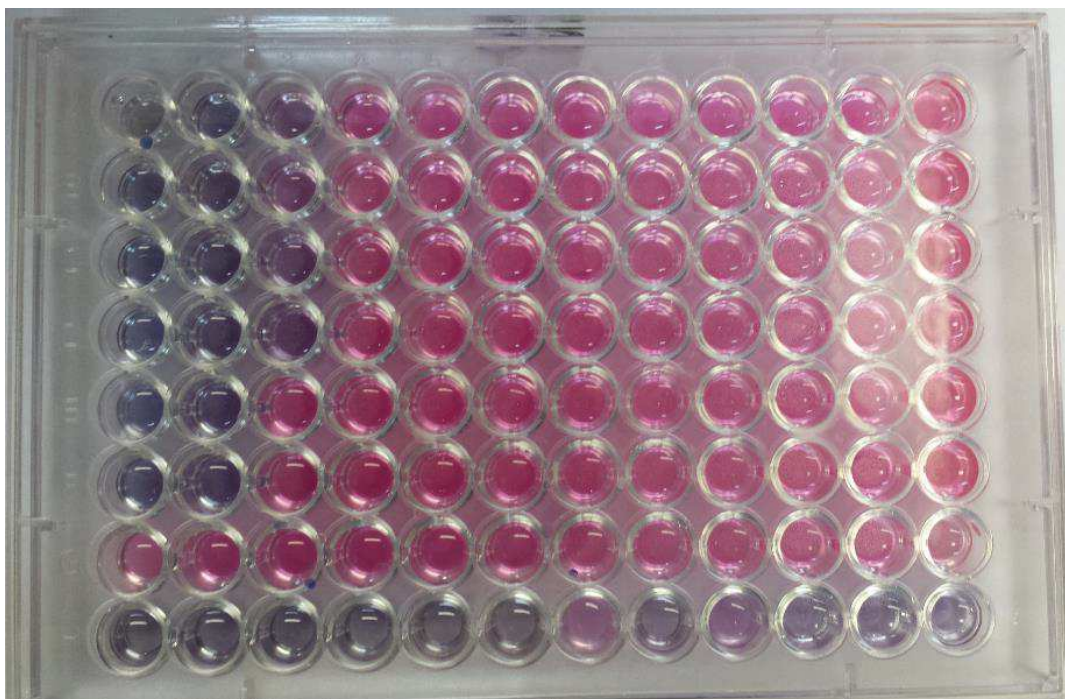
Fonte: Elaborada pelo autor.

Como pode ser observado através das tabelas 10 e 11, os valores da CIM e da CBM encontrados para a cepa *Staphylococcus aureus* INCQS 00015 ainda indicam a necessidade de concentrações maiores da amostra de AgNP tanto para a atividade bactericida quanto para a inibição das bactérias quando comparados com resultados obtidos por AgNPs sintetizadas quimicamente. Bruniera *et al.* (2014), por exemplo, realizou os testes CIM e CBM para a cepa *S.aureus* 25923, com CIM e CBM de 1,8 mgL<sup>-1</sup>.

#### 4.4.3 CIM e CBM para *Escherichia coli* INCQS 00033

Para o teste CIM pode-se observar na Figura 31 que as amostras AgNP1 e AgNP2 apresentaram melhor desempenho do que a amostra AgNP3. Há também indícios de erros de pipetagem em A1, H7 e H9, porém os resultados realizados em duplicata e a observação de corpo de fundo nos poços pode eliminar possíveis dúvidas relacionadas a estes casos.

Figura 31 – Teste de Concentração Inibitória Mínima para a bactéria *Escherichia coli* INCQS 00033 para as amostras AgNP1 (linhas “A” e “B”), AgNP2 (linhas “C” e “D”) e AgNP3 (linhas “E” e “F”) com controle da bactéria na linha “G”, controle de AgNP1 em “H1” e “H2”, AgNP2 em “H3” e H4” e AgNP3 em “H5” e “H6”; controle do meio de “H7” a “H12”.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Tem-se então para a *Escherichia coli* uma concentração inibitória mínima de 12,5% para AgNP1 e AgNP2, enquanto AgNP3 apresentou CIM de 25%, conforme a Tabela 15.

