

Édipo da Silva Almeida

**Biossíntese e caracterização de nanopartículas de prata por
*Fusarium oxysporum***

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do Grau de mestre em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Dachamir Hotza

Coorientadora: Profa. Dra. Débora Oliveira

Florianópolis-SC
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC

Almeida, Édipo da Silva

Biossíntese e caracterização de nanopartículas de prata por *Fusarium oxysporum* / Édipo da Silva Almeida ; orientador, Dachamir Hotza ; coorientadora, Débora Oliveira. Florianópolis, SC, 2016.

149p.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-graduação em Engenharia Química.

Inclui referências

1. Engenharia Química. 2. Nanotecnologia. 3. Biossíntese. 4. Nanopartículas de prata. 5. *Fusarium oxysporum*. I. Hotza, Dachamir. II. Oliveira, Débora. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. IV. Título.

Édipo da Silva Almeida

**Biossíntese e caracterização de nanopartículas de prata por
*Fusarium oxysporum***

Esta dissertação foi julgada adequada para obtenção do título de “Mestre”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Florianópolis-SC, 16 de fevereiro de 2017

Prof^a. Dr^a. Cíntia Soares
Coordenadora do Programa

Prof. Dr. Dachamir Hotza
Orientador

Prof^a. Dr^a. Débora Oliveira
coorientadora

Banca examinadora:

Prof. Dr. Marco Di Luccio
Membro externo

Dr. Mateus Vieira Carlesso
Membro externo

Prof. Dr. Elidio Angioletto
Membro Externo

“Aos meus pais Maria Bethânia da Silva Brito, Ruy José de Almeida Júnior e às duas professoras mais incríveis, notáveis, admiráveis e sagazes que tive e tenho a felicidade de conviver: minhas avós Maria da Silva Brito e Maria de Oliveira Nóbrega (*in memoriam*). Tais senhoras fazem parte do meu *curriculum*, são os melhores livros que já li em toda minha vida”...

Dedico

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pelo porto seguro, amor, fidelidade quando por muitas vezes fraquejei, pelo seu colo ao qual sempre fui embalado e acima de tudo por sua presença em minha vida.

Aos meus pais Maria Bethânia da Silva Brito e Ruy José de Almeida Júnior, por toda confiança, fé e crença em minhas atitudes e no meu trabalho ao longo de todos esses anos. É duro viver longe do amparo, aconchego e do abraço de vocês desde os meus 17 anos, longe de casa. Mas sei que toda essa angústia é recompensada pelo carinho, confiança e otimismo que vocês sempre tiveram por mim. Amo vocês!

À minha avó Maria da Silva Brito, a mulher mais sábia com a qual tenho o prazer de conviver e compartilhar suas instruções, sugestões e lições de vida que me auxiliaram nos momentos de aflição e solidão e que hoje me tornaram um ser humano cada vez melhor dia após dia.

Ao meu orientador, professor Dr. Dachamir Hotza por toda confiança, dedicação, orientação, pelas críticas e sábias palavras nos momentos e ocasiões mais oportunas. E acima de tudo por acreditar em mim na execução deste trabalho, dando-me total liberdade para minhas ações no desenvolvimento deste projeto. Sua sabedoria e serenidade nas palavras são mais que um exemplo de inspiração e conduta de profissionalismo. Muito obrigado!

À minha coorientadora, professora Dra. Débora Oliveira, que por incontáveis razões, destacando uma feliz ou “maluca coincidência” de datas de nascimento, a senhora é a profissional pela qual eu mais me identifiquei durante meu período de mestrando. O modo alegre, extravagante, excêntrico e acima de tudo original e único de conviver e ensinar seus alunos, para mim é mais que um alicerce na minha formação profissional, é um espelho. Este trabalho não seria o mesmo sem seu “jeitão bizarro/fabuloso” de orientar. Muito obrigado!

Aos meus demais parentes, meu irmão Édino, meus tios, tias, primos e primas que mesmo distantes, mantiveram contato, e me apoiaram com palavras de força e entusiasmo; contribuíram muito no desenvolvimento desse trabalho.

Às amigas impagáveis que conquistei ao longo do mestrado. Em especial a Cecília Lenzi, Priscila Shiki, Carlos de Oliveira, Márcia Salim, Luís Antonio, Vódice Feisther, Tarcísio Leal, Danielle Maass, Michaela Coradi e demais companheiros e colegas do LabSIN/LabMASSA. Guardarei cada momento de boas risadas, filmes, séries e bastante comilança que testemunhamos juntos. Vocês são incríveis!

As boas amizades também extrapolam e fogem das paredes do laboratório. Não poderia deixar de prestar minha gratidão aos amigos Lizandro Simão, Ellen Rodrigues, Suellen Battiston e Morgana Machado pelas incontáveis aventuras que passamos regadas de grandes risadas, companheirismo e ótimas histórias para contar. Vocês são demais!

Aos amigos e demais colegas do Laboratório de Controle de Processos (LCP), Central de Análises Químicas, CERMAT e o Laboratório Central de Microscopia Eletrônica, os quais foram de fundamental importância na execução dos experimentos deste trabalho.

À Universidade Federal de Santa Catarina por ser a instituição que outorga mais esse título de minha conquista pessoal e profissional e, acima de tudo, pela disponibilidade dos laboratórios e demais materiais para a execução desse trabalho.

À cidade de Florianópolis que me proporcionou um misto de tantas alegrias e tristezas que passei a amá-la e considerá-la minha nova casa longe da minha cultura e raízes. Guardarei com carinho, cada esquina, cada casa e cada aventura que vivi nesta cidade.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro que custeou minha permanência em Florianópolis e conseqüentemente a execução deste trabalho.

A todos os demais amigos, parceiros e colegas que de alguma maneira contribuíram nesta minha conquista; do meu orientador ao porteiro do laboratório, meus sinceros agradecimentos de coração.

A todos vocês, muito obrigado!

*“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades,
cultivando sempre o amor e a generosidade. Lembrai-
vos de que as grandes coisas do homem foram
conquistadas do que parecia impossível”.*
(Charles Chaplin)

RESUMO

As nanopartículas de prata sintetizadas a partir de sistemas microbianos por meio de métodos de produção verde, também conhecido como métodos ecoeficientes são uma realidade do século XXI. O método da biossíntese é considerado uma técnica ecologicamente limpa, não-tóxica e ambientalmente aceitável. Muitos microrganismos atuam diretamente na síntese intracelular ou extracelular de nanopartículas metálicas com diferentes eficiências, além de tamanhos e formas variáveis de nanopartículas. Desse modo, a síntese de nanopartículas de prata (AgNPs) por fungos é um processo alternativo e promissor devido a sua natureza ecoeficiente, segura e rentável. O objetivo deste estudo foi a biossíntese de AgNPs mediada pelo fungo *Fusarium oxysporum*, bem como a caracterização destas nanopartículas, incluindo a avaliação do controle do tamanho e estabilidade em diferentes condições de tratamento e a verificação de seu potencial como agente antimicrobiano. O tamanho e a estabilidade das AgNPs foram determinados respectivamente pelos métodos de espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial zeta (PZ). As nanopartículas de prata também foram caracterizadas via espectroscopia na região ultravioleta visível (UV-Vis), espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), espectroscopia de absorção atômica por chama (FAAS), microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV-EC) e microscopia eletrônica de transmissão (TEM). Por fim, o potencial antimicrobiano foi avaliado testando-as contra diferentes cepas bacterianas, medindo os halos de inibição de bactérias tratadas com diferentes quantidades de soluções coloidais contendo nanopartículas de prata. Os resultados mostraram que a biossíntese produziu AgNPs com tamanho médio de 34 nm e valores de potencial zeta inferiores a -30 mV nas condições de tratamento. Os espectros UV-Vis e FAAS confirmaram a presença de íons de prata reduzidos e consequentemente a formação de AgNPs. Já as análises em FTIR detectaram bandas correspondentes a vibrações em ligações químicas de grupamentos tipo amida I e II de proteínas, além da presença de alcanos cíclicos, ciclo-hexano, éteres e hidrocarbonetos aromáticos. As análises em MEV-EC e TEM revelaram a formação de AgNPs com formato esférico e bem dispersos. Por fim, a verificação dos testes de sensibilidade de cepas bacterianas tratadas com AgNPs confirmaram a eficiência das nanopartículas como agente antimicrobiano.

Palavras-chave: Nanotecnologia, Biossíntese, Nanopartículas de prata, *Fusarium oxysporum*, Agente antimicrobiano.

ABSTRACT

Silver nanoparticles synthesized from microbial systems by means of green production or eco-friendly methods are a reality of the 21st century. The synthesis of silver nanoparticles (AgNPs) by fungi is a promising alternative processing due to its eco-friendly, safe, and cost-effective nature. The goal of this study was to evaluate the biosynthesis of AgNPs mediated by the fungus *Fusarium oxysporum*, as well as the characterization of these nanoparticles, including the evaluation of size control and stability in different treatment conditions and the verification of their potential as an antimicrobial agent. The size and stability of the AgNPs were determined respectively by the methods of dynamic light scattering (DLS) and zeta potential (ZP). Silver nanoparticles were also characterized by visible ultraviolet (UV-Vis) spectroscopy, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), flame atomic absorption spectroscopy (FAAS), field emission scanning electron microscopy (FE-SEM) and transmission electron microscopy (TEM). Finally, the effectiveness of the antimicrobial potential was evaluated by testing them against different bacterial strains by the antimicrobial susceptibility test, measuring the inhibition halos of bacteria treated with different quantities of colloidal solutions containing silver nanoparticles. The results showed that biosynthesis produced silver nanoparticles with a mean size of 34 nm and zeta potential values below -30 mV under treatment conditions. The UV-Vis and FAAS spectra confirmed the presence of reduced silver ions and consequently the formation of AgNPs, whereas FTIR detected bands corresponding to vibrations in chemical bonds of groupings type: amide I and II of proteins besides the presence of alkanes, cyclohexane, ethers and aromatic hydrocarbons. FE-SEM and TEM revealed the formation of AgNPs with spherical shape and well dispersed. Finally, the verification of the sensitivity tests of bacterial strains treated with AgNPs confirmed the efficiency of the nanoparticles as an antimicrobial agent.

Key words: Nanotechnology, Biosynthesis, Silver nanoparticles, *Fusarium oxysporum*, Antimicrobial agent.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Comparações de tamanho: Objetos que variam em tamanho de 1 metro a 1 picometro.....	35
Figura 2 - Estrutura típica em camadas de uma nanopartícula com aplicação biológica.....	38
Figura 3 - Ilustração do comparativo baseado no tamanho de partículas entre soluções verdadeiras, solução coloidal e suspensões.....	40
Figura 4 – Ilustração do efeito de <i>Tyndall</i> produzido por dispersões coloidais. Dispersão de nanopartículas de Ag (em amarelo) e dispersão de nanopartículas de Au (em vermelho).....	42
Figura 5 - Energia potencial (V) de interação partícula-partícula em função da distância (d) de separação entre duas partículas.....	46
Figura 6 - Mecanismo de estabilização eletrostática.....	48
Figura 7 - Mecanismo de estabilização estérica.....	50
Figura 8 - Mecanismo de estabilização eletroestérica.....	51
Figura 9 - Ilustração do mecanismo hipotético de biorredução dos íons de prata pela enzima nitrato redutase em uma célula de <i>B. licheniformis</i>	59
Figura 10 - Reação bioquímica envolvendo o mecanismo hipotético da biorredução de íons Ag^+ para Ag^0 na biossíntese de nanopartículas de prata.....	60
Figura 11 - Micrografia em microscópio eletrônico de transmissão de nanopartículas de prata biossintetizadas por <i>Aspergillus niger</i> com tamanho de partícula variando entre 3 e 30 nm.....	62
Figura 12 - Biossíntese de nanopartículas de prata mediado pelo fungo endofítico <i>Epicoccum nigrum</i> . Visualização da colônia após 9 dias de crescimento (a); conídios (estruturas reprodutivas) provenientes dos conidióforos (b); micrografia em MET das AgNPs sintetizadas.....	64

Figura 13 - Ilustração esquemática em cores dos diferentes mecanismos de ação antimicrobiana das nanopartículas de prata: (1) rompimento da parede celular por radicais livres formados pelas AgNPs; (2) íons de Ag promovem a formação de espécies de oxigênio reativas no interior da célula bacteriana e (3) interação entre as AgNPs nos grupamentos contendo P e S na molécula de DNA provocando a interrupção da replicação e transcrição do DNA.....7171

Figura 14 - Cepa do *Fusarium oxysporum f. sp. Phaseoli* utilizado na síntese das AgNPs após 5 dias de crescimento em placa de Petri..76.....76

Figura 15 - Ilustração esquemática do método resumido de biossíntese das AgNPs. A etapa 1 compreende os procedimentos referentes ao cultivo do fungo, transferência da biomassa para um frasco contendo água destilada e sua separação do meio por filtração. Já a etapa 2 compreende na adição de AgNO₃ ao filtrado fúngico e a caracterização das AgNPs formadas por microscopia eletrônica.....77

Figura 16 - Equipamentos utilizados na determinação do tamanho e estabilidade via potencial zeta das AgNPs. Sistema NANO-flex/Stabino (a); célula cilíndrica e pistão de teflon (b) e componente contendo o feixe de luz a laser imerso na amostra contendo as AgNPs para medição do tamanho das nanopartículas pelo princípio do DLS.....79

Figura 17 - Ilustração do *grid* onde foi depositada uma gota da solução contendo as AgNPs (à esquerda) e o suporte onde os grids são armazenados (à direita).....83

Figura 18 - Filtrado fúngico antes da adição de AgNO₃ (esquerda) e após 5 dias da adição de AgNO₃ (direita). A mudança na tonalidade da cor do meio reacional é um indicativo da biossíntese das nanopartículas de prata.....87

Figura 19 - Distribuição cumulativa e percentual das AgNPs (à esquerda) e variação do potencial zeta em função do pH (à direita) para a amostra controle padrão das nanopartículas de prata.....89

Figura 20 - Distribuição cumulativa e percentual do tamanho das AgNPs biossintetizadas sob diferentes concentrações de AgNO ₃ : (a) 0,001 M; (b) 0,01 M e (c) 0,1 M.....	91
Figura 21 - Variação do potencial zeta em função do pH para as AgNPs biossintetizadas em diferentes concentrações de AgNO ₃	93
Figura 22 - Distribuição cumulativa e percentual do tamanho das AgNPs biossintetizadas sob diferentes quantidades de biomassa fúngica em gramas: (a) 5 g; (b) 10 g e (c) 15 g.....	95
Figura 23 - Variação do potencial zeta em função do pH para as AgNPs biossintetizadas com diferentes quantidades de biomassa fúngica.....	96
Figura 24 - Distribuição cumulativa e percentual do tamanho das AgNPs biossintetizadas sob diferentes temperaturas de biorredução: (a) 20 °C; (b) 40 °C e (c) 60 °C.....	99
Figura 25 - Variação do potencial zeta em função do pH para as AgNPs biossintetizadas em diferentes temperaturas de biorredução.....	101
Figura 26 - Distribuição cumulativa e percentual do tamanho das AgNPs biossintetizadas com variação na idade do fungo <i>Fusarium oxysporum</i> : (a) 10 dias; (b) 20 dias e (c) 30 dias.....	103
Figura 27 - Variação do potencial zeta em função do pH para as AgNPs biossintetizadas com variação da idade de crescimento do <i>Fusarium oxysporum</i>	105
Figura 28 - Distribuição cumulativa e percentual do tamanho das AgNPs biossintetizadas com variação na idade das nanopartículas (intervalo pós-biossíntese): (a) 10 dias; (b) 20 dias e (c) 30 dias.....	107
Figura 29 - Variação do potencial zeta em função do pH para as AgNPs biossintetizadas com variação da idade das nanopartículas (intervalo pós-biossíntese).....	109
Figura 30 - Espectros em UV-Vis registrados em função do tempo de reação de biossíntese de nanopartículas de prata mediados por <i>Fusarium oxysporum</i> . O pico da banda de plasmon encontra-se na região de 408 nm.....	112

Figura 31 - Espectro de absorção UV-Vis em função do tempo de reação registrado em valores de baixo comprimento de onda para as AgNPs biossintetizadas mediado pelo <i>Fusarium oxysporum</i>	113
Figura 32 - Espectro em FTIR das AgNPs biossintetizadas por intermédio do <i>Fusarium oxysporum</i>	114
Figura 33 - Micrografia em MEV-EC das nanopartículas de prata biossintetizadas por intermédio do <i>Fusarium oxysporum</i> : (a) aumento em 10000x; (b) aumento em 50000x.....	118
Figura 34 - Micrografias em MET das nanopartículas de prata biossintetizadas por intermédio do fungo <i>Fusarium oxysporum</i> , em três escalas diferentes: (a) 20 nm; (b) 50 nm e (c) 100 nm.....	119
Figura 35 - Testes de medição dos halos de inibição pelo método de perfuração em ágar para as cepas bacterianas tratadas com 50 µL da solução contendo as AgNPs. São ilustradas as seguintes cepas: (a) <i>E. coli</i> , (b) <i>Listeria monocytogenes</i> , (c) <i>Salmonella enterica</i> , (d) <i>Staphylococcus aureus</i> e (e) <i>Bacillus cereus</i>	120
Figura 36 - Curva de crescimento de <i>Escherichia coli</i> em função do tempo para as células tratadas com diferentes concentrações de nanopartículas de prata.....	123
Figura 37 - Curva de crescimento de <i>Listeria monocytogenes</i> em função do tempo para as células tratadas com diferentes concentrações de nanopartículas de prata.....	123

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dimensões de diferentes estruturas biológicas em nanoescala.....	35
Tabela 2 - Classificação básica dos diferentes campos de atuação da nanobiotecnologia.....	36
Tabela 3 - Relação entre o tamanho de uma nanopartícula e a fração quantitativa de átomos dispostas em sua superfície.....	39
Tabela 4 - Classificação dos colóides de acordo com as fases dispersa e de dispersão.....	43
Tabela 5 - Visão global de microrganismos produtores de nanopartículas de prata.....	54
Tabela 6 - Materiais utilizados na execução da biossíntese das AgNPs.....	74
Tabela 7 - Variação dos parâmetros de biossíntese das AgNPs.....	78
Tabela 8 - Valores do tamanho médio, potencial zeta e pH inicial para as AgNPs do controle padrão.....	89
Tabela 9 - Tamanho médio das AgNPs em função da variação da concentração de AgNO_3	92
Tabela 10 - Valores numéricos do PZi e pH inicial das AgNPs produzidas em diferentes concentrações de AgNO_3	92
Tabela 11 - Tamanho médio das AgNPs em função da variação da quantidade de biomassa.....	96
Tabela 12 - Valores numéricos do PZi e pH inicial das AgNPs produzidas com diferentes quantidades de biomassa fúngica.....	97
Tabela 13 - Tamanho médio das AgNPs em função da variação da temperatura de biorredução.....	100

Tabela 14 - Valores numéricos do PZi e pH inicial das AgNPs produzidas em diferentes temperaturas de biorredução.....	101
Tabela 15 - Tamanho médio das AgNPs em função da variação na idade do fungo <i>Fusarium oxysporum</i>	104
Tabela 16 - Valores numéricos do PZi e pH inicial das AgNPs produzidas variando a idade do fungo <i>Fusarium oxysporum</i>	105
Tabela 17 - Tamanho médio das AgNPs em função da variação na idade das nanopartículas.....	108
Tabela 18 - Valores numéricos do PZi e pH inicial das AgNPs produzidas variando a idade nanopartículas (intervalo pós-biossíntese).....	109
Tabela 19 - Resumo dos valores numéricos do tamanho médio e potencial zeta inicial das AgNPs biossintetizadas por intermédio do <i>Fusarium oxysporum</i>	110
Tabela 20 - Espectros no FTIR e seus respectivos grupos funcionais encontrados no filtrado fúngico as AgNPs biossintetizadas.....	116
Tabela 21 - Resultados numéricos da análise realizado em FAAS das concentrações de prata reduzidas em função da concentração inicial de nitrato de prata adicionada ao filtrado fúngico.....	117
Tabela 22 - Tamanho médio dos halos de inibição dos ensaios contendo as cepas bacterianas tratadas com diferentes quantidades da solução contendo as AgNPs. Os resultados foram comparados com o controle positivo.....	121

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AgNPs – Nanopartículas de prata
BDA – Batata, dextrose e ágar
CIBIOT - Centro de Estudios e Investigaciones en Biotecnologia
CIM - Concentração Inibitória Mínima
DLS - Espalhamento de luz dinâmico
DO - Densidade ótica
DRX - Difração de raios-X
EDX - Energia dispersiva de raios-X
FAAS - Espectroscopia de absorção atômica por chama
FTIR - Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
LabMASSA - Laboratório de Transferência de Massa
LCP - Laboratório de Controle de Processos
LCME - Laboratório Central de Microscopia Eletrônica
MET - Microscopia eletrônica de transmissão
MEV-EC – Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo
PZ - Potencial zeta
PZ_i - Potencial zeta inicial
rpm - Rotações por minuto
UPB - Universidad Pontificia Bolivariana
UV - Ultravioleta
Vis - Visível
XPS - Espectroscopia de fotoelétrons em raios-X

