

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

WALTER BOTELHO SEIXAS

**ELABORAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE GEL ANTISSÉPTICO
A BASE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA OBTIDAS POR SÍNTESE
BIOLÓGICA**

Recife

2023

WALTER BOTELHO SEIXAS

**ELABORAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE GEL ANTISSÉPTICO
A BASE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA OBTIDAS POR SÍNTESE
BIOLÓGICA**

Área de concentração: Microbiologia, Bioprocessos e Bioprodutos

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Tânia Lúcia Montenegro Stamford

Co-orientadora: Profa. Dra. Thayza Christina Montenegro Stamford

Recife

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Seixas, Walter Botelho

Elaboração e caracterização de gel antisséptico a base de nanopartículas de prata obtidas por síntese biológica / Walter Botelho Seixas– 2023.

68 f. : il., fig., tab.

Orientadora: Tânia Lúcia Montenegro Stamford

Coorientadora: Thayza Christina Montenegro Stamford

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Recife, 2023.

Inclui referências.

1. Nanotecnologia 2. Aspergillus 3. Agentes anti-infecciosos I. Stamford, Tânia Lúcia Montenegro (orient.) II. Stamford, Thayza Cristina Montenegro (coorient.) III. Título

620.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2022 -135

WALTER BOTELHO SEIXAS

**ELABORAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE GEL ANTISSÉPTICO
A BASE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA OBTIDAS POR SÍNTESE
BIOLÓGICA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovado em: 29/03/2023

COMISSÃO EXAMINADORA

Dra. Thayza Christina Montenegro Stamford
UFPE

Dra. Norma Buarque de Gusmão
UFPE

Dra. Luciana de Oliveira Franco
UFRPE

À pessoa que me ajudou a expressar e a
manter o que de melhor há em mim,
Taciana de Amorim Silva.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Pernambuco – UFPE e a Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE pelo apoio financeiro e estrutural que possibilitaram a execução deste projeto. A Universidade Federal do Amazonas – UFAM, em nome da professora Maria Francisca Simas Teixeira, por ceder as linhagens de *Aspergillus* que foram a base para este trabalho. A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco – FACEPE pela concessão de bolsa desde o início deste curso.

Às minhas orientadoras oficiais da UFPE Thayza Christina Montenegro Stamford e Tânia Lúcia Montenegro Stamford e aos meus orientadores voluntários da UFRPE Marcos Antônio Barbosa de Lima, Taciana de Amorim Silva, Luciana de Oliveira Franco e Éder Galinari Ferreira, bem como aos professores do Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia da UFPE, por dedicarem tempo para ensinar e compartilhar suas experiências, por ajudarem a dirimir minhas dúvidas, pela paciência e pelo profissionalismo.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia Agrícola e Ambiental da UFRPE, do Laboratório de Microbiologia Aplicada da UFPE e do Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia da UFPE, aos técnicos do Laboratório Multiusuário de Análises Químicas do Departamento de Química da UFRPE, aos professores Ana Lúcia Figueiredo Porto, André Galembeck, Francisco Humberto Xavier Júnior e seus respectivos alunos, que de alguma forma contribuíram em diversas etapas deste trabalho. À Maria Clara Müller de Andrade, que esteve prontamente disponível e engajada nas etapas finais deste trabalho.

À minha família e aos meus amigos, por torcerem pela conclusão de mais uma etapa da minha vida.

A todos que, apesar das dificuldades, se dedicam a expandir os limites da Ciência no Brasil.

RESUMO

As nanopartículas de prata têm ganhado destaque pela sua comprovada atividade antimicrobiana e por serem uma ótima alternativa aos antibióticos tradicionais, aos quais uma série de patógenos tem adquirido resistência. Por sua vez, as técnicas de síntese de nanopartículas utilizando microrganismos e seus produtos metabólicos vem sendo aprimoradas de modo a contornar os efeitos causados pelas técnicas químicas e físicas, conhecidamente danosas ao meio ambiente e à saúde humana. Este trabalho tem como principal objetivo a elaboração de um gel antisséptico a base de quitosana formulado com nanopartículas de prata, obtidas por meio de síntese biogênica, tendo como agentes mediadores linhagens fúngicas da espécie *Aspergillus flavo-furcatis*. Busca-se como característica do produto a não indução de resistência nos microrganismos alvos e ação antagônica contra uma ampla variedade de microrganismos patogênicos, além de ser seguro para o usuário. A metodologia aplicada é ecossustentável e de baixo custo, e tem como base a redução de nitrato de prata por meio de biomoléculas presentes na biomassa fúngica e obtidas por meio de extração aquosa. As etapas de síntese foram otimizadas com base em um delineamento experimental fatorial, com variação das condições de temperatura, concentração de prata e pH. Ensaios de toxicidade foram realizadas através de HET-CAM; a concentração mínima inibitória e ação antimicrobiana das nanopartículas, bem como do gel antisséptico, foram determinadas por microdiluição seriada em caldo e por difusão em ágar por poço contra *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* e *Candida krusei*. As nanopartículas de prata foram caracterizadas através de DLS, STEM, D-RX e FTIR. Das linhagens testadas foi possível obter biomoléculas capazes de mediar a biossíntese de nanopartículas de prata, e estas, tanto em suspensão quanto em gel a base de quitosana, inibiram o crescimento dos microrganismos testados. Este trabalho de pesquisa permitiu o desenvolvimento de um gel com ação antimicrobiana contra uma diversidade de microrganismos patogênicos e oportunistas, utilizando tecnologia não agressiva ao meio ambiente e à saúde humana.

Palavras-chave: *Aspergillus*; Bionanotecnologia; Nanocompósito.

ABSTRACT

Silver nanoparticles have gained prominence for their proven antimicrobial activity and for being a great alternative to traditional antibiotics, to which a number of pathogens have acquired resistance. In turn, the techniques for synthesizing nanoparticles using microorganisms and their metabolic products have been improved in order to circumvent the effects caused by chemical and physical techniques, known to be harmful to the environment and human health. The main aim of this study is the elaboration of an antiseptic gel based on chitosan formulated with silver nanoparticles, obtained through biogenic synthesis, having as mediating agents fungal strains of the species *Aspergillus flavo-furcatis*. The non-induction of resistance in target microorganisms and antagonistic action against a wide variety of pathogenic microorganisms, in addition to being safe for the user, are desired characteristics for the product. The applied methodology is eco-sustainable and low cost, and is based on the reduction of silver nitrate through biomolecules present in fungal biomass and obtained through aqueous extraction. The synthesis steps were optimized based on a factorial experimental design, with varying conditions of temperature, silver concentration and pH. Toxicity assays were performed using HET-CAM; the minimum inhibitory concentration and antimicrobial action of the nanoparticles, as well as the antiseptic gel, were determined by serial microdilution in broth and agar diffusion per well against *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* and *Candida krusei*. Silver nanoparticles were characterized using DLS, STEM, D-RX and FTIR. From the strains tested, it was possible to obtain biomolecules capable of mediating the biosynthesis of silver nanoparticles, and these, both in suspension and in chitosan-based gel, inhibited the growth of the tested microorganisms. This study allowed the development of a gel with antimicrobial action against a variety of pathogenic and opportunistic microorganisms, using non-aggressive technology to the environment and human health.

Keywords: *Aspergillus*; Bionanotechnology; Nanocomposite.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Conidióforo de <i>Aspergillus</i> : (A) Esquema estrutural. (B) Microscopia ótica de <i>A. ochraceus</i>	20
Figura 2 – As várias aplicações para as nanopartículas de prata.....	22
Figura 3 – Mecanismos gerais para o modo de ação antimicrobiano das nanopartículas de prata	23
Figura 4 – Distribuição das substâncias teste (ST), meio (ME) e microrganismos testados (MO)	31
Figura 5 – Cultivo de <i>Aspergillus</i> em ágar Czapek-Dox (A) e estrutura reprodutiva em microscopia ótica (B)	34
Figura 6 – Biomassa separada do extrato bruto (A); extrato aquoso obtido da biomassa após 72h em agitação a 180 rpm e a 25 °C (B); extrato aquoso recuperado da biomassa por filtração a vácuo (C).....	35
Figura 7 – Extrato aquoso da biomassa de <i>Aspergillus flavo-furcatis</i> sem AgNO ₃ (A) e a mudança de coloração resultante da reação com AgNO ₃ (B)	36
Figura 8 – Espectros de absorção das AgNPs sintetizadas a partir dos extratos aquosos da biomassa de <i>A. flavo-furcatis</i> DPUA 1493 para cada diluição (esquerda); e as misturas reacionais referentes à mesma linhagem e às 4 concentrações de extrato aquoso micelial, com mudança de coloração característica da reação de síntese (direita)	37
Figura 9 – Espectros de absorção das AgNPs sintetizadas a partir dos extratos aquosos da biomassa de <i>A. flavo-furcatis</i> DPUA 1622 para cada diluição (esquerda); e as misturas reacionais referentes à mesma linhagem e às 4 concentrações de extrato aquoso micelial, com mudança de coloração característica da reação de síntese (direita)	38
Figura 10 – Espectros de absorção das AgNPs sintetizadas a partir dos extratos aquosos da biomassa de <i>A. flavo-furcatis</i> DPUA 1623 para cada diluição (esquerda); e as misturas reacionais referentes à mesma linhagem e às 4 concentrações de extrato aquoso micelial, com mudança de coloração característica da reação de síntese (direita)	39
Figura 11 – Atividade antimicrobiana das AgNPs sintetizadas por <i>A. flavo-furcatis</i> contra <i>E. coli</i> (A) e <i>C. albicans</i> (B): halos de inibição formados por cloranfenicol (a/A) e itraconazol (a/B), por AgNO ₃ (b) e por AgNPs (c)	43

Figura 12 – Mudança de coloração da mistura reacional após adição de AgNO ₃ ao extrato aquoso e incubação a 28° C em diferentes condições (1-4) de pH e concentração de AgNO ₃	44
Figura 13 – Mudança de coloração da mistura reacional após adição de AgNO ₃ ao extrato aquoso e incubação a 38° C em diferentes condições (1-4) de pH e concentração de AgNO ₃	44
Figura 14 – Mudança de coloração da mistura reacional das quatro amostras do ponto central após adição de AgNO ₃ ao extrato aquoso [EX.A.] e incubação a 33° C, pH e AgNO ₃ [1 mmol.L ⁻¹]	45
Figura 15 – Espectro de absorvância das misturas reacionais de extrato aquoso micelial de <i>A. flavo-furcatis</i> e AgNO ₃ submetidas a diferentes condições de temperatura, pH e concentração de AgNO ₃ ; formação de bandas de ressonância plasmônica para 1622-D, 1622-H e 1622-PC3	45
Figura 16 – Gráfico de Pareto dos Efeitos Padronizados	47
Figura 17 – Gráfico de superfície de Absorvância x Concentração de AgNO ₃ x pH. 47	
Figura 18 – Determinação do potencial de irritação pelo ensaio da membrana corioalantoide do ovo de galinha fecundado para as nanopartículas de prata biossintetizadas	52
Figura 19 – Imagem de microscopia eletrônica de transmissão das AgNPs sintetizadas por <i>A. flavo-furcatis</i> (esquerda) e histograma de distribuição das AgNPs em função do diâmetro (direita) referentes a 1622-D	54
Figura 20 – Imagem de microscopia eletrônica de transmissão das AgNPs sintetizadas por <i>A. flavo-furcatis</i> (esquerda) e histograma de distribuição das AgNPs em função do diâmetro (direita) referentes a 1622-H	54
Figura 21 – Imagem de microscopia eletrônica de transmissão das AgNPs sintetizadas por <i>A. flavo-furcatis</i> (esquerda) e histograma de distribuição das AgNPs em função do diâmetro (direita) referentes a 1622-PC3	55
Figura 22 – Espectro de FTIR da solução de AgNPs da amostra 1622-D	56
Figura 23 – Espectro de FTIR da solução de AgNPs da amostra 1622-PC3.....	56
Figura 24 – Espectro de FTIR da solução de AgNPs da amostra 1622-H	57
Figura 25 – Padrão de DRX das AgNPs sintetizadas por de <i>A. flavo-furcatis</i>	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Código das amostras de suspensão de nanopartículas de prata de acordo com a linhagem de <i>Aspergillus flavo-furcatis</i> e com a diluição do extrato aquoso em água deionizada ultrapura.....	27
Tabela 2 – Delineamento experimental do tipo fatorial 2 ³ , com quatro pontos centrais, para verificação da influência do pH, temperatura e concentração de nitrato de prata na síntese de AgNPs por <i>A. flavo-furcatis</i> DPUA 1622	28
Tabela 3 – Ensaio e códigos das amostras de acordo com as condições de síntese de AgNPs.....	29
Tabela 4 – Parâmetros dos espectros de UV-vis do extrato aquoso micelial de <i>Aspergillus</i> em diferentes diluições com adição de AgNO ₃ 1 mmol.L ⁻¹ , obtidos após 96 h de reação	40
Tabela 5 – Médias dos picos de absorvância por diluição	40
Tabela 6 – Tamanho hidrodinâmico, polidispersividade (PDI) e potencial Zeta das suspensões de nanopartículas biossintetizadas por intermédio de <i>A. flavo-furcatis</i> utilizando extrato aquoso micelial em diferentes diluições	41
Tabela 7 – Diâmetro médio (cm) e desvio padrão dos halos de inibição microbiana por ação das nanopartículas de prata sintetizadas por <i>A. flavo-furcatis</i> contra bactérias	42
Tabela 8 – Diâmetro médio (cm) e desvio padrão dos halos de inibição por ação das nanopartículas de prata sintetizadas por <i>A. flavo-furcatis</i> contra leveduras	42
Tabela 9 – Parâmetros dos espectros de UV-vis do extrato aquoso micelial de <i>Aspergillus</i> com adição de AgNO ₃ 1 mmol.L ⁻¹ , obtidos após 96 h de reação, sob diferentes condições de síntese	46
Tabela 10 – Tamanho hidrodinâmico, polidispersividade (PDI) e potencial Zeta das suspensões de nanopartículas biossintetizadas por intermédio de <i>A. flavo-furcatis</i> em diferentes condições de temperatura, pH e concentração de AgNO ₃	48
Tabela 11 – Diâmetro médio (cm) e desvio padrão dos halos de inibição microbiana por ação das nanopartículas de prata sintetizadas por <i>A. flavo-furcatis</i> contra bactérias.	49

Tabela 12 – Diâmetro médio (cm) e desvio padrão dos halos de inibição microbiana por ação das nanopartículas de prata sintetizadas por <i>A. flavo-furcatis</i> contra leveduras.	49
Tabela 13 – Concentração mínima inibitória das suspensões de AgNPs sintetizadas por <i>A. flavo-furcatis</i> sob diferentes condições de temperatura, pH e concentração de AgNO ₃	50
Tabela 14 – Concentração mínima inibitória do gel de quitosana (branco) e do mesmo gel contendo AgNPs da amostra 1622-D	59

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	17
2.1	OBJETIVO GERAL	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3	REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1	NANOTECNOLOGIA E BIONANOTECNOLOGIA.....	18
3.2	GÊNERO <i>ASPERGILLUS</i>	19
3.3	NANOPARTÍCULAS DE PRATA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	21
3.4	BIOSSÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS.....	23
4	MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1	MICROORGANISMOS	26
4.2	CULTIVO DE <i>ASPERGILLUS</i> EM MEIO SÓLIDO	26
4.3	CULTIVO SUBMERSO DE <i>ASPERGILLUS</i> E OBTENÇÃO DE EXTRATO AQUOSO.....	26
4.4	OTIMIZAÇÃO DA SÍNTESE BIOLÓGICA DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA MEDIADA POR <i>ASPERGILLUS</i>	27
4.4.1	Variação da concentração do extrato aquoso	27
4.4.2	Variação de temperatura, pH e concentração de nitrato de prata	28
4.5	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS AGNPS	29
4.5.1	Difusão em ágar por poço	29
4.5.2	Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI)	30
4.6	TESTE DE POTENCIAL DE IRRITAÇÃO EM OVO DE GALINHA USANDO MEMBRANA CORIOALANTOIDE (HET-CAM).....	31
4.7	ELABORAÇÃO DE GEL ANTISSÉPTICO A BASE DE QUITOSANA CONTENDO AGNPS E DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	32

4.8	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA SINTETIZADAS POR <i>A. FLAVO-FURCATIS</i>	32
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1	CULTIVO DE <i>ASPERGILLUS FLAVO-FURCATIS</i> EM MEIO SÓLIDO	34
5.2	CULTIVO SUBMERSO DE <i>ASPERGILLUS</i> E OBTENÇÃO DO EXTRATO AQUOSO MICELIAL	34
5.3	OTIMIZAÇÃO DA SÍNTESE BIOLÓGICA DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA MEDIADA POR <i>ASPERGILLUS FLAVO-FURCATIS</i>	35
5.3.1	Variação da concentração do extrato aquoso	35
5.3.1.1	<i>Aspecto visual e espectrofotometria de UV-Vis</i>	35
5.3.1.2	<i>Espalhamento dinâmico de luz (DLS)</i>	40
5.3.1.3	<i>Ensaio antimicrobiano por difusão em ágar por poço</i>	41
5.3.2	Variação de temperatura, pH e concentração de nitrato de prata	43
5.3.2.1	<i>Aspecto visual e espectrofotometria de UV-Vis</i>	43
5.3.2.2	<i>Espalhamento dinâmico de luz (DLS)</i>	47
5.3.2.3	<i>Ensaio antimicrobiano por difusão em ágar por poço</i>	48
5.3.2.4	<i>Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI)</i>	49
5.3.2.5	<i>Teste de potencial de irritação em ovo de galinha usando membrana corioalantoide (HET-CAM)</i>	50
5.4	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA	53
5.4.1	Espectrofotometria de Luz Ultra Violeta Visível (UV-Vis)	53
5.4.2	Espalhamento dinâmico de luz (DLS)	53
5.4.3	Microscopia Eletrônica de Transmissão-Varredura (STEM)	53
5.4.4	Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	55
5.4.5	Difração de raios-X (DRX)	57

5.5	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO GEL POLIMÉRICO A BASE DE QUITOSANA CONTENDO AGNPS.....	58
6	CONCLUSÕES.....	60
	REFERÊNCIAS	61

1 INTRODUÇÃO

As nanopartículas de prata (AgNPs) são excelentes antimicrobianos e por isso são muito utilizadas para tratar infecções e prevenir colonização bacteriana nas mais variadas superfícies. Muitos autores destacam a ação antagônica das AgNPs contra diversos microrganismos patogênicos, incluindo bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, fungos e vírus (GÚZMAN et al., 2009; ROY et al., 2019). As AgNPs também se destacam por apresentarem efeitos terapêuticos mesmo em baixas concentrações e sem efeitos tóxicos, além de não haver relatos sobre aquisição de resistência a compostos de prata na escala nanométrica por microrganismos (PANÁČEK et al., 2009).