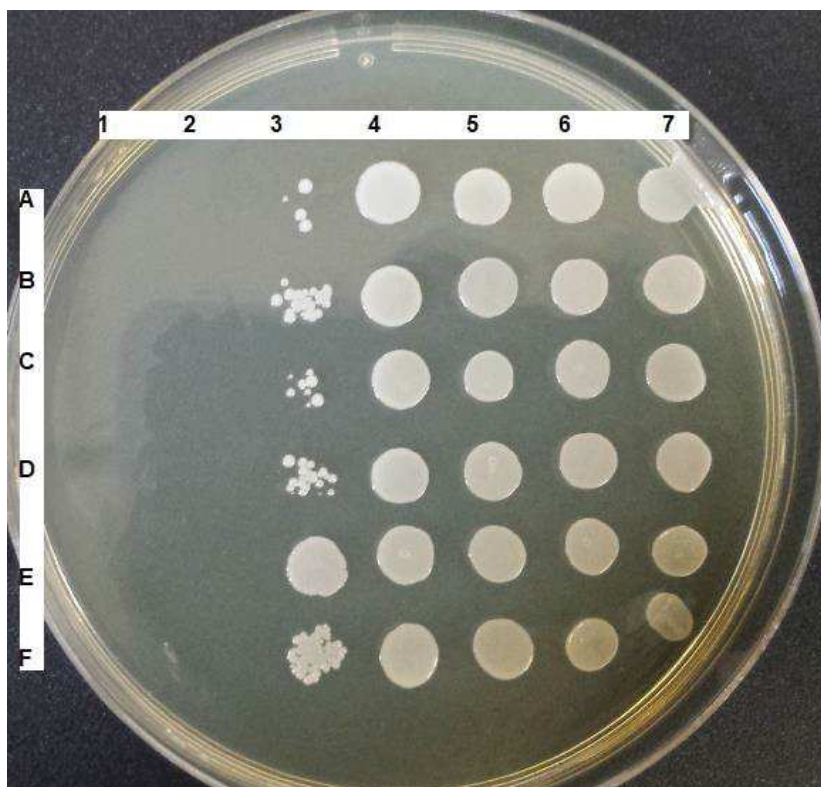
Tabela 15 – Teste CIM em placa de microdiluição para *Escherichia coli* INCQS 00033 nas amostras AgNP1, AgNP2 e AgNP3.

Amostra	AgNP1	AgNP2	AgNP3
CIM (%)	12,50	12,50	25,00
CIM (mmolL <sup>-1</sup> )	0,6625	0,4716	1,3537
CIM (mgL <sup>-1</sup> )	71,4533	50,8678	146,0878

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para a CBM tem-se resultado negativo para o crescimento bacteriano em 25% da concentração das AgNPs, indicando uma CBM com concentrações maiores do que as apresentadas na CIM. A Figura 32 apresenta a placa onde foi realizada a CBM.

Figura 32 – Teste CBM para a bactéria *Escherichia coli* INCQS 00033 para as amostras AgNP1 (linhas “A” e “B”), AgNP2 (linhas “C” e “D”) e AgNP3 (linhas “E” e “F”), sendo as diluições decrescentes, iniciando com 50% na coluna “1” e finalizando com 0,781% na coluna “7”.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Para a relação exata da CBM das amostras AgNP1, AgNP2 e AgNP3 tem-se a Tabela 16 apresentada a seguir.

Tabela 16 – Teste CIM em placa de microdiluição para *Escherichia coli* INCQS 00033 nas amostras AgNP1, AgNP2 e AgNP3.

Amostra	AgNP1	AgNP2	AgNP3
CBM (%)	25,00	25,00	25,00
CBM (mmolL <sup>-1</sup> )	1,3249	0,9432	1,3537
CBM (mgL <sup>-1</sup> )	142,9066	101,7355	146,0878