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	27
2 OBJETIVOS	31
2.1 OBJETIVO GERAL.....	31
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	33
3.1 NANOTECNOLOGIA E NANOBIOTECNOLOGIA.....	33
3.2 O USO DE NANOPARTÍCULAS EM NANOBIOTECNOLOGIA.....	36
3.3 SISTEMAS COLOIDAIIS.....	39
3.4 ESTABILIDADE DE SISTEMAS COLOIDAIIS.....	43
3.4.1 Estabilização eletrostática	47
3.4.2 Estabilização estérica	49
3.4.3 Estabilização eletroestérica	50
3.5 BIOSÍNTESE MICROBIANA DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA.....	51
3.5.1 Mecanismo de biossíntese de nanopartículas de prata por microrganismos	57
3.5.2 Biossíntese de nanopartículas de prata por fungos	60
3.5.2.1 <i>O fungo Fusarium oxysporum</i>	65
3.6 NANOPARTÍCULAS DE PRATA COMO AGENTES ANTIMICROBIANOS.....	68
3.6.1 Mecanismo de ação antimicrobiana das nanopartículas de prata	69
4 MATERIAL E METODOS	73
4.1 DESCRIÇÃO DO MÉTODO E MATERIAL UTILIZADO.....	73
4.2 MÉTODO DE BIOSÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO.....	75
4.2.1 Extrato fúngico utilizado e condições de cultivo	75
4.2.2 Biossíntese das nanopartículas de prata mediada por <i>Fusarium oxysporum</i>	75
4.2.3 Determinação do tamanho e estabilidade das AgNPs	77

4.2.4 Caracterização das AgNPs.....	79
4.2.4.1 <i>Caracterização via espectroscopia na região ultravioleta visível (UV-Vis).....</i>	<i>80</i>
4.2.4.2 <i>Caracterização via espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).....</i>	<i>80</i>
4.2.4.3 <i>Caracterização via espectroscopia de absorção atômica por chama (FAAS).....</i>	<i>81</i>
4.2.4.4 <i>Caracterização via Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (MEV-EC) e Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....</i>	<i>82</i>
4.2.5 Análise do potencial antimicrobiano das AgNPs.....	83
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	87
5.1 EFETIVIDADE DA BIOSÍNTESE.....	87
5.2 TAMANHO E ESTABILIDADE DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA.....	88
5.3 TAMANHO E ESTABILIDADE DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE BIOSÍNTESE.....	90
5.3.1 Variação do tamanho e estabilidade das AgNPs biossintetizadas sob diferentes concentrações de AgNO₃.....	90
5.3.2 Variação do tamanho e estabilidade das AgNPs biossintetizadas sob diferentes quantidades de biomassa.....	94
5.3.3 Variação do tamanho e estabilidade das AgNPs biossintetizadas em diferentes temperaturas de biorredução....	97
5.3.4 Variação do tamanho e estabilidade das AgNPs biossintetizadas em função da idade do fungo.....	101
5.3.5 Variação do tamanho e estabilidade das AgNPs em função do tempo após a biossíntese (idade das nanopartículas).....	105
5.4 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA..	111
5.4.1 Espectroscopia UV-Vis.....	111
5.4.2 Espectroscopia FTIR.....	113
5.4.3 Espectroscopia de absorção atômica por chama (FAAS).....	117

5.4.4 Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (MEV-EC) e Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	117
5.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA.....	119
6 CONCLUSÕES.....	127
SUGESTÕES PARA VTRABALHOS FUTUROS.....	129
7 REFERÊNCIAS.....	131

INTRODUÇÃO

Segundo Narayanan & Sakthivel, (2010) nos últimos anos, pesquisas voltadas para o campo da nanotecnologia, estão emergindo como tecnologia de ponta, abordando conceitos da física, química, biologia, ciência dos materiais e da medicina. Nesse contexto, as nanopartículas de metal têm sido amplamente estudadas devido às suas propriedades físico-químicas únicas (KHATOON, AHMAD, & SARDAR, 2015).

De fato, existe uma necessidade crescente de desenvolver processos ecológicos para a síntese de nanopartículas por meio da química "verde", envolvendo o uso de microrganismos. Na última década, o desenvolvimento de sínteses biologicamente inspiradas de nanopartículas metálicas está evoluindo como um importante ramo da nanotecnologia (DAR, INGLE, & RAI, 2013; GHOLAMI-SHABANI et al., 2014; VIGNESHWARAN et al., 2007).

As nanopartículas de metal têm propriedades magnéticas, eletrônicas e óticas novas, que variam com base em seu tamanho, forma e composição. O uso de microrganismos para a biossíntese de nanomateriais sobre outros métodos disponíveis tem despertado grande interesse devido ao seu potencial para ser explorado como uma fonte inesgotável de nanopartículas que pode ser usada para várias aplicações (GADE et al., 2008; SYED et al., 2013).

Nesse âmbito, as nanopartículas de prata (AgNPs - *silver nanoparticles*), ou simplesmente nanop prata, são aglomerados de átomos de prata que variam em diâmetro de 1 a 100 nm (CHALOUPKA, MALAM, & SEIFALIAN, 2010) cujas aplicações têm aumentado desde os tempos antigos (MONTAZER, PAKDEL, & MOGHADAM, 2010).

Dentre as características mais atraentes das nanopartículas de prata visando sua produção e manipulação, destacam-se sua boa condutividade elétrica, sendo maior que a do cobre por exemplo, segundo Jiang et al. (2006); sua estabilidade química e catalítica; e principalmente sua atividade antimicrobiana (KHATOON et al., 2015). A atividade antimicrobiana proporcionada pela utilização da prata é atualmente bastante distinta, pelo fato desta possuir baixa toxicidade em células humanas quando utilizadas em baixas concentrações. Por esta razão, a prata tem sido usada há muito tempo como um agente para a purificação da água e como um antisséptico para o tratamento de feridas abertas e queimaduras antes da inclusão da terapia antibiótica (KUMAR, SINGH, HALDER, & MITRA, 2014).

Além do mais, a nanoprata é provavelmente um dos nanomateriais mais comercializados no mundo atualmente, em aplicações desde agentes antimicrobianos, aplicados na modificação de têxteis como relatado por Dastjerdi & Montazer, (2010) em sistemas de purificação de água, cosméticos, dispositivos médicos, eletrônicos e eletrodomésticos (MAYNARD, 2007; SINTUBIN, VERSTRAETE, & BOON, 2012). A nanoprata também exibe características ópticas marcantes, tornando-as adequadas para aplicação em imagiologia biológica, por exemplo (JAIN, HUANG, EL-SAYED, & EL-SAYED, 2008).

Com a finalidade de se produzir com eficiência nanopartículas de prata, vários métodos de síntese têm sido utilizados. Originalmente, tais métodos incluem processos físicos e químicos, tais como atomização ou moagem (DURASAMY, HONG, & CHOI, 2013). Outros métodos incluem síntese em fase líquida, como bem relatado por Harada, Yamada, Kimura, & Saijo, (2013), redução em alta temperatura, condensação em fase de vapor, fotorredução e microemulsões de água-em-óleo (MONTAZER et al., 2012; SINTUBIN; VERSTRAETE; BOON, 2012). Um outro método bastante promissor incluía síntese fotoquímica como descrito por Harada, Kimura, Saijo, Ogawa, & Isoda, (2009) Os métodos químicos, em particular, apresentam algumas desvantagens, das quais se destacam o alto custo com reagentes e soluções, alto gasto de água, instabilidade das nanopartículas, mudança de escala e a eventual utilização de reagentes tóxicos ao meio ambiente (ZHANG et al., 2011; SINTUBIN; VERSTRAETE; BOON, 2012).

Assim, a procura por métodos de produção verde, também denominada de métodos “ecoeficientes”, que priorizem tecnologias de produção que proporcionem a redução de danos ambientais bem como a diminuição dos custos de aquisição do produto final, é uma realidade do século XXI. Dentre algumas características ditas desvantajosas na utilização de microrganismos na síntese de nanopartículas de prata incluem desde o controle do crescimento do microrganismo, a heterogeneidade do meio de cultivo, o controle do tamanho das nanopartículas e a ampliação de escala são alguns dos empecilhos de se promover a biossíntese de metais.(QUESTER; AVALOS-BORJA; CASTRO-LONGORIA, 2013).e A nanobiotecnologia tem concentrado sua atuação em sistemas biológicos para a biossíntese de nanopartículas de prata.

Tal esforço global para diminuir a geração de resíduos indesejáveis na produção da nanoprata está sendo integrado progressivamente com o desenvolvimento moderno em ciência e

indústria. A implementação destes processos sustentáveis é a nova tendência na geração de nanopartículas oriundas de bioprocessos (SHARMA; YNGARD; LIN, 2009).

No presente estudo, foi realizada a biossíntese de AgNPs mediada pelo fungo *Fusarium oxysporum*. As nanopartículas de prata foram caracterizadas, incluindo a determinação da estabilidade em diferentes condições de biossíntese. Posteriormente, as AgNPs foram testadas diante do seu potencial como agente antimicrobiano. A principal contribuição e justificativa deste trabalho é a avaliação detalhada do estudo do desempenho da estabilidade das nanopartículas de prata variando diferentes parâmetros de biossíntese. Tal aspecto de caracterização é tido como ponto relevante no trabalho, visto que diante da literatura voltada à síntese microbiana de nanometais, a biossíntese de nanopartículas de prata mediada por fungos já está consolidada na comunidade científica. O estudo da estabilidade das nanopartículas metálicas é o principal fator a ser levado em consideração na biossíntese das AgNPs, uma vez que está relacionada à sua conservação, durabilidade e aplicação.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho é promover a biossíntese de nanopartículas de prata (AgNPs) por meio da redução bioquímica de íons de prata, mediada pela utilização do fungo *Fusarium oxysporum* e avaliar o potencial biológico dessas nanopartículas utilizando-as como agentes antimicrobianos.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos deste trabalho são, respectivamente:

- Avaliar o controle do tamanho das nanopartículas de prata sob diferentes condições de biossíntese;
- Verificar a estabilidade das nanopartículas de prata, incluindo os aspectos de aglomeração e dispersão destas, via análise de potencial zeta em diferentes condições de biossíntese;
- Caracterizar química e estruturalmente as nanopartículas de prata via ensaios em espectroscopia UV-Vis. FTIR e Microscopia eletrônica;
- Avaliar a capacidade antimicrobiana das nanopartículas de prata utilizando diferentes cepas bacterianas tratadas com as nanopartículas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo, será apresentada uma revisão detalhada da literatura sobre os principais temas e tópicos que abrangem o conteúdo teórico deste estudo.

2.1 NANOTECNOLOGIA E NANOBIOTECNOLOGIA

Em 1959, Richard Feynman foi o primeiro cientista a sugerir que dispositivos e materiais poderiam algum dia ser fabricados em escala atômica e a introduzir o conceito de nanotecnologia na comunidade científica. Nesse mesmo ano, em uma conferência no Instituto de Tecnologia da Califórnia intitulada: *There is plenty of room at the bottom* (“Há bastante espaço no fundo”), o físico norte-americano descreveu com maestria a possibilidade de manipular átomos em uma escala jamais explorada e esboçou a ideia de construir objetos *bottom-up* (“de baixo para cima”). Nasce, assim, a nanotecnologia (DE MORAIS et al., 2014).

Por definição, nanotecnologia (“nano” em grego significa anão) pode ser definida como a “ciência e a engenharia envolvidas na concepção, síntese, caracterização e aplicação de materiais e dispositivos cuja menor organização funcional em pelo menos uma dimensão está na escala nanométrica”. A nanotecnologia envolve a manipulação individual de moléculas simples ou mesmo átomos. A construção de componentes átomo por átomo ou molécula por molécula, a fim de criar materiais com propriedades novas ou melhoradas vastamente tem sido a meta de nanotecnólogos. No entanto, o campo tem se expandido de modo bastante mal definido e tende a incluir todas as estruturas tão pequenas que o seu estudo ou manipulação era impossível ou impraticável até recentemente. Em nanoescala, efeitos quânticos surgem e materiais muitas vezes tendem a se comportar estranhamente, em comparação com as suas propriedades originais (CLARK; PAZDERNIK, 2016).

Diante da problemática e adversidade do mal esclarecimento sobre o que pode ser considerado um objeto ou sistema nanotecnológico, a *National Nanotechnology Initiative* (“Iniciativa Nacional em Nanotecnologia” – www.nano.gov) aborda a nanotecnologia como o entendimento e controle da matéria em dimensões de cerca de 1-100 nm, nas quais os fenômenos únicos nesse ambiente permitem novas aplicações para um dado produto nanotecnológico (JAIN, 2011).

Desse modo, a nanotecnologia trata da criação e utilização de materiais, dispositivos e sistemas por meio do controle da matéria na

escala nanométrica de comprimento entre 1 e 100 nm, ou seja, no nível de átomos, moléculas e estruturas supramoleculares. Abrangendo ciência em nanoescala, engenharia e tecnologia, a nanotecnologia envolve imagem, medição, modelagem e manipulação nesta escala de comprimento (JAIN, 2007). A Tabela 1 descreve as dimensões de diferentes objetos em nanoescala.

Tabela 1 - Dimensões de diferentes estruturas biológicas em nanoescala.

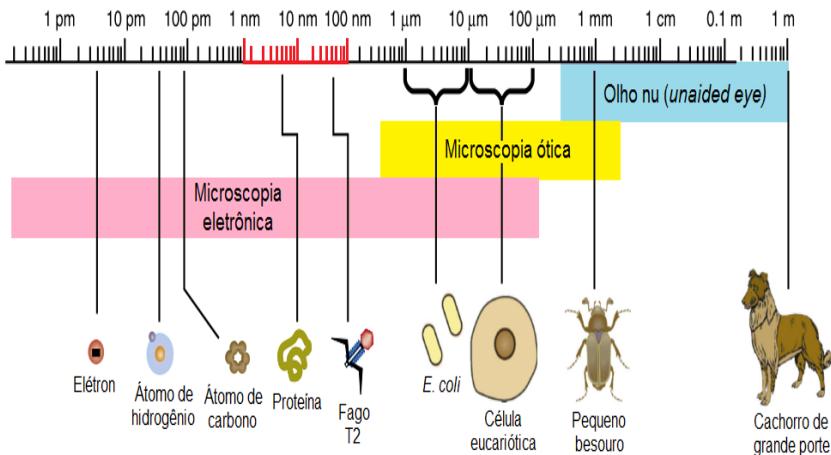
Objeto	Dimensão
Diâmetro de um fio de cabelo	50000 nm
Hemácia	2500 nm
Vesícula em uma célula	200 nm
Célula bacteriana	1000 nm
Vírus	100 nm
Exossomos (nanovesículas responsáveis pela comunicação celular entre os dendritos)	65-100 nm
Largura do DNA	2,5 nm
Ribossomo	2-4 nm
Um par de bases nitrogenadas do genoma humano	0,4 nm
Molécula de triptofano	1,2 nm
Molécula de aspirina	1 nm
Um átomo individual	0,25 nm

Fonte: Jain (2011)

Assim, nanotecnologia é o termo popular para a construção e utilização de estruturas funcionais com pelo menos uma dimensão característica medidos em nanômetros (nm): um nanometro é um bilionésimo de um metro (10^{-9} m). Este é cerca de 4 vezes o diâmetro de um átomo individual e a ligação entre dois átomos individuais é de 0,15 nm de comprimento, por exemplo. Já as proteínas possuem de 1-20 nm de tamanho. A definição de "pequeno", outro termo usado em relação à nanotecnologia, dependerá da aplicação, mas sempre deverá variar entre

1-100 nm (JAIN, 2011). A Figura 1 ilustra a comparação de tamanhos em objetos sob diferentes escalas de comprimento.

Figura 1 - Comparações de tamanho: Objetos que variam em tamanho de 1 metro a 1 picometro



Fonte: Clark & Pazdernik (2016)

Os componentes internos de células biológicas estão na mesma escala como os estudados por nanotecnologia. Como consequência, nanotecnólogos têm voltado suas atenções para a biologia celular visando a obtenção de estruturas úteis, processos e informações. Organelas celulares, tais como ribossomos por exemplo, podem ser considerados como "nanomáquinas" programáveis ou "nanomontadores". Assim, a nanotecnologia pode estar relacionada à biologia molecular (CLARK; PAZDERNIK, 2016). Surge então a "nanobiotecnologia", a qual, de acordo com Fortina et al. (2005), trata-se de um termo recente, que descreve a convergência entre duas vertentes científicas já existentes, porém distantes: a nanotecnologia e a biologia molecular.

Os principais objetivos práticos da nanobiotecnologia estão em usar componentes biológicos para realizar tarefas em nanoescala. Algumas dessas tarefas possuem ênfase na aplicação não-biológica e têm aplicações em áreas como eletrônica e computação, enquanto outras são aplicáveis à biologia ou medicina (CLARK; PAZDERNIK, 2016). Para alguns, nanobiotecnologia tornou-se o paradigma de mudança de ciência e tecnologia que está prestes a mudar a face do século 21, fornecendo vias

para uma sociedade sustentável e de alta qualidade de vida (KOOPMANS & AGGELI, 2010).

Das diversas áreas de atuação da nanobiotecnologia, destacam-se: a manipulação de componentes biológicos aliados à aplicação em diagnóstico laboratorial clínico, desde o uso de *biochips* agregado a células humanas até a utilização de nanopartículas magnéticas como marcadores de células tumorais (JAIN, 2005). Outras aplicações da nanotecnologia destacam também o uso de nanopartículas terapêuticas no controle de fármacos; uso de biossurfactantes oriundos de microrganismos para o tratamento de efluentes e o uso de nanopartículas metálicas de origem microbiana com propriedades antimicrobianas (ROCO et al., 2006; RAHMAN, K. S. M. & GAKPE, 2008; HULKOTI; TARANATH, 2014). Uma classificação básica dos diversos campos de atuação da nanobiotecnologia está descrita na Tabela 2.

Tabela 2 - Classificação básica dos diferentes campos de atuação da nanobiotecnologia.

Classificação básica da nanobiotecnologia	
Nanopartículas metálicas	Nanocanais
Pontos quânticos	Nanoporos
Nanocristais	Nanofluidos
Lipopartículas	Nanoestruturados de silício
Nanopartículas magnéticas	Manipulação em nanoescala
Nanopartículas poliméricas	Microscopia de força atômica
Nanofibras	Microscopia de varredura por sonda
Nanofibras de carbono	Ressonância de plasmon de superfície
Dendrímeros	Sistemas à laser em femtossegundo
Nanocompósitos	Nanolipossomos
Nanovesículas	Nanotubos

Fonte: Jain (2011)

2.2 O USO DE NANOPARTÍCULAS EM NANBIOTECNOLOGIA

A nanotecnologia começou com avanços na visualização e medição de componentes incrivelmente pequenos. Em seguida, mudou-se para a elaboração de estruturas em nanoescala. Nanoestruturas simples

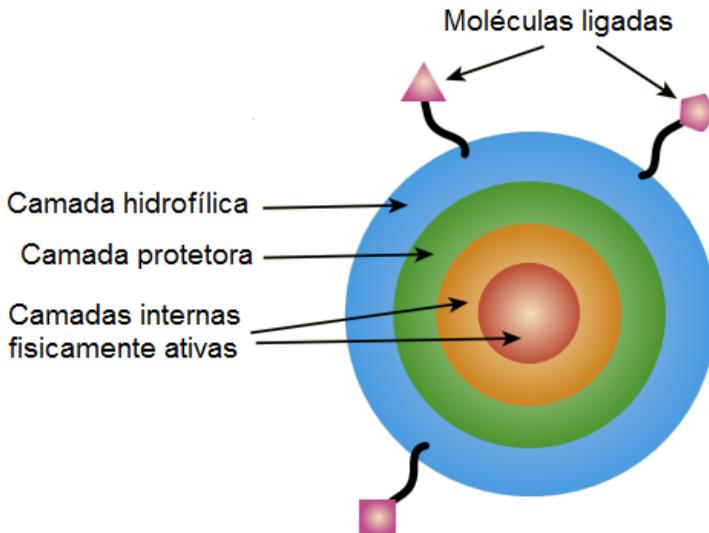
estão agora sendo desenvolvidas e usadas para uma variedade de fins de análise (CLARK; PAZDERNIK, 2016).

Nanopartículas são definidas como partículas em dispersão ou partículas sólidas com tamanho variando entre 1-100 nm (MOHANRAJ & CHEN, 2006). As nanopartículas podem ser feitas de diferentes materiais e cada um contém dezenas a milhares de átomos, coexistindo em um plano que atravessa o quântico e o newtoniano. Nessa escala cada partícula possui novas propriedades que mudam dependendo de seu tamanho. Como a matéria é reduzida a nanoescala, propriedades eletrônicas e outras mudam radicalmente. As nanopartículas podem conter formas inusitadas de desordem estrutural que podem modificar significativamente as propriedades dos materiais e, portanto, não podem apenas ser consideradas como pequenos pedaços de material (JAIN, 2011).

As nanopartículas apresentam-se geralmente com diferentes formatos dependendo da natureza da composição química. Nanopartículas metálicas, por exemplo, apresentam predominância de formato esférico, mas varetas, placas, e outras formas são por vezes encontradas. Podem ser sólidas ou ocas e são compostas por uma variedade de materiais, muitas vezes em várias camadas discretas com funções distintas. Em se tratando de nanopartículas metálicas com atividade biológica, tipicamente, essas apresentam uma camada funcional central, uma camada protetora, e uma camada exterior permitindo a interação com o mundo biológico (CLARK; PAZDERNIK, 2016).