Várias técnicas têm sido desenvolvidas para sintetizar AgNPs, incluindo processos físicos e químicos. Contudo, esses métodos necessitam de equipamentos de altos custos ou resultam em subprodutos poluentes. Entretanto, é possível utilizar sistemas biológicos para sintetizar nanopartículas de prata por um processo de biossíntese ou síntese verde sem gerar subprodutos tóxicos (BILAL et al., 2017; ROY et al., 2019). Dentre os sistemas biológicos empregados para síntese verde de AgNPs, os fungos são os mais promissores, pois têm tolerância a metais pesados, secretam grande quantidade de enzimas e são economicamente viáveis, uma vez que o custos com meios de cultura e reagentes são relativamente baixos e o tempo de cultivo e de reação de síntese são mais curtos; ainda, por se tratar de síntese extracelular, o processo de obtenção e purificação tanto dos bioagentes redutores quanto das próprias nanopartículas é mais simplificado se comparado à síntese utilizando bactérias, por exemplo. Além disso, a micossíntese possibilita a formação de uma interface biocompatível, pois as AgNPs são estabilizadas por proteínas do próprio fungo (DURÁN et al., 2005; HULKOTI e TARANATH, 2014; SILVA et al., 2017).

O gênero *Aspergillus* é composto por cerca de 350 espécies de fungos e, devido ao grande potencial de adaptação fisiológica, muitas espécies são importantes produtoras de moléculas com atividade biológica relevante para a indústria. A capacidade de produzir e secretar uma ampla gama de moléculas bioativas faz dos *Aspergillus*, não toxigênicos, ótimos candidatos para síntese biológica de nanopartículas de prata (SAMSON, 2014; SILVA et al., 2017; BARRS & TALBOT, 2020).

Numerosos estudos demonstraram resultados positivos empregando nanocompósitos constituídos por géis contendo AgNPs biogênicas no controle de

micro-organismos patogênicos (OVAIS et al., 2018). Além disso, a utilização de geleificante como quitosana para síntese de nanocompósitos de prata pode contribuir para a estabilização das AgNPs e prevenir a formação de agregados (Polinarski *et al.* 2021). Mediante o exposto, o presente projeto tem por objetivo produzir nanopartículas de prata por síntese biológica e desenvolver uma formulação de gel utilizando as AgNPs com propriedades antimicrobianas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Produzir nanopartículas de prata por síntese biológica e desenvolver uma formulação de gel antisséptico.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Otimizar a síntese de nanopartículas de prata, mediada por *Aspergillus* utilizando um processo ecossustentável, através de um delineamento experimental do tipo fatorial;
2. Selecionar a melhor linhagem de *Aspergillus flavo-furcatis* dentre três linhagens testadas como mediadora de síntese de nanopartículas de prata;
3. Caracterizar as nanopartículas de prata por meio de análises físico-químicas;
4. Determinar a concentração mínima inibitória (CMI) contra micro-organismos patogênicos e oportunistas;
5. Desenvolver uma formulação em gel à base de quitosana incorporando as nanopartículas de prata sintetizadas;
6. Avaliar a atividade antimicrobiana do gel a base de quitosana contendo nanopartículas de prata contra *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* e *Candida krusei*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 NANOTECNOLOGIA E BIONANOTECNOLOGIA

A Nanotecnologia trata da criação, manipulação e exploração de materiais em escala nanométrica, 1 nm a 100 nm (TOLEDO & SOARES, 2016), baseada nos conhecimentos da Nanociência, campo de estudo multidisciplinar que envolve Biologia, Engenharia de Materiais, Física, Química, entre outras áreas do conhecimento (SOUSA et al., 2018).

É atribuída à palestra “There is plenty of room at the bottom” (“há muito espaço na parte inferior”), ministrada em 1959 por Richard. P. Feynman, vencedor do Prêmio Nobel de Física de 1965, a origem dos conceitos de Nanociência e Nanotecnologia. Em 1974, é usado pela primeira vez o termo Nanotecnologia, quando o Norio Taniguchi, professor da Tokyo Science University, se refere à construção de materiais na escala nanométrica (MENEZES et al., 2011; DISNER & CESTARI, 2016).

A nanotecnologia se difere da química, física e disciplinas afins quando consideramos a construção de novos materiais átomo a átomo, com individualidade e precisão que não se obtêm quando se trabalha com aglomerados de moléculas. A este conjunto de materiais, ou nanomateriais, incluem-se os nanotubos, nanocanais, nanopartículas, nanocapacitores, nanoporos e as nanofibras (MENEZES, et al. 2011; MORAIS et al., 2014).

Voltada para as aplicações da Biologia e da Medicina, explica Souza (2019), a Bionanotecnologia tem buscado o aprimoramento em processos que envolvem a biocompatibilidade dos nanomateriais, permanência na circulação sanguínea, implicações no sistema imunológico e barreiras biológicas. Neste sentido, Mughal (2021) destaca a capacidade de se produzir nanomateriais a partir de sistemas vivos como algas, fungos e bactérias, seja através de suas estruturas celulares ou de seus produtos metabólicos isolados.

A nanotecnologia deve seu diferencial às propriedades singulares dos materiais em escala nanométrica. As nanopartículas, por exemplo, apresentam-se como importantes catalisadores de reações químicas e biologicamente mais ativas. Isto se deve a taxa de átomos de superfície, que aumenta exponencialmente conforme o tamanho da partícula decai (RAI et al., 2009; DISNER & CESTARI, 2016).

Preocupações atuais quanto a essa área promissora dizem respeito à biocompatibilidade, fontes renováveis e formas de obtenção não agressivas ao meio ambiente; assim como efeitos sobre a saúde e agregação de valor em diversos

produtos, principalmente àqueles destinados para o consumo humano (BECKER et, 2011; TOLEDO & SOARES, 2016).

Neste sentido, ressalta-se o debate relativamente aberto que tem sido promovido a respeito do potencial negativo do uso e do desenvolvimento da Nanociência e da Nanotecnologia, especialmente em se tratando do meio ambiente e as questões regulatórias. Dessa forma, os recursos tecnológicos desenvolvidos a partir dessas duas áreas podem ser vistos com maior confiança (LEAD et al., 2018; SCHWIRN et al., 2020).

3.2 GÊNERO ASPERGILLUS

As cerca de 350 espécies de *Aspergillus* já descritas compõem o grupo de fungos mais comuns da Terra, distribuídos principalmente no solo e na vegetação em decomposição, a partir da qual desempenham a importante função de reciclagem de carbono e nutrientes ambientais (SAMSON, 2016; BARRS & TALBOT, 2020).

Esses microrganismos sapróbios podem causar problemas à saúde humana através de seus esporos presentes no ambiente, e que são constantemente inalados. No entanto, requer-se uma carga alta de esporos e um hospedeiro com imunidade deficitária para que a doença se desenvolva (DUONG Nu el al, 2020); frequentemente no trato respiratório, visto que, tanto para humanos quanto para animais, a infecção se dá primariamente via inalação (BARRS & TALBOT, 2020).

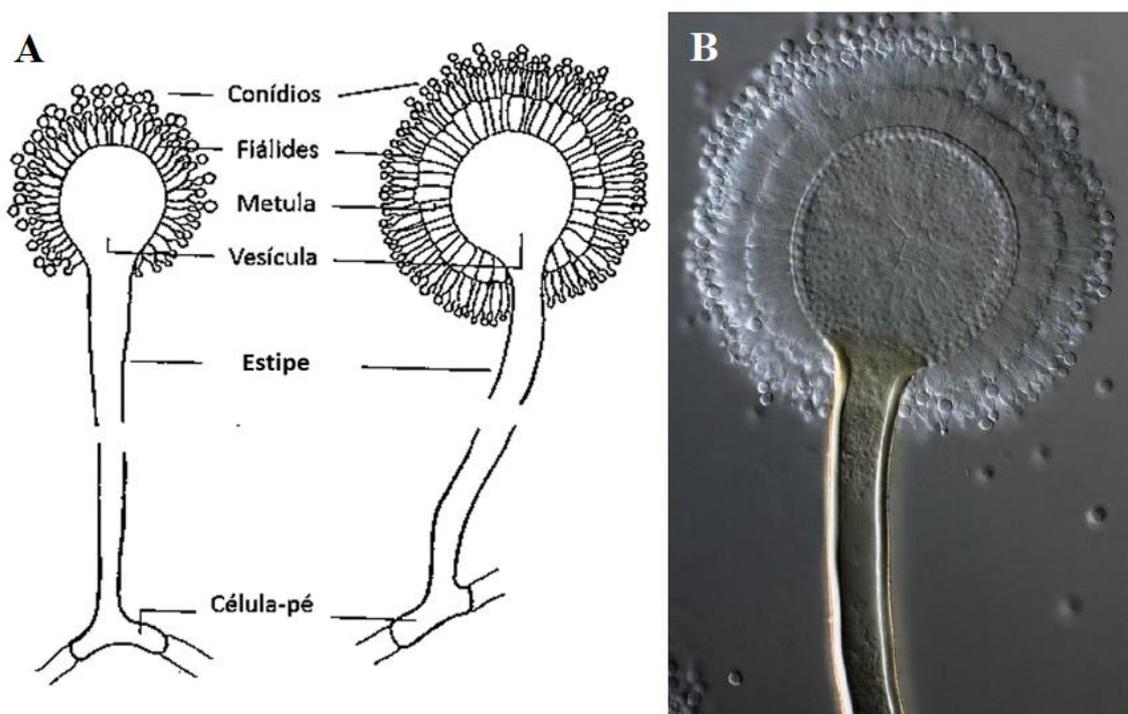
Outra preocupação acerca deste gênero, segundo Oliveira (2014) e Scazzocchio (2019), está no alto nível de toxicidade de alguns metabólitos secundários que estes fungos secretam, os quais provocam a deterioração de alimentos armazenados.

No entanto, argumenta Teixeira (2011), espécies de *Aspergillus* qualificados pela *Food and Drug Administration* (FDA) como GRAS (*Generally Regarded As Safe*) destacam-se na indústria alimentícia como importantes produtores de pectinase, proteases, celulasas, entre outros compostos. As características metabólicas de *Aspergillus* são exploradas em outros âmbitos da vida humana, tendo grande destaque na produção de recursos farmacêuticos cuja matéria-prima, como destaca Hasan (2019), é de baixo custo e de alto rendimento.

A maioria dos representantes de *Aspergillus* se reproduzem assexuadamente através de fiálides e conídios, enquanto outras espécies de reprodução sexuada o fazem por meio de ascas. A identificação morfológica do gênero se baseia

principalmente no micélio vegetativo, constituído por hifas septadas e ramificadas; e na estrutura de reprodução constituída por conidióforos originários da célula pé (figura 1), cuja expansão em uma estrutura no formato de vesícula fértil ou cabeça apresenta aspecto variado (SAMSON, 2014; SCAZZOCCHIO, 2019).

Figura 1. Conidióforo de *Aspergillus*: (A) Esquema estrutural (RAPER & FENNEL, 1977). (B) Microscopia ótica de *A. ochraceus* (SAMSON et al., 2014).



Para dar maior credibilidade ao processo de identificação de espécies de microrganismos, a taxonomia polifásica tem sido muito utilizada, pois baseia-se em aspectos morfológicos, fisiológicos, bioquímicos e moleculares. O crescente uso da espectrometria de massa associada a ferramentas estatísticas têm fortalecido ainda mais os métodos de identificação das espécies fúngicas (SAMSON, et al., 2014; YILMAZ et al., 2014; TAKAHASHI et al., 2017).

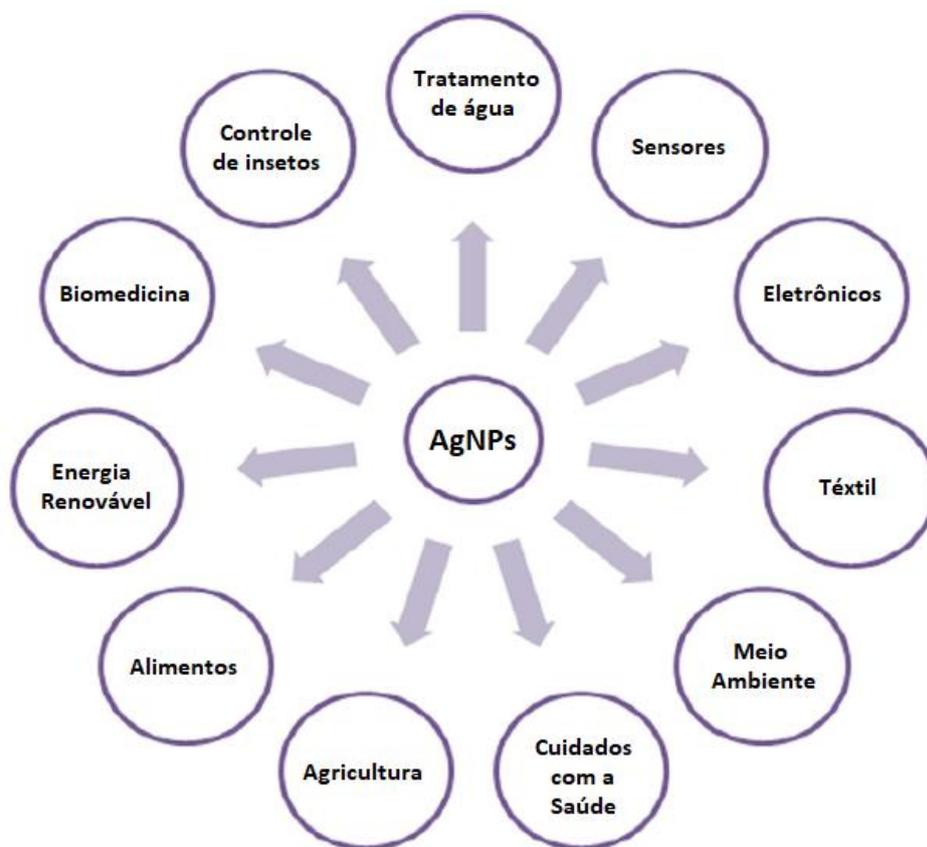
Uma série de estudos tem mostrado o potencial biotecnológico deste gênero, seja como biorreatores ou por meio de seus produtos metabólicos em meio extracelular. Espécies de *Aspergillus* são usados, por exemplo, na biotransformação de artemisinina, um agente antimalárico obtido de *Artemisia annua*, como é caso de *A. niger* (ZHAN et al., 2015), *A. terreus* (YU et al., 2017) e *A. flavus* (PONNAPALLI et al., 2018).

Os fungos são de fácil cultivo e fornecem uma grande quantidade de biomassa e biomoléculas, cujo processo de isolamento é mais simples se considerarmos o uso de bactérias para a obtenção de biocompostos de interesse, que requerem procedimentos relativamente mais sofisticados; além disso, o escalonamento da produção a partir do micélio fúngico é mais acessível (HULKOTI e TARANATH, 2014; MUGHAL et al., 2021).

3.3 NANOPARTÍCULAS DE PRATA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

As nanopartículas metálicas mais estudadas são de prata (DURAN, 2011), cujas propriedades antimicrobianas são conhecidas há muitos anos (BARILLO & MARX, 2014). Mas suas aplicações envolvem também, relatam Jannathul & Lalitha (2015), o tratamento de câncer e feridas, atividade catalítica e larvicida; incluindo-se ainda as aplicações no campo comercial (ABDELGHANY, 2018), conforme mostra a figura 2. Recentemente tem se buscado a eficácia dos medicamentos através de efeitos sinérgicos, com o emprego de nanopartículas metálicas para o controle de infecções microbianas (KUMAR, 2015).

Figura 2. As várias aplicações para as nanopartículas de prata (Adaptado de Abdelghany, 2018).

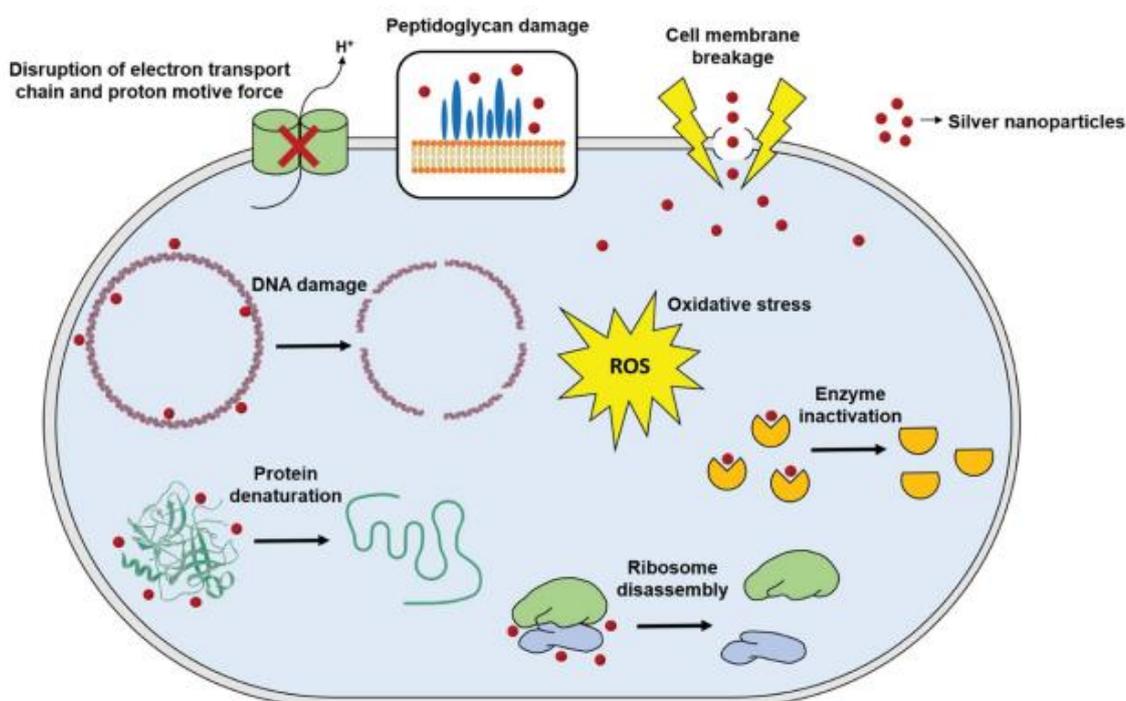


Segundo Ramesh (2015), a vantagem das nanopartículas está em seu comprimento de onda mais curto, que a torna transparente e apropriada em aplicações cosméticas e de revestimento. Em relação à medicina, a capacidade de otimizar a distribuição e direcionamento de drogas no organismo é um atrativo. Ainda, de acordo com Abdelghany (2018), as nanopartículas de prata biossintetizadas tem como particularidade uma biocompatibilidade muito maior em relação àquelas obtidas por métodos químicos.