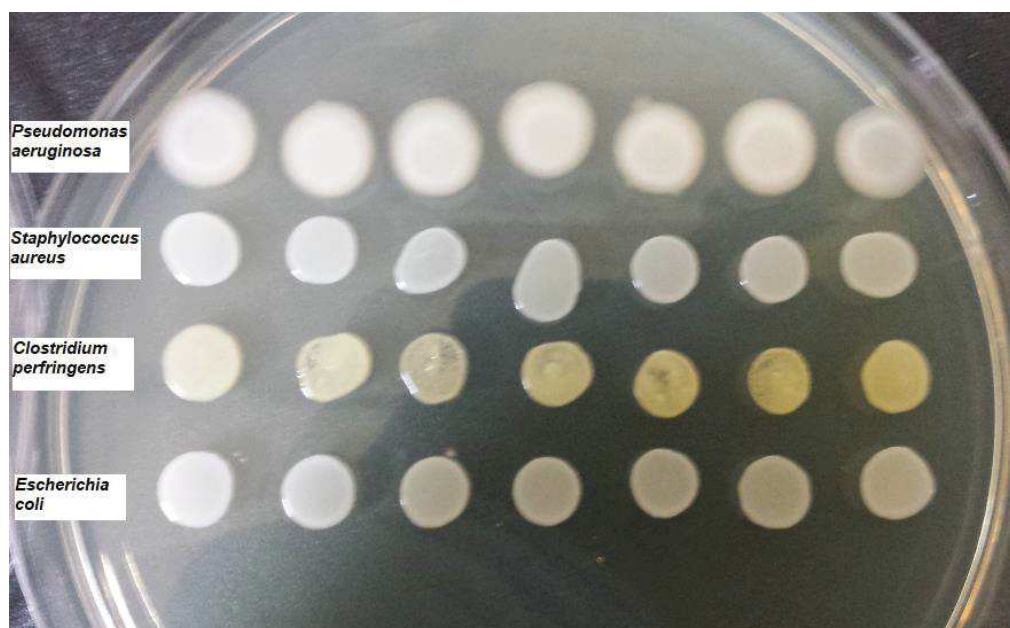
Fonte: Elaborada pelo autor.

No presente trabalho, as AgNPs biossintetizadas apresentaram valores com maior CIM e CBM para a bactéria *Escherichia coli* quando comparada a outros trabalhos. Bruniera *et al.* (2014), por exemplo, obteve uma CIM de 0,0019 mgL<sup>-1</sup> testada na cepa *E.coli* ATCC 25922 por AgNPs sintetizadas por métodos químicos. Loo *et al.* (2018) apresentou também CIM menor do que a obtida neste trabalho, com CBM e CIM de 7,8 mgL<sup>-1</sup> testada em *E.coli* ATCC 25922 com AgNPs biossintetizadas a partir de folhas de chá.

#### 4.4.4 Controle CBM

Para assegurar a credibilidade dos experimentos realizados, foi feito o controle para as bactérias utilizadas, como apresenta a Figura 33. Tem-se que todas as colônias apresentaram características morfológicas esperadas pela espécie, apresentando colônias uniformes em todos os controles, podendo afirmar que foram utilizadas as bactérias corretas para cada experimento.

Figura 33 – Controle na CBM das quatro bactérias utilizadas nos experimentos.



Fonte: Elaborada pelo autor.

## 5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos confirmam a capacidade do fungo *Aspergillus niger* INCQS 40371 de biossintetizar nanopartículas de prata e a possibilidade de refinamento do processo através do melhoramento genético do fungo para a nitrato redutase, enzima responsável pela síntese da nanopartícula de prata. Tem-se que as concentrações para os experimentos não foram tão distintas e condizem entre si, indicando que diferentes quantidades de esporo resultaram em atividade enzimática similar. A difusão em poços para as quatro bactérias apresentou resultado positivo para a inibição da prata, apresentando maior eficiência contra a *Escherichia coli* e a *Staphylococcus aureus* em ambas as concentrações de 100% e 50% de prata, com halos de diâmetro satisfatório quando comparados com dados presentes na literatura.

Para todas as bactérias as AgNPs biossintetizadas apresentaram atividade bactericida, até mesmo para concentrações diferentes (100% e 50% da concentração inicial) com pouca variação entre as mesmas, o que sugere inibição similar em concentrações de prata maiores do que 50%. Para clarificar este tópico, tem-se a CIM e a CBM, que indicaram CIM e CBM bastante similares para todas as

bactérias, salvo a *Clostridium perfringens*, a qual apresentou uma CIM de 6,25% para a amostra AgNP3, sendo esta a menor concentração inibitória mínima encontrada.