A camada funcional no centro normalmente exibe algum comportamento óptico ou magnético útil, sendo o mais frequente a fluorescência. A camada protetora preserva a camada funcional de danos químicos por ar, água, ou componentes de células, por exemplo, e, inversamente, protege a célula de quaisquer propriedades tóxicas dos produtos químicos que constituem a camada funcional. A camada exterior envolve aspectos de biocompatibilidade, solubilidade em água e de reconhecimento específico. Para utilização biológica, as nanopartículas são muitas vezes solúveis em água através da adição de uma camada exterior hidrófila. Além disso, os grupamentos químicos e bioquímicos devem estar presentes e agregados na camada superficial para permitir a ligação específica da nanopartícula para outras moléculas ou estruturas biológicas como células humanas ou microbianas por exemplo (CLARK & PAZDERNIK, 2016; PAPAOGLOU & PARTHASARATHY, 2007). A Figura 2 ilustra a conformação estrutural de uma nanopartícula típica de aplicação biológica.

Figura 2 - Estrutura típica em camadas de uma nanopartícula com aplicação biológica



Fonte: Adaptado de Clark & Pazdernik (2016)

Como já frisado anteriormente, a descrição sobre o que é nanotecnologia é um tanto quanto controversa quando se trata do que pode ser considerado um produto ou componente nanotecnológico, mas é de consenso que as dimensões das nanopartículas devem estar entre 1-100 nm. Outro consenso é de que as propriedades físicas e químicas das nanopartículas variam quando em escalas de tamanho maiores, e estas baseiam suas propriedades na tese de que as estruturas superficiais envolvidas são muito maiores em comparação com os volumes acarretando em maiores áreas de contato. De fato, quando uma nanopartícula diminui de tamanho, uma grande proporção de seus átomos estará disposta na região superficial da nanopartícula quando comparada com as camadas mais internas. Pode-se tomar como exemplo prático que uma nanopartícula com tamanho de 30 nm possui cerca de 5% de seus átomos dispostos em sua superfície; já para uma dada nanopartícula com tamanho de 10 nm, essa proporção aumenta para 20%, chegando em até 50% para uma nanopartícula de 5 nm. Por consequência, pode-se deduzir que quanto menor for uma nanopartícula, essa irá apresentar uma

quantidade maior de fração de átomos em sua superfície quando comparada com nanopartículas maiores (CAO, 2011; SRIVATSAN, 2012; LOWE; LOWE, 2015). Sendo assim, como as reações envolvendo nanopartículas ocorrem em sua superfície, as nanopartículas que apresentarem menor tamanho serão extremamente mais reativas quando comparadas com nanopartículas maiores (CAO, 2011). A Tabela 3 mostra uma comparação entre o tamanho de uma nanopartícula e a fração percentual de átomos dispostos em sua superfície.

Tabela 3 - Relação entre o tamanho de uma nanopartícula e a fração quantitativa de átomos dispostas em sua superfície.

Tamanho da partícula (nm)	Número de átomos	Fração da quantidade de átomos na superfície (%)
0,5	1	-
1,0	8	100
2,0	64	99
5,0	1000	50
10,0	8000	25
20,0	64000	12

Fonte: Cao (2011)

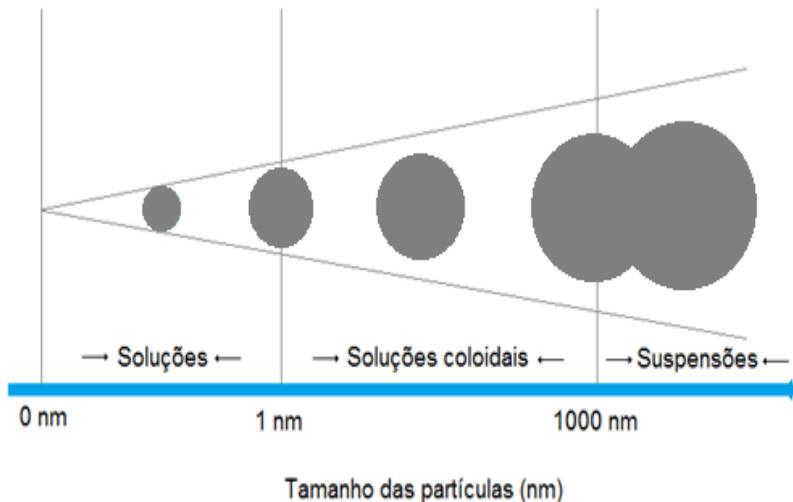
2.3 SISTEMAS COLOIDAIS

Sistemas coloidais, dispersões coloidais ou simplesmente coloides são misturas heterogêneas contendo pelo menos duas fases distintas, com a matéria de uma das fases na forma finamente dividida (sólido, líquido ou gás), denominada fase dispersa, misturada com a fase contínua (sólido, líquido ou gás), denominada meio de dispersão. A ciência dos coloides está relacionada com o estudo dos sistemas nos quais pelo menos um dos componentes da mistura apresenta uma dimensão no intervalo de 1 a 1000 nanômetros ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$). Soluções de macromoléculas são misturas homogêneas e também são consideradas coloides porque a dimensão das macromoléculas está no intervalo de tamanho coloidal e, como tal, apresentam as propriedades características dos coloides (JAFELICCI JR; VARANDA, 1999).

Os sistemas coloidais apresentam tanto partículas pequenas quanto moléculas de grandes dimensões. Como apresentado na Figura 3, os sistemas coloidais são intermediários entre as soluções verdadeiras (ou simplesmente soluções) e os sistemas heterogêneos. As características

que melhor colaboram para a natureza global de um sistema coloidal são as dimensões, a forma e a flexibilidade das partículas que nela estão contidas. Tem-se também as propriedades superficiais (inclusive a elétrica), as interações partícula-partícula e as interações partícula-solvente (FEYNMAN, 1992).

Figura 3 - Ilustração do comparativo baseado no tamanho de partículas entre soluções verdadeiras, solução coloidal e suspensões



Onde: $1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$ (metro)

Fonte: Adaptado de Feynman (1992)

Thomas Graham, em 1861, foi o primeiro a introduzir os termos coloide e diálise em um estudo que relatava a difusão da matéria no estado líquido e gasoso. O termo coloide provém do grego *kolla*, e significa “cola”, e na época referiu-se às soluções de goma arábica, substância sem conformação estrutural definida e bastante viscosa, atualmente considerada uma macromolécula. Já a diálise trata do método de separação pela qual as partículas menores atravessam uma membrana semipermeável enquanto as partículas com dimensões maiores que os poros da membrana ficam retidas pela mesma membrana (WALKER, 1989; JAFELICCI JR; VARANDA, 1999).

O desempenho e a dinâmica de sistemas coloidais têm sido objeto de muitos estudos nas últimas décadas devido ao seu potencial para aplicação e utilização em diferentes áreas tais como nas indústrias farmacêuticas, de alimentos, de tintas e de cosméticos. Existe também bastante interesse com relação ao entendimento e compreensão dos mecanismos que regem as questões fundamentais nesse sistema. Como exemplo, sabe-se que o fenômeno do movimento browniano das partículas está bem estabelecido, porém, ainda pouco se sabe do movimento browniano de partículas coloidais em altas concentrações, e esse impasse ainda está longe de ser compreendido (SEGRÈ; PUSEY, 1996). Os processos dinâmicos de suspensões ou soluções podem ser avaliados por diferentes métodos, sendo o espalhamento de luz dinâmico (DLS – do inglês: *Dynamic Light Scattering*) um dos mais utilizados, em particular na análise de fluidos complexos. O DLS analisa as flutuações temporais na luz espalhada, gerando assim informações sobre o comportamento das partículas em suspensão (SEGRÈ; PUSEY, 1996; BERNE; PECORA, 2000).

De fato, outra característica inerente às propriedades dos sistemas coloidais é de que estes possuem partículas próximas ao comprimento de luz visível. É devido a essa característica que os sistemas coloidais provocam o espalhamento de luz. Se o tamanho das partículas em uma suspensão coloidal é maior que o comprimento de onda, a luz não se separa e todos os comprimentos de onda apresentam-se dispersos (BERNE & PECORA, 2000; PAIS, 1979). É característico que em uma solução coloidal ocorra o fenômeno do espalhamento múltiplo, mais conhecido como efeito de *Tyndall*, que está representado pelo feixe de luz apresentado na Figura 4.

Figura 4 – Ilustração do efeito de *Tyndall* produzido por dispersões coloidais. Dispersão de nanopartículas de Ag (em amarelo) e dispersão de nanopartículas de Au (em vermelho)



Fonte: Bernardo (2005)

As partículas que compõem os sistemas coloidais são bastante pequenas para serem vistas a olho nu. De fato, na ordem de nanômetros de comprimento, porém estas apresentam tamanhos maiores do que o comprimento de onda da luz visível. Nesse caso, em toda ocasião que um feixe de luz atravessar um sistema coloidal, esse mesmo feixe de luz será refratado pelas partículas em suspensão (FRENS, 1972).

Como relatado anteriormente, todo sistema coloidal apresenta pelo menos duas fases distintas: a fase dispersa e a contínua (também chamada de fase de dispersão ou dispersante), cujas relações estão apresentadas na Tabela 4. As partículas dispersas podem apresentar tamanhos diferentes. Nesse caso, o sistema coloidal é denominado polidisperso. Na prática, a grande maioria dos coloides obtidos industrialmente são polidispersos. Já os sistemas coloidais contendo partículas de um mesmo tamanho são denominadas monodispersos. Um exemplo típico de um sistema coloidal monodisperso são as macromoléculas de natureza proteica biossintetizadas pelas células humanas (JAFELICCI JR & VARANDA, 1999).

Tabela 4 - Classificação dos coloides de acordo com as fases dispersa e de dispersão.

Coloide	Fase dispersa	Fase de dispersão	Exemplo
Aerossol líquido	Líquido	Gás	Neblina e desodorante
Aerossol sólido	Sólido	Gás	Fumaça e poeira
Espuma	Gás	Líquido	Espuma de sabão e de combate a incêndio
Espuma sólida	Gás	Sólido	Isopor e poliuretano
Emulsão	Líquido	Líquido	Leite, maionese e manteiga
Emulsão sólida	Líquido	Sólido	Margarina, opala e pérola
Sol*	Sólido	Líquido	Tinta, creme dental, dispersão de nanometais
Sol sólido	Sólido	Sólido	Vidro e plástico pigmentado

Fonte: Jafelicci JR & Varanda (1999)

*Sol: Sistema coloidal constituído de partículas sólidas finamente divididas e dispersas em um meio de dispersão líquido.

Em um sistema coloidal contendo nanopartículas dispersas em uma fase líquida, o pequeno tamanho das nanopartículas provoca a elevada relação área/volume de partículas, influenciando assim nas propriedades da interface entre as duas fases (dispersa e de dispersão), determinando o comportamento deste sistema coloidal. As diferentes interações entre as fases dispersa (nanopartículas) e a de dispersão (fase líquida) compreendem um dos pontos cruciais da dinâmica e da estabilidade de um sistema coloidal. As propriedades físicas e químicas em ambas as fases controlam tais interações, e essas interações na superfície das nanopartículas em contato com a fase líquida incluem principalmente as coulombianas de repulsão eletrostática, as de atração de van der Waals, as de repulsão estérica e as de solvatação (JAFELICCI JR & VARANDA, 1999; SHAW, 1975).

2.4 ESTABILIDADE DE SISTEMAS COLOIDAIIS

As interações entre partículas coloidais governam as propriedades dos coloides e dependem da distância de separação e da

quantidade de partículas coloidais dispersas. Forças externas provenientes do campo gravitacional ou ao cisalhamento também exercem influência na dinâmica de colisão e interação entre as partículas. Tais forças de interação entre as superfícies das partículas coloidais originam-se da natureza eletromagnética das interações entre a matéria (JAFELICCI JR & VARANDA, 1999; SHAW, 1975).

A estabilidade de uma suspensão no que diz respeito aos fenômenos agregação entre as partículas são determinadas pelas forças de atração e repulsão entre as partículas do sistema, o que depende exatamente de suas características físico-químicas e da interface partícula-solvente. A estabilidade de uma suspensão coloidal é atingida quando as forças de repulsão são suficientemente grandes para superar as forças de atração (HOTZA, 1997). Partículas finas, incluindo aquelas dispostas em escala nanométrica, devido à sua grande relação área superficial/volume, eventualmente se agregam ou se aglomeram para formar partículas secundárias com o objetivo de reduzir sua área superficial total e conseqüentemente minimizar a tensão superficial do sistema. Quando as nanopartículas contidas em um sistema coloidal juntam-se, formam aglomerados denominados agregados. Diversos casos em que um material requer que as partículas finas estejam dispersas são por exemplo algumas tintas, pigmentos e soluções contendo nanopartículas de prata (CAO, 2011; GIBBS, 1999).

Nas dispersões coloidais aquosas, as forças de atração estão sempre presentes devido à tendência de as partículas estarem sempre em contato umas com as outras. As principais forças que regem tal fenômeno são: (1) interações repulsivas de duplas camadas de cargas presentes na superfície das partículas, (2) interação atrativa de van der Waals, (3) interação estérica repulsiva de cadeias de polímeros adsorvidos na camada superficial das partículas, (4) interação atrativa de polímeros, (5) interação entre as moléculas do solvente (solvatação), e (6) interação hidrofóbica (JAFELICCI JR & VARANDA, 1999).

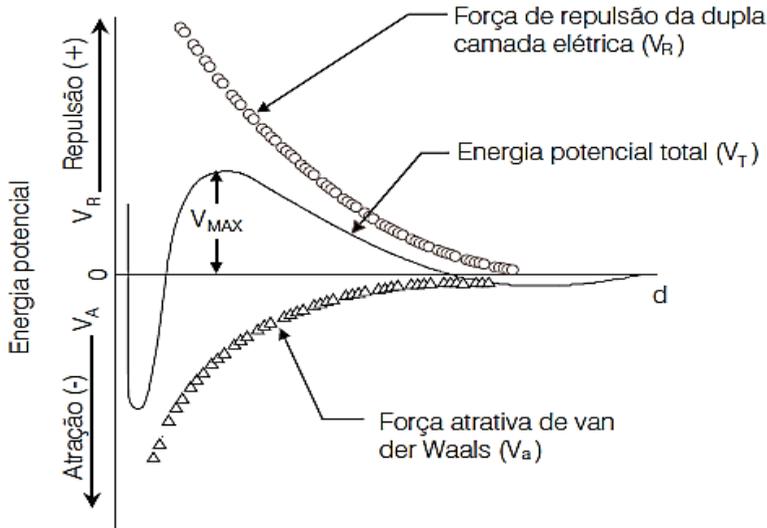
As forças atrativas entre as partículas causadas por forças de van der Waals tendem a diminuir a energia de superfície do sistema. Quando as partículas na ordem de nanômetros, presentes em um sistema coloidal, estão dispersas no solvente, as forças de van der Waals e os movimentos brownianos executam papéis importantes pois a influência da gravidade nesse caso, torna-se desprezível. As forças de van der Waals são significativas apenas em situações de curtíssima distância entre as nanopartículas do sistema, e os movimentos brownianos asseguram que as nanopartículas colidam umas com as outras todo tempo. São

exatamente as forças atrativas de van der Waals e os movimentos brownianos que causam a aglomeração entre as nanopartículas presentes em um sistema coloidal (CAO, 2011; RATYAKSHI & CHAUHAN, 2009; SRIVATSAN, 2012).

As nanopartículas coloidais adquirem cargas elétricas na superfície quando em contato com um solvente polar, por diferentes mecanismos, tais como: dissociação de grupos presentes na superfície das nanopartículas e adsorção ou dissolução de íons na superfície. A carga elétrica superficial apresentada pelas nanopartículas presentes em um sistema coloidal exerce influência na distribuição de íons da solução na vizinhança, atraindo e repelindo contra-íons e co-íons, respectivamente. Essa distribuição de íons desde a região superficial das nanopartículas até o interior da solução (meio de dispersão) resulta em diferentes potenciais elétricos e está representada esquematicamente na Figura 5. O potencial entre a superfície da nanopartícula e o meio de dispersão reduz mais rapidamente à medida que a força iônica aumenta, porque a dupla camada de cargas que se forma ao redor das nanopartículas é comprimida em direção à superfície pela concentração de íons da solução. Consequentemente, as propriedades elétricas das nanopartículas presentes em um sistema coloidal são regidas pelas interações repulsivas coulombianas (JAFELICCI JR & VARANDA, 1999).

Um dos métodos mais utilizados para analisar os aspectos de estabilidade de nanopartículas presentes em sistemas coloidais é a análise de potencial zeta (PZ). O potencial zeta de uma nanopartícula é comumente utilizado para caracterizar as propriedades de carga superficial de nanopartículas. Tal método reflete o potencial elétrico das nanopartículas e é influenciado pela composição das nanopartículas e pelo meio no qual está disperso. As nanopartículas com um potencial zeta acima de (+/-) 30 mV mostram-se estáveis em suspensão, uma vez que a carga superficial impede a agregação das nanopartículas (MOHANRAJ & CHEN, 2006).

Figura 5 - Energia potencial (V) de interação partícula-partícula em função da distância (d) de separação entre duas partículas



Fonte: Jafelicci JR & Varanda (1999)

A energia de repulsão entre as nanopartículas presentes em um sistema coloidal não garante a estabilidade das partículas dispersas. Na prática, as dispersões coloidais podem agregar-se e os agregados sedimentam-se rapidamente, como por exemplo, em uma dispersão de argila em água. As forças de interação atrativas de curto alcance de van der Waals impulsionam a agregação do sistema à medida que as superfícies das nanopartículas aproximam-se uma das outras. Tais forças atrativas de curto alcance são as mesmas provenientes da polarização de átomos e moléculas (dipolos) constituintes dos sólidos dispersos no meio polar que provocam a separação das nanopartículas no meio dispersante (JAFELICCI JR & VARANDA, 1999). Logo, uma suspensão coloidal será termodinamicamente estável quando a energia potencial total de interação entre as nanopartículas (V_T) for negativa. V_T é a soma da energia potencial de atração (V_A), resultante das forças de van der Waals, e da energia potencial de repulsão (V_R), que é devido a dupla camada elétrica ao redor da partícula (SHAW, 1992a). A relação entre V_T , V_A e V_R está ilustrada graficamente na Figura 5.

Tal relação é a base da teoria DLVO, formulada independentemente Derjaguin & Landau e Verwey & Overbeek, no final da década de 40, para explicar a estabilidade cinética coloidal (DERJAGYUIN, B. & LANDAU, 1941; VERWEY, E. J. W. & OVERBEEK, 1947). A teoria DLVO descreve que as curvas de energia potencial, atuam em função da separação entre as partículas, d , e estas são quantificadas para repulsão eletrostática (HOTZA, 1997). A partir dos modelos e da formulação dessa teoria, o estudo dos colóides passou a ser executado com maior rigor científico (JAFELICCI JR & VARANDA, 1999).

Os principais mecanismos de estabilidade englobam os fenômenos de atração e repulsão entre nanopartículas dispersas em um sistema coloidal podem ser genericamente classificados em: (a) estabilização eletrostática, (b) estabilização estérica e (c) estabilização eletroestérica. Tais classificações serão descritas a seguir.

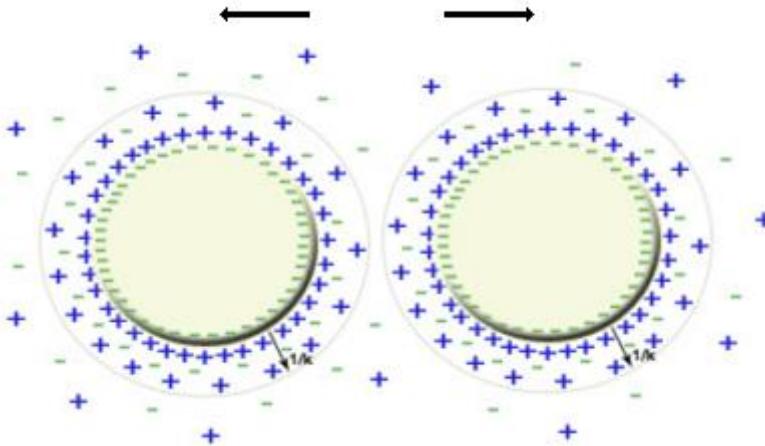
2.4.1 Estabilização eletrostática

A região superficial de nanopartículas sólidas dispersas em um meio líquido pode ser vista como uma região de transição entre uma estrutura cristalina organizada com padrão definido, e uma região desprovida de qualquer ordem. Nessa região, os planos cristalográficos estão interrompidos e os átomos apresentam-se disponíveis para efetuar ligações químicas. Isso resulta em um desbalanceamento das cargas elétricas, tornando a superfície da nanopartícula, por consequência, carregada eletricamente, formando uma nuvem de cargas elétricas que circundam a nanopartícula. Tal nuvem de cargas origina a dupla camada elétrica que consiste de uma camada fixa de íons de carga elétrica contrária à da superfície da nanopartícula (camada de Stern) e de uma camada móvel de íons, conhecida como camada difusa (SHAW, 1992b; OLIVEIRA et al., 2000).

A estabilização eletrostática é uma consequência da presença da dupla camada (camada de Stern) de íons adsorvidos nas nanopartículas carregadas eletricamente, dispersas em um líquido polar (água ou solvente orgânico). A diferença entre o potencial elétrico da camada difusa e a dispersão eletricamente neutra, conhecida como potencial zeta (PZ) pode ser determinada experimentalmente (HUNTER, 1981). Como relatado anteriormente, o potencial zeta é um parâmetro importante na determinação da estabilidade em um sistema coloidal, em suma, se dois sistemas contendo diferentes valores de PZ, forem comparados

permanecendo as demais variáveis intrínsecas a manutenção da estabilidade desse sistema, a expectativa é que o sistema que apresente os valores mais altos de PZ, sejam os mais estáveis em relação à agregação (HUNTER, OTTEWILL, & ROWELL, 1981). A Figura 6 ilustra o mecanismo básico de estabilização eletrostática.