A ação antimicrobiana das nanopartículas de prata já foi comprovada contra uma ampla gama de microrganismos. Apesar do entendimento sobre o mecanismo de ação das AgNPs (figura 3) ainda ser pouco preciso, alguns estudos o resumem em três processos principais: (1) interrupção dos processos de produção de ATP e replicação do DNA, como consequência da captação de íons de prata livres; (2) indução da formação de espécies reativas de oxigênio; e (3) danos diretos às membranas celulares (DURAN & MARCATO 2011; PELGRIFT & FRIEDMAN, 2013; ROY et al., 2019).

Os estudos com nanopartículas de prata demonstram ainda uma baixa possibilidade de microrganismos adquirirem resistência devido ao seu variado mecanismo de ação, e que o surgimento de resistência microbiana pode ser dificultado ainda mais quando aos produtos contendo AgNPs são adicionados outros agentes antimicrobianos, como quitosana (PELGRIFT & FRIEDMAN, 2013; HASSAN, 2015; SHIH *et al.*, 2019).

Figura 3. Mecanismos gerais para o modo de ação antimicrobiano das nanopartículas de prata (Fonte: Roy *et al.*, 2019).



Estudos alertam sobre a exposição humana às AgNPs a partir de suas muitas aplicações e os riscos de intoxicação com as mesmas, uma vez que testes com pele, fígado, pulmão, cérebro, sistema vascular e órgãos reprodutivos de mamíferos apontam uma certa suscetibilidade às nanopartículas. No entanto, a toxicidade induzida por AgNPs é dependente do tamanho, concentração e duração do tratamento (AHMED *et al.*, 2010; JOHNSTON *et al.*, 2010; BECKER *et al.*, 2011).

3.4 BIOSÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS

Muitas das técnicas de redução química para a obtenção de nanopartículas e sua estabilização envolvem altos custos e produtos que afetam negativamente a saúde humana e o meio ambiente (RAMESH, 2015), e para minimizar estes impactos,

têm-se dado um maior enfoque aos processos de síntese biológica. Fungos filamentosos, bactérias, algas, leveduras e plantas, os chamados sistemas vivos, apresentam capacidade para a redução metálica a partir de suas vias metabólicas (DURÁN, 2011; ABDELGHANY, 2018).

O potencial da biossíntese de nanopartículas parte da diversidade de biomoléculas, atualmente exploradas de forma a contornar as desvantagens das técnicas físicas e químicas. Ramesh (2015) destaca que estes biorrecursos, como enzimas, proteínas e extratos vegetais, podem ser usados para produzir nanopartículas intracelular e/ou extracelularmente.

A capacidade de certos microrganismos para sintetizar direta ou indiretamente nanopartículas metálicas parece derivar dos mecanismos próprios de resistência à toxicidade dos resíduos de metais pesados (FARAMARZI & SADIGHI, 2013). Klaus *et al.* (1999) demonstrou, em seu estudo com *Pseudomonas stutzeri* cultivada em meio com alta concentração de sais de prata, a existência de uma via natural para processar os íons de prata e resistir a seus efeitos tóxicos.

O mecanismo preciso para a biossíntese ainda não foi compreendido, uma vez que as reações de síntese dependem dos diferentes agentes biológicos e íons metálicos, além dos mecanismos empregados para a produção, que podem ser intracelulares ou extracelulares. Em fungos, por exemplo, a síntese extracelular de nanopartículas se dá basicamente pela redução dos íons metálicos por ação da enzima nitrato redutase, (DURÁN *et al.*, 2005; HULKOTI e TARANATH, 2014).

A metodologia envolvida na biossíntese de nanopartículas de prata inclui a etapa de caracterização. De acordo com Abdelghany (2018), informações como tamanho, forma, distribuição de tamanho, área de superfície, solubilidade, agregação, entre outras, são importantes porque refletem as propriedades biológicas das nanopartículas e são utilizadas nas avaliações de toxicidade e biocompatibilidade.

Quando consideramos a biossíntese mediada por fungos, encontramos na literatura nanopartículas de dimensões bem definidas e com monodispersividade satisfatória. Devido a capacidade de produzirem grandes quantidades de proteínas que hidrolisam íon metálicos, principalmente quando comparados às bactérias, os fungos são significativos produtores de nanopartículas (HULKOTI & TARANATH, 14; ROY & DAS, 2018).

Além disso, segundo mostra Duran *et al.* (2005) e Hulkoti & Taranath (2014), as nanopartículas biossintetizadas apresentam diferentes composições químicas,

interface biocompatível e menor toxicidade, uma vez que as próprias proteínas do microrganismo atuam como agente estabilizante. Através de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier, é possível identificar os prováveis grupos químicos envolvidos no processo de síntese e estabilização das AgNPs (SHAHZAD et al., 2019).

Uma revisão de Roy & Das (2015) focou nos estudos envolvendo a biossíntese de nanopartículas por espécies de *Aspergillus*, intracelular e extracelularmente, resultando num compilado que inclui as espécies a seguir: *A. niger*, *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. foetidus*, *A. clavatus*, *A. terreus*, *A. oryzae*, *A. concius*, *A. tubingensis*, *A. parasiticus*, *A. tamarii*, *A. nidulans*, *A. ochraceus*, *A. ustus*, *A. sydowii*. Pode-se acrescentar ainda *A. wentii* (Biswas e Bafunbiandi, 2016) e *A. versicolor* (ABDELGHANY, 2018).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MICRORGANISMOS

Nesta pesquisa foram utilizadas três linhagens de *Aspergillus flavo-furcatis*, DPUA 1493, DPUA 1622 e DPUA 1623, cedidos pela Coleção de Culturas DPUA/UFAM para mediar a síntese de AgNPs. Os testes antimicrobianos foram realizados contra as seguintes linhagens de microrganismos: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9028), *Candida albicans* (URM 5901) e *Candida krusei* (URM 6391).

4.2 CULTIVO DE ASPERGILLUS EM MEIO SÓLIDO

As linhagens de *Aspergillus* foram cultivadas em ágar Czapek-Dox (Nitrato de sódio 0,2%, Sulfato de Magnésio 0,05%, Cloreto de Potássio 0,05%, Sulfato Ferroso 0,001%, Difosfato de Potássio 0,1% e Sacarose 3%) durante 10 dias em temperatura ambiente, para avaliação da viabilidade das culturas. Lâminas coradas com azul de Amann foram preparadas para observação das microestruturas reprodutivas e confirmação da pureza das colônias.

Posteriormente foram preparados inóculos por meio de suave raspagem da superfície da colônia fúngica com *swab*, após adição de 10 mL de água destilada esterilizada contendo *tween* 80 (0,01% v/v). As três suspensões celulares obtidas [10^{-1}] das linhagens de *Aspergillus flavo-furcatis* foram homogeneizadas em agitadores tipo vórtex e 100 µL foram inoculados na superfície de agar Czapek-Dox de modo a espalhá-la homoganeamente por toda a superfície do meio. As culturas foram incubadas a 28 °C por sete dias.

4.3 CULTIVO SUBMERSO DE ASPERGILLUS E OBTENÇÃO DE EXTRATO AQUOSO

Os *Aspergillus* foram cultivados em 200 mL de MGY (Extrato de malte 0,3%; glicose 1%; extrato de levedura 0,3% e peptona 0,5 % [p/v]), por 96 h, a 28 °C, 180 rpm; o pH do meio foi ajustado para 7,0 com o auxílio de ácido clorídrico (HCl) 1 M e hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 M; o meio foi autoclavado a 121 °C por 15 min. 10 discos miceliais ($\varnothing = 8$ mm) dos cultivos em meio Czapek-Dox foram usados como inóculo.

Posteriormente o extrato bruto foi separado da biomassa usando um crivo de alumínio; o micélio foi lavado com água deionizada ultrapura esterilizada (água Milli-Q®) para remoção de resíduos do meio de cultivo. 50g da biomassa úmida foram transferidas para 250 mL de água Milli-Q [1:5, (p/v)] para o processo de extração das biomoléculas em meio aquoso. O processo foi conduzido a 28 °C, a 180 rpm, por 72h.

Após esse período, o extrato aquoso foi separado da biomassa por filtração a vácuo em papel de filtro Whatman n° 01, e membrana de filtração de nitrocelulose de 0,45 e 0,22 µm. O extrato aquoso filtrado foi armazenado em frascos de vidro esterilizados e mantidos a 4 °C para posterior uso na síntese de nanopartículas de prata.

4.4 OTIMIZAÇÃO DA SÍNTESE BIOLÓGICA DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA MEDIADA POR *ASPERGILLUS*

4.4.1 Variação da concentração do extrato aquoso

A primeira etapa da otimização da síntese de AgNPs foi realizada a partir de três diluições diferentes (v/v) do extrato aquoso (com pH entre 8 e 8,5) em água deionizada ultrapura Milli-Q® (1:3; 1:1; 3:1) e extrato aquoso não diluído. A síntese foi realizada após adição de uma solução de nitrato de prata (AgNO₃) 1 M ao extrato aquoso da biomassa de *Aspergillus* até obtenção de concentração final de 1 mmol.L⁻¹ de AgNO₃. A mistura reacional ficou incubada no escuro, a 28 °C, sob 180 rpm, por 96 horas (DURÁN et al., 2007; SILVA et al., 2017). A cada 24 hs foi coletada uma alíquota para leitura em espectrofotômetro de luz ultravioleta-luz visível (UV-Vis) em um intervalo de 200 a 600 nm durante 5 dias; a presença de nanopartículas de prata foi detectada por visualização de uma banda de ressonância plasmônica de superfície na faixa de 400 a 500 nm. As AgNPs sintetizadas a partir de diluições diferentes do extrato aquoso foram testadas em relação ao potencial antimicrobiano pelo método de difusão em ágar por poço (item 4.5.1).

Tabela 1. Código das amostras de suspensão de nanopartículas de prata de acordo com a linhagem de *Aspergillus flavo-furcatis* e com a diluição do extrato aquoso em água deionizada ultrapura.

Linhagem	Diluições			
	1:3	1:1	3:1	1
1493	1493-1	1493-2	1493-3	1493-4

1622	1622-1	1622-2	1622-3	1622-4
1623	1623-1	1623-2	1623-3	1623-4

4.4.2 Variação de temperatura, pH e concentração de nitrato de prata

A segunda etapa da otimização de síntese de AgNPs foi realizada utilizando apenas uma linhagem e uma diluição. A linhagem e a diluição foram selecionadas com base nos resultados obtidos nas leituras em espectrofotômetro de UV-Vis e por ensaio antimicrobiano (difusão em ágar por poço).

Esta etapa foi realizada com base em um delineamento experimental do tipo fatorial 2^3 com quatro pontos centrais visando avaliar as melhores condições de pH (ajustado com o auxílio de ácido clorídrico (HCl) 1 M e hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 M), temperatura e concentração de nitrato de prata para a síntese de nanopartículas de prata de acordo com a tabela 2. A síntese de AgNPs foi realizada seguindo o método descrito no item 4.4.1 e com as modificações apresentadas no delineamento experimental, elaborado com auxílio do software Minitab® versão 21.2.0. No total, foram realizados 12 ensaios (Tabela 3).

Tabela 2. Delineamento experimental do tipo fatorial 2^3 , com quatro pontos centrais, para verificação da influência do pH, temperatura e concentração de nitrato de prata na síntese de AgNPs por *A. flavo-furcatis* DPUA 1622.

Nível	pH	Temperatura (°C)	Concentração de AgNO ₃ (mmol.L ⁻¹)
-1	6	28	0,5
0	8	33	1
1	10	38	1,5

Tabela 3. Ensaio e códigos das amostras de acordo com as condições de síntese de AgNPs.

Ensaio	Código da Amostra	Temperatura (°C)	pH	Concentração de AgNO ₃ (mmol.L ⁻¹)
A	1622-A	28 °C	6,0	0,5
B	1622-B	28 °C	6,0	1,5
C	1622-C	28 °C	6,0	0,5
D	1622-D	28 °C	6,0	1,5
E	1622-E	38 °C	10,0	0,5
F	1622-F	38 °C	10,0	1,5
G	1622-G	38 °C	10,0	0,5
H	1622-H	38 °C	10,0	1,5
PC-1	1622-PC1	33 °C	8,0	1,0
PC-2	1622-PC2	33 °C	8,0	1,0
PC-3	1622-PC3	33 °C	8,0	1,0
PC-4	1622-PC4	33 °C	8,0	1,0

4.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS AGNPS

4.5.1 Difusão em ágar por poço

A atividade antimicrobiana das suspensões de AgNPs obtidas a partir da primeira (item 4.4.1) e da segunda (item 4.4.2) etapa de otimização da síntese foi determinada pelo método de difusão em ágar por poço contra os microrganismos testes selecionados.

As suspensões microbianas foram preparadas em água destilada esterilizada a partir de colônias das cepas bacterianas testes cultivadas em meio Brain Heart Infusion (BHI) por 24 horas e de colônias das linhagens de leveduras testes cultivadas em meio Sabouraud (SAB) por 48 horas. A padronização das suspensões microbianas foi realizada em espectrofotômetro; a confirmação da turvação igual à suspensão 0,5 da escala de McFarland (aproximadamente $1,0 \times 10^8$ UFC/mL) foi realizada com leituras nas faixas de 0,08-0,1 a 625 nm para bactérias, e 530 nm para leveduras.

Uma alíquota de 100 µL das suspensões dos microrganismos testes foram inoculados na superfície de BHI e SAB e espalhados com auxílio de um *swab*. Em seguida, foram adicionados 100 µL das suspensões de AgNPs em poços ($\varnothing = 8$ mm); como controles foram utilizados 100 µL de solução de clorafenicol (50 µg/mL) para bactérias e 100 µL de solução de itraconazol (50 µg/mL) para leveduras, bem como 100 µL de solução de nitrato de prata (1 mmol.L⁻¹). Os cultivos foram incubados a 37 °C por 18 h (bactérias) e 37° C por 24h (levedura). A atividade antimicrobiana foi

expressa em milímetros, medindo-se o diâmetro do halo de inibição (PRADO et al., 2017) e subtraindo o diâmetro do poço.

4.5.2 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI)

A determinação da Concentração Mínima Inibitória das suspensões de AgNPs obtidas na segunda etapa de síntese (item 4.4.2) foi realizada de acordo com a metodologia de Gudinã et al. (2010) com modificações, tendo sido reservada a última linha da microplaca para os controles. Para os ensaios, as bactérias foram cultivadas em caldo Mueller Hinton (CMH) (2 mL) a 37 °C por 24h, e as leveduras em caldo Sabouraud Dextrose a 37°C por 48h.

As suspensões microbianas foram padronizadas a partir destas mesmas culturas. De 24 horas para as bactérias, adicionando-se PBS pH 7,2 estéril até atingir turvação igual à suspensão do tubo 0,5 da escala de McFarland (aproximadamente $1,0 \times 10^8$ UFC/mL), com leitura espectrofotométrica a 625nm para confirmação da concentração de microrganismos e diluição 1:10, em CMH, obtendo-se uma suspensão de $1,0 \times 10^7$ UFC/mL. A partir de culturas de 48 horas para leveduras, adicionando-se PBS pH 7,2 estéril até atingir turvação igual à suspensão do tubo 0,5 da escala de McFarland (aproximadamente 5×10^6 UFC/mL). A leitura espectrofotométrica foi feita na faixa de 530nm e a suspensão fúngica foi feita primeiro 1:100 e em seguida 1:20 em PBS, chegando-se a uma suspensão de $2,5 \times 10^3$ UFC/mL.

O teste foi realizado em microplaca de 96 poços (Figura 4), em duplicata, contendo caldo BHI para bactéria e caldo Sabouraud para levedura. As suspensões de AgNPs foram adicionadas em diferentes volumes para obtenção de um gradiente de concentração. O volume final em cada poço contendo meio, substância teste e microrganismo foi de 100 µL.

Figura 4. Distribuição das substâncias teste (ST), meio (ME) e microrganismos testados (MO) em placa de 96 poços.

Volumes (μL)				<i>S. aureus</i>		<i>E. faecalis</i>		<i>E. coli</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>C. albicans</i>		<i>C. krusei</i>	
Meio []	ST + ME + MO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
2x	60+20+20	A	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
2x	50+30+20	B	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
1x	40+40+20	C	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
1x	30+50+20	D	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
1x	20+60+20	E	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
1x	15+65+20	F	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
1x	10+70+20	G	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
1x	5+75+20	H	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●

O controle de crescimento foi feito em duplicata para cada uma das amostras selecionadas, com os poços sendo preenchidos apenas com o meio e a substância teste.

As microplacas contendo meio, suspensão de AgNPs e microrganismos teste foram submetidas a leitura de absorbância a 492 nm no espectrofotômetro de microplaca Elisa após permanecer 30 minutos em incubadora BOD, para obtenção dos valores de densidade óptica (DO) inicial, e 24 horas em BOD para densidade óptica final. Após a obtenção das DOs, foram adicionados 30 μL do revelador resazurina, preparada em solução aquosa [0,01%] para observação da viabilidade celular.

4.6 TESTE DE POTENCIAL DE IRRITAÇÃO EM OVO DE GALINHA USANDO MEMBRANA CORIOALANTOIDE (HET-CAM)

O teste da membrana corioalantoide do ovo de galinha fecundado (HET-CAM) foi utilizado para avaliar o potencial de irritação das nanopartículas de prata sintetizadas e seguindo a metodologia descrita por Steiling et al. (1999), em quintuplicata, em ovos fertilizados de galinha (livres de patógenos específicos) incubados por 10 dias à temperatura de $38,0 \pm 0,5$ °C. A casca do ovo foi removida cuidadosamente de modo a expor a membrana corioalantoide, que foi hidratada com solução NaCl 0,9% esterilizada. Em seguida foram aplicados 300 μL da suspensão de AgNPs na membrana e, durante 5 minutos (300 segundos), foi examinada para detecção das reações fisiológicas (efeitos irritantes) de vasoconstrição, hemorragia e

coagulação, com a finalidade de estabelecer o potencial de irritação (PI). O tempo (em segundos) para o início de cada processo foi aplicado na equação abaixo. O PI ou score de irritação (IS) foi determinado da seguinte forma: 0,0–0,9, não irritante; 1,0–4,7, ligeiramente irritante; 5,0–8,9, irritação moderada; e 9,0–21,0, irritação grave/severa (OLIVEIRA et al., 2012; FREIRE et al., 2015).

$$PI = \frac{[(301 - \text{hemorragia})5] + [(301 - \text{vasoconstrição})7] + [(301 - \text{coagulação})9]}{300}$$

Como controle foram utilizados solução salina 0,9% (controle negativo para irritação) e lauril sulfato de sódio (LSS) 1% (controle positivo para irritação).

4.7 ELABORAÇÃO DE GEL ANTISSEPTICO A BASE DE QUITOSANA CONTENDO AGNPS E DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Para a elaboração do gel antisséptico, 1000 mg de quitosana foi solubilizada em 50 mL de ácido acético 1%, sob agitação em vórtex por 2 horas. Foi obtida uma solução de quitosana a 20 mg/mL, a qual foi adicionada a solução de AgNPs, resultando em uma mistura na proporção 3:1 (v/v), que foi homogeneizada em seguida.