Apesar de bons desempenhos na difusão em poços, apenas a cepa *Clostridium perfringens* INCQS 00053 apresentaram resultados comparáveis com a literatura, sendo os demais resultados obtidos a partir das CIM e CBM mais elevados quando comparados com outros trabalhos. Maiores especulações devem ser realizadas quanto à síntese convencional e os diferentes tipos de microrganismos utilizados na biossíntese.

As perspectivas para este trabalho incluem o melhoramento genético do fungo para a nitrato redutase, proporcionando assim maiores taxas de conversão do nitrato de prata em nanopartículas. Outras possibilidades estão em especulações de diferentes variáveis para o procedimento, como temperatura e pH, podendo também ser realizada a síntese através de outro fungo ou organismo. A avaliação da atividade das nanopartículas biossintetizadas em outros microrganismos patogênicos também é de grande interesse para este trabalho.



## REFERÊNCIAS

- ALLEN, L. H.; FRIEDMAN, H.; BENDINELLI, M. *Staphylococcus aureus* Infection and Disease. **Kluwer Academic Publishers**, London. 2002.
- ARORA, P.; RAJPUT, K. J. One-pot multicomponent click synthesis of pyrazole derivatives using cyclodextrin-supported capsaicin nanoparticles as catalyst. **Journal of Materials Science**, India, vol.52, out. 2017.
- AMIMOTO, K.; NORO, T.; OISHI, E.; SHIMIZU, M. A novel toxin homologous to large clostridial cytotoxins found in culture supernatant of *Clostridium perfringens* type C. **Microbiology**, Japão, vol.153, p. 1198-1206, 2007.
- AMIN, R. M.; MOHAMED, M. B.; RAMADAN, M. A.; VERWANDER, T.; KRAMMER, B. Rapid and sensitive microplate assay for screening the effect of silver and gold nanoparticles on bacteria. **Nanopadicine**. Inglaterra: Duture Medicine. p. 637-643, 2009.
- BENN, T. M.; WASTERHOFF, P. Nanoparticle silver released into water from commercially available sock fabrics. **Environ. Sci. Technol.** ed. 42, p. 4133-4139, 2008.
- BORSARI et al. Antimicrobial activity of biogenic hop-based silver nanoparticles for Application in sugar and alcohol industries. **Journal of Siberian Federal University**. p. 277-286, 2019.
- BRUNIERA, João Felipe Bonatto et al . Development of Intracanal Formulation Containing Silver Nanoparticles. **Braz. Dent. J.**, Ribeirão Preto , v. 25, n. 4, p. 302-306, 2014 . Disponível em:  
<[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-64402014000400302&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-64402014000400302&lng=en&nrm=iso)>. Acessado em 13 Ago. 2019.  
<http://dx.doi.org/10.1590/0103-6440201302431>.
- BOROUMAND M. A.; NAMYAR, F.; MONIRI, M.; MD. TAHIR, P.; AZIZI, S.; MOHAMAD, R., Nanoparticles Biosynthesized by Fungi and Yeast: A Review of Their Preparation, Properties, and Medical Applications. **Molecules**. 20 ed., vol. 9, 2015.

CAMPBELL, H. W. NITRATE REDUCTASE STRUCTURE, FUNCTION AND REGULATION: Bridging the Gap between Biochemistry and Physiology.

**Phytotechnology Research Center and Department of Biological Sciences**.vol. 50, p. 277 – 303, 1999.

DE LIMA, R.; SEABRA, A.; DURÁN, N. Silver nanoparticles: a brief review of cytotoxicity and genotoxicity of chemically and biogenically synthesized nanoparticles. **J. of Appl. Toxic.** vol. 32, p. 867-879. 2012.

DOPAZO, P. J. Application of Nanomaterials in Nanomedicine, Dermatology and Cosmetics by Endor Nanotechnologies. **Supporting University Ventures in Nanotechnology, Biomaterials and Magnetic Sensing Applications**, 1 ed. Espanha: Springer, Cham. p. 165-170. 2018.

DONNENBERG, M. *Escherichia coli*: Virulence Mechanisms of a Versatile Pathogen.**Academic Press**, 2002.