Figura 6 - Mecanismo de estabilização eletrostática



Fonte: Rahaman (2003)

O potencial elétrico permanente na superfície das nanopartículas provoca a atração de grande quantidade de íons de carga contrária (contra-íons) da solução, que, apesar da quantidade adsorvida na superfície das nanopartículas serem limitadas, o mecanismo de adsorção é bastante eficiente. Os contra-íons permanecem rigidamente aderidos à superfície da partícula formando a camada de Stern. Tais contra-íons são capazes de neutralizar a carga elétrica superficial da nanopartícula reduzindo linearmente o potencial elétrico de superfície ou potencial de Stern ao longo da camada difusa. As forças de repulsão necessárias para minimizar a aglomeração entre as partículas, dependem diretamente do potencial elétrico de superfície das partículas (B. P. SINGH, MENCHAVEZ, TAKAI, FUJI, & TAKAHASHI, 2005).

Outro fator importante que também exerce influência sobre a estabilização eletrostática de nanopartículas é o pH do meio dispersante. Para valores de pH em meio aquoso, as cargas das partículas são positivas

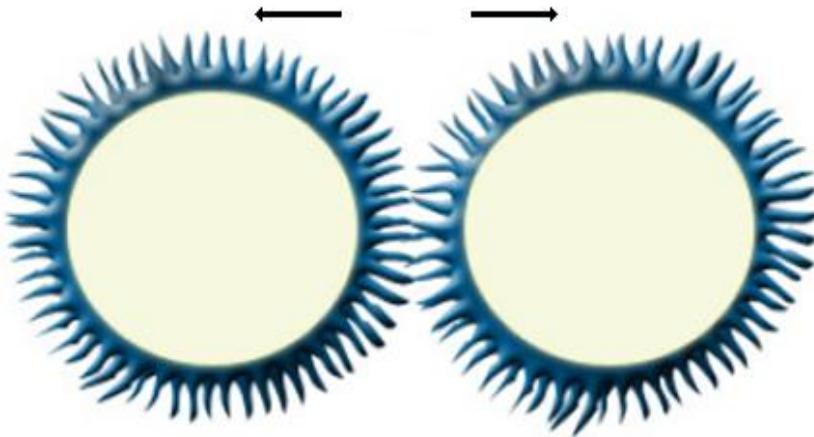
para valores ácidos, e negativas para valores básicos. Assim, o aparecimento de cargas na superfície das partículas resulta em uma diferença de potencial elétrico (RAHAMAN, 2003).

2.4.2 Estabilização estérica

Em determinados sistemas coloidais, não é possível produzir suspensões estáveis apenas pelo ajuste dos valores de pH do sistema, pois a adição de grandes quantidades de uma base ou ácido pode provocar uma dissolução das partículas no sistema, ou no aumento da força iônica do meio, comprimindo assim a dupla camada elétrica, favorecendo a floculação das partículas no sistema. Em situações como essa, torna-se necessário a utilização de dispersantes poliméricos para promover a estabilização da suspensão pelo impedimento físico entre as nanopartículas, caracterizando assim, a estabilização estérica (APPIAGYEI, MESSING, & DUMM, 2008; MONTANARO, JORAND, FANTOZZI, & NEGRO, 1998).

A estabilização estérica é uma consequência da interação física de substâncias poliméricas de cadeia longa, que são adsorvidas pelas nanopartículas dispersas no sistema coloidal. Com a aproximação das partículas, as camadas adsorvidas se interpenetram e as cadeias poliméricas tendem a se ordenar paralelamente. Desta forma, no equilíbrio termodinâmico, as partículas permanecem isoladas. O sucesso da estabilização estérica dependerá das características superficiais da partícula, da configuração do polímero adsorvido e da espessura da camada adsorvida (HOTZA, 1997). Em se tratando da biossíntese de nanopartículas de prata oriundas de microrganismos, as biomoléculas e demais proteínas produzidas pelo próprio microrganismo atuarão no mecanismo de estabilização estérica dessas nanopartículas metálicas dispersas em solução (LEDWITH, WHELAN, & KELLY, 2007). A Figura 7 ilustra o mecanismo básico da estabilização estérica.

Figura 7 - Mecanismo de estabilização estérica.



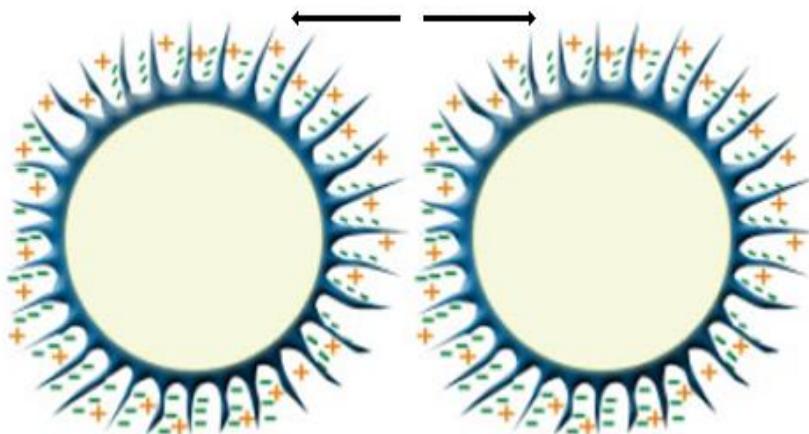
Fonte: Rahaman (2003)

2.4.3 Estabilização eletroestérica

Em alguns casos a repulsão eletrostática é mais eficiente em água do que em líquidos não-aquosos, devido à baixa constante dielétrica destes. A repulsão estérica, por sua vez, é eficiente tanto em meios aquosos quanto em não-aquosos. Partículas dispersas em sistemas coloidais estabilizados estericamente podem ser termodinamicamente estáveis, enquanto que partículas dispersas em sistemas coloidais estabilizados eletrostaticamente são apenas metaestáveis (HOTZA, 1997).

Diante de tais fatores, uma combinação dos mecanismos de estabilização eletrostático e estérico podem ocasionar em um melhor resultado quanto a estabilização do sistema. Tal combinação é conhecida como estabilização eletroestérica, nesse mecanismo são utilizadas moléculas poliméricas ionizáveis como os polieletrólitos (poliacrilatos e polimetacrilatos), os quais se solubilizam em meio aquoso. Os íons resultantes da dissociação somam o efeito estérico e a barreira eletrostática originária das cargas elétricas que circundam a porção superficial das partículas dispersas (RAHAMAN, 2003). A Figura 8 ilustra o mecanismo básico da estabilização estérica.

Figura 8 - Mecanismo de estabilização eletroestérica.



Fonte: Rahaman (2003)

2.5 BIOSÍNTESE MICROBIANA DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA

Nanopartículas são de grande interesse científico devido ao fato de que tais estruturas atuam como uma “ponte” entre os materiais de consumo e utilização por seres humanos e estruturas atômicas ou moleculares. Um material macroscópico possui propriedades físicas constantes, independentemente do seu tamanho, em nanoescala isso muitas vezes não é o caso. Verificou-se que vários materiais quando bem caracterizados possuem suas propriedades mais interessantes quando estudados em nanoescala. No caso das nanopartículas de prata (AgNPs), seu pequeno tamanho lhe permite interagir facilmente com outras partículas ou moléculas resultando no aumento de sua eficiência antibacteriana por exemplo (THAKKAR, MHATRE, & PARIKH, 2010).

Diferentemente dos materiais de maior escala de tamanho, as nanopartículas metálicas possuem como características intrínsecas à sua aplicação, propriedades físicas, químicas, eletrônicas, elétricas, mecânicas, magnéticas, térmicas, dietéticas, ópticas e biológicas (DANIEL & ASTRUC, 2004; SCHMID, 1992). Diminuir a dimensão dessas partículas tem efeito direto sobre as propriedades físicas que diferem significativamente de um material em maior escala de tamanho. Essas propriedades físicas são causadas pela grande quantidade de átomos

dispostas na superfície da nanopartícula, grande energia superficial, confinamento espacial e imperfeições reduzidas (NARAYANAN & SAKTHIVEL, 2010).

A utilização de material biológico como agente redutor para a produção de nanopartículas metálicas é atualmente objeto de várias investigações. Um número crescente de estudos tem demonstrado a utilidade de organismos e biomoléculas para síntese de metais nanoestruturados. Contudo, para um processo biológico competir com êxito frente à síntese química e física de nanoestruturas, é necessário um controle rigoroso sobre o tamanho médio de partícula numa gama de tamanhos específicos e uma morfologia de partícula uniforme (QUESTER, AVALOS-BORJA, & CASTRO-LONGORIA, 2013).

Dentre os nanometais de aplicação e utilização em produtos de consumo pelos seres humanos, as nanopartículas de prata (AgNPs) possuem destaque. A prata é utilizada por suas propriedades antimicrobianas em inúmeras aplicações, tais como produtos de higiene pessoal, dispositivos médicos, curativos para feridas, máquinas de lavar e teclados de computador (EDWARDS-JONES, 2009; SILVER, PHUNG, & SILVER, 2006). A sua popularidade é devido à sua atividade para uma vasta gama de agentes microbianos e pela sua toxicidade relativamente baixa para os seres humanos (EDWARDS-JONES, 2009; SINTUBIN et al., 2012). O uso de nanopartículas de prata como um agente antimicrobiano remonta desde tempos antigos, quando a água e o vinho, por exemplo, eram armazenados em vasos de prata para evitar sua contaminação e deterioração (SILVER et al., 2006; WANG et al., 2005). No século XVII, o íon prata (aplicado como sal de nitrato) era utilizado, por exemplo, para curar úlceras e feridas crônicas, uma terapia que provavelmente se originou na idade média (KLASSEN, 2000).

A biossíntese de AgNPs é tratada como um destaque emergente da interseção da nanotecnologia e da biotecnologia e tem recebido grande atenção devido à crescente necessidade de desenvolver tecnologias ambientalmente sustentáveis na síntese de materiais (KALISHWARALAL et al. 2008). O papel das células microbianas na biossíntese de nanometais ainda não foi completamente elucidado. Contudo, já é estabelecido que os microrganismos representam um componente importante da dinâmica dos nanometais (MALISZEWSKA, 2011). O primeiro relato sobre a biossíntese de AgNPs por microrganismos ocorreu em 1984 pelo uso da bactéria *Pseudomonas stutzeri* AG259, uma cepa que foi originalmente isolada de uma mina de prata (HAEFELI, FRANKLIN, & HARDY, 1984). As análises em

microscopia eletrônica de transmissão mostraram a deposição de nanopartículas de prata pela cepa bacteriana. Tal relato abriu novas vias para a biossíntese de metais nanoestruturados que incorporam partículas cristalinas à base de prata com propriedades estruturais, composição e morfologia definida. Os métodos biológicos estão ganhando ímpeto por causa do uso de condições normais para a síntese que permitem o controle sobre o tamanho e estabilidade das nanopartículas (MALISZEWSKA, 2011).

Quando se trata de produção biogênica de nanop prata, muitos microrganismos incluindo bactérias, fungos e leveduras são capazes de sintetizar estas nano partículas a partir do seu próprio metabolismo, seja essa biossíntese intracelular ou extracelular (MOHANPURIA, RANA, & YADAV, 2008). Nos casos em que a síntese é essencialmente química, três componentes principais são requeridos, são eles um sal de prata (geralmente AgNO_3); um agente redutor responsável pela transformação química do íon prata (geralmente boro-hidreto de sódio) e um agente estabilizador para controlar o crescimento das nanopartículas e prevenir sua agregação (geralmente polivinilpirrolidona) (SI, SHI, LI, & MA, 2011). Entretanto, quando a síntese da nanop prata é oriunda de microrganismos, o agente redutor e o estabilizador são substituídos por moléculas produzidas pelo próprio microrganismo (LEDWITH et al., 2007).

Segundo Gade et al. (2010), se o agente redutor e estabilizador são produzidos pelos microrganismos, a redução pode ser enzimática ou não enzimática, e o agente estabilizador em muitos casos é uma proteína, como mostrado por Durán et al., (2011). Nesse caso, é possível a biossíntese de nanopartículas de prata utilizando peptídeos que podem ligar-se à superfície das partículas de nanop prata, acelerando sua redução e o crescimento dos cristais de prata. Dependendo do sistema biológico ou tipo de biomassa utilizada, uma variedade de nanopartículas de diferentes tamanhos podem ser produzidas (SINTUBIN et al., 2012). A Tabela 5 apresenta uma visão global de alguns microrganismos produtores de nanopartículas de prata.

Tabela 5 - Visão global de microrganismos produtores de nanopartículas de prata.

Microrganismo	Local da biossíntese	Tamanho médio das nanopartículas (nm)	Formato das nanopartículas	Referência
Cianobactéria				
<i>Spirulina platensis</i>	Extracelular	5-30	---	Mahdieh et al., (2012)
Leveduras				
<i>Extrato de mky3</i>	Extracelular	2-5	Hexagonal	Kowshik et al., (2002)
Bactérias				
<i>Bacillus</i> sp.	Extracelular e intracelular	42-92	Esférica	(Das et al., 2013)
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Extracelular	15	Cubica e hexagonal	Jain et al., (2010)
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Extracelular	43-143	Cubica	Najitha Banu; Balasubramanian; moorthi, (2014)
<i>Acinetobacter</i> sp.	--	15-50	Cubica e hexagonal	Zaki; el kady; abd-el-haleem, (2011)
<i>Bacillus megaterium</i>				
<i>Escherichia coli</i>				
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>				
<i>Arthrobacter gangotriensis</i>	Extracelular	6-13	---	Shivaji; Madhu; Singh, (2011)
<i>Arthrobacter kerguelensis</i>	Extracelular			
<i>Pseudomonas antarctica</i>	Extracelular			
<i>Pseudomonas meridian</i>	Extracelular			
	Extracelular			

(<i>Continua</i>)				
<i>Pseudomonas proteolytica</i>				
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Extracelular	5-24	Esférico e triangular	Wei et al., (2012)
<i>Brevibacterium casei</i>	Intracelular	10-50	Esférico	(Kalishwaralal et al., 2010)
<i>Escherichia coli</i>	Extracelular	50	Esférico	(Gurunathan et al., 2009)
Bactérias				
<i>Rhodococcus</i> sp.	--	10	Esférico	Otari et al., (2012)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Extracelular	5-32	---	Shahverdi et al., (2007)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Extracelular	160-180	---	Nanda; Saravanan, (2009)
<i>Morganella</i> sp.	Extracelular	15-25	Esférico	Parikh et al., (2008)
<i>Streptomyces</i> sp.	Extracelular	10-100	Esférico	Faghri Zonooz; Salouti, (2011)
Fungos				
<i>Alternaria alternata</i>	Extracelular	20-60	Esférica	(Gajbhiye et al., 2009)
<i>Aspergillus flavus</i>	Intracelular	8-10	---	Vigneshwaran et al., (2007)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Extracelular	5-25	Esférica e triangular	Bhainsa; d'Souza, (2006)
<i>Aspergillus niger</i>	Extracelular	1-20	Esférica	Sagar; Shok, (2012)
	Extracelular	3-30	Esférica	(Jaidev; Narasimha, 2010)
<i>Cryphonectria</i> sp.	Extracelular	30-70	---	(DAR; Ingle; Rai, 2013)
<i>Fusarium oxysporum</i>	Extracelular	20-50	Esférica	Durán et al., (2005)
	Extracelular	5-13	Esférica	(Husseiny; Salah; Anter, 2015)
<i>Fusarium semitectum</i>	Extracelular	10-60	Esférica	Basavaraja et al., (2008)
<i>Epicoccum nigrum</i>	Extracelular	1-25	Cúbica	Qian et al., (2013)
<i>Fusarium solani</i>	Extracelular	8-15	---	EL-Rafie et al., (2012)
<i>Humicola</i> sp.	Extracelular	5-25	Esférica	Syed et al., (2013)
<i>Neurospora crassa</i>	Extracelular	11	Esférica e elipsoidal	Castro-Longoria et al., (2011)
<i>Penicillium citrinum</i>	Extracelular	90-120	Esférica	Honary et al., (2013)

<i>(Continua)</i> <i>Pencillium</i> sp.	Extracelular	25	Esférica	Singh et al., (2013)
	Extracelular	52-104	Esférica	Kumar & kkarthik, (2010)
Fungos				
<i>Trichoderma viride</i>	Extracelular	5-40	Esférica	Fayaz et al., (2010)
<i>Trichoderma reesei</i>	Extracelular	5-50	Esférica	Vahabi; Mansoori; Karimi, (2011)
Algas unicelulares				
<i>Chlorella vulgaris</i>	Extracelular	16-24	Circular e triangular	Xie et al., (2007)
<i>Scenedesmus</i> sp.	Intracelular e extracelular	15-20	Esférica	Jena et al., (2014)
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	Extracelular	53-80	---	Merin; Prakash; Bhimba, (2010)
<i>Isochrysis galbana</i>				
<i>Tetraselmis gracilis</i>				
<i>Chlorella vulgaris</i>	Extracelular	15	---	Mohseniazar et al., (2011)

Fonte: Do autor

Nota: --- Informação não encontrada

2.5.1 Mecanismo de biossíntese de nanopartículas de prata por microrganismos

O mecanismo exato de redução das nanopartículas de prata (Ag^+ para Ag^0) ainda é pouco conhecido (DURÁN et al., 2011). Isto ocorre pelo fato de que diferentes agentes biológicos reagem de forma diferente com os íons metálicos que conduzem à formação das nanopartículas de prata. Muitos microrganismos produzem componentes inorgânicos intra ou extracelulares, porém o mecanismo de síntese intra e extracelular de nanopartículas depende do tipo de microrganismo utilizado para a biossíntese (HULKOTI & TARANATH, 2014).

Grande parte dos metais é tóxica para a maioria dos microrganismos. Porém, a prata, por exemplo, não causa nenhum efeito adverso em algumas bactérias. Nesse caso, essas bactérias são resistentes às nanopartículas de prata, e isso está associado ao acúmulo dessas nanopartículas no espaço intracelular, como é o caso da *Morganella* sp. (PARIKH et al., 2008).

O mecanismo intracelular de biossíntese de nanopartículas de prata envolve o transporte de íons no interior da célula microbiana. Na biossíntese intracelular de nanopartículas de prata, a parede celular da célula microbiana desempenha um papel fundamental. De forma sintética, o mecanismo envolve a interação eletrostática da carga positiva dos íons de prata com a carga negativa da superfície interna da parede celular. As enzimas presentes na parede celular serão as biomoléculas responsáveis pela redução dos íons de prata, e estas irão se difundir para o meio extracelular, porém mantendo-se aderidas à membrana esquelética da célula microbiana (HULKOTI & TARANATH, 2014). Esse mecanismo permanece íntegro e corrobora a proposta definida por Mukherjee et al. (2001) os quais, em um estudo da biossíntese e imobilização de nanopartículas de prata, verificaram que a maioria das nanopartículas fica claramente aderida à superfície da membrana citoplasmática de diversos fungos do gênero *Verticillium*.

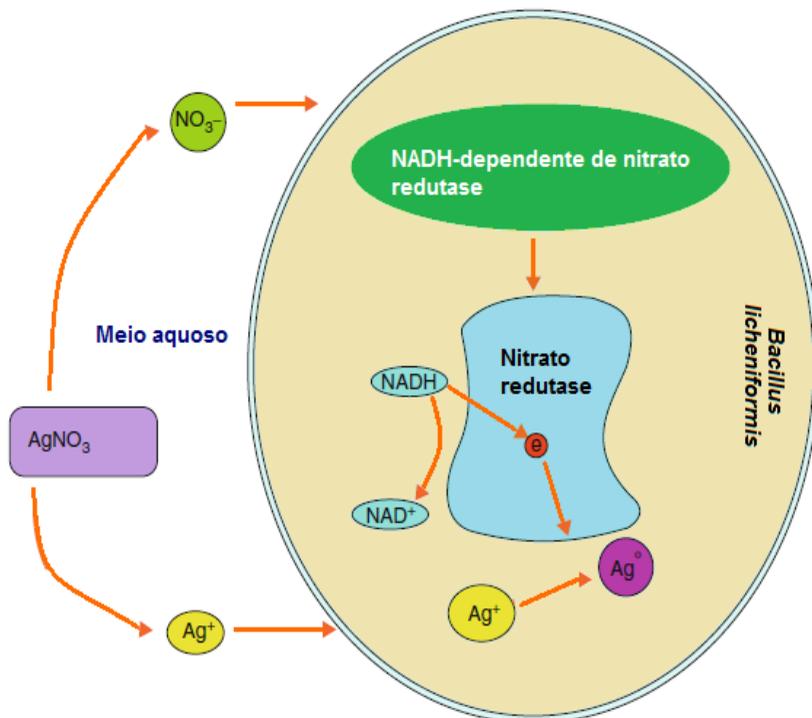
Segundo Zhang et al. (2011), os íons de prata que são capturados na superfície da célula através da interação eletrostática entre as nanopartículas e a face interna da parede celular, são primeiramente reduzidos, formando núcleos de prata na superfície da membrana esquelética da célula microbiana. Posteriormente, devido à ação de enzimas ainda desconhecidas, esses núcleos de prata, após o seu acúmulo, formam micélios. Em actinomicetos, por exemplo, a redução de íons metálicos de prata ocorre sobre a superfície do micélio sobre a membrana

citoplasmática, resultando assim na formação das nanopartículas (AHMAD et al., 2003).