A atividade antimicrobiana do gel antisséptico foi determinada através de diluições seriadas em microplacas de 96 poços, seguindo a mesma metodologia apresentada no item 4.5.2.

4.8 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA SINTETIZADAS POR A. FLAVO-FURCATIS

O processo de síntese de AgNPs foi acompanhado diariamente por cinco dias observando-se a mudança de coloração característica da reação, que ocorre devido à oscilação dos elétrons da superfície na mesma frequência da luz incidente (Biswas & Bafubiandi, 2016). Este processo resulta na formação das bandas de ressonância plasmônica de superfície localizada, fenômeno indicador da presença de AgNPs na amostra e que foi registrado através de espectrofotômetro de UV-Vis, com leituras na faixa de comprimento de 200 a 800 nm das amostras diluídas em água deionizada (1:10, v/v).

A técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS) foi utilizada para analisar os seguintes aspectos: potencial zeta (ou elétrico) da superfície de nanopartículas, que

permite avaliar a estabilidade das suspensões de AgNPs; o índice de polidispersividade (PDI), que indica a distribuição dos tamanhos das nanopartículas; e o tamanho hidrodinâmico das mesmas. Essas três análises foram feitas no equipamento ZetaSizer Nano ZS90 localizado no Laboratório de Biotecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba (BIOTECFARM-UFPB).

A determinação da forma e do tamanho das AgNPs foi feita por Microscopia Eletrônica de Transmissão-Varredura (STEM) no Laboratório de Compostos Híbridos, Interfaces e Coloides do Departamento de Química Fundamental - UFPE.

Os dados referentes aos grupos químicos responsáveis pela síntese e estabilização das nanopartículas foram obtidos por espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) no Laboratório Multiusuário de Análises Químicas (LABMAQ) da UFRPE.

A confirmação complementar da síntese e dados sobre a estrutura microcristalina das AgNPs foram obtidos por difratometria em um aparelho de difração de raios-X da marca Rigaku e modelo SmartLab, na Central Multiusuário do Departamento de Física da UFPE. A amostra foi liofilizada e os parâmetros adotados para esta análise foram os seguintes: tensão de 40 kV, corrente de 30 mA, velocidade de varredura 2° min^{-1} com ângulo de 2θ entre 5 e 90° .

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

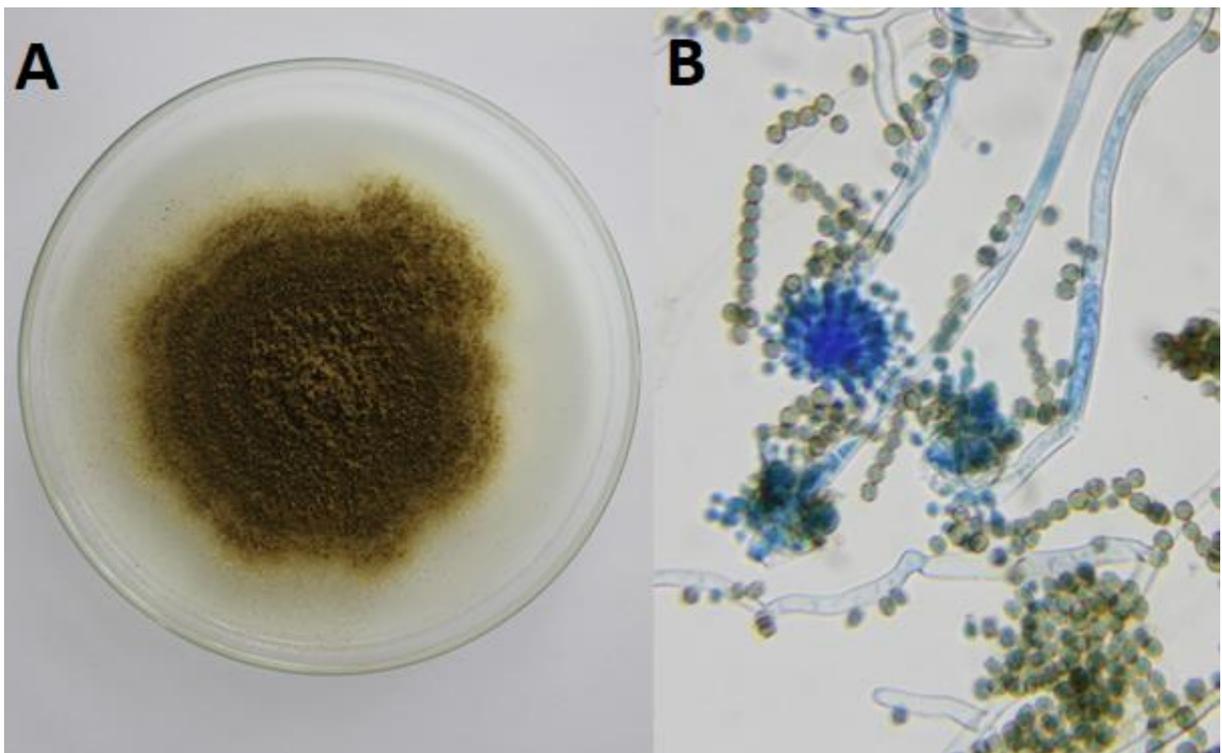
Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) ao nível de 95% de significância e teste de tukey considerando a diferença entre as médias dos grupos significativa quando $p > 0,05$ (*software* MiniTab® versão 21.2.0.) Os gráficos foram confeccionados no *software* Origin versão pro 8.5.1 SR2 e as imagens das nanopartículas foram analisadas no *software* Image J.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CULTIVO DE *ASPERGILLUS FLAVO-FURCATIS* EM MEIO SÓLIDO

As linhagens de *Aspergillus flavo-furcatis* apresentaram as características morfológicas típicas do gênero e espécie sem alterações fisiológicas, mostrando-se viáveis para ensaios biotecnológicos, conforme Raper and Fennel (1977) e Klich and Pitt (1988).

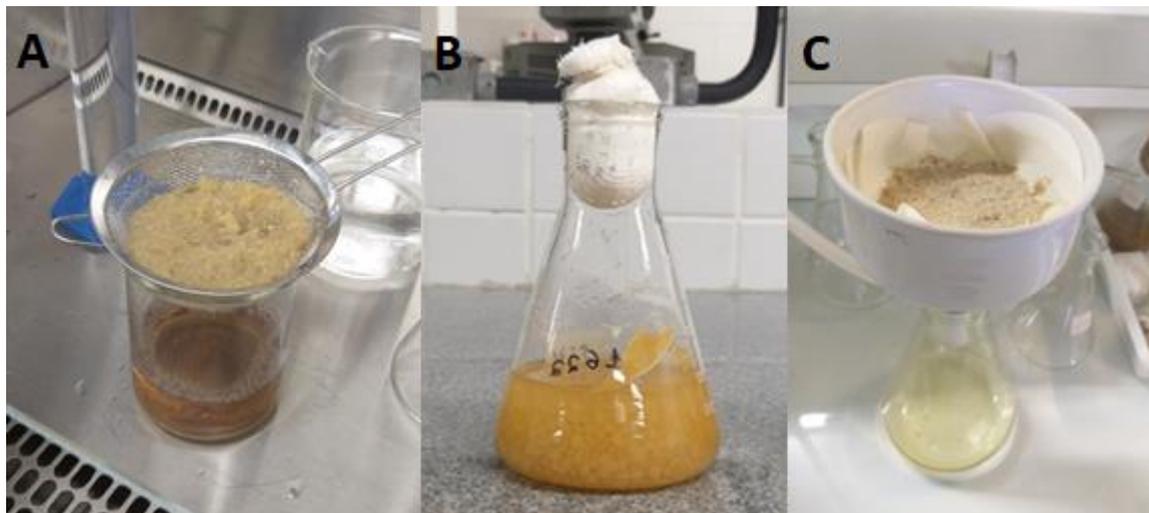
Figura 5. Cultivo de *Aspergillus* em ágar Czapek-Dox (A) e estrutura reprodutiva em microscopia óptica (B) com aumento 20x.



5.2 CULTIVO SUBMERSO DE *ASPERGILLUS* E OBTENÇÃO DO EXTRATO AQUOSO MICELIAL

Todas as amostras das 3 linhagens de *Aspergillus flavo-furcatis* produziram biomassa, a partir da qual foram obtidos os extratos aquosos miceliais.

Figura 6. Biomassa separada do extrato bruto (A); extrato aquoso obtido da biomassa após 72h em agitação a 180 rpm e a 25 °C (B); extrato aquoso recuperado da biomassa por filtração a vácuo (C).



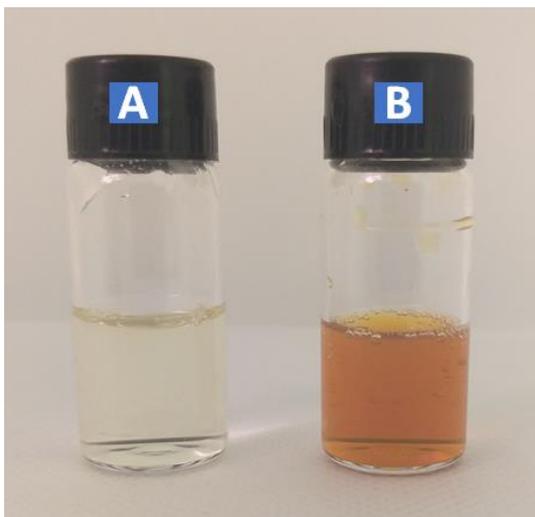
5.3 OTIMIZAÇÃO DA SÍNTESE BIOLÓGICA DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA MEDIADA POR *ASPERGILLUS FLAVO-FURCATIS*

5.3.1 Variação da concentração do extrato aquoso

5.3.1.1 Aspecto visual e espectrofotometria de UV-Vis

Nesta etapa da pesquisa, todas as 12 amostras, sendo 4 de cada linhagem, em diferentes condições de diluição, apresentaram mudança de coloração (figura 7), indicando biorredução após adição de AgNO_3 e reação desta mesma substância com moléculas produzidas pelas linhagens testadas, possivelmente nitrato-redutases dependes de cadeia transportadora de elétrons (Durán *et al.*, 2011). Dentro de cada grupo de amostras por linhagem, é possível observar tons de marrom-amarelado que variam conforme a diluição da amostra (figuras 8, 9 e 10). Mudanças para tons de marrom-amarelado foram observadas em diversos experimentos de síntese de nanopartículas envolvendo espécies de *Aspergillus* (Al Juraifani, 2015; Silva *et al.*, 2017; Gomes, 2019).

Figura 7. Extrato aquoso da biomassa de *Aspergillus flavo-furcatis* sem AgNO_3 (A) e a mudança de coloração resultante da reação com AgNO_3 (B).



Através de espectrofotometria de UV-Vis, foi observada a formação de bandas de ressonância plasmônica de superfície, cujos picos de absorvância foram registrados na faixa de comprimento de onda entre 428 e 440 nm nas 12 amostras (figuras 8, 9 e 10), confirmando a presença de nanopartículas de prata. Silva *et al.* (2017) registrou picos de absorvância entre 420 e 455 nm para nanopartículas de prata biossintetizadas por intermédio de *Aspergillus flavo-furcatis*. Para outras espécies do mesmo gênero, como *A. fumigatus*, *A. clavatus*, *A. niger*, *A. flavus*, Zomorodian *et al.* (2016) e Gursoy (2020) registraram picos de absorvância entre 420 e 430 nm.

Figura 8. Espectros de absorção das AgNPs sintetizadas a partir dos extratos aquosos da biomassa de *A. flavo-furcatis* DPUA 1493 para cada diluição (esquerda); e as misturas reacionais referentes à mesma linhagem e às 4 concentrações de extrato aquoso micelial, com mudança de coloração característica da reação de síntese (direita).

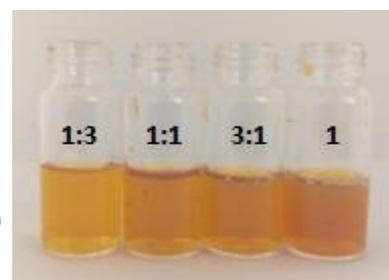
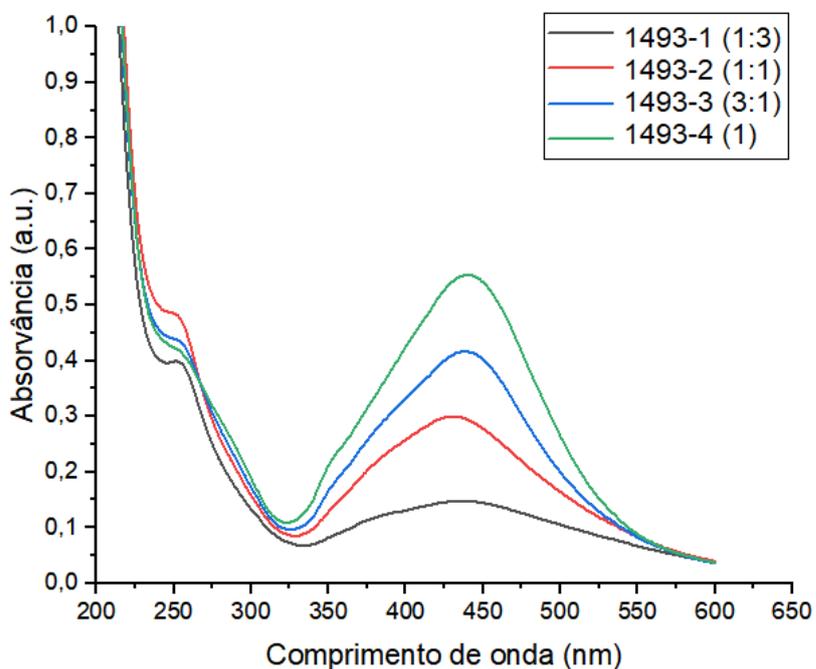


Figura 9. Espectros de absorção das AgNPs sintetizadas a partir dos extratos aquosos da biomassa de *A. flavo-furcatis* DPUA 1622 para cada diluição (esquerda); e as misturas reacionais referentes à mesma linhagem e às 4 concentrações de extrato aquoso micelial, com mudança de coloração característica da reação de síntese (direita).

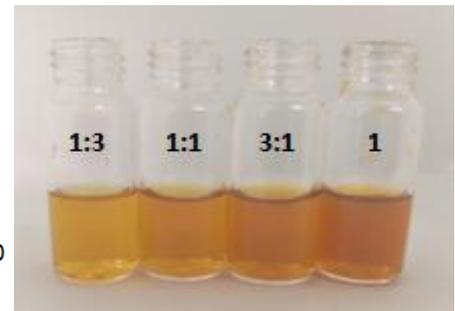
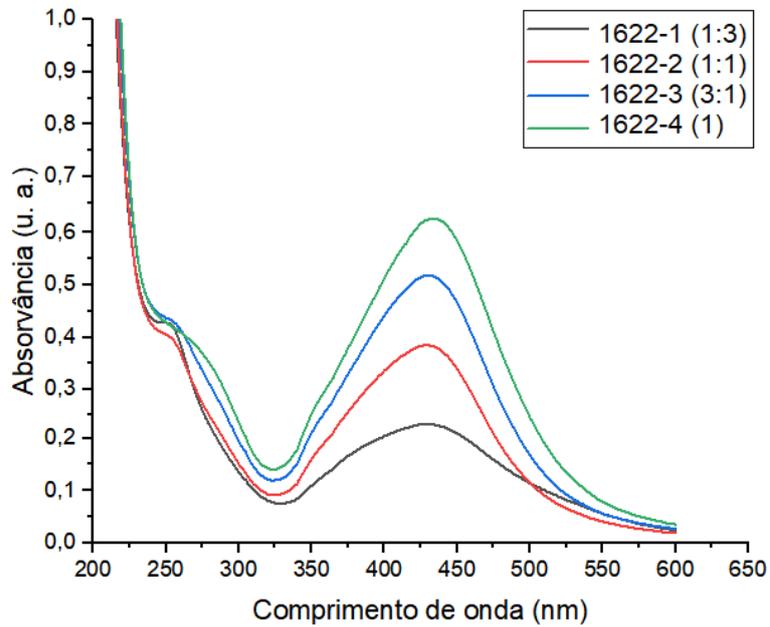
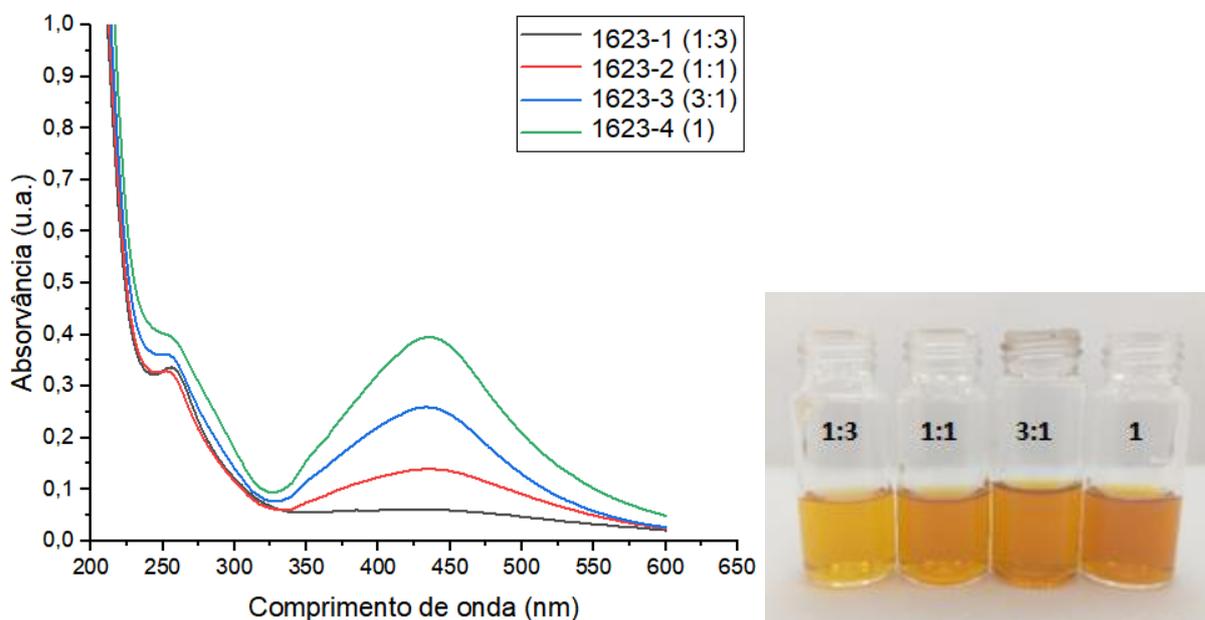


Figura 10. Espectros de absorção das AgNPs sintetizadas a partir dos extratos aquosos da biomassa de *A. flavo-furcatis* DPUA 1623 para cada diluição (esquerda); e as misturas reacionais referentes à mesma linhagem e às 4 concentrações de extrato aquoso micelial, com mudança de coloração característica da reação de síntese (direita).