FRATTINI, A.; PELLEGGRI, N.; NICASTRO, D. De Sanctis. Materials Chemistry and Pshysics. **Journal of Materials Chemistry A**. 1 ed. vol. 94, p. 148-152, nov. 2005.

GERICKE, M.; PINCHES, A. Microbial production of gold nanoparticles.**Gold Bulletin**, vol. 39, n. 1, p. 22-28, mar., 2006.

GHASEM, D. N. Production of Citric Acid. **Biochemical Engineering and Biotechnology**. vol. 4, p. 280-286, outubro 2007.

GHOSH, I. N. *et al.* Synergistic action of cinnamaldehyde with silver nanoparticles against spore-forming bacteria: a case for judicious use of silver nanoparticles for antibacterial applications. **Int. J. Nanomedicine**. vol. 8, p. 4721-4731, 2013.

GODFREY, T.; REICHEL, J.; WEST, S. Industrial enzymology. Nova lorque: **Stockton Press**. 1996.

HUANG, C.; MOREHART, A. L., The removal of Cu(II) from dilute aqueous solutions by *Saccharomyces cerevisiae*. **Water Research**.24 ed., vol. 4, p. 433-439, 1990.

HUYNH, U. W.; DITTMER, J. J.; ALIVISATOS, P. A. (2001).Hybrid Nanoroid-Polymer Solar Cells,**Science**, USA, vol. 295, 5564, 2425-2427, 2002.

IRAVANI, S.; KORBEEKANDI, H.; MIRMOHAMMADI, S. V.; ZOLFAGHARI, B. Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods. **Research in pharmaceutical Sciences**, vol. 9, n. 6, p. 385-406, dez.,2013.

JAIN, N.; BHARGAVA, A.; MAJUMDAR, S.; TARAFDAR, J. C.; PANWAR, J. Extracellular biosynthesis and characterization of silver nanoparticles using *Aspergillus flavus* NJP08: A mechanism perspective. **The Royal Society of Chemistry**. vol. 3, p. 635-641, 2011.

KAPOOR, S.; LAWLESS, D.; KENNEPOHI, P.; MEISEL, D.; SERPONE, N. *Langmuir*, 10 ed., vol. 9, p. 3018-3022, set. 1994.

KARAMAN, I.; SAHIN, F.; GULLUCE, M.; OGUTÇU, H.; SENGUL, M.; ADIGUZEL, A. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperusoxycedrus*L. **Journal of Ethnopharmacology**. 3 ed., vol. 85, p. 231-235, abril 2003.

KIM, S.; CHOI, J. E.; CHUNG, K. H.; PARK, K.; YI, J. *et. al.* Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells. **Toxicology In Vitro**. vol. 23, p.1076-1084. 2009.

KRAEMER, E. O.; STAMM, A. J. Mohr's Method for the Determination of Silver and Halogens in other than Neutral Solutions. **Journal of the American Chemical Society**. Vol 46, p. 2707 – 2709, 1924.

KUMAR, V.; BANO, D.; MOHAN, S.; SINGH, D. K.; HASAN, S. H. Sunlight-induced green synthesis of silver nanoparticles using aqueous leaf extract of *Polyalthialongifolia* and its antioxidant activity. **Materials Letters**.vol. 181, p. 371-377, 2016.

LOO, Y. Y. *et al.* In vitro Antimicrobial Activity of Green Synthesized Silver Nanoparticles Against Selected Gram-negative Foodborne Pathogens. **Frontiers in Microbiology**. vol. 9, 2018.

MACHIDA, M.; GOMI, K. *Aspergillus: Molecular Biology and Genomics*. Japão: **Caister Academic Press**, 2010.

MIRANDA, J. A. L.; ROCHA, J. A.; ARAÚJO, K. M.; QUELEMES, P.V.; MAYO, S. J.; ANDRADE, I. M. Atividade antibacteriana de extratos de folhas de *Montrichardia*

linifera (Arruda) Schott (Araceae). **Rev. Bras. Pl. Med.** 3 ed., vol. 17, p. 1142-1149, julho 2015.

MOHAREKAR, T. S. et al. EXPLOITATION OF ASPERGILLUS NIGER FOR SYNTHESIS OF SILVER NANOPARTICLES AND THEIR USE TO IMPROVE SHELF LIFE OF FRUITS AND TOXIC DYE DEGRADATION. **International Journal of Innovative Pharmaceutical Sciences and Research**, Índia, p. 2106-2118, set. 2014.