Sabe-se atualmente que os extratos orgânicos produzidos pelos microrganismos podem atuar tanto como agentes redutores quanto agentes de estabilização na síntese de AgNPs. A redução de íons Ag^+ por combinações de biomoléculas encontradas nestes extratos tais como enzimas/proteínas, aminoácidos, polissacáridos e vitaminas é ambientalmente favorável para a biossíntese. Contudo, tais biomoléculas são quimicamente complexas. Mas o mecanismo que é amplamente aceito para a síntese de nanopartículas de prata é a presença da enzima nitrato redutase (KUMAR et al., 2007). A nitrato redutase é uma enzima do ciclo do nitrogênio responsável pela conversão do nitrato em nitrito e, de acordo com Durán et al. (2011), a redução mediada pela presença da enzima nitrato redutase em *Fusarium oxysporum* é a responsável pela biossíntese de AgNPs.

Durante a catálise, o nitrato é convertido em nitrito, e um elétron resultante será transportado diretamente para os íons de prata resultantes da dissociação do nitrato de prata (AgNO_3) presente no meio onde se encontra a célula microbiana. Essa teoria foi descrita por Kalimuthu et al. (2008), através da utilização de *Bacillus licheniformis* na biossíntese de AgNPs. Sabe-se que o *B. licheniformis* secreta o cofator NADH (Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina – forma reduzida) e enzimas dependentes de NADH, especialmente a nitrato redutase, que são as principais biomoléculas responsáveis pela biorredução de Ag^+ para Ag^0 e a subsequente formação de nanopartículas de prata. A Figura 9 mostra o mecanismo básico em que a enzima nitrato redutase presente nas bactérias atuam na síntese de nanopartículas de prata.

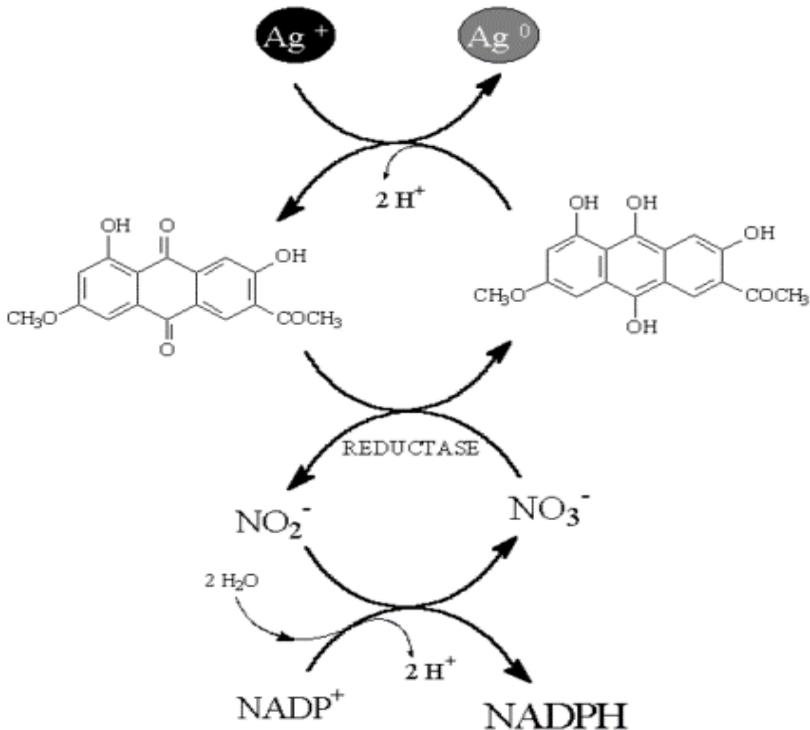
Figura 9 - Ilustração do mecanismo hipotético de biorredução dos íons de prata pela enzima nitrato redutase em uma célula de *B. licheniformis*



Fonte: Adaptado de Kalimuthu et al. (2008)

O mecanismo de biossíntese extracelular mediado pela nitrato redutase também é corroborado por Durán et al. (2005) que promoveu a biossíntese de nanopartículas de prata com dimensões entre 20-50 nm por intermédio do fungo *Fusarium oxysporum*. Nesse caso, a biossíntese das nanopartículas de prata foi consequência da atuação não somente da enzima nitrato redutase na redução de íons de prata, mas também de um processo de transporte extracelular de moléculas de quinona que atuam como transportadores de elétrons. Assim, pôde-se concluir que a enzima redutase dependente de NADP^+/H está associada à redução de Ag^+ para Ag^0 , para o caso de biossíntese extracelular de nanopartículas por fungos. A reação química envolvendo redução de íons Ag^+ para Ag^0 está ilustrada na Figura 10.

Figura 10 - Reação bioquímica envolvendo o mecanismo hipotético da biorredução de íons Ag^+ para Ag^0 na biossíntese de nanopartículas de prata



Fonte: Durán et al. (2005)

2.5.2 Biossíntese de nanopartículas de prata por fungos

Segundo Maliszewska (2011), no decorrer dos últimos 20 anos, um número considerável de diferentes gêneros de fungos foi estudado com o propósito de revelar se tais microrganismos são passíveis de biossintetizar nanopartículas metálicas. De acordo com Hulkoti & Taranath (2014), a biossíntese de nanopartículas metálicas por fungos é satisfatória devido ao fato destes metais apresentarem-se monodispersos com diferentes composições químicas, tamanhos variados e dimensões bem definidas.

Como relatado por Narayanan & Sakthivel (2010), as nanopartículas de prata, quando biossintetizadas intracelularmente por

fungos são menores quando comparadas com as nanopartículas de pratas produzidas extracelularmente. E essa limitação no tamanho pode estar relacionada com o mecanismo de nucleação das nanopartículas. Tal asserção foi validada por Vigneshwaran et al. (2007), que demonstraram que o *Aspergillus flavus* desenvolveu e acumulou nanopartículas de prata sobre a superfície da parede celular em 72 h quando confrontado com nitrato de prata. As nanopartículas geradas apresentaram dimensões entre 8 e 10 nm.

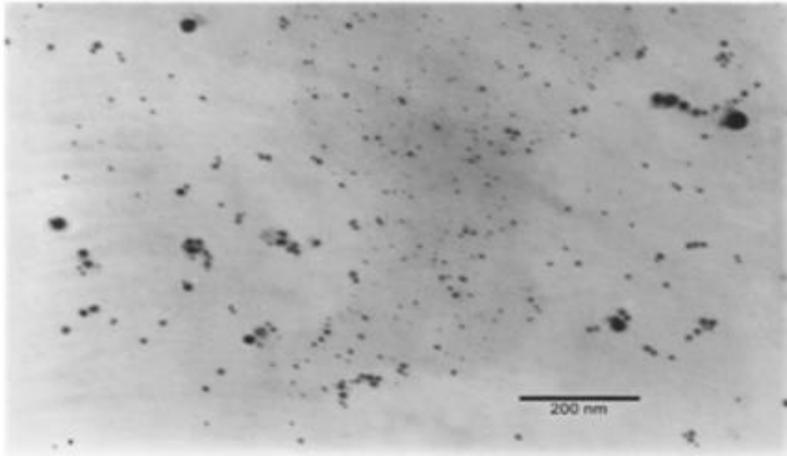
Quando comparada com sistemas bacterianos, a produção de nanopartículas por fungos ocorre em maiores quantidades devido à sua maior complexidade estrutural celular. Nesse caso, os fungos secretam maiores quantidades de proteínas, aumentando assim o rendimento da biossíntese (MOHANPURIA et al., 2008). A síntese extracelular de nanopartículas de prata pelos fungos é conhecida devido a suas muitas aplicações, uma vez que é desnecessário o desenvolvimento de técnicas para extração e separação dos componentes celulares (NARAYANAN & SAKTHIVEL, 2010).

De acordo com Hulkoti & Taranath (2014), uma das razões para o melhor rendimento na produção de nanoprata por fungos em comparação com bactérias é a presença de enzimas específicas nos fungos que ajudam a redução dos íons de prata. Kumar et al. (2007) mostraram que íons de prata foram reduzidos na presença de nitrato redutase produzida por *Fusarium oxysporum*, formando nanopartículas com tamanho variando entre 10 e 25 nm. A síntese da nanoprata ocorreu in vitro com uso de nitrato redutase dependente de α -NADPH e uma proteína fitoquelatina como agente estabilizador da nanoprata. A caracterização ocorreu por difração em raios-X (DRX), microscopia eletrônica de transmissão (MET), espectroscopia na região ultravioleta visível (UV-Vis) e espectroscopia de fotoelétrons em raios-X (XPS).

Outra espécie fúngica do gênero *Aspergillus* que apresenta um grande potencial na biossíntese de nanopartículas de prata é o *Aspergillus niger*, e alguns trabalhos recentes comprovam essa constatação. Jaidev & Narasimha (2010), utilizaram uma técnica de diluição em série para isolar o *Aspergillus niger* do solo ao redor de uma fábrica de tecelagem de fios de prata. Para a síntese extracelular da nanoprata, os autores cultivaram o *A. niger* em um meio multiforme com NaNO_3 ; KH_2PO_4 ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; KCl ; sacarose e estreptomina. As análises em UV-Vis, MET, EDX (energia dispersiva de raios-X) e FTIR (Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier) revelaram nanopartículas de prata dispersas com tamanhos variando entre 3 e 30 nm, como mostra a Figura 11. Sagar

& Ashok (2012), também utilizaram *A. niger* para biossíntese de nanop prata a partir da redução de íons Ag^+ em meio PDA. De acordo com os autores, pôde-se constatar que a configuração do meio de cultura influencia no tamanho da nanop prata em *A. niger*.

Figura 11 - Micrografia em microscópio eletrônico de transmissão de nanopartículas de prata biossintetizadas por *Aspergillus niger* com tamanho de partícula variando entre 3 e 30 nm



Fonte: Jaidev & Narasimha (2010)

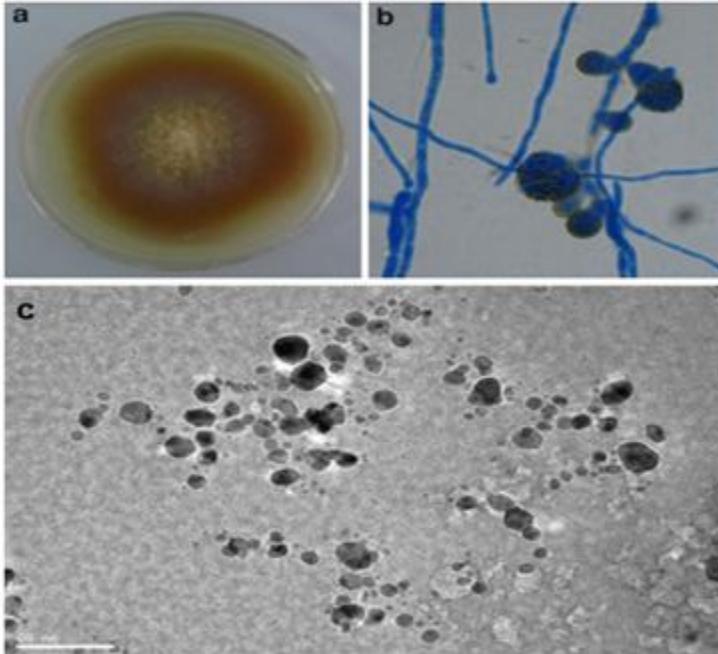
Na execução de um bioprocesso envolvendo a síntese de nanopartículas de prata por fungos, El-Rafie et al. (2012) relataram que fatores que afetam a biossíntese como concentração da biomassa, pH no meio de reação e concentração de AgNO_3 devem ser cuidadosamente verificados e analisados. Os autores selecionaram o fungo *Fusarium solani* para a biossíntese da nanop prata, e demonstraram que as condições ótimas para a biossíntese das nanop prata ocorreu em pH 12, com temperatura em 25 °C, com concentrações de biomassa e AgNO_3 de 10 g/100 mL e 0,078 g/100 mL, respectivamente. As análises de caracterização resultaram em nanopartículas de prata com tamanho entre 8 e 15 nm. Esse mesmo trabalho revelou que a nanop prata sintetizada por *Fusarium solani* possuía atividade antimicrobiana e pôde ser aplicada em fábricas de algodão.

Dar et al. (2013) desenvolveram um método de síntese de nanop prata rápido e “ecoamigável” utilizando fungos do gênero

Cryphonectria sp. isolados da casca do tronco do castanheiro. As análises de caracterização revelaram nanopartículas de prata com tamanho variando entre 30 e 70 nm. Ademais as nanopartículas de prata biossintetizadas pelos fungos *Cryphonectria* sp. também apresentaram propriedades bactericidas e antifúngicas.

Estudos voltados à biossíntese de nanometais por fungos endofíticos têm sido desenvolvidos recentemente, e tais fungos apresentam propriedades efetivas na síntese de nanopartículas de prata. Qian et al. (2013) verificaram extratos de 16 espécies de fungos endofíticos da planta *Phellodendron amurense*, e selecionaram o fungo *Epicoccum nigrum* para a biossíntese de nanopartículas de prata. As análises de caracterização por MET revelaram nanopartículas de prata com tamanhos entre 1 e 20 nm, como mostrado na Figura 12. Outro trabalho ainda mais recente foi realizado por Devi & Joshi (2015); os autores sintetizaram nanopartículas de prata com formatos esféricos por três fungos endofíticos isolados da planta medicinal *Potentilla fulgens* L.: *Aspergillus tamaris* PFL2, *Aspergillus niger* PFR6 e *Penicillium ochrochloron* PFR8.

Figura 12 - Biossíntese de nanopartículas de prata mediada pelo fungo endofítico *Epicoccum nigrum*. Visualização da colônia após 9 dias de crescimento (a); conídios (estruturas reprodutivas) provenientes dos conidióforos (b); micrografia em MET das AgNPs sintetizadas



Fonte: Qian et al. (2013)

Outros registros na literatura revelam que fungos do gênero *Penicillium* sp. têm sido utilizados na biossíntese de nanopartículas de prata. Shaligram et al. (2009) promoveram a biossíntese de nanopartículas de prata com tamanhos entre 23 e 105 nm em um processo utilizando o fungo *Penicillium brevicompactum* WA 2315. Nesse trabalho, os autores constataram que o mecanismo de biossíntese da nanopartícula de prata estava relacionado à presença da enzima nitrato redutase dependente de NADH. Nesse caso, a redução dos íons de prata ocorre por meio dos elétrons de NADH, sendo que o NADH ao qual a enzima nitrato redutase é dependente, pode atuar como um transportador de elétrons. Em outro estudo, Maliszewska, Szewczyk, & Waszak (2009), também promoveram a biossíntese de nanopartículas de prata com dimensões entre 10 e 100 nm de extratos livres de células de *Penicillium* sp. isolados do solo.

Por fim, outros trabalhos que demonstram o mecanismo de biorredução dos íons de prata na biossíntese de dessas nanopartículas são relatados por Fayaz et al. (2010) e Vahabi et al. (2011), que empregaram respectivamente os fungos *Trichoderma viride* e *Trichoderma reesei* na síntese biogênica de nanopartículas de prata. No trabalho envolvendo *Trichoderma viride*, as nanopartículas produzidas apresentaram tamanho variando entre 5 e 40 nm; já a pesquisa envolvendo *Trichoderma Reesei* resultou em nanopartículas sintetizadas com tamanho entre 5 e 50 nm.

2.5.2.1 O fungo *Fusarium oxysporum*

Com base na estrutura das hifas que suportam os conídios (ou conidiósporos) – esporos formados por mitose responsáveis pela reprodução assexuada de alguns grupos de fungos – os fungos do gênero *Fusarium* são classificados na subclasse taxonômica dos Hyphomycetes, do filo Deuteromycota, da ordem dos Moniliales, família Tuberculariaceae. O *Fusarium oxysporum*, assim descrito por Snyder & Hansen (1940), compreende todas as espécies, variedades e formas de indivíduos do reino dos fungos inclusas no grupo intragênico conhecida como “*elegans*”. Booth, (1971), descreve o *Fusarium oxysporum* como um fungo filamentosos cosmopolita do solo. Trata-se de uma espécie anamórfica dos quais estão inclusas inúmeras estirpes patogênicas de plantas agrícolas e ornamentais.

Caracterizada como uma espécie cosmopolita, o *Fusarium oxysporum* possui ampla distribuição geográfica, ocorrendo em praticamente todos os ambientes do planeta, com algumas restrições em determinados sítios com pouca ocorrência. O *Fusarium oxysporum* pode ser encontrado predominantemente nas regiões tropicais e subtropicais, essa espécie também pode ser encontrada em ambientes de clima frio nas regiões temperadas, podendo ser encontradas também espécies com íntima associação com seus hospedeiros (ALEXOPOULOS, MIMS, & BLACKWELL, 1996).

Como citado anteriormente, o *F. oxysporum* é fungo habitante do solo e sobrevive saprofiticamente utilizando como substrato para o seu desenvolvimento restos de matéria orgânica, podendo assim, sobreviver sob a forma de clamidósporo, apresentando também além de plantas alguns hospedeiros alternativos, tais como *Dolichos lablab*, *Mucuna aterrima* e *Crotalaria spectabilis* (DIAS, BERBARA, & FERNANDES, 2013; KIMATI, 1978). Sua ação patogênica é favorecida quando o seu desenvolvimento ocorre em ambientes com temperaturas amenas girando

em torno de 20 °C. Já a sua temperatura ótima para o desenvolvimento dessa espécie *in vitro* se dá em torno de 28 °C (KIMATI, 1978). Em seu ambiente natural, a disseminação do *F. oxysporum* de um local para outro ocorre principalmente pela dispersão de sementes infestadas pelos esporos aderidas na superfície (PEREIRA, RAMALHO, & ABREU, 2007). A disseminação do *F. oxysporum* por meio das sementes ocorre principalmente por intermédio do vento e pela água de irrigação que transportam partículas do solo contendo as sementes infectadas (KIMATI, 1978).

O *Fusarium oxysporum* também é responsável por inúmeras micoses e toxicoses em animais e seres humanos, a moniliformina, por exemplo, é uma toxina hidrossolúvel que é produzidas por diversas espécies de *Fusarium*, inclusive o *Fusarium oxysporum* (NELSON, DIGNANI, & ANAISSIE, 1994; RABIE et al., 1982). Em um estudo realizado por Zhang & Li (1990), verificou-se que uma provável relação entre a ingestão de toxinas sintetizadas por *Fusarium* e a ocorrência de uma doença crônica no coração conhecida como “doença de Keshan”, bastante comum em algumas regiões do continente asiático. O grande interesse científico neste gênero é devido sua função como fungo fitopatogênico de muitas culturas agrícolas de interesse econômico (NELSON et al., 1994).

O *Fusarium oxysporum* possui o micélio incolor no início de sua fase de desenvolvimento, porém com o passar da idade, esse vai se tornando colorido, amarelo pálido, cor-de-rosa pálido ou com coloração púrpura (AGRIOS, 2005). O *Fusarium oxysporum* produz três tipos de esporos assexuais: os microconídios, macroconídios e os clamidósporos. Os conídios são originários de células especializadas denominadas células conidiogênicas, as quais localizam-se nas extremidades das hifas e são espalhadas vagamente sobre a superfície de um micélio (TORTORA, FUNKE, & CASE, 2012). Os microconídios são predominantemente não-nucleados e germinam de forma bastante irregular e variável, com eficiência de germinação variando de 1 a 20%. Os macroconídios são produzidos abundantemente, estes são multinucleados e germinam rapidamente, reproduzindo assim o fungo de forma eficiente. Os clamidósporos são esporos produzidos assexuadamente, resultantes da modificação estrutural de um ou mais segmentos das hifas vegetativas ou células conidiais possuindo uma parede celular espessa, consistindo principalmente do polissacarídeo quitina e glucanos, onde sua função é principalmente a sobrevivência no solo (AGRIOS, 2005; TORTORA et al., 2012). A caracterização

morfológica do *F. oxysporum* baseia-se na forma dos macroconídios, na estrutura dos microconidióforos e na formação e disposição dos clamidósporos (BECKMAN, 1987). A reprodução assexuada em *F. oxysporum* é realizada pelos macroconídios e microconídios, enquanto que um registro da reprodução sexual do fungo nunca foi observado (AGRIOS, 2005).

Apesar do fato de que o *Fusarium oxysporum* ser o agente vetor de diversas doenças, não somente em espécies vegetais, mas também em animais, recentemente o interesse científico pela espécie tem concentrado seus estudos em sua capacidade e potencialidade de atuar na síntese de nanopartículas metálicas, como as nanopartículas de prata, além de outros metais, como o zinco, também é relatado por Mirzadeh, Darezereshki, Bakhtiari, Fazaelpoor, & Hosseini, (2013). Outros trabalhos envolvendo a biossíntese de nanopartículas via utilização de *Fusarium oxysporum* incluem o desenvolvido por Syed & Ahmad (2013), que promoveram a biossíntese e caracterização de nanocristais de telureto de cádmio (CdTe), por fim pode-se citar também o trabalho desenvolvido por Hosseini, Schaffie, Pazouki, Darezereshki, & Ranjbar (2012), na biossíntese e caracterização de nanopartículas esféricas de sulfureto de cobre.