Nas tabelas 4 e 5, é possível observar que os maiores picos de absorvância foram registrados para amostras cujas diluições do extrato aquoso em água deionizada ultrapura são 3:1 e 1. A linhagem com os menores picos foi a 1623, mesmo na amostra não diluída. Entre todas as amostras, a 1622-4 apresentou o maior pico de absorção, portanto, maior quantidade de nanopartículas (Zomorodian *et al.* 2016). 1622-4 também apresentou o pico mais estreito (figura 9), indicando menor variação de tamanho das nanopartículas (Chen *et al.*, 2008) em comparação com as demais amostras.

Tabela 4. Parâmetros dos espectros de UV-vis do extrato aquoso micelial de *Aspergillus* em diferentes diluições com adição de AgNO_3 1 mmol.L^{-1} , obtidos após 96 h de reação.

Amostra/Diluição	Absorbância (a 420 nm)	Pico de Absorbância (u.a.)	Ponto central da BRPS (nm)
1493-1/1:3	0,143	0,148	435
1493-2/1:1	0,293	0,300	431
1493-3/3:1	0,388	0,416	439
1493-4/1	0,509	0,554	440
1622-1/1:3	0,224	0,227	429
1622-2/1:1	0,371	0,378	429
1622-3/3:1	0,499	0,511	430
1622-4/1	0,594	0,620	434
1623-1/1:3	0,061	0,061	428
1623-2/1:1	0,136	0,14	435
1623-3/3:1	0,251	0,259	435
1623-4/1	0,377	0,395	436

Tabela 5. Médias dos picos de absorvância por diluição

Diluição	Média Abs (420 nm)
1:3	$0,14 \pm 0,08$ a
1:1	$0,27 \pm 0,12$ ab
3:1	$0,37 \pm 0,12$ ab
1	$0,49 \pm 0,11$ b

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

5.3.1.2 Espalhamento dinâmico de luz (DLS)

As análises por espalhamento dinâmico de luz (Tabela 6) demonstraram que as amostras de AgNPs de *A. flavo-furcatis* possuem tamanhos hidrodinâmicos dentro da escala nanométrica para as três linhagens testadas, com exceção da amostra 1623-2. O índice de polidispersividade das amostras variou entre 0,31 e 0,45. De acordo Danaei *et al.* (2018), populações de nanopartículas monodispersas apresentam PDI menor que 0,3. O potencial Zeta de todas as amostras variou entre -5,01 mV e -17,9mV. Valores dentro desta faixa foram registrados por Balakumaran *et al.* (2016) e Lotfy *et al.* (2021) para nanopartículas de prata sintetizadas por *A. terreus*. Segundo Andrade (2013), uma alta estabilidade eletrostática pode ser atingida quando o potencial Zeta é $\leq -30 \text{ mV}$ ou $\geq 30 \text{ mV}$.

Tabela 6. Tamanho hidrodinâmico, polidispersividade (PDI) e potencial Zeta das suspensões de nanopartículas biossintetizadas por intermédio de *A. flavo-furcatis* utilizando extrato aquoso micelial em diferentes diluições.

Amostra	Tamanho (nm)	Pdi	Potencial Zeta (mV)
1493-1	53,52 ±1,30	0,32 ±0,03	-17,10 ±3,11
1493-2	49,21 ±2,33	0,36 ±0,02	-07,62 ±0,63
1493-3	56,55 ±1,09	0,31 ±0,04	-15,03 ±1,27
1493-4	62,12 ±1,67	0,40 ±0,03	-17,90 ±2,35
1622-1	77,38 ±0,82	0,44 ±0,03	-07,66 ±1,38
1622-2	48,83 ±0,52	0,36 ±0,05	-14,60 ±3,10
1622-3	58,23 ±0,79	0,44 ±0,00	-11,33 ±2,24
1622-4	52,67 ±1,08	0,34 ±0,06	-10,50 ±0,40
1623-1	97,51 ±1,41	0,38 ±0,03	-05,01 ±0,89
1623-2	110,63 ±12,03	0,42 ±0,01	-14,27 ±5,75
1623-3	47,33 ±1,11	0,35 ±0,04	-11,65 ±3,54
1623-4	47,52 ±0,79	0,45 ±0,02	-12,60 ± 2,08

5.3.1.3 Ensaio antimicrobiano por difusão em ágar por poço

No ensaio antimicrobiano por difusão em ágar por poço, quatro amostras apresentaram atividade inibitória contra 75% das cepas bacterianas testadas (Tabela 7). Contra *E. faecalis* apenas uma amostra, 1622-4, apresentou efeito inibitório; contra *E. coli*, 75% das amostras se mostraram efetivas, com a amostra 1622-4 apresentando o maior halo de inibição (1,1 cm); contra *P. aeruginosa*, apenas três amostras foram efetivas, no entanto, com halos de inibição menos expressivos em 1623-3 e 1623-4; contra *S. aureus*, cerca de 83% das amostras demonstraram efeito inibitório, com maior halo de inibição correspondendo à amostra 1623-4. Todas as doze amostras apresentaram atividade inibitória contra as cepas de leveduras testadas (Tabela 8). As amostras 1622-3 e 1622-4 apresentaram os maiores halos de inibição tanto contra *C. albicans* quanto contra *C. krusei*. A primeira cepa se mostrou mais suscetível à ação inibitória das suspensões de AgNPs de um modo geral. Estes resultados corroboram os achados de Hassan et al. (2015), Mehmetoglu et al. (2021) e Lotfy et al (2021), que demonstraram a ação antimicrobiana de AgNPs sintetizadas por *A. flavus*, *A. niger* e *A. terreus* contra *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *C. albicans*.

Tabela 7. Diâmetro médio (cm) e desvio padrão dos halos de inibição microbiana por ação das nanopartículas de prata sintetizadas por *A. flavo-furcatis* contra bactérias.

Amostra	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
1493-1	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00 c	0,0 ± 0,00 b	0,2 ± 0,00 b
1493-2	0,0 ± 0,00	0,55 ± 0,05 b	0,0 ± 0,00 b	0,4 ± 0,00 a
1493-3	0,0 ± 0,00	0,83 ± 0,05 a	0,0 ± 0,00 b	0,47 ± 0,05 a
1493-4	0,0 ± 0,00	0,8 ± 0,0 a	0,3 ± 0,0 a	0,4 ± 0,00 a
1622-1	0,0 ± 0,00	0,6 ± 0,05 c	0,0 ± 0,00	0,2 ± 0,00 b
1622-2	0,0 ± 0,00	0,7 ± 0,05 c	0,0 ± 0,00	0,2 ± 0,00 b
1622-3	0,0 ± 0,00	0,9 ± 0,06 b	0,0 ± 0,00	0,2 ± 0,06 b
1622-4	0,4 ± 0,00	1,1 ± 0,00 a	0,0 ± 0,00	0,5 ± 0,06 a
1623-1	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00 b	0,0 ± 0,00 b	0,0 ± 0,00 c
1623-2	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00 b	0,0 ± 0,00 b	0,0 ± 0,00 c
1623-3	0,0 ± 0,00	0,7 ± 0,05 a	0,1 ± 0,00 a	0,2 ± 0,00 b
1623-4	0,0 ± 0,00	0,7 ± 0,00 a	0,1 ± 0,05 a	0,6 ± 0,06 a

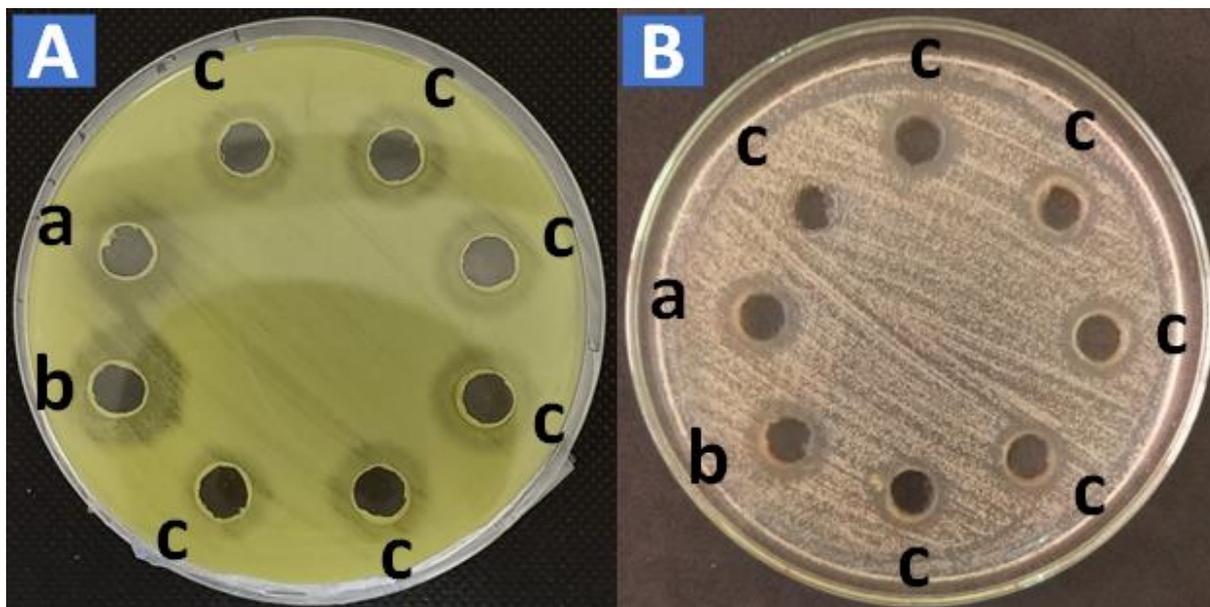
Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 8. Diâmetro médio (cm) e desvio padrão dos halos de inibição por ação das nanopartículas de prata sintetizadas por *A. flavo-furcatis* contra leveduras.

Amostra	<i>C. albicans</i>	<i>C. krusei</i>
1493-1	0,3± 0,06 a	0,2± 0,00 c
1493-2	0,4± 0,00 a	0,2± 0,06 bc
1493-3	0,4± 0,12 a	0,3± 0,06 ab
1493-4	0,4± 0,06 a	0,4± 0,06 a
1622-1	0,4± 0,00 c	0,3± 0,06 b
1622-2	0,5± 0,00 bc	0,3± 0,06 b
1622-3	0,6± 0,06 ab	0,4± 0,00 ab
1622-4	0,7± 0,06 a	0,5± 0,00 a
1623-1	0,2± 0,00 c	0,2± 0,00 b
1623-2	0,3± 0,06 bc	0,2± 0,00 b
1623-3	0,4± 0,06 ab	0,3± 0,00 a
1623-4	0,4± 0,00 a	0,3± 0,00 a

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

Figura 11. Atividade antimicrobiana das AgNPs sintetizadas por *A. flavo-furcatis* contra *E. coli* (A) e *C. albicans* (B): halos de inibição formados por cloranfenicol (a/A) e itraconazol (a/B), por AgNO_3 (b) e por AgNPs (c).



5.3.2 Variação de temperatura, pH e concentração de nitrato de prata

5.3.2.1 Aspecto visual e espectrofotometria de UV-Vis

Considerando os resultados da espectrofotometria de UV-Vis, DLS e do ensaio antimicrobiano da etapa anterior, o extrato aquoso utilizado para a síntese nesta etapa da pesquisa não foi diluído.

Em doze ensaios executados, seis apresentaram mudança de coloração característica de biossíntese de nanopartículas de prata após adição de AgNO_3 (figuras 12, 13 e 14); sendo elas uma amostra submetida à incubação a 28 °C e uma a 38 °C (ambas com pH 10 e AgNO_3 1,5 mmol.L⁻¹), e as quatro amostras de ponto central, incubadas a 33 °C, com pH 8 e AgNO_3 1,0 mmol.L⁻¹. A figura 15 mostra as bandas de ressonância plasmônica formadas para as 6 amostras, bem como o espectro de absorvância para todos os doze ensaios, revelando diferentes resultados da reação entre extrato aquoso e AgNO_3 sob influência das diversas condições testadas.

Figura 12. Mudança de coloração da mistura reacional após adição de AgNO_3 ao extrato aquoso e incubação a 28°C em diferentes condições (1-4) de pH e concentração de AgNO_3 .

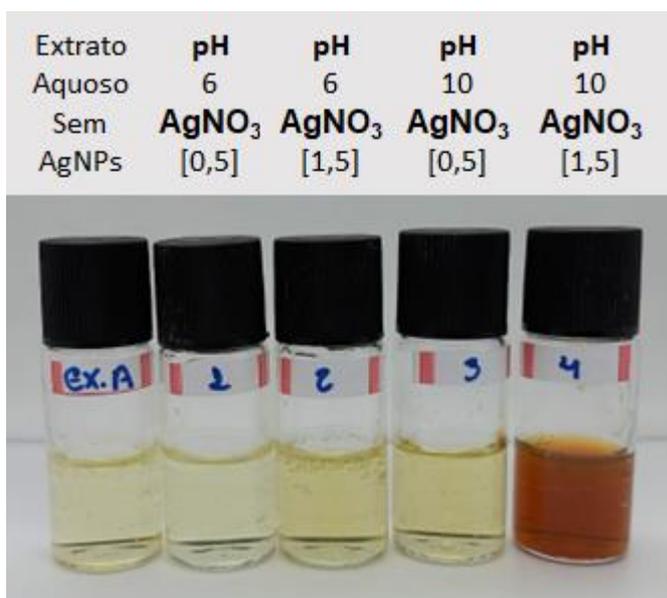


Figura 13. Mudança de coloração da mistura reacional após adição de AgNO_3 ao extrato aquoso e incubação a 38°C em diferentes condições (1-4) de pH e concentração de AgNO_3 .

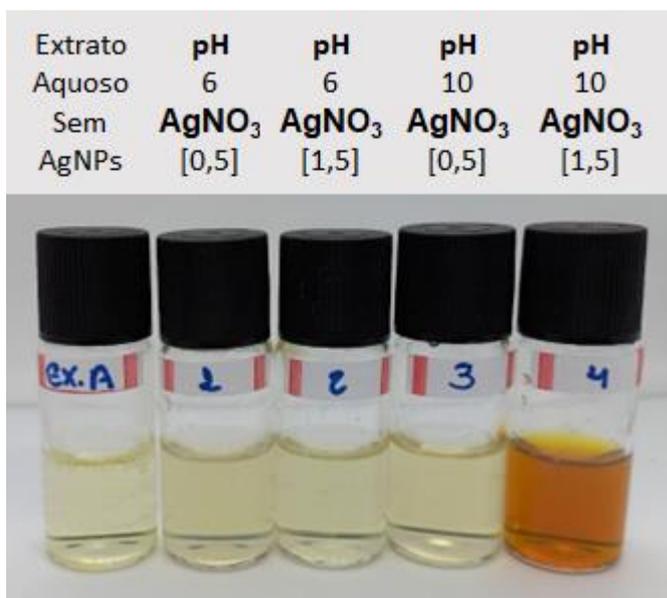


Figura 14. Mudança de coloração da mistura reacional das quatro amostras do ponto central após adição de AgNO_3 ao extrato aquoso [EX.A.] e incubação a 33°C , pH e AgNO_3 [1 mmol.L^{-1}]

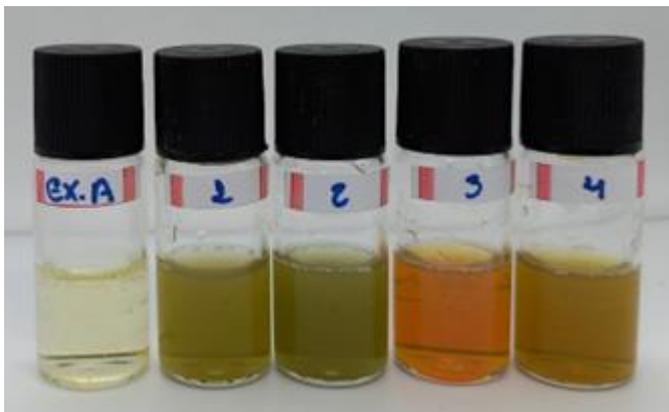
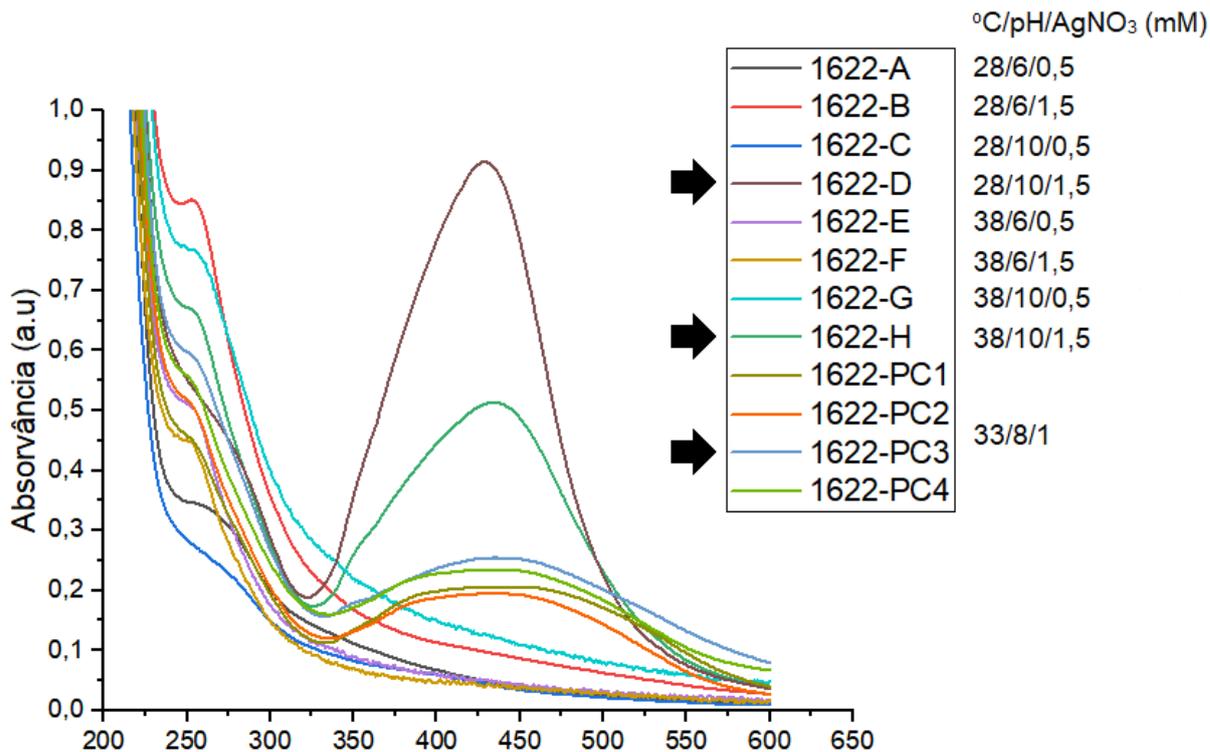


Figura 15. Espectro de absorvância das misturas reacionais de extrato aquoso micelial de *A. flavo-furcatis* e AgNO_3 submetidas a diferentes condições de temperatura, pH e concentração de AgNO_3 ; formação de bandas de ressonância plasmônica para 1622-D, 1622-H e 1622-PC3.