MUDARA, K. P.; CHINTIKA, P. G.; PRADEEP, M. J.; NUWAN, D. H. A.; NELUKA, F. Biosynthesized silver nanoparticles: are they effective antimicrobials? **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** vol. 112, p. 537-543, 2017.

NEVES, P. R.; MAMIZUKA, E. M.; LEVY, C. E.; LINCOPAN, N. Pseudomonas aeruginosa multirresistente: um problema endêmico no Brasil. **J Bras Patol Med Lab.** Brasil, vol. 47, p. 409-420, ago. 2011.

NIDA, T. K.; NAMRA, J. Mycosynthesis of Silver Nanoparticles from Aspergillus niger. **Journal of Biotechnology and Biomaterials.** 3 ed., vol. 6, 2016.

PALOMO, J.; FILICE, M., Biosynthesis of Metal Nanoparticles: Novel Efficient Heterogeneous Nanocatalysts. **Nanomaterials.** 6 ed., vol. 5, p.84, 2016.

PRABHU, S.; POULOSE, E. Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. **International Nano Letters.** p. 1-10, 2012.

RAI, M.; DURAN, N. Metal Nanoparticles in Microbiology. India: **Springer Heidelberg** Dordrecht London, 2011.

REOLON, C. M. M. *Síntese de Nanopartículas de Prata Estabilizadas por Carboximetilcelulose e Avaliação da Atividade Catalítica.* 2019. Dissertação (Pós-Graduação em Química) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Paraná.

RIBEIRO, C. et al. Evaluation of hybrid neutralization/biosorption process for zinc ions removal from automotive battery effluent by dolomite and fish scales.

**Environmental Technology.** vol. 40, p. 2373 – 2388, DOI: 10.1080/09593330.2018.1441332, 2019.

SHARMA, V. K.; YNGARD, R. A.; LIN, Y. Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. **Advances in Colloid and Interface Science**. Estados Unidos: Elsevier, vol. 145, p. 83-96, 2009.

SOLOMON, S. D.; BAHADORY, M.; JEYARAJASINGAM, A.; RUTKOWSKY, S.; BORITZ, S.; MULFINGER, L. Synthesis and Study of Silver Nanoparticle. **Journal of Chemical Education**. vol. 84, p. 322-325, fev. 2007.

TOSHIMA, N. Metal Nanoparticles for Catalysis. In: LIZ-MARZÁN, M. L.; KAMAT, V. P. **NANOSCALE MATERIALS**. Estados Unidos: Kluwer Academic Publishers, 2003.

UNKLES S. E.; CAMPBELL E. I.; CARREZ, D.; GRIEVE, C.; CONTRERAS, R.; VAN DER HONDEL, C. A. M. J. J.; KINGHORN, J. R. Transformation of *Aspergillus niger* with the homologous nitrate reductase gene. **Elsevier**. vol. 78, p. 157-166, 1989.

VIGNESHWARAN, N.; ASHTAPUTRE, N. M.; VARADARAJAN, P. V.; NACHNANE, R.P.; PARALIKAR, K. M.; BALASUBRAMANYA, R. H. Biological Synthesis of silver nanoparticles using the fungus *Aspergillus flavus*. **Materials Letters**. vol. 61, p. 1413-1418, 2007.

WILLIAMS, D. B.; CARTER, C. B. The transmission Electron Microscope. Nova lorque: **Springer Verlag**. 2009.

XIE, J.; LEE, J. Y.; WANG, D. I. C.; TING, Y. P. High-yield synthesis of complex gold nanostructures in a fungal system. **J Phys Chem C**. vol. 111, p. 16858-16865. 2007.

ZEWDE, B.; AMBAYE, A.; STUBBS, J. 3rd; RAGHAVAN, D. A review of Stabilized Silver Nanoparticles – Synthesis, Biological properties, Characterization, and Potential Areas of Application. **JSM Nanotechnology & Nanomedicine**, 2 ed., n. 2, p. 1-15, dez. 2016.

ZHANG, X.; LIU, Z.; SHEN, W.; GURUNATHAN, S. Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. **International Journal of Molecular Sciences**. Korea: MDPI, 2016.