Em estudos realizados por Gholami-Shabani et al. (2014) e Durán et al. (2005) foi possível constatar a importância da enzima nitrato redutase no mecanismo de biorredução de íons de prata. A enzima foi extraída de *Fusarium oxysporum* e posteriormente purificada para utilização da síntese das AgNPs. Em ambos os trabalhos, a caracterização em MET constatou a presença de AgNPs com tamanho médio abaixo de 50 nm, o que as torna passíveis para utilização como agente antimicrobiano.

Um aspecto importante é o rígido controle dos parâmetros de regem o princípio da biossíntese das nanopartículas. Hussein et al. (2015) e Birla et al. (2013), promoveram a biossíntese de nanopartículas de prata via *Fusarium oxysporum* objetivando o controle do tamanho das AgNPs variando os diferentes parâmetros de biossíntese: temperatura, pH do meio de cultivo, concentração de AgNO₃, quantidade de biomassa fúngica, e luminosidade. Em ambos os trabalhos, a otimização do processo de biossíntese a partir da comparação dos diferentes parâmetros de produção resultou em nanopartículas de prata com tamanho médio entre 5 e 20 nm.

2.6 NANOPARTÍCULAS DE PRATA COMO AGENTES ANTIMICROBIANOS

Com o aparecimento de diversos organismos microbianos resistentes a múltiplos antibióticos e a ênfase contínua nos custos dos cuidados de saúde, muitos pesquisadores procuram desenvolver novos e eficazes agentes antimicrobianos de baixo custo. Tais problemas e necessidades levaram ao ressurgimento do uso de antissépticos à base de Ag que podem estar ligados à atividade de amplo espectro e propensão muito mais baixa para induzir resistência microbiana do que as drogas antimicrobianas (KIM et al., 2007). Assim sendo, nos últimos anos têm havido um interesse crescente na preparação e estudo de nanopartículas de prata porque essas nanopartículas têm demonstrado exibir interessantes atividades antimicrobianas (GUZMAN, DILLE, & GODET, 2012).

As nanopartículas de prata são menores do que 100 nm de tamanho, e comparáveis às moléculas biológicas, tais como enzimas, proteínas receptoras e o DNA, os quais possuem um tamanho cerca de 100-10.000 vezes menor do que as células, por exemplo. As nanopartículas de metais nobres como a prata (AgNPs) com sua superfície funcionalizada são poderosas e promissoras ferramentas para as aplicações de administração de fármacos. As propriedades únicas tais como grande razão superfície/volume, absorção no intervalo visível, funcionalidade de superfície e liberação controlada de fármaco tornam as nanopartículas muito úteis na vida humana (MITTAL et al., 2014).

Como já relatado, mesmo sabendo que as propriedades antimicrobianas apresentadas pelas nanopartículas proporcionam sua aplicação em uma grande variedade de aplicações para controlar o crescimento microbiano, a atividade antimicrobiana, no entanto, depende do tamanho das nanopartículas (ZHANG et al., 2003). Quanto menor as nanopartículas, maior a área de superfície específica e, portanto, também a sua atividade (GUZMAN et al., 2012; SINTUBIN et al., 2012; ZHANG et al., 2003). Pal, Tak, & Song (2015) constataram que o tamanho das nanopartículas metálicas garante que uma área de superfície significativamente grande das nanopartículas esteja em contato com o efluente bacteriano ao qual as nanopartículas estão atuando com ação antimicrobiana. Neste estudo, verificou-se que o potencial antimicrobiano de nanopartículas de prata contra a bactéria gram-negativa *Escherichia coli* depende do seu formato. Além disso, o tipo de molécula que atua como agente estabilizante nas nanopartículas de prata pode também

influenciar a atividade, alterando sua interação com os microrganismos alvo (CHO et al., 2005). Como cada tipo de prata biogênica é único devido ao seu tamanho, formato e às proteínas ou outras biomoléculas que funcionalizam as suas superfícies. É de suma importância caracterizar cuidadosamente a sua atividade antimicrobiana para formular a concentração mais eficaz para cada aplicação (SINTUBIN et al., 2012).

A atividade antimicrobiana das AgNPs pode ser explorada para desinfecção em estações de tratamento de águas residuais, para evitar a colonização bacteriana e eliminar microrganismos em juntas de borracha médica e de silicone para proteger e transportar alimentos e tecidos (GUZMAN et al., 2012; PANACEK et al., 2006). Outras aplicações incluem por exemplo compostos à base de prata as quais têm sido amplamente utilizados em muitas aplicações bactericidas. Vale citar ainda alguns exemplos, tais como compósitos inorgânicos com uma taxa de liberação de prata lenta que são atualmente utilizados como conservantes numa variedade de produtos. Outra aplicação atual inclui novos compostos de microesferas de gel de sílica, que contêm um complexo de tiossulfato de prata, que são misturados em plásticos para proteção antibacteriana duradoura (GUPTA & SILVER, 1998). Os compostos de prata também têm sido utilizados no campo médico para tratar queimaduras e uma variedade de infecções hospitalares (MORONES & ELECHIGUERRA, 2005).

2.6.1 Mecanismo de ação antimicrobiana das nanopartículas de prata

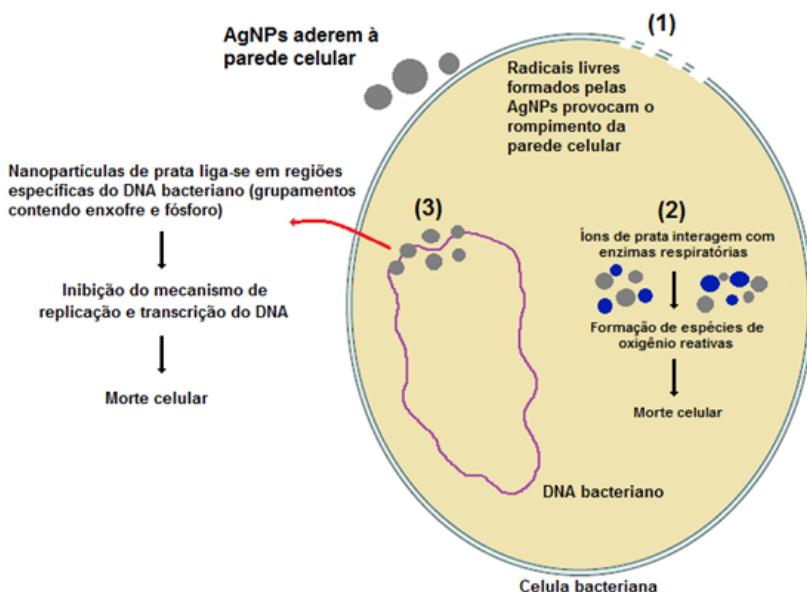
Embora a síntese de nanopartículas de prata seja considerada como um "atributo ou capacidade" do microrganismo, essa característica é principalmente considerada como um mecanismo de defesa pelos microrganismos para os íons de prata muito reativos que chegam. Fatos interessantes sobre a síntese de nanopartículas de prata podem ser entendidos quando o mecanismo real envolvido na atividade antimicrobiana de íons de prata é conhecido (SILVER et al., 2006). Os íons de prata são muito reativos e são conhecidos por se ligar a vários componentes vitais das células que induzem a morte celular (DEEPAK & KALISHWARALAL, 2011).

O mecanismo exato que causa o efeito antimicrobiano das nanopartículas de prata não é claramente conhecido, e é um tópico atualmente bastante debatido. Entretanto, existem várias teorias sobre a ação de nanopartículas de prata em microrganismos para causar o efeito

antimicrobiano. As nanopartículas de prata possuem a capacidade de ancorar na parede celular bacteriana e, posteriormente, penetrar, causando mudanças estruturais na membrana celular como sua permeabilidade, consequentemente causando a morte da célula (SONDI & SALOPEK-SONDI, 2004). A formação de radicais livres pelas nanopartículas de prata também pode ser considerada um outro mecanismo pelo qual as células microbianas morrem. Há relatos de estudos de espectroscopia de ressonância de spin de elétrons que sugerem que há formação de radicais livres pelas nanopartículas de prata quando em contato com as células bacterianas e que estes radicais livres possuem a capacidade de danificar a membrana celular, tornando-a porosa, e levando à morte da célula (DANILCZUK et al., 2006; KIM et al., 2007).

Outra teoria proposta é a de que pode haver a liberação de íons de prata pelas nanopartículas (CHEN et al., 2000; SHAHVERDI et al., 2007). Esses íons podem interagir com os grupos tiol de muitas enzimas vitais das células microbianas e inativá-las (MATSUMURA et al., 2003). As células bacterianas em contato com as nanopartículas de prata absorvem esses íons, que inibem as várias funções metabólicas na célula causando sua danificação e consequentemente sua morte. Em seguida, existe a geração de espécies reativas de oxigênio, que são produzidas possivelmente pela inibição de uma enzima respiratória por íons de prata que atacam a própria célula (PRABHU & POULOSE, 2012). Sabe-se atualmente que os íons de prata inibem particularmente enzimas tais como a NADH-desidrogenase II no sistema metabólico energético/respiratório da célula bacteriana, o que o torna principal candidato para o local de produção de espécies reativas de oxigênio *in vivo* (DEEPAK & KALISHWARALAL, 2011). Este mecanismo de formação de espécies reativas de oxigênio pode também ser estudado indiretamente, isto é, a enzima catalase é considerada como um “eliminador” de espécies reativas de oxigênio em células microbianas. Em experimentos envolvendo a ação antimicrobiana de AgNPs realizados em *B. licheniformis*, o aumento na concentração de íons de prata foi acompanhado por um aumento na síntese de catalase, onde a enzima também auxiliou na degradação e consequentemente, na morte do *B. licheniformis*. Isto também foi evidenciado por Matsumura et al. (2003) onde se verificou que a estirpe mutada de *E. coli* UM1 (katE katG), deficiente da enzima catalase, era mais sensível tanto ao zeólito de prata como ao nitrato de prata do que o seu progenitor. Como resultado do trabalho, concluiu-se que os íons de prata induzem a apoptose em células bacterianas. A Figura 13 ilustra os diferentes mecanismos de ação antimicrobiana das AgNPs.

Figura 13 - Ilustração esquemática em cores dos diferentes mecanismos de ação antimicrobiana das nanopartículas de prata: (1) rompimento da parede celular por radicais livres formados pelas AgNPs; (2) íons de Ag promovem a formação de espécies de oxigênio reativas no interior da célula bacteriana e (3) interação entre as AgNPs nos grupamentos contendo P e S na molécula de DNA provocando a interrupção da replicação e transcrição do DNA



Fonte: Prabhu & Poulouse (2012)

Portanto, a célula bacteriana tenta proteger-se dos íons de prata que penetram na célula resultantes, em geral, da dissociação do AgNO_3 (Figura 10), convertendo-os na forma Ag^0 inativa. Tal mecanismo de defesa é aplicável a vários nanometais, sendo que a diferença ocorre apenas na respectiva enzima responsável pela biossíntese. Em *B. licheniformis*, por exemplo, a nitrato redutase é encontrada na membrana celular como nitrato redutase respiratória. Portanto, pode-se considerar que, na maioria dos organismos identificados para sintetizar nanopartículas de prata, a enzima nitrato redutase será parte integrante do microrganismo (DEEPAK & KALISHWARALAL, 2011).

Por fim, outro mecanismo responsável pela atividade antimicrobiana das nanopartículas de prata em células bacterianas é através da deformação estrutural do DNA (SINTUBIN et al., 2012). De fato, sabe-se que o citoplasma bacteriano possui altas concentrações de moléculas de fósforo e enxofre, outro fato é que o DNA possui enxofre e fósforo como seus principais componentes, e este não se encontra condensado em bactérias devido à ausência de histonas (principal complexo de proteínas responsáveis pela condensação e compactação do DNA) aderidas ao DNA. Portanto, as nanopartículas de prata podem agir sobre o DNA bacteriano, ligando-se principalmente às moléculas de enxofre e fósforo, o que conseqüentemente levaria à morte celular. A interação das nanopartículas de prata com o enxofre e o fósforo do DNA acarretam em problemas no mecanismo de replicação do DNA das bactérias e assim provoca a morte celular (DEEPAK & KALISHWARALAL, 2011; PRABHU & POULOSE, 2012).

Visto a importância da utilização de métodos sustentáveis na síntese de metais nobres com alta gama de aplicações, a grande relevância desse trabalho frente a comunidade científica é o estudo e avaliação dos parâmetros de estabilidade das AgNPs em sua biossíntese, de modo a torná-las passíveis a utilização como agente antimicrobiano. A avaliação da estabilidade de nanopartículas de prata por potencial zeta com variação nos parâmetros de biossíntese torna tal análise inédita frente a literatura.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Os tópicos a seguir deste capítulo têm como objetivo apresentar e descrever sucintamente todo procedimento experimental envolvendo os materiais utilizados e a metodologia desenvolvida para obtenção dos resultados nesse trabalho.

3.1 DESCRIÇÃO DO MÉTODO E MATERIAL UTILIZADO

O trabalho desenvolvido consistiu em promover a biossíntese de nanopartículas de prata (AgNPs) por intermédio do fungo *Fusarium oxysporum* e em seguida caracterizar o produto a fim de se determinar suas propriedades químicas e biológicas. O apelo primordial do trabalho foi a determinação do tamanho e estabilidade das AgNPs em diferentes condições de biossíntese. Para isso, foi estabelecido que o extrato fúngico bruto, elaborado sob condições de biossíntese já estabelecidas na literatura, o qual será chamado a partir daqui de “meio reacional padrão ou controle padrão”, contendo as AgNPs seria utilizado separadamente diante das técnicas de caracterização e no método de determinação de tamanho e estabilidade. Os principais materiais utilizados no método envolvendo a biossíntese das nanopartículas de prata estão listados na Tabela 6.

Tabela 6 - Materiais utilizados na execução da biossíntese das AgNPs.

	Conc. utilizada	Quantidade utilizada	Procedência/Referência
Microrganismo			
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	---	10 g	CERMAT/UFSC
Meio de cultivo			
BDA em pó	2,3% m/v	2,3 g	Merck
Extrato de levedura	0,5% m/v	0,5 g	LabSynth
Extrato de malte	2% m/v	2 g	HiMedia
Reagente analítico para formação das AgNPs			
Nitrato de prata (AgNO₃)	1 mM	0,017 g	Quimespar

4.2 METODO DE BIOSÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO

4.2.1 Extrato fúngico utilizado e condições de cultivo

A cepa fúngica utilizada no desenvolvimento deste estudo foi o *Fusarium oxysporum* f. sp. *Phaseoli*, obtido Centro de Estudios e Investigaciones en Biotecnología (CIBIOT) da Universidad Pontificia Bolivariana (UPB), Medellín, Colômbia.. Primeiramente, a cepa foi cultivada em meio de cultura sólido contendo batata, dextrose e ágar (BDA) em placas de Petri; em seguida a cepa foi mantida sob refrigeração a 5 ± 1 °C. Antes de proceder com a execução da biossíntese das nanopartículas de prata, a estirpe fúngica foi transferida para uma incubadora e mantida a 28 °C durante 24 h, para que, em seguida, pudesse prosseguir com a inoculação no meio de cultura para promover o seu crescimento.

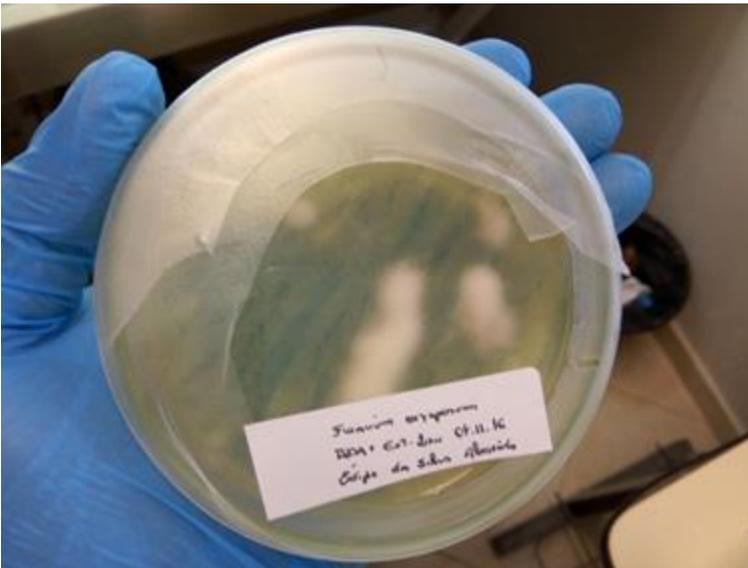
4.2.2 Biossíntese das nanopartículas de prata mediada por *Fusarium oxysporum*

O *Fusarium oxysporum* f. sp. *Phaseoli* foi inoculado em meio de cultura sólido BDA (Batata, dextrose e ágar, Merck) suplementado com 2% (m/v) de extrato de malte (HiMedia) e 0,5% (m/v) de extrato de levedura (LabSynth) em placas de Petri durante um período de 5 dias a 28 °C para promover o crescimento do microrganismo. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,0 para otimizar as condições de desenvolvimento do fungo no meio e conseqüentemente acelerar o crescimento do microrganismo. A Figura 14 mostra uma fotografia da estirpe do fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *Phaseoli* após os 5 dias de crescimento em placa de Petri.

Após o período de crescimento de 5 dias da cepa fúngica, a redução dos íons de prata (Ag^+ para Ag^0) foi realizada como segue: aproximadamente $10 \pm 0,5$ g da biomassa do *Fusarium oxysporum* f. sp. *Phaseoli* foi transferida para um frasco Erlenmeyer contendo 100 mL de água destilada por meio de raspagem dos esporos formados pela cepa fúngica sobre o meio sólido, em seguida mantido durante 72 h a 28 °C em solução aquosa. O período de manutenção do fungo em meio aquoso por 72 h permite a síntese extracelular dos componentes e demais biomoléculas responsáveis pelo mecanismo bioquímico de biorredução e estabilização das nanopartículas de prata.

Após o período de 72 h, a biomassa foi separada do meio por filtração a vácuo usando papel de filtro (Whatman, nº 1). Após a filtração, ao filtrado fúngico adicionou-se 1 mM (10^{-3} M ou 0,017g/100 mL) de AgNO_3 (nitrato de prata - Quimespar). Posteriormente, a solução contendo o filtrado fúngico com o nitrato de prata foi mantido durante 5 dias sob incubadora no escuro a 28 °C.

Figura 14 - Cepa do *Fusarium oxysporum* f. sp. *Phaseoli* utilizado na síntese das AgNPs após 5 dias de crescimento em placa de Petri

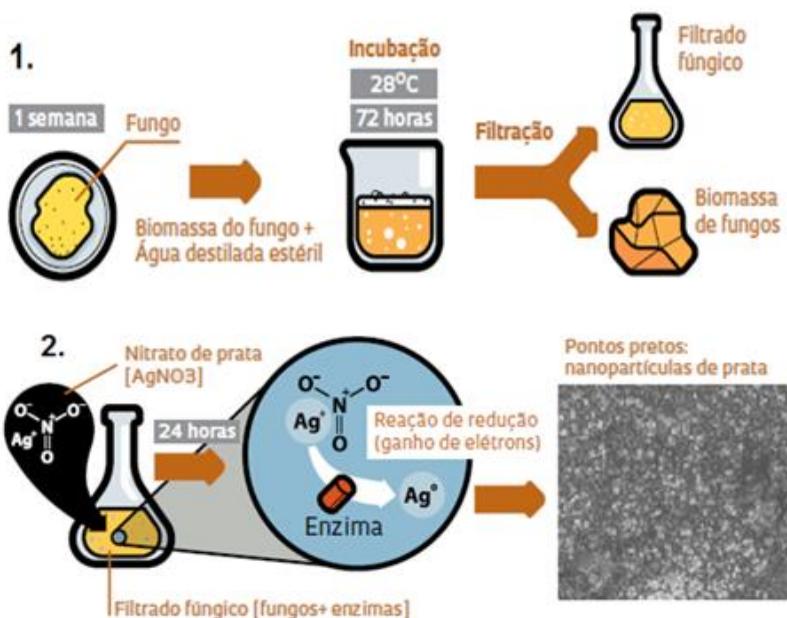


Fonte: Do autor

A avaliação da eficiência da biorredução foi observada posteriormente através da alteração do tom de cor do meio reacional. O aparecimento de uma coloração castanha escura do filtrado de células fúngicas indica a formação das AgNPs. À solução contendo as AgNPs biossintetizadas nas condições apresentadas neste tópico foi atribuído o nome de “solução padrão”. Tal solução foi utilizada separadamente para a determinação do tamanho e estabilidade das nanopartículas, alterando os parâmetros de biossíntese, e posteriormente, na caracterização das AgNPs. A Figura 15 ilustra resumidamente o método descrito de síntese das nanopartículas de prata via *Fusarium oxysporum* f. sp. *Phaseoli*. Os

experimentos envolvendo a biossíntese das AgNPs foram realizados no LabMASSA/UFSC.

Figura 15 - Ilustração esquemática do método resumido de biossíntese das AgNPs. A etapa 1 compreende os procedimentos referentes ao cultivo do fungo, transferência da biomassa para um frasco contendo água destilada e sua separação do meio por filtração. Já a etapa 2 compreende na adição de AgNO_3 ao filtrado fúngico e a caracterização das AgNPs formadas por microscopia eletrônica



Fonte: Do autor

4.2.3 Determinação do tamanho e estabilidade das AgNPs

Após o processo experimental de biossíntese das AgNPs, as nanopartículas foram submetidas à determinação do tamanho e estabilidade com a finalidade de definir se as nanopartículas estavam viáveis para utilização como agente antimicrobiano. Para isso, os parâmetros de biossíntese utilizados para formação da solução representada pelo controle padrão contendo as nanopartículas de prata (10^{-3} M de AgNO_3 ; 10 g de biomassa fúngica; temperatura de biorredução

de 28 °C e tempo de crescimento do fungo de 5 dias) foram modificadas a fim de se avaliar o comportamento do tamanho e da estabilidade das nanopartículas de prata sob a variação das condições de biossíntese. Os valores do controle padrão e os valores modificados dos parâmetros estabelecidos na biossíntese das AgNPs estão dispostos na Tabela 7.