A tabela 9 mostra que picos de absorvância ocorreram nas faixas entre 428 e 435 nm, e variaram entre 0,195 e 0,914 u.a., sendo os maiores associados às amostra

1622-D (0,514 u.a.) e 1622-H (0,914 u.a.). Estes dois maiores picos de absorvância ocorreram em condições diferentes de temperatura, 28 °C e 38 °C, respectivamente; mas nas mesmas condições de pH (6) e concentração de AgNO₃ (1,5 mmol.L⁻¹).

Tabela 9. Parâmetros dos espectros de UV-vis do extrato aquoso micelial de *Aspergillus* com adição de AgNO₃ 1 mmol.L⁻¹, obtidos após 96 h de reação, sob diferentes condições de síntese.

Ensaio	pH	Concentração		Pico de Absorvância (a.u.)	Ponto central da BRPS (nm)
		Temperatura (°C)	de AgNO ₃ (mmol.L ⁻¹)		
A	6,0	28 °C	0,5	-	-
B	6,0	28 °C	1,5	-	-
C	10,0	28 °C	0,5	-	-
D	10,0	28 °C	1,5	0,514	434
E	6,0	38 °C	0,5	-	-
F	6,0	38 °C	1,5	-	-
G	10,0	38 °C	0,5	-	-
H	10,0	38 °C	1,5	0,914	428
PC-1	8,0	33 °C	1,0	0,206	435
PC-2	8,0	33 °C	1,0	0,195	434
PC-3	8,0	33 °C	1,0	0,254	435
PC-4	8,0	33 °C	1,0	0,231	435

Na figura 16, o gráfico de Pareto mostra a interação das variáveis avaliadas que influenciaram na síntese de nanopartículas mediada por *A. flavo-furcatis* DPUA-1622. Todos os fatores, analisados de forma isolada, bem como todas interações possíveis entre eles tiveram efeitos significativos ($p > 0,05$) sobre o processo de síntese; o pH foi o fator com maior relevância, seguido pela concentração e pela interação entre esses dois fatores. O gráfico de superfície de Absorvância x Concentração x pH (figura 17) mostra que a melhor condição de síntese, entre todas que foram avaliadas nesta pesquisa, consiste em extrato aquoso ajustado para pH 10,0 e AgNO₃ na concentração 1,5 mmol.L⁻¹. Avaliando a síntese de AgNPs por *A. sydowii*, Wang *et al.* (2021) registrou os maiores picos de absorvância a 50 °C, com pH 8 e concentração de AgNO₃ 1,5 mmol.L⁻¹; enquanto Gomes *et al.* (2020) observou os maiores picos associados ao pH 9 e concentração de AgNO₃ 1,5 mmol.L⁻¹ para *A. flavo-furcatis*.

Figura 16. Gráfico de Pareto dos Efeitos Padronizados.

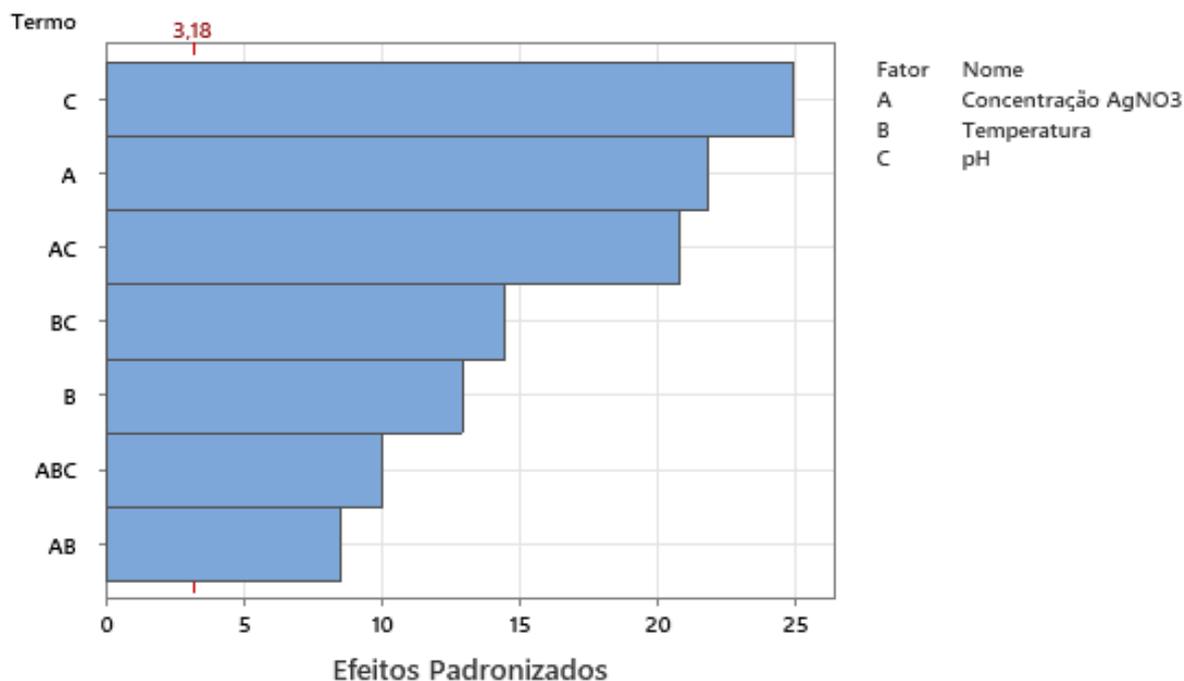
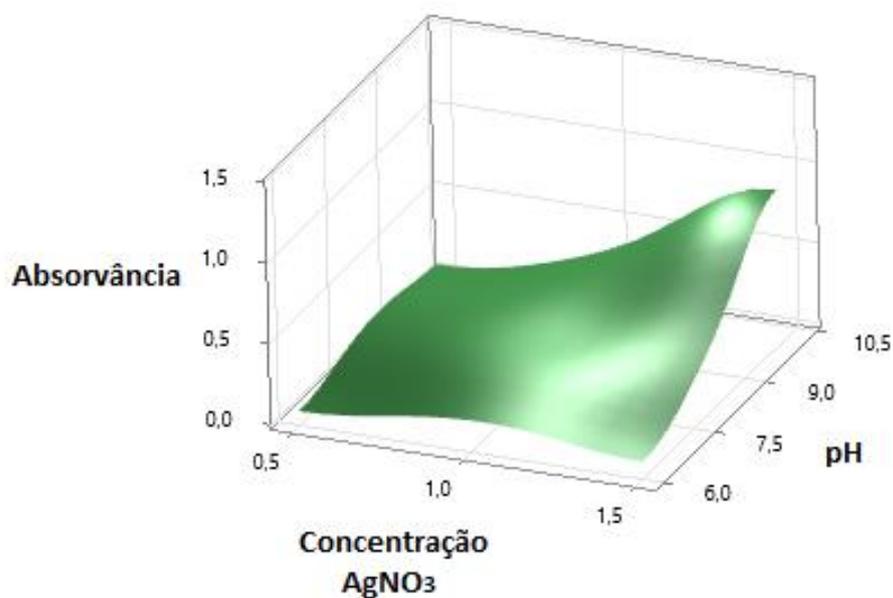


Figura 17. Gráfico de superfície de Absorvância x Concentração de AgNO_3 x pH.



5.3.2.2 Espalhamento dinâmico de luz (DLS)

As amostras 1622-D, 1622-H e 1622-P3 (amostra de ponto central com melhor resultado quanto ao pico de absorvância) foram avaliadas quanto ao potencial Zeta, PDI e tamanho hidrodinâmico pela técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS) e os dados obtidos estão apresentados na tabela 10. Essas nanopartículas

apresentaram tamanho hidrodinâmico entre 42,10nm e 63,68 nm, sendo as menores delas provenientes da amostra 1622-PC3. O índice de polidispersividade variou entre 0,34 e 0,59, sendo o menor deles correspondente a amostra 1622-H. Valores de PDI abaixo de 0,3 tendem a apresentar populações com menor variação de tamanho ou monodispersas (Honary et al, 2013). O potencial Zeta das nanopartículas variou entre -8,64mV e -12,13 mV. Suspensões de AgNPs estáveis apresentam potencial Zeta ≤ -30 mV ou ≥ 30 mV (Clogston & Patri, 2010).

Tabela 10. Tamanho hidrodinâmico, polidispersividade (PDI) e potencial Zeta das suspensões de nanopartículas biossintetizadas por intermédio de *A. flavo-furcatis* em diferentes condições de temperatura, pH e concentração de AgNO_3 .

Ensaio	pH	Temperatura (°C)	[AgNO_3] (mmol.L ⁻¹)	Tamanho (nm)	Pdi	Potencial Zeta (mv)
D	10	28 °C	1,5	63,68 \pm 0,63 a	0,44 \pm 0,02 b	-8,64 \pm 2,55 a
H	10	38 °C	1,5	46,99 \pm 0,45 b	0,34 \pm 0,00 c	-11,24 \pm 1,79 a
PC-3	8	33 °C	1	42,10 \pm 0,57 c	0,59 \pm 0,06 a	-12,13 \pm 0,98 a

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

5.3.2.3 Ensaio antimicrobiano por difusão em ágar por poço

As amostras 1622-D, 1622-H e 1622-P3 foram avaliadas quanto ao seu potencial antimicrobiano pela difusão das suspensões de AgNPs em ágar por poços de 8 mm. Os dados obtidos estão apresentados na tabela 11 e 12. A amostra 1622-D apresentou efeito inibitório contra as quatro cepas bacterianas selecionadas para o estudo; o menor halo de inibição corresponde a *E. faecalis* (0,2 mm) e maior a *E. coli* (0,6 mm). A amostra 1622-PC3 apresentou efeito inibitório contra as cepas de *E. faecalis*, *E. coli* e *S. aureus*, mas com resultados inferiores em relação à amostra 1622-D. A amostra 1622-H não se mostrou efetiva contra as cepas bacterianas testadas. Nesta etapa do trabalho, *E. coli* se mostrou mais suscetível aos efeitos antimicrobianos das AgNPs, enquanto *P. aeruginosa* sofreu inibição apenas quando submetida a amostra 1622-D. Embora *E. faecalis* tenha sido afetado pela ação de 1622-D e 1622-PC, os halos de inibição foram os menos expressivos. Contra as cepas de leveduras, todas as amostras apresentaram ação inibitória. 1622-D apresentou os maiores halos de inibição com médias significativamente diferentes das outras suspensões de AgNPs testadas e *C. albicans* foi a levedura mais suscetível à ação inibitória das três amostras. Estes resultados estão de acordo com o que a literatura

tem revelado a respeito de AgNPs biossintetizadas e seus efeitos inibitórios contra esses mesmos microrganismos (Sanjenbam *et al.* 2014; Durán *et al.* 2016; Siddiqui *et al.* 2018).

Tabela 11. Diâmetro médio (cm) e desvio padrão dos halos de inibição microbiana por ação das nanopartículas de prata sintetizadas por *A. flavo-furcatis* contra bactérias.

Amostra	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
1622-D	0,2± 0,00 a	0,6± 0,00 a	0,4± 0,06 a	0,4± 0,06 a
PC	0,2± 0,00 a	0,4± 0,06 b	0,0± 0,00 b	0,3± 0,00 b
1622-H	0,0± 0,00 b	0,0± 0,00 c	0,0± 0,00 b	0,0± 0,00 c

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

Tabela 12. Diâmetro médio (cm) e desvio padrão dos halos de inibição microbiana por ação das nanopartículas de prata sintetizadas por *A. flavo-furcatis* contra leveduras.

Amostra	<i>C. albicans</i>	<i>C. krusei</i>
1622-D	0,7± 0,00 a	0,5± 0,06 a
PC	0,4± 0,06 b	0,3± 0,00 b
1622-H	0,5± 0,06 b	0,2± 0,06 b

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

5.3.2.4 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI)

Os dados obtidos no ensaio para determinação da concentração mínima inibitória das AgNPs estão apresentados na tabela 13. A amostra 1622-D apresentou efeito inibitório contra todos os seis microrganismos testados, com melhor resultado contra *S. aureus*, obtendo 92% de inibição com 40 µL da suspensão de nanopartículas. A amostra 1622-PC3 apresentou efeito inibitório contra as cepas de *E. faecalis*, *E. coli* e *C. krusei*, obtendo melhores resultados contra as duas cepas bacterianas, com 50 µL de suspensão. A amostra 1622-H conseguiu inibir o crescimento apenas de *S. aureus*, atingindo 91% de inibição com 50 µL da suspensão.

Tabela 13. Concentração mínima inibitória das suspensões de AgNPs sintetizadas por *A. flavo-furcatis* sob diferentes condições de temperatura, pH e concentração de AgNO₃.

	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. krusei</i>
1622-D						
Inibição (%)	92	99,8	98,4	99	99	97,3
MIC (µL)	40	60	60	60	60	60
1622-PC3						
Inibição (%)	-	90,9	-	90,5	-	99,8
MIC (µL)	-	50	-	50	-	60
1622-H						
Inibição (%)	91	-	-	-	-	-
MIC (µL)	50	-	-	-	-	-

(-) Inibição abaixo de 90%.

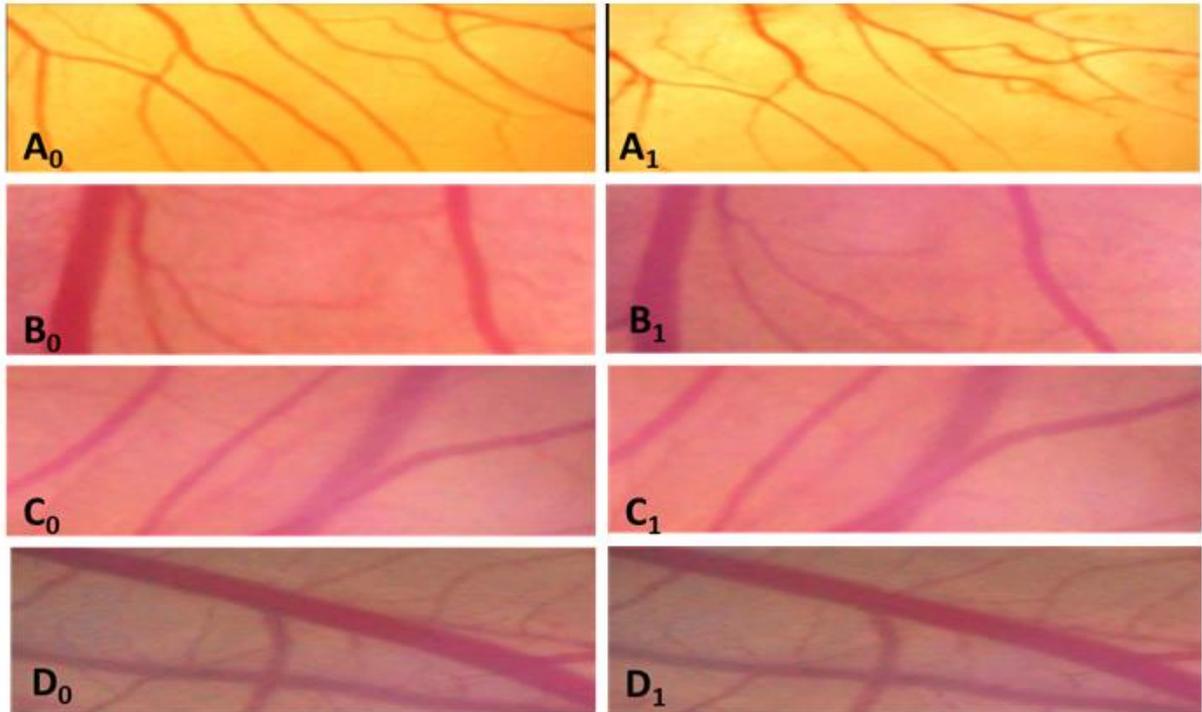
5.3.2.5 Teste de potencial de irritação em ovo de galinha usando membrana corioalantoide (HET-CAM)

Como verificado na figura 18, o cloreto de sódio a 0,9% (controle negativo), e as três amostras de nanopartículas de prata (1622-D, 1622-H e 1622-PC3) foram consideradas como não irritantes, segundo o ensaio HET-CAM, com PI de 0,0, com ausência dos efeitos inflamatórios e vasculares de vasoconstrição, hemorragia e coágulo durante os 300 segundos de observação. Por outro lado, como esperado, o lauril sulfato de sódio 1% (controle positivo para irritação) apresentou PI de 17,74±0,4, sendo visualizado vasoconstrição (6,0±1,0 segundos), coágulo (63,0±3,0 segundos) e hemorragia (48±3,0 segundos), sendo classificado como irritante severo/grave. Os resultados obtidos no teste de HET-CAM sugerem que as nanopartículas de prata biossintetizadas por *A. flavo-furcatis*, quanto ao potencial de irritação, podem compor formulações antissépticas seguras para uso em humanos.

O ensaio da membrana corioalantoide do ovo de galinha fecundado é considerado um ensaio de irritação *in vitro*, até o 10^o dia de fecundação do ovo, tendo grande aplicabilidade por ser de baixo custo, ser efetivo, e de rápida análise, quando comparada com outros testes *in vivo*, tais como o teste Draizer do olho do coelho (BAGLEY *et al.*, 1994), para o qual o HET-CAM tem sido proposto como uma

alternativa *in vitro* (FREIRE et al., 2015). O ensaio de HET-CAM permite se aferir o potencial de irritação pela visualização de efeitos agudos induzidos por uma substância sobre os pequenos vasos sanguíneos e proteínas da membrana corioalantóide, uma vez que se assemelha a mucosa de mamíferos (BAGLEY et al., 1994; FREIRE et al., 2015). Contudo, o ensaio de HET-CAM apresenta algumas limitações, como não ser possível a realização do teste quando a substância a ser avaliada apresenta alta viscosidade, não é solúvel em solventes compatíveis ao teste, ou quando é muito opaca ou de cor intensa, dificultando a visualização da membrana corioalantoide (VARGAS et al., 2007; SAW et al., 2008).

Figura 18. Determinação do potencial de irritação pelo ensaio de HET-CAM para as AgNPs biossintetizadas, e para o controle positivo de irritação LSS 1%, sendo A_0 = LSS 1% tempo zero (t_0); A_1 = LSS 1% tempo 300 segundos (t_{300s}); B_0 = 1622-D t_0 ; B_1 = 1622-D t_{300s} ; C_0 = 1622-H t_0 ; C_1 = 1622-H t_{300s} ; D_0 = 1622-PC3 t_0 ; D_1 = 1622-PC3 t_{300s} .