Tabela 7 - Variação dos parâmetros de biossíntese das AgNPs.

Parâmetros de biossíntese	Valores do			
	controle padrão	Valores modificados		
Concentração de AgNO₃ (M)	10 ⁻³	10 ⁻³	10 ⁻²	10 ⁻¹
Quantidade de biomassa (g)	10	5	10	15
Temperatura de biorredução (°C)	28	20	40	60
Idade do fungo (dias)	5	10	20	30
Idade das nanopartículas (dias)	5	10	20	30

A medição do tamanho das nanopartículas de prata foi determinada por espalhamento de luz dinâmico (DLS, Nano-flex MicrotracS3000/S3500 Series - Particle Metrix).

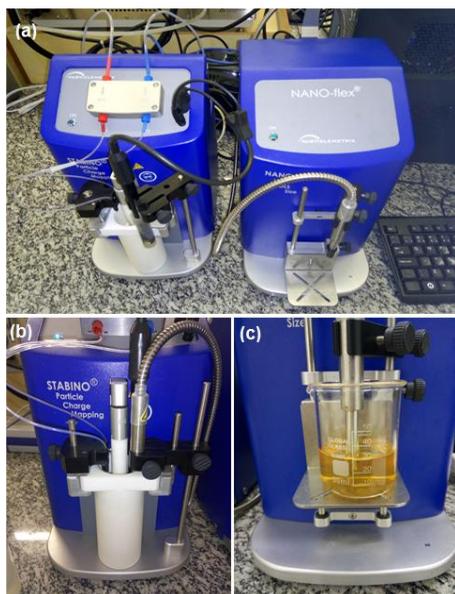
Para a execução experimental da medição do tamanho das AgNPs via DLS, cerca de 10 mL das amostras coloidais contendo as nanopartículas de prata foram transferidas para um béquer de 50 mL. Em seguida, o componente contendo a fonte de luz a laser foi imerso na amostra. A análise da frequência da luz incidida sobre as partículas foi executada pelo software do equipamento gerando um histograma contendo a distribuição cumulativa e percentual do tamanho das nanopartículas.

Além das análises de distribuição de tamanho das AgNPs tanto da solução padrão, quanto das amostras com variação dos parâmetros de biossíntese, a determinação da estabilidade das nanopartículas via potencial zeta foram realizadas em outro equipamento acoplado ao Nano-flex (Stabino Control2.00.23 – Particle Metrix).

Para a execução experimental da determinação do potencial zeta das amostras contendo as AgNPs da solução padrão e das amostras com variação dos parâmetros de biossíntese, cerca de 10 mL das amostras coloidais contendo as AgNPs foram transferidas para a célula cilíndrica de teflon, posteriormente a agitação da solução foi iniciada. O valor em mV do potencial zeta (PZ) instantâneo e o pH da amostra é rapidamente

determinado e a este valor do potencial zeta foi atribuído como potencial zeta inicial. Posteriormente, o equipamento foi ajustado para medição do potencial zeta sob efeito de diferentes valores de pH da amostra, sempre variando de um pH ácido para um pH alcalino (3,0 para 10,0). O resultado é computadorizado, e este resulta em um gráfico da variação do PZ em função do pH das amostras. A Figura 16 ilustra o sistema utilizado para medição dos valores de distribuição de tamanho e potencial zeta respectivamente. Ambos os experimentos foram realizados no LCP/UFSC.

Figura 16 - Equipamentos utilizados na determinação do tamanho e estabilidade via potencial zeta das AgNPs. Sistema NANO-flex/Stabino (a); célula cilíndrica e pistão de teflon (b) e componente contendo o feixe de luz a laser imerso na amostra contendo as AgNPs para medição do tamanho das nanopartículas pelo princípio do DLS



Fonte: Do autor

4.2.4 Caracterização das AgNPs

Tendo já descrito que o método de medição do tamanho das nanopartículas de prata e determinação do potencial zeta destes foram

realizadas tanto para o controle padrão de biossíntese (10^{-3} M de AgNO_3 ; 10 g de biomassa fúngica; temperatura de biorredução a 28°C e tempo de crescimento do fungo de 5 dias), quanto para as amostras variando os parâmetros de biossíntese; os experimentos visando a caracterização química e física das AgNPs foram realizadas apenas na amostra do controle padrão.

4.2.4.1 *Caracterização via espectroscopia na região ultravioleta visível (UV-Vis)*

Para esse ensaio, a partir do quinto dia da reação de biorredução das nanopartículas de prata presentes no meio reacional, as alíquotas contendo as nanopartículas foram periodicamente removidas e submetidas à análise em espectroscopia UV-Vis, em um espectrofotômetro de feixe duplo (Hitachi, Modelo U 1900), operando a uma resolução de 1 nm, com espectros de absorção de varredura ajustado em um intervalo de comprimento de onda entre 200 e 600 nm. Cerca de 5 mL das amostras contendo as nanopartículas de prata coloidais foram analisadas em cubetas de quartzo. As amostras tiveram que ser diluídas em água para que o pico de absorção permanecesse dentro da faixa de detecção de comprimento de onda ajustado no espectrofotômetro. Todas as análises em UV-Vis foram realizadas no LCP/ UFSC.

A oscilação do plasma em um metal é a agitação conjunta de um gás formado pelos elétrons de condução do metal. Tal excitação quando se propaga sobre estruturas manométricas possui uma frequência própria que dependerá da geometria e do tamanho das nanopartículas, sendo denominado de superfície de *plasmon*. Leituras de absorção de luz pelo *plasmon* de nanopartículas metálicas pode ser obtidas na região do ultravioleta visível (STEPANOV, 2011). De acordo com Birla et al. (2013), para nanopartículas monodispersas em solução, apenas uma banda de *plasmon* é obtida e o aumento de sua intensidade é uma indicação do grau de avanço da reação da biorredução com o consequente aumento do número de nanopartículas de prata, sendo assim um indicador útil para validação do processo de biossíntese.

4.2.4.2 *Caracterização via espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)*

A espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) é bastante observada em amostras sólidas secas ou pulverizadas.

Seu princípio de funcionamento baseia-se em uma luz que incide em uma matriz descontínua, penetra na amostra (amostras do tipo pó sólido) e reflete resultando em informações espectrais (SOUZA & FERRÃO, 2006).

As análises de medições no FTIR foram realizadas em um equipamento (Shimadzu Modelo IRPrestige-21, 8400S) no modo de refletância difusa, operando sob uma resolução de 4 cm^{-1} com varredura na faixa de $400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ em pastilhas de brometo de potássio (KBr). As amostras contendo as nanopartículas de prata coloidais foram centrifugadas a aproximadamente 10000 rpm durante 12 min. O sobrenadante foi rejeitado e o *pellet* foi disperso novamente em água destilada estéril para remover quaisquer moléculas biológicas não adsorvidas, posteriormente a amostra foi seca em estufa e depois submetida à análise em FTIR. Os ensaios envolvendo o FTIR foram realizados no Laboratório de Controle de Processos (LCP) da UFSC.

Neste trabalho, os resultados obtidos por FTIR são úteis para identificar as possíveis biomoléculas que são responsáveis pela redução dos íons de prata na formação das nanopartículas (Ag^+ para Ag^0), bem como as biomoléculas responsáveis pelo mecanismo de estabilização das AgNPs em solução coloidal. É importante lembrar que tais biomoléculas foram sintetizadas pelo *Fusarium oxysporum*, em uma etapa que antecedeu a separação da biomassa do caldo onde a estirpe cresceu, onde posteriormente foi adicionado AgNO_3 (concentração de 10^{-3} M).

4.2.4.3 Caracterização via espectroscopia de absorção atômica por chama (FAAS)

Considerada uma técnica já bem sucedida e estabelecida, a espectroscopia de absorção atômica por chama (FAAS - do inglês *Fire Atomic Absorption Spectrometry*) é uma técnica das mais utilizadas na determinação qualitativa e quantitativa de elementos em baixas concentrações, principalmente metais que estão presentes em uma variedade de amostras, sejam estas líquidas, sólidas, ou em suspensão (AMORIM et al., 2008).

Neste trabalho a análise em FAAS foi utilizada para determinar a presença e a quantidade de nanopartículas de prata após a biossíntese por detecção da presença de íons de prata reduzidos nas dispersões coloidais. As análises foram realizadas em um equipamento (Hitachi Modelo Z-8230) com uma lâmpada catódica oca de prata, trabalhando em

uma corrente de operação de 2 mA, e um comprimento de onda e largura de banda espectral de 328,1 e 0,2 nm, respectivamente. As amostras contendo as AgNPs submetidas à análise em FAAS foram preparadas variando a concentração de AgNO_3 para avaliar a efetividade da biossíntese a partir da quantidade de nanopartículas de prata produzidas em comparação com a concentração de AgNO_3 inserida na amostra. As concentrações de AgNO_3 utilizadas foram 10^{-3} M, 10^{-2} M e 10^{-1} M, respectivamente. Os ensaios realizados em FAAS foram realizados na Central de Análises Químicas do QMC/UFSC.

4.2.4.4 Caracterização via Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (MEV-EC) e Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

As análises em microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (MEV-EC) e microscopia eletrônica de transmissão (MET) das nanopartículas de prata foram realizadas com a finalidade de avaliar a forma, o tamanho e os aspectos de disposição espacial e de superfície das nanopartículas. Os ensaios com ambos os equipamentos foram realizados no LCME/UFSC.

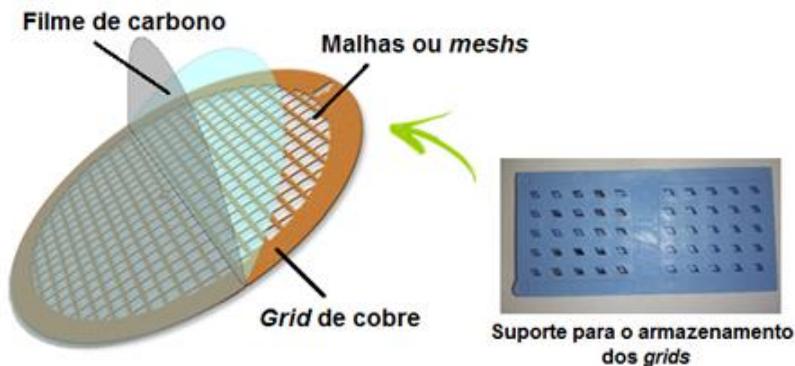
A preparação das amostras de nanopartículas de prata para visualização no MEV-EC foi conduzida a partir da diluição das amostras em 50% (v/v) seguida de gotejamento destas sobre pequenos suportes de alumínio previamente limpos e esterilizados denominados “*stubs*”. Após o gotejamento, os *stubs* foram levados à uma incubadora à vácuo onde permaneceram por um período de 48 h para promover a secagem da amostra gotejada. As análises em MEV-EC foram realizadas em um equipamento (JEOL, modelo JSM-6701F) operando em uma voltagem de 10,0 kV com ampliação máxima das imagens de 50000 \times .

Já para a preparação das amostras de AgNPs para análise no MET, a execução experimental seguiu-se a partir do depósito de uma gota da solução contendo as AgNPs sobre um *grid*, um tipo de grade de cobre com 3 mm de diâmetro revestido por um filme de carbono com várias malhas, também conhecidas como *meshs* (cerca de 300 *meshs*), representado na Figura 17.

Após o gotejamento da solução contendo as AgNPs, os *grids* foram levados para estufa e permaneceram por um período de 24 h para promover a secagem das amostras gotejadas. Após a secagem, as amostras foram submetidas à visualização no MET (JEOL modelo JEM-

1011) operando a uma voltagem de 100 kV, com a resolução das imagens ajustadas na faixa de visualização entre 20-100 nm.

Figura 17 - Ilustração do *grid* onde foi depositada uma gota da solução contendo as AgNPs (à esquerda) e o suporte onde os grids são armazenados (à direita)



Fonte: Do autor

4.2.5 Análise do potencial antimicrobiano das AgNPs

A atividade antimicrobiana de nanopartículas de prata é avaliada pela determinação de uma pequena quantidade da substância necessária para inibir o crescimento do microrganismo-teste; esse valor é conhecido como Concentração Inibitória Mínima (CIM). Um aspecto bastante relevante na determinação da CIM das AgNPs é a preocupação em relação aos aspectos toxicológicos, microbiológicos pertinentes aos compostos naturais ou suas combinações (PINTO, KANEIRO, & OHARA, 2003).

É importante lembrar que a CMI não é sempre constante para um determinado agente antimicrobiano, uma vez que este pode ser afetado pela natureza do microrganismo-teste utilizado, tamanho do inóculo, composição do meio de cultura, tempo e condições de incubação. Nesse caso, torna-se importante a padronização das condições experimentais a fim de se comparar diferentes quantidades ou concentrações do agente antimicrobiano determinando-se qual quantidade mínima é eficaz contra um determinado microrganismo (MADIGAN, MARTINKO, & PARKER, 2014).

Neste trabalho, a análise do potencial antimicrobiano das nanopartículas de prata foi realizada por meio da medição de halos de

inibição de bactérias tratadas com as AgNPs em meio sólido pela técnica de perfuração em ágar. Outro teste realizado foi a análise do crescimento bacteriano de cepas tratadas com diferentes concentrações de AgNPs seguido da determinação da concentração inibitória mínima (CIM).

Para o teste de medição dos halos de inibição, foram utilizadas 5 cepas bacterianas como agentes alvo do composto antimicrobiano: *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* e *Bacillus cereus*. Para a análise de crescimento das bactérias tratadas com as AgNPs foram utilizados apenas *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*. Todas as cepas bacterianas foram provenientes do Departamento de Microbiologia aplicada da UNOCHAPECÓ. A execução experimental dos testes de medição dos halos de inibição segue conforme descrito por Costa et al. (2010).

A semeadura dos inóculos foi padronizada de acordo com o tubo 1 da escala de McFarland, e as cepas foram semeadas em meio ágar Mueller Hinton (KASVI) a 10% (p/v) (3,6 g/100 mL) para comprovar a pureza da cultura. Todas as semeaduras foram realizadas em tubos de ensaio reclinados, posteriormente os tubos contendo as cepas semeadas foram incubadas a 37 °C por 24 h.

Após o período de incubação, uma nova semeadura para cada cepa bacteriana foi realizada. Dessa vez, com o auxílio de uma alça de platina, as cepas bacterianas foram inoculadas em novos tubos de ensaio contendo 5 mL de meio Nutrient Broth (KASVI®) a 10% (m/v) (1,3 g/100 mL). Posteriormente, obedecendo as características fisiológicas das cepas bacterianas, os tubos contendo o meio líquido inoculado foram novamente incubadas a 37 °C por mais 24 h para permitir o crescimento do microrganismo.

Após a incubação, obteve-se um extrato bacteriano para transferência em placas de Petri a partir da adição de 1 mL de cada solução contendo o meio (Nutrient Broth) com as cepas bacterianas em solução salina (5 mL, 1% (p/v)). Obtidos os extratos, preparou-se novamente o ágar Mueller Hinton, o qual foi distribuído em placas de Petri de 140 mm de diâmetro, com volume suficiente para atingir uma espessura de 5 mm. Após a solidificação, por meio da técnica de semeadura de superfície, as suspensões microbianas foram inoculadas em cada placa com o auxílio de uma alça de Drigalski, em três sentidos: horizontal, vertical e diagonal para evitar o crescimento isolado das colônias. Posteriormente, foram confeccionados 3 poços no ágar de cada placa, cada poço contendo aproximadamente 6 ± 1 mm. Os poços foram

confeccionados com o auxílio de uma ponteira para micropipeta com o intuito de padronizar o diâmetro da perfuração.

Após a confecção dos poços, estes mesmos poços de cada placa foram preenchidos com volumes variados da solução contendo as AgNPs coloidais a uma concentração de 1 mM (10^{-3} M/100 mL). Para cada placa contendo três poços, um volume diferente foi utilizado: 20, 30, 40 e 50 μ L da solução contendo as AgNPs. Como controle positivo, foi aplicado 50 μ L de amoxicilina (50 μ g/mL). Já o controle negativo constituiu-se de água destilada (50 μ L). As placas de Petri foram mantidas à temperatura ambiente e isoladas no interior de uma câmara de fluxo laminar por um período de 1 h para ocorrer a pré-difusão da solução contendo as AgNPs, posteriormente, as placas foram incubadas a 37 °C por mais 24 h. Transcorrido o tempo, as placas de Petri foram analisadas, sendo medidos, em mm com um paquímetro, os halos de inibição do crescimento microbiano formados no ágar. Como cada placa continha três poços, os ensaios foram realizados em triplicata e o resultado final foi dado pela média aritmética dos halos de inibição.

O método da análise do crescimento das cepas bacterianas tratadas com diferentes concentrações de AgNPs segue o procedimento descrito por Chatterjee et al. (2014).

Ambas as cepas bacterianas: *E. coli* e *L. monocytogenes* foram cultivadas em 5 mL de meio Nutrient Broth (10% p/v) e mantidas sob incubação por um período de 24 h a 37 °C. O meio Nutrient Broth foi novamente preparado, e após o crescimento de ambas as cepas, 2% do inóculo foram transferidos para frascos Erlenmeyer contendo 50 mL do meio de cultura. A cada frasco foram adicionadas as soluções contendo as AgNPs em concentrações variadas de 10, 20, 30, 40 e 50 μ M. Para cada cepa, um frasco sem a adição da solução contendo as AgNPs foi mantido como controle para rastrear o crescimento normal das células bacterianas. Todos os frascos foram incubados a 37 °C em *shaker* com agitação contínua de 120 rpm. As amostras foram retiradas assepticamente em intervalos de 1 hora e a densidade ótica (DO) foi medida em espectrofotômetro (FEMTO Modelo Cirrus 80) com comprimento de onda ajustado para 595 nm. A referência utilizada como controle negativo foram as amostras sem adição das AgNPs. Os dados de DO obtidos foram plotados em função do tempo de crescimento das cepas bacterianas, a CIM foi considerada como sendo a menor concentração da solução contendo as AgNPs em que não houve crescimento significativo das cepas bacterianas por comparação do controle negativo.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os principais resultados obtidos conforme a execução experimental dos métodos envolvendo a biossíntese e caracterização das AgNPs, apresentadas anteriormente.

5.1 EFETIVIDADE DA BIOSÍNTESE

Como já descrito, a biossíntese das AgNPs foi promovida por meio da adição do sal de prata (AgNO_3) no filtrado fúngico, permitindo assim que as proteínas e demais biomoléculas biossintetizadas pelo microrganismo atuem no mecanismo de biorredução dos íons de prata bem como no processo de estabilização das nanopartículas. Com relação à eficiência da biossíntese mediada pelo *Fusarium oxysporum*, a alteração na cor do meio de reação foi a primeira evidência da formação das AgNPs. Como se vê na Figura 18, após a adição do nitrato de prata (1 mM) no frasco contendo o filtrado fúngico, a cor do meio mudou para uma tonalidade marrom-amarelado após 5 dias da adição do sal de prata. O aparecimento de uma cor marrom-amarelada no filtrado fúngico sugere a formação das nanopartículas de prata em solução (AHMAD et al., 2003; DURÁN et al., 2005; PATIL & MURALI SASTRY, 1997).

Figura 18 - Filtrado fúngico antes da adição de AgNO_3 (esquerda) e após 5 dias da adição de AgNO_3 (direita). A mudança na tonalidade da cor do meio reacional é um indicativo da biossíntese das nanopartículas de prata



Fonte: Do autor

A redução dos íons Ag^+ para Ag^- ocorreu extracelularmente assim como também descrito por Basavaraja et al., (2008) e Mulvaney (1996). Desse modo, a hipótese aceita é de que este fungo segrega uma enzima extracelular que promove a redução dos íons de prata, consequentemente acarretando na formação das nanopartículas de prata metálica. A síntese extracelular oferece uma grande vantagem sobre um processo de síntese intracelular do ponto de vista tecnológico, devido ao fato de que os métodos intracelulares requerem processos pós-biossíntese para liberar as nanopartículas das células microbianas (GADE et al., 2008).

5.2 TAMANHO E ESTABILIDADE DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA

O efeito da concentração de AgNO_3 , da quantidade de biomassa, da temperatura de biorredução, da idade do fungo e da idade das nanopartículas sobre o tamanho e a estabilidade das nanopartículas de prata, foram avaliados individualmente. A Figura 19 mostra a distribuição cumulativa e percentual do tamanho das nanopartículas de prata biosintetizadas por *Fusarium oxysporum* e a variação do potencial zeta (PZ) em função do pH para o controle padrão (10^{-3} M de AgNO_3 ; 10 g de biomassa fúngica; temperatura de biorredução a 28 °C e tempo de crescimento do fungo de 5 dias). A Tabela 8 expõe os dados informativos do tamanho médio das nanopartículas (d_{50}), bem como o potencial zeta e o pH inicial das amostras no momento da análise.