5.4 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA

5.4.1 Espectrofotometria de Luz Ultra Violeta Visível (UV-Vis)

Os dados relacionados aos espectros de absorvância e formação de bandas de ressonância plasmônica de superfície, indicadores de síntese de nanopartículas de prata, foram apresentados no item 5.3.1.1 no e item 5.3.2.1 para primeira e segunda etapas de síntese, respectivamente.

5.4.2 Espalhamento dinâmico de luz (DLS)

Os dados relacionados a tamanho hidrodinâmico, índice de polidispersividade e potencial Zeta das nanopartículas de prata foram apresentados no item 5.3.1.2 no e item 5.3.2.2 para primeira e segunda etapas de síntese, respectivamente.

5.4.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão-Varredura (STEM)

As imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão-Varredura (figura 19A, 20A e 21A) mostraram que as AgNPs sintetizadas por *A. flavo-fucartis* apresentam formas variadas, incluindo nanopartículas esféricas, octogonais, elipsoides, nanobastões e, com menor frequência, triangulares. O tamanho médio das nanopartículas, segundo os histogramas (figuras 19B, 20B e 21B), foi de 44 nm para a 1622-D, com a maioria das partículas se concentrando na faixa de 40 a 45 nm; 40 nm para 1622-H, com maioria entre 40 e 45 nm; e 43 nm para 1622-PC3, com maioria localizada entre 41,9 e 47,5. Alhazmi (2022) obteve AgNPs esféricas com 14 a 16 nm de diâmetro a partir de *A. niger*. Lotfy *et al.* (2021), em estudo com *A. terreus*, registrou nanopartículas de prata com o mesmo formato, com medidas de diâmetro entre 7 a 23 nm, sendo de 14 nm as mais frequentes, enquanto as AgNPs sintetizadas por *A. tubingensis* apresentaram diâmetro médio de 35 nm no experimento realizado por Rodriguez *et al.* (2021). Silva *et al.* (2017) registrou formas esféricas e triangulares com diâmetro médio de 61 nm associados a *A. oryzae*.

Figura 19. Imagem de microscopia eletrônica de transmissão das AgNPs sintetizadas por *A. flavo-furcatis* (esquerda) e histograma de distribuição das AgNPs em função do diâmetro (direita) referentes a 1622-D.

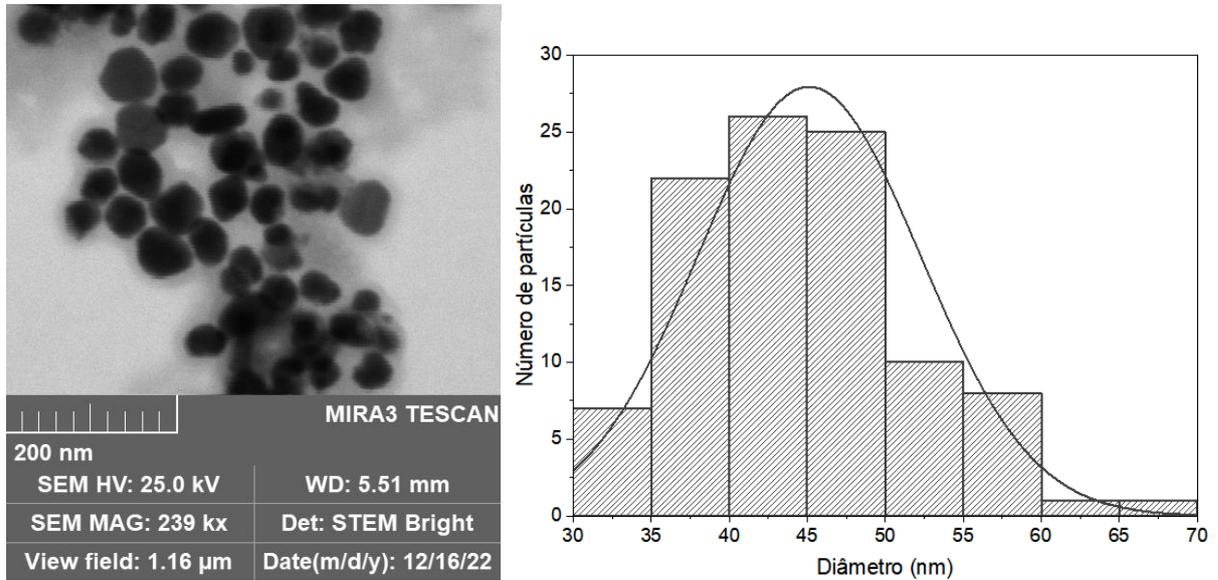


Figura 20. Imagem de microscopia eletrônica de transmissão das AgNPs sintetizadas por *A. flavo-furcatis* (esquerda) e histograma de distribuição das AgNPs em função do diâmetro (direita) referentes a 1622-H.

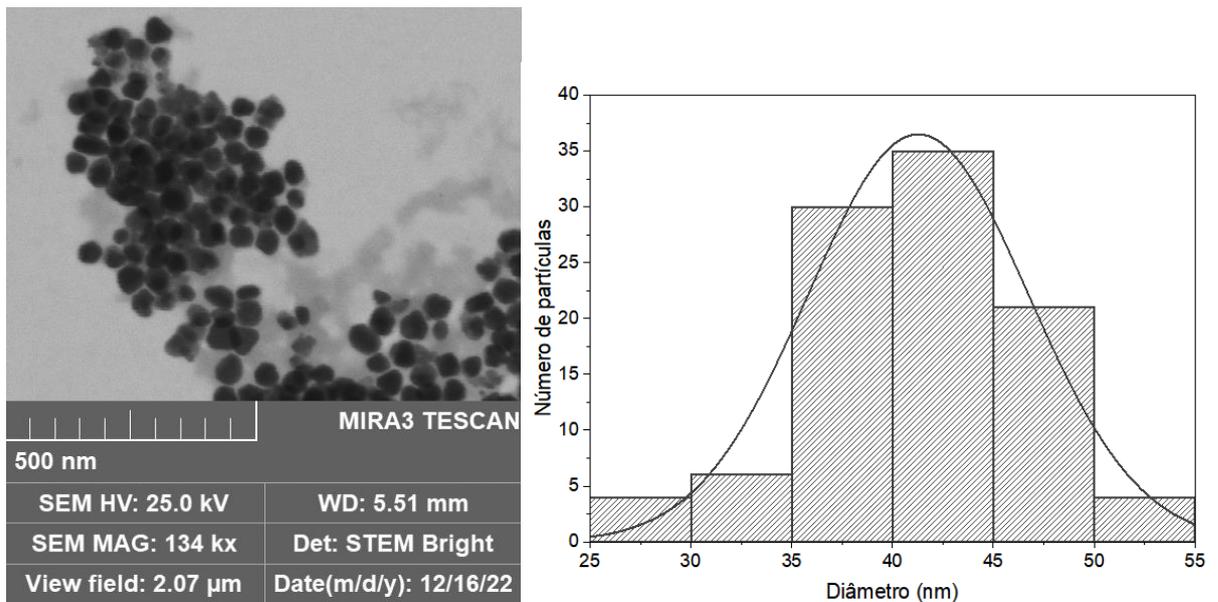
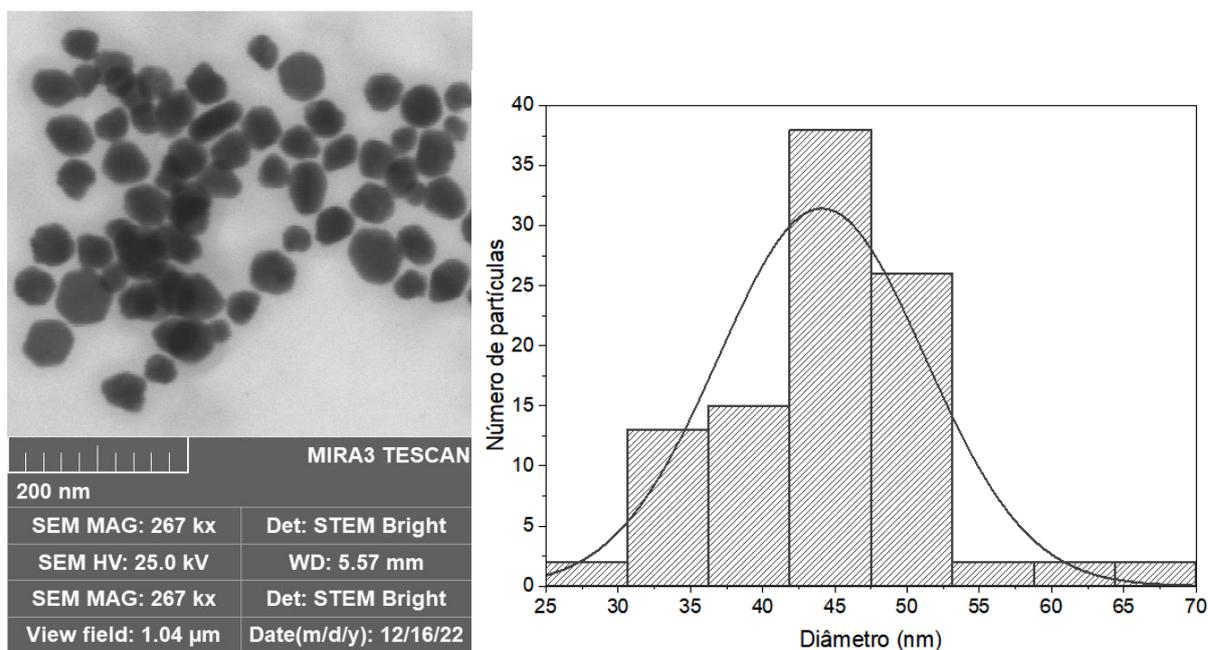


Figura 21. Imagem de microscopia eletrônica de transmissão das AgNPs sintetizadas por *A. flavo-furcatis* (esquerda) e histograma de distribuição das AgNPs em função do diâmetro (direita) referentes a 1622-PC3.



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

Através de espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), foi possível analisar os modos vibracionais das amostras 1622-D, 1622-PC3 e 1622-H. Dois picos distintos foram obtidos (figuras 22, 23 e 24) para as três amostras: 3310 cm^{-1} , correspondente ao estiramento do grupo funcional N-H da amina primária da proteína; e 1630 cm^{-1} , que corresponde ao estiramento C=C. Este espectro de infravermelho aponta para a ocorrência de compostos associados às moléculas envolvidas tanto na redução de íons de prata quanto na estabilização de nanopartículas (LOTFY *et al.*, 2021; RAI, *et al.*, 2021).

Figura 22. Espectro de FTIR da solução de AgNPs da amostra 1622-D.

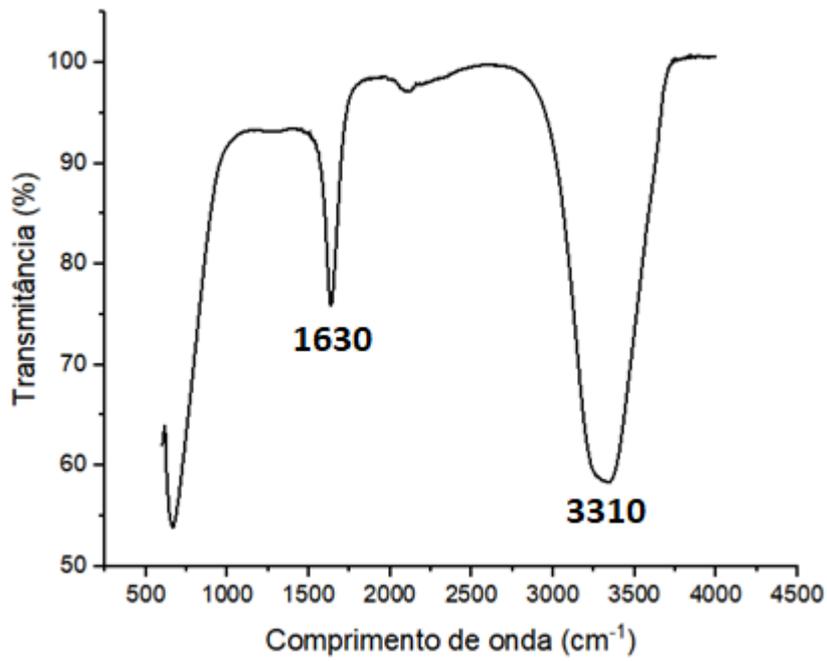


Figura 23. Espectro de FTIR da solução de AgNPs da amostra 1622-PC3.

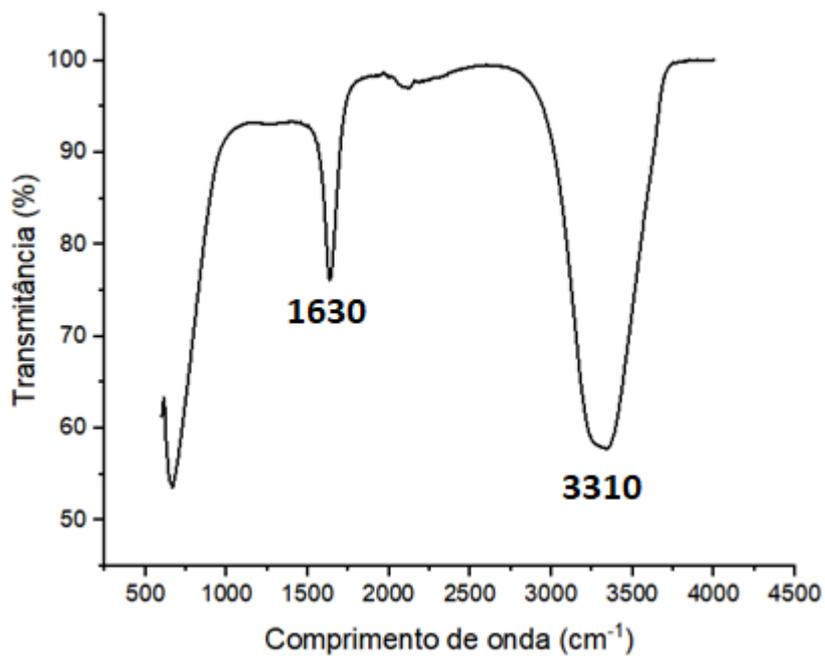
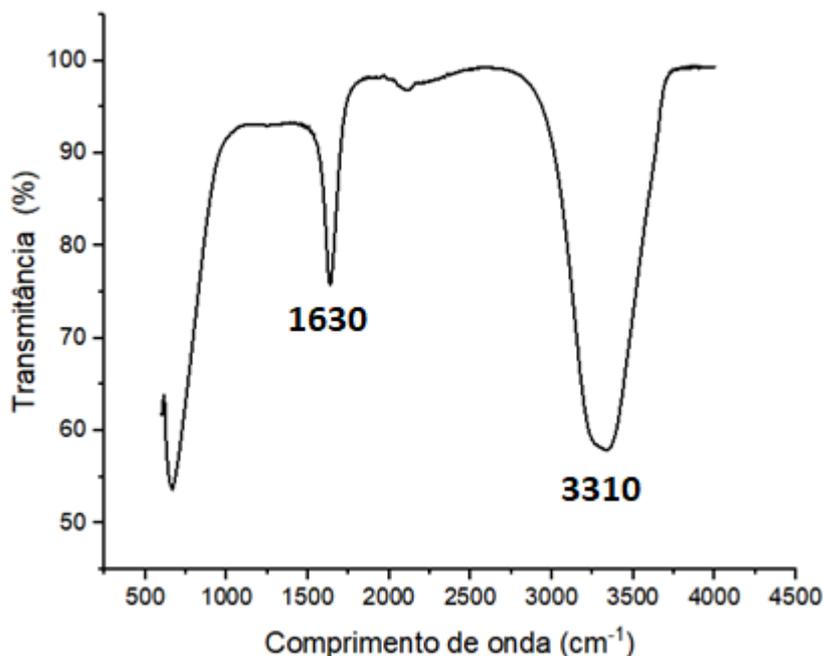
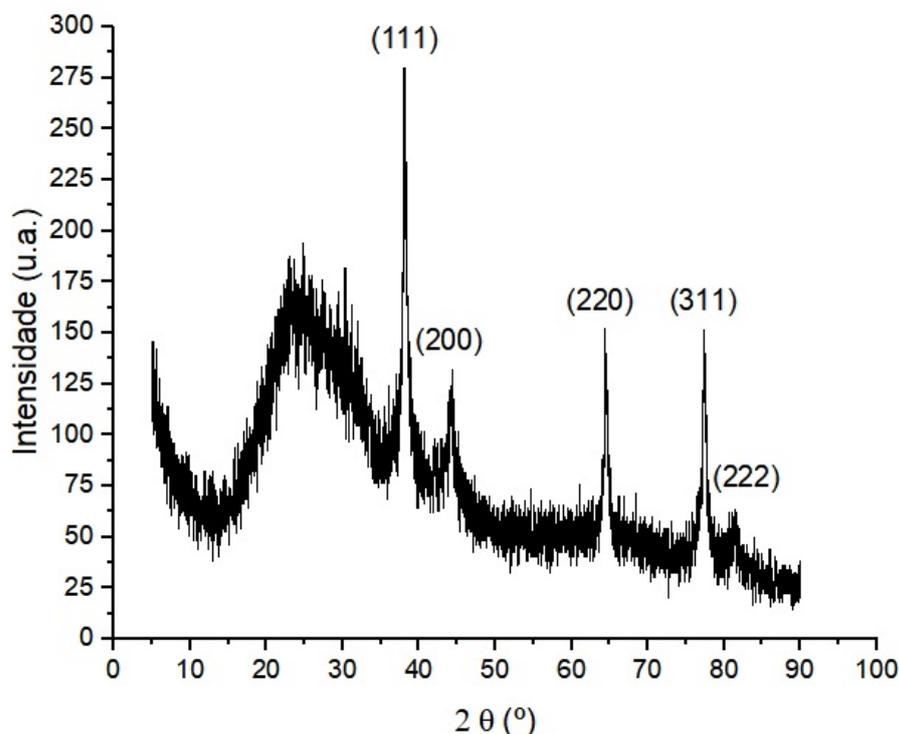


Figura 24. Espectro de FTIR da solução de AgNPs da amostra 1622-H.



5.4.5 Difração de raios-X (DRX)

Os padrões de difração de Raios X das AgNPs confirmaram a natureza cristalina da amostra 1622-D e a presença de prata pura na solução de nanopartículas submetidas a difratometria. As cinco bandas distintas em $37,97^\circ$, $44,29^\circ$, $64,66^\circ$, $77,46^\circ$ e $81,44^\circ$ apresentadas na figura 25 correspondem, respectivamente, aos planos (111), (200), (220), (311) e (222), relacionados às faces cúbicas centradas (FCC) de nanopartículas de Ag^0 (Crystal Structure Database-ICSD/Code 64,994) com um parâmetro de rede de $a = 4,077 \text{ \AA}$. O difratograma não mostrou picos de padrão associados a possíveis subprodutos como nanopartículas de cloreto de prata (AgCl), óxido de prata (Ag_2O), entre outros, o que indica alto grau de pureza das AgNPs (Chen *et al.*, 2008; Durán *et al.*, 2016) da amostra 1622-D.

Figura 25. Padrão de DRX das AgNPs sintetizadas por de *A. flavo-furcatis*.

5.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO GEL POLIMÉRICO A BASE DE QUITOSANA CONTENDO AGNPS

A formulação de gel a base de quitosana contendo as AgNPs, assim como o gel sem as nanopartículas, foram testados no ensaio de determinação da concentração mínima inibitória e os dados obtidos estão apresentados na tabela 14. O gel de quitosana sem AgNPs conseguiu inibir o crescimento de todos os seis microrganismos testados, com maior porcentagem de inibição contra as duas linhagens de leveduras. O gel de quitosana com AgNPs também apresentou efeito inibitório contra todos os microrganismos testados e obteve melhores resultados, notadamente contra *S. aureus* e *C. albicans*, atingindo 95,9% de inibição com 50 μ L da suspensão. O efeito antimicrobiano de quitosana é bastante relatado na literatura e sua ação inibitória é dependente de suas propriedades físico-químicas e do microrganismo alvo (Shih *et al.*, 2019; Yuan *et al.*, 2020; Ke *et al.*, 2021). O efeito sinérgico entre quitosana e AgNPs também tem sido alvo de uma série de estudos, incluindo géis poliméricos com altos graus de inibição contra os mesmos microrganismos utilizados neste trabalho (Polinarski *et al.* 2021; Zhang *et al.* 2023).

Tabela 14. Concentração mínima inibitória do gel de quitosana (branco) e do mesmo gel contendo AgNPs da amostra 1622-D.

	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. krusei</i>
Gel						
Inibição (%)	94,3	92,7	91,3	97,1	98,5	99,2
MIC (μ L)	60	60	60	60	60	60
Gel+AgNPs						
Inibição (%)	95,9	99,6	97,6	91,4	95,9	93,2
MIC (μ L)	50	60	60	50	50	50

(-) Inibição abaixo de 90%.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos através deste trabalho de pesquisa permitem concluir que:

1. A espécie *Aspergillus flavo-furcatis* é viável e eficiente como mediadora de biossíntese de nanopartículas de prata através das moléculas presentes no extrato aquoso micelial.
2. Nas condições em que foram realizados os experimentos, fatores como pH e concentração de nitrato de prata e a interação dos mesmos exerceram influência significativa no processo de síntese de nanopartículas de prata.
3. O potencial antimicrobiano das nanopartículas de prata, cuja síntese se deu por intermédio de *Aspergillus flavo-furcatis* e em meio alcalino, ficou evidente contra *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9028), *Candida albicans* (URM 5901) e *Candida krusei* (URM 6391), com maior ação inibidora contra as duas primeiras bactérias.
4. Estas mesmas nanopartículas de prata, quanto ao potencial de irritação, segundo o ensaio HET-CAM, podem compor formulações antissépticas seguras para uso em humanos.
5. A ação antimicrobiana das nanopartículas de prata associada ao gel polimérico à base de quitosana é maior contra todos os microrganismos testados quando comparada com a ação das AgNPs isoladas.

REFERÊNCIAS

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

AHAMED, M., ALSALHI, M. S., SIDDIQUI, M. K., 2010. Silver nanoparticle applications and human health. **Clinica Chimica Acta**. 411, 1841–1848.

AL JURAIFANIR A.A.A., GHAZWANI A.A. Biosynthesis of silver nanoparticles by *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum* and *Alternaria solani*. **African Journal of Biotechnology**. 2015;14(26):2170–4.

ALHAZMI, N. M., 2022. Fungicidal Activity of Silver and Silica Nanoparticles against *Aspergillus sydowii* Isolated from the Soil in Western Saudi Arabia. **Microorganisms**, 11, 86.

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

BAGLEY, D. M., WATERS, D., KONG, B. M., 1994. Development of a 10-day chorioallantoic membrane vascular assay as an alternative to the Draize rabbit eye irritation test. **Food and Chemical Toxicology**, 32, 1155–1160.

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

BARRS, V., TALBOT, J., 2020. Fungal Rhinosinusitis and Disseminated Invasive Aspergillosis in Cats. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 50(2), 331-357.

BECKER H., HERZBERG F., SCHULTE A., KOLOSSA-GEHRING M., 2011. The carcinogenic potential of nanomaterials, their release from products and options for regulating them. **Intenational Journal Hygiene Environmental Health**. 214, 231–238.

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

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

CHEN, P., WU, Q., DING, Y., 2008. Facile synthesis of monodisperse silver nanoparticles by bio-template of squama inner coat of onion. **Journal of Nanoparticle Research**, 10:207-213.

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

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

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

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

DUONG NU, T., NGUYEN, P., VAN LE, T., NGUYEN, H., NGUYEN, B., NGUYEN, B., NGUYEN, T., CHEN, S., BARRS, V., HALLIDAY, C., SORRELL, T., BEARDSLEY, J., 2020. Drug-resistant *aspergillus flavus* is highly prevalent in the environment of Vietnam: A new challenge for the management of aspergillosis? **Journal of Fungi**. 6(4): 1-8. <http://dx.doi.org/10.3390/jof6040296>

DURAN N., MARCATO P. D., 2011. Biotechnological routes to nanoantimicrobials and industrial: mechanistic aspects, antimicrobial activity, toxicity and industrial implications. In: Rai M, Cioffi N, editors. Nano-Antimicrobials: Progress and Prospects. In press. Germany: **Springer**.

DURÁN, N.; MARCATO, P.D.; ALVES, O.L; SOUZA, G.I.H.; ESPOSITO, E., 2005. Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains. **Journal of Nanobiotechnology** 3:8.

DURÁN, N.; MARCATO, P. D.; SOUZA, G. I. H.; ALVES, O. L.; ESPOLITO, E., 2007. Antibacterial Effect of Silver Nanoparticles Produced by Fungal Process on Textile Fabrics and Their Effluent Treatment. **Journal of Biomedical Nanotechnology** 3(2): 203-208. DOI: <https://doi.org/10.1166/jbn.2007.022>.

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

FARAMARZI, M.A., SADIGHI, A., 2013. Insights into biogenic and chemical production of inorganic nanomaterials and nanostructures. **Advances in Colloid and Interface Science** 189–190: 1–20.

FREIRE, P. L. L., ALBUQUERQUE, A. J. R., FARIAS, I. A. P., SILVA, T. G., AGUIAR, J. S., GALEMBECK, A., FLORES, M. A. P SAMPAIO, F.C., STAMFORD, T. C. M., ROSENBLATT, A., 2016. Antimicrobial and cytotoxicity evaluation of colloidal chitosan – silver nanoparticles – fluoride nanocomposites. **International Journal of Biological Macromolecules** 93; 896–903.

FREIRE, P. L. L. STAMFORD, T. C. M., ALBUQUERQUE, A. J. R., SAMPAIO, F. C., CAVALCANTE, H. M. M., MACEDO, R. O., GALEMBECK, A., FLORES, M. A. P., ROSENBLATT, A., 2015. Action of silver nanoparticles towards biological systems: cytotoxicity evaluation using hen's egg test and inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm formation. **International Journal of Antimicrobial Agents** 45;183–187.

GOMES, D. M. D., DURÁN, N., SEABRA, A. B., SILVA, L. P., PRADO F. B., SILVA, T. A., TEIXEIRA, S. M. F., 2020. Síntese verde de nanopartículas de prata intermediada por fungo anamórfico e eficácia antibacteriana e antifúngica. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi - Ciências Naturais**, v. 15, n. 2, p. 433-443.

GUDIÑA, E.J.; ROCHA, V.; TEIXEIRA, J.A.; RODRIGUES, L.R. Antimicrobial and antiadhesive properties of a biosurfactant isolated from *Lactobacillus paracasei* ssp. *Paracasei* A20. *Letters in Applied Microbiology*, v. 50, n. 4, p. 419-424, 2010.

GURSOY, N., 2020. Fungus-mediated synthesis of silver nanoparticles (agnp) and inhibitory effect on *aspergillus* spp. in combination with antifungal agent. **Cumhuriyet Science Journal**, 41(1): 311-318.

GÚZMAN, M. G., DILLE, J., GODET, S., 2009. Synthesis of silver nanoparticles by chemical reduction method and their antibacterial activity. **International Journal of Chemical and Biomolecular Engineering**. 2:3.

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

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

HONARY, S., BARABADI, H., GHARAEI-FATHABAD, E., NAGHIBI, F., 2013. Green Synthesis of Silver Nanoparticles Induced by the Fungus *Penicillium citrinum*. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, 12(1):7–11.

HULKOTI, N.I., TARANATH, T. C., 2014. Biosynthesis of nanoparticles using microbes – A review. **Colloids Surfaces B: Biointerfaces**.121:474–83.

JANNATHUL, F. M., LALITHA, P., 2015. Biosynthesis of silver nanoparticles and its applications. **Journal of Nanotechnology**, 18pp. doi:10.1155/2015/829526.

JOHNSTON H. J., HUTCHISON G., CHRISTENSEN F., PETERS M., HANKIN S., STONE S., 2010. A review of the *in vivo* and *in vitro* toxicity of silver and gold particulates: particle attributes and biological mechanisms responsible for the observed toxicity. **Critical Reviews in Toxicology**, 4:328–346.

KLAUS, T., JOERGER, R., OLSSON, E., GRANQVIST, C. G., 1999. Silver-based crystalline nanoparticles, microbially fabricated. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA** 96(24): 13611–13614.

KLICH, MA, PITT J. I. A Laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs. **Australia: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization**. 1988; 115pp.

KUMAR, C. G., POORNACHANDRA, Y., 2015. Biodirected synthesis of Miconazole-conjugated bacterial silver nanoparticles and their application as antifungal agents and drug delivery vehicles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 125: 110–119.

LEAD, J. R., BATLEY, G. E., ALVAREZ, P. J. J., CROTEAU, M. N., HANDY, R. D., MCLAUGHLIN, M. J., JUDY, J. D., SCHIRMER, K., 2018. Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects – an updated review. **Environmental Toxicology and Chemistry**. <https://doi.org/10.1002/etc.4147>.

LOTFY, W., ALKERSH, B. M., SABRY, S. A., GHOZLAN, H. A., 2021. Biosynthesis of Silver Nanoparticles by *Aspergillus terreus*: Characterization, Optimization, and Biological Activities. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, 9:633468.

MENEZES G. A., MENEZES, P. S., MENEZES C., 2011. Nanoscience in diagnostic: A short review. **International Journal of Medical Update**. 1: 16-23.

MEHMETOGLU, A. C., SEZER, E., EROL, S., 2021. Development of antimicrobial whey protein-based film containing silver nanoparticles biosynthesised by *Aspergillus Niger*, 2021. **International Journal of Food Science and Technology**, 56: 965–973.

MORAIS, M. G. DE, MARTINS, V. G., STEFFENS, D., PRAKE P., COSTA J. A. V. DE, 2014. Biological Applications of Nanobiotechnology. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**. 14: 1007-1017.

MUGHAL, B., ZAIDI, S. Z. J., ZHANG, X., UL HASSAN, S., 2021. Biogenic Nanoparticles: Synthesis, Characterisation and Applications **Applied Sciences**, 11(6): 2598.

OLIVEIRA, J. C. DE. 2014. Tópicos em micologia médica. Natal, 2014. 4ª Edição, 230 p.

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

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

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

POLINARSKI, M. A., BEAL, A. L. B., SILVA, F. E. B., BERNARDI-WENZEL, J., BURIN, G. R. M., MUNIZ, G. I. B., ALVES, H. J., 2021. New Perspectives of Using Chitosan, Silver, and Chitosan–Silver Nanoparticles against Multidrug-Resistant Bacteria. **Particle and Particle Systems Characterization**, 38(4). DOI: 10.1002/ppsc.202100009

PONNAPALLI, M. G., SURA, M. B., SUDHAKAR, S., GOVINDARAJALU, G., SIJWALI, P. S. 2018. Biotransformation of Artemisinin to 14-Hydroxydeoxyartemisinin: C-14 Hydroxylation by *Aspergillus flavus*. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, 66(40).

PRADO, F. B., ROCHA, W. C., MARTIM, S. R., ALECRIM, M. M., SILVA, L. P., SILVA, L. S. C., SILVA, T. A., TEIXEIRA, M. F. S., 2017. Production of bioactive compounds by *Aspergillus* kept under two preservation conditions. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi: Ciências Naturais** 12(1): 37-47.

RAI, M., YADAV A., GADE A., 2009. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. **Biotechnol Advances**. 27(1):76–83.

RAI, M., BONDE, S., GOLINSKA, P., TRZCINSKA-WENCEL, J., GADE, A., ABD-ELSALAM, K. A., SHENDE, S., GAIKWAD, S., INGLE, A. P., 2021. *Fusarium* as a Novel Fungus for the Synthesis of Nanoparticles: Mechanism and Applications. **Journal of fungi**, 7, 139.

RAMESH, A., SUNDARI, M. P., THIRUGNANAM, P. E., 2015. Microbial Molecular Mechanisms in Biosynthesis of Nanoparticles. **Bio-Nanoparticles: Biosynthesis and Sustainable Biotechnological Implications**. 1: 53-81. DOI: 10.1002/9781118677629.ch3

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

RODRIGUES, A. G., RUIZ, R. C., SELARI, P. J. R. G., ARAÚJO, W. L., SOUZA, A. L., 2021. Anti-Biofilm Action of Biological Silver Nanoparticles Produced by *Aspergillus tubingensis* and Antimicrobial Activity of Fabrics Carrying it. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, 11(6): 14764-14774.

ROY, A., BULUT, O., SOME, S., MANDAL, A.K., YILMAZ, M.D., 2019. Green synthesis of silver nanoparticles: biomolecule-nanoparticle organizations targeting antimicrobial activity. **RSC advances**, 9(5), 2673-2702. <https://doi.org/10.1039/C8RA08982E>.

ROY, S., DAS, T. K., 2015. A review on biosynthesis of silver nanoparticles using aspergillus species. **Advanced Science, Engineering and Medicine**. 7: 1-10.

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

SCAZZOCCHIO C., 2009. *Aspergillus*: A Multifaceted Genus. **Encyclopedia Microbiology**, 2:401–21.

SANJENBAM, P., GOPAL, J. V., KANNABIRAN, K., 2014. Anticandidal activity of silver nanoparticles synthesized using *Streptomyces* sp. VITPK1. **Journal de Mycologie Médicale**, 24:211-219.

SAW, C. L. L., HENG, P. W. S., LIEW, C. V., 2008. Chick chorioallantoic membrane as an in situ biological membrane for pharmaceutical formulation development: a review. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, 34(11), 1168–1177.

SCHWIRN, K., VOELKER D., GALERT W., QUIK, J., TIETJEN L., 2020. Environmental Risk Assessment of Nanomaterials in the Light of New Obligations Under the REACH Regulation: Which Challenges Remain and How to Approach Them? **Integrated Environmental Assessment and Management**. 16(5): 706–717.

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

SIDDIQUI, M. N., REDHWI, H. H., ACHILIAS, D. S., KOSMIDOU, E., VAKALOPOULOU, E., IOANNIDOU, M. D., 2017. Green Synthesis of Silver Nanoparticles and Study of Their Antimicrobial Properties. **Journal of Polymers and the Environment**, 26: 423–433. DOI 10.1007/s10924-017-0962-0

SILVA, T.A., P. F. ANDRADE, K. SEGALA, L. S. C. SILVA, L. P. SILVA, S. V. G. NISTA, L. H. I. MEI, N. DURÁN; TEIXEIRA, M. F. S., 2017. Silver nanoparticles

biosynthesis and impregnation in cellulose acetate membrane for anti-yeast therapy. **African Journal of Biotechnology** 16(27): 1490-1500. DOI: <https://doi.org/10.5897/AJB2017.16024>.

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

STEILING, W., BRACHER, M., COUTELLEMONT, P., SILVA, O., 1999. The HET-CAM, a useful in vitro assay for assessing the eye irritation properties of cosmetic formulations and ingredients. **Toxicol In Vitro**, 13:375–84.

TAKAHASHI, J. A., LIMA, G. S., DOS SANTOS, G. F., LYRA, F. H., DA SILVA-HUGHES, A. F., GONÇALVES, F. A. G., 2017. Fungos Filamentosos e Química: Velhos Conhecidos, Novos Aliados. **Revista Virtual de Química**, 9(6).

TEIXEIRA M. F. S., SILVA T. A., PALHETA R.A., CARNEIRO A. L. B., ATAYDE H. M. Fungos da Amazonia: uma riqueza inexplorada (aplicações biotecnológicas).1 ed. Manaus: **EDUA- Editora da Universidade Federal do Amazonas**, 2011; 255 p.

TOLEDO, A. M. N., SOARES, L. N. S., Bionanopartículas: principais aspectos e aplicações da matéria orgânica em escala nanométrica. **Holos**, v. 1, 340-349, 2016.

VARGAS. A., ZEISSER-LABOUÈBE, M., LANGE, N., GURNY, R., DELIE, F., 2007. The chick embryo and its chorioallantoic membrane (CAM) for the in vivo evaluation of drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 59:1162-1176.

WANG, D., XUE, B., WANG, L., ZHANG, Y., LIU, L., ZHOU, Y., 2021. Fungus-mediated green synthesis of nano-silver using *Aspergillus sydowii* and its antifungal/antiproliferative activities. **Nature Scientific Reports**, 11:10356.

YILMAZ, N., VISAGIE, C. M., HOUBRAKEN, J., FRISVAD, J. C., SAMSON, R. A., 2014. Polyphasic taxonomy of the genus *Talaromyces*. **Studies in Mycology**. 78: 175-341. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.08.001>

YU, H., ZHU, B., ZHAN, Y., 2017. Microbial transformation of artemisinin by *Aspergillus terreus*. **Bioresources and Bioprocessing**. 4(1): 33.

ZHAN, Y., LIU, H., WU, Y., WEI, P., CHEN, Z., WILLIAMSON, J. S., 2015. Biotransformation of artemisinin by *Aspergillus niger*. **Applied Microbiology Biotechnology**, 99: 3443.

ZHANG, T., QIN, X., GAO, Y., KONG, D., JIANG, Y., CUI, X., GUO, M., CHEN, J., CHANG, F., ZHANG, M., LI, J., YIN, P., 2023. Functional chitosan gel coating enhances antimicrobial Properties and osteogenesis of titanium alloy under persistent chronic inflammation. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, 11:1118487. doi: 10.3389/fbioe.2023.1118487

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