Figura 19 - Distribuição cumulativa e percentual das AgNPs (à esquerda) e variação do potencial zeta em função do pH (à direita) para a amostra controle padrão das nanopartículas de prata

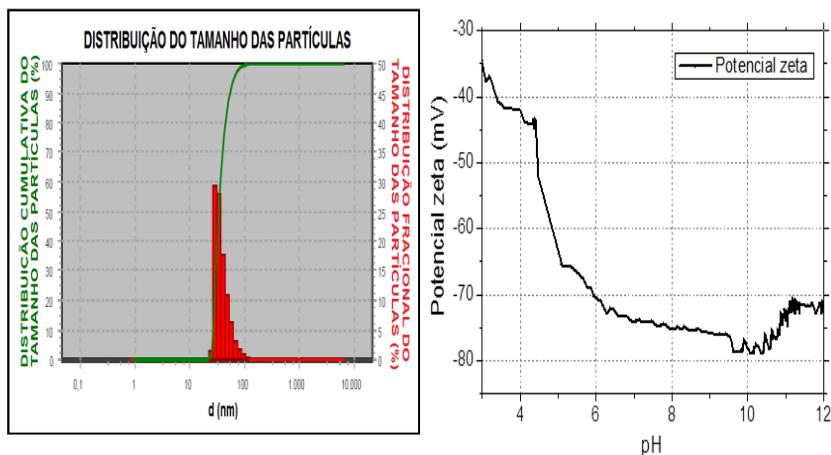


Tabela 8 - Valores do tamanho médio, potencial zeta e pH inicial para as AgNPs do controle padrão.

Tamanho médio das nanopartículas (d_{50}) (nm)	Potencial zeta após 5 dias de biorredução (PZ_i) (mV)	pH inicial
34	-45,9	4,4

As nanopartículas de prata apresentaram um tamanho médio de 34 nm, este valor para o tamanho médio está situado no intervalo geralmente aceito para que as AgNPs sejam consideradas nanomateriais com aplicação biológica (entre 1 e 100 nm) (BERA & BELHAJ, 2016).

O valor imediato do potencial zeta detectado após 5 dias do período de biorredução (PZ_i) foi de -45,9 mV. A varredura para verificação do PZ em função da variação do pH foi realizada com valores de pH crescente (variando de valores de pH ácido para básico). Verifica-se que o potencial zeta declina para valores entre -70 mV e -80 mV quando o pH atinge valores próximos da neutralidade e valores alcalinos (Figura 20). Tais resultados concordam com os valores geralmente aceitos para estabilidade de partículas em uma suspensão coloidal, que prevalece quando o valor do potencial zeta é menor ou igual a -30 mV; ou superior

ou igual a 30 mV (MIRHOSSEINI et al., 2008). Diante dos resultados obtidos de potencial zeta, para a solução de controle padrão, as nanopartículas de prata permaneceram estáveis e defloculadas mesmo em valores de pH elevados.

5.3 TAMANHO E ESTABILIDADE DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE BIOSÍNTESE

5.3.1 Variação do tamanho e estabilidade das AgNPs biossintetizadas sob diferentes concentrações de AgNO_3

Os resultados de distribuição de tamanho das nanopartículas de prata tratadas sob diferentes concentrações de AgNO_3 mostram um aumento acentuado no tamanho médio das nanopartículas à medida que aumenta a concentração do sal de prata na solução (Figura 20). Os tamanhos médios das nanopartículas de prata tratadas a uma concentração de 0,001; 0,01 e 0,1 M de AgNO_3 estão expostos na Tabela 9.

Figura 20 - Distribuição cumulativa e percentual do tamanho das AgNPs biossintetizadas sob diferentes concentrações de AgNO_3 : (a) 0,001 M; (b) 0,01 M e (c) 0,1 M

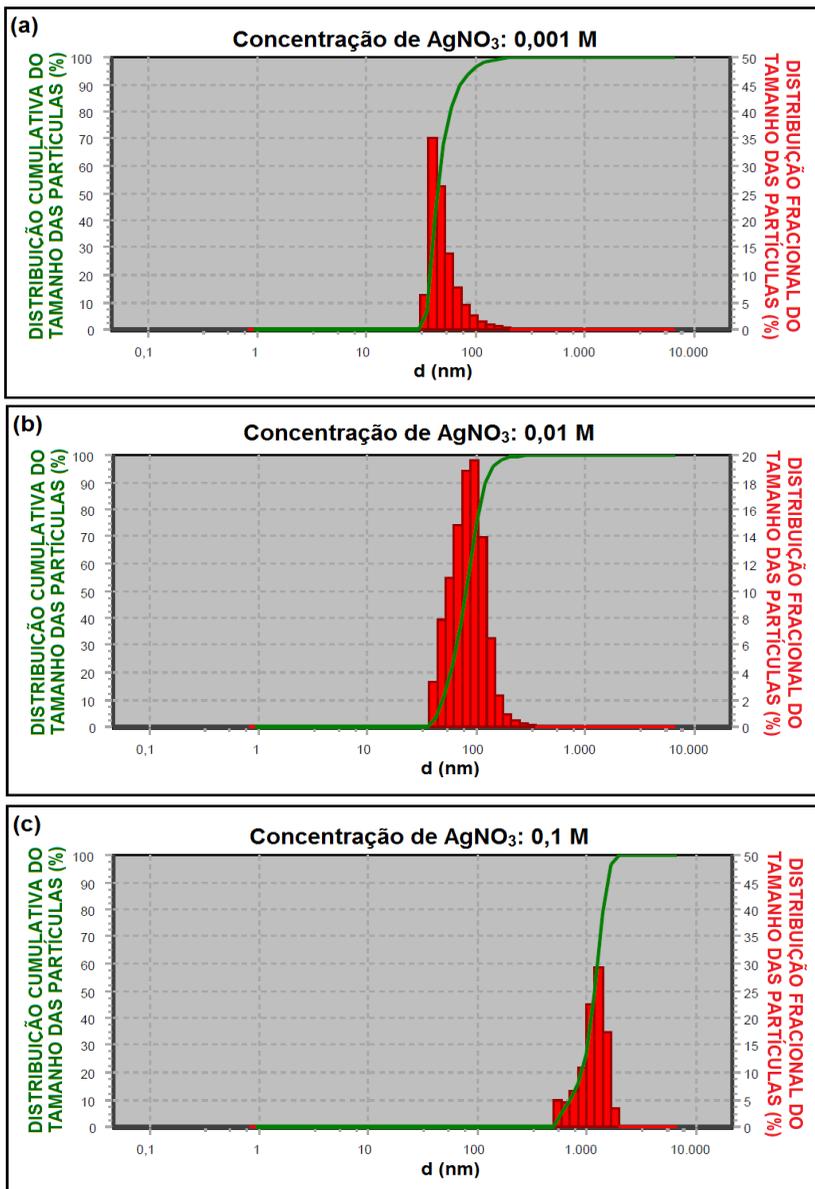


Tabela 9 - Tamanho médio das AgNPs em função da variação da concentração de AgNO_3 .

Tamanho médio das nanopartículas/Concentração de AgNO_3	0,001 M	0,01 M	0,1 M
d_{50} (nm)	45,1	81,6	1187

De acordo com a Tabela 9, os tamanhos médios das nanopartículas de prata tratadas a uma concentração de 0,001; 0,01 e 0,1 M de AgNO_3 foram respectivamente: 45,10; 81,60 e 1187 nm. Os resultados corroboram com os apresentados por Husseiny et al. (2015) em relação à biossíntese de AgNPs tratadas em baixas concentrações de AgNO_3 , nos quais o excesso de enzimas extracelulares liberadas pelo *F. oxysporum* pode estar disponível no sistema. Contudo, pode não ter ocorrido uma produção mais elevada das nanopartículas devido à falta de uma quantidade mais elevada das biomoléculas secretadas extracelularmente pelo fungo ao qual são responsáveis pela transformação dos íons de prata em nanopartículas.

À medida que mais moléculas de AgNO_3 são fornecidas ao sistema, a biotransformação dos íons Ag^+ em Ag^0 aumenta proporcionalmente, sendo mediada pelas enzimas e demais biomoléculas liberadas pelo fungo (Figura 20b) até uma concentração limiar, neste caso 0,01 M. A adição de concentrações mais elevadas de AgNO_3 , tal como 0,1 M (Figura 20c), resulta na produção de AgNPs com tamanho elevado, atingindo a ordem dos μm , apresentando também um formato irregular. Isto pode significar que a maioria das enzimas celulares foram consumidas pelo processo de biorredução das nanopartículas, mostrando a alta capacidade das células para a redução da prata. Esses resultados concordam com os apresentados por Husseiny et al. (2015) que relataram uma concentração em 1,5 mM de AgNO_3 para a produção máxima de nanopartículas de prata.

As maiores nanopartículas de prata geradas no tratamento com 0,1 M de concentração de AgNO_3 resultou na aglomeração das nanopartículas. Isto é confirmado pelo potencial zeta medido com valor de -3,1 mV (Tabela 10) que corresponde a uma instabilidade muito elevada das partículas em suspensão.

O potencial zeta em função do pH para as nanopartículas de prata produzidas em diferentes concentrações de AgNO_3 (Figura 21) mostra que altas concentrações do sal de prata (0,1 M) correspondem à instabilidade e aglomeração das AgNPs. Mesmo em pH alcalino, os

valores de potencial zeta permaneceram em valores característicos para suspensões floculadas, isto é, valores absolutos próximos de zero (MIRHOSSEINI et al., 2008). Por outro lado, no tratamento com baixas concentrações do sal de prata (0,001 e 0,01 M), os valores de potencial zeta sob a variação do pH permaneceram inferiores a -30 mV, principalmente em níveis alcalinos de pH (Figura 21), caracterizando assim uma condição estável para as nanopartículas.

Figura 21 - Variação do potencial zeta em função do pH para as AgNPs biossintetizadas em diferentes concentrações de AgNO_3

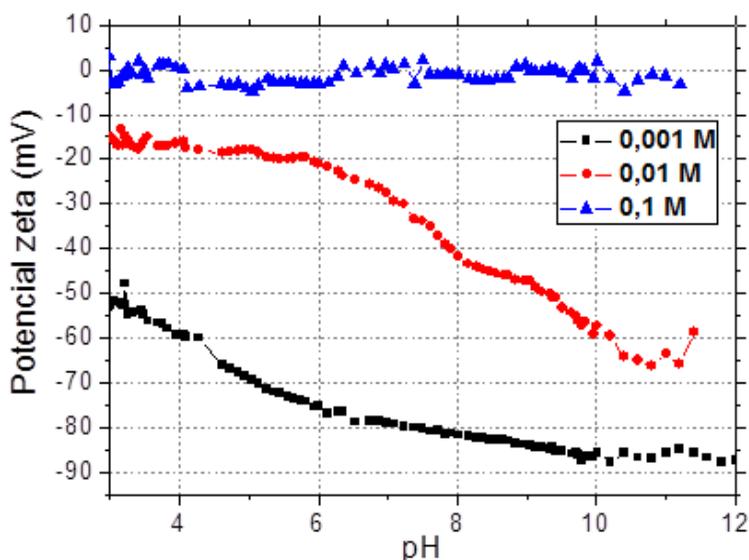


Tabela 10 - Valores numéricos do PZi e pH inicial das AgNPs produzidas em diferentes concentrações de AgNO_3 .

Concentração de AgNO_3	Potencial zeta após 5 dias de biorredução (PZ _i) (mV)	pH inicial
0,001 M	-3,1	5,9
0,01 M	-19,6	5,8
0,1 M	-66,2	5,7

De acordo com Nayak et al. (2011), a variação do pH no meio reacional contendo as AgNPs determinam a concentração de prótons

responsáveis por afetar diretamente as enzimas redutoras de nitrato presentes no filtrado fúngico. Em outro estudo, Maliszewska (2011) afirmou que em uma biossíntese fúngica de nanopartículas de prata trabalhando-se em pH alcalino, a síntese será mais rápida do que em condições ácidas. Sob condições alcalinas, as proteínas envolvidas na síntese podem ligar-se com a prata nas regiões tiol (-SH) formando uma ligação do tipo S-Ag, auxiliando assim, na conversão dos íons Ag^+ em Ag^0 . Além disso, a hidroxila (-OH) é necessária para a redução de íons metálicos. Por fim, na biossíntese sob condições alcalinas, a capacidade das enzimas responsáveis (não apenas a nitrato redutase) para a síntese das AgNPs aumenta significativamente (SANGHI & VERMA, 2009).

5.3.2 Variação do tamanho e estabilidade das AgNPs biossintetizadas sob diferentes quantidades de biomassa

O efeito da quantidade de biomassa fúngica no tamanho e estabilidade das AgNPs também foi estudado. Os resultados apresentados pela análise de DLS mostram que com o aumento da quantidade da biomassa fúngica em gramas, o tamanho médio das nanopartículas de prata também aumenta. Esse resultado é mostrado nos gráficos de distribuição de tamanho de partícula na Figura 22 (a, b, c), a qual mostra que para 5, 10 e 15 g de quantidade de biomassa, os tamanhos médios das nanopartículas de prata foram respectivamente 30,2; 47,7 e 71,6 nm (Tabela 11). Estes resultados concordam com os trabalhos desenvolvidos por Husseiny et al. (2015) e Birla et al. (2013). De acordo com os autores, a quantidade de biomassa desempenha um papel fundamental no mecanismo de biorredução dos íons Ag^+ para Ag^0 . O aumento da quantidade de biomassa no meio reacional permite uma liberação mais elevada das enzimas redutase e de outras proteínas responsáveis tanto pelo processo de biorredução como também pelo processo de estabilização das nanopartículas de prata.

Figura 22 - Distribuição cumulativa e percentual do tamanho das AgNPs biossintetizadas sob diferentes quantidades de biomassa fúngica em gramas: (a) 5 g; (b) 10 g e (c) 15 g

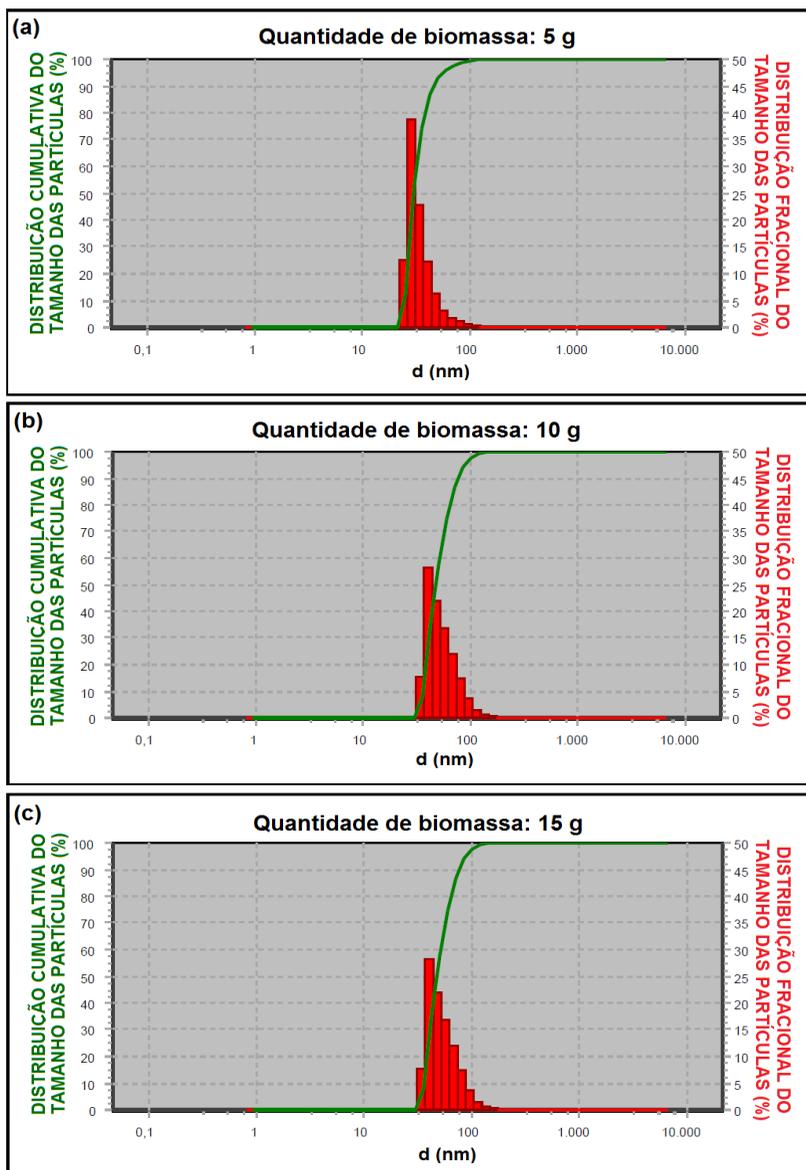


Tabela 11 - Tamanho médio das AgNPs em função da variação da quantidade de biomassa.

Tamanho médio das nanopartículas/Quantidade de biomassa	5 g	10 g	15 g
d_{50} (nm)	30,2	47,7	71,6

Os valores para a variação do potencial zeta em função do pH também corroboram a hipótese de que, para uma elevada quantidade de biomassa em gramas no meio reacional, o tamanho das nanopartículas de prata também aumentará (BIRLA et al., 2013). Nota-se que ao aumentar a quantidade de biomassa de 5 para 10 g e de 10 para 15 g; os valores iniciais do potencial zeta diminuíram de -33,2 para -50,8 mV e de -50,8 para -73,4 mV, respectivamente. O gráfico com a variação do potencial zeta em função do pH para as nanopartículas de prata produzidas com diferentes quantidades de biomassa é apresentado na Figura 23, e os valores do PZ_i e do pH inicial para cada quantidade do fungo utilizado são apresentados na Tabela 12.

Figura 23 - Variação do potencial zeta em função do pH para as AgNPs biossintetizadas com diferentes quantidades de biomassa fúngica

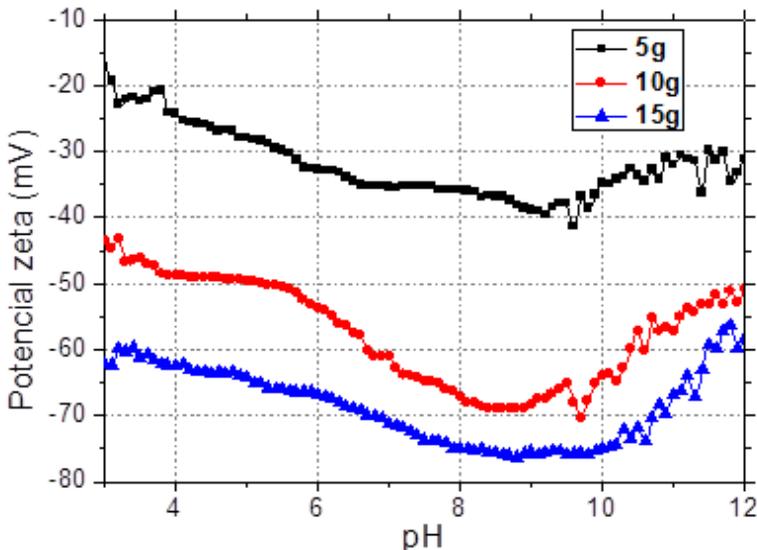


Tabela 12 - Valores numéricos do PZi e pH inicial das AgNPs produzidas com diferentes quantidades de biomassa fúngica.

Quantidade de biomassa	Potencial zeta após 5 dias de biorredução (PZ_i) (mV)	pH inicial
5 g	-33,2	5,3
10 g	-50,8	5,8
15 g	-73,4	5,2

De acordo com a Figura 23, nota-se também que para cada aumento na quantidade de biomassa, o potencial zeta apresentado pelas nanopartículas de prata tende a diminuir acentuadamente quando o meio reacional é sujeito a níveis de pH ácido. Mais uma vez, tal fato reforça a tese de que, em condições alcalinas, a biossíntese das nanopartículas de prata será mais eficiente, ou seja, geração de nanopartículas de prata estáveis será bem-sucedida. (BIRLA et al., 2013).

5.3.3 Variação do tamanho e estabilidade das AgNPs biossintetizadas em diferentes temperaturas de biorredução

Para estudar o efeito da temperatura no tamanho e estabilidade das AgNPs, a biorredução foi realizada em diferentes temperaturas: 20, 40 e 60 °C. Os resultados obtidos pelo DLS para o tamanho das nanopartículas de prata tratadas em diferentes temperaturas mostram que o maior tamanho das nanopartículas foi atingido a 60 °C, como mostrado na Figura 24.

De acordo com Birla et al. (2013) a temperatura adotada para promover a biossíntese é um dos fatores mais importantes em qualquer reação química e biológica, pois afeta diretamente a taxa de reação. O tamanho médio das nanopartículas de prata aumentou notavelmente à medida que a temperatura foi elevada: de 40 para 60 °C, no qual o tamanho médio das nanopartículas aumentou nos valores de 49,40 para 109,3 nm, respectivamente, como pode ser visualizado na Tabela 13. O aumento abrupto no tamanho das nanopartículas ocorreu entre as temperaturas de 40 a 60 °C, o que corrobora os resultados obtidos por Darroudi et al. (2011). Esses autores verificaram um aumento no tamanho das nanopartículas de prata à medida que a temperatura de tratamento foi aumentada. Nesse caso, foi atingido um limite de temperatura, na qual o crescimento das nanopartículas é interrompido e estas tendem a

aglomerar-se devido à desnaturação das proteínas responsáveis pela estabilização e ao efeito de proteção (capeamento) das nanopartículas.

Figura 24 - Distribuição cumulativa e percentual do tamanho das AgNPs biossintetizadas sob diferentes temperaturas de biorredução: (a) 20 °C; (b) 40 °C e (c) 60 °C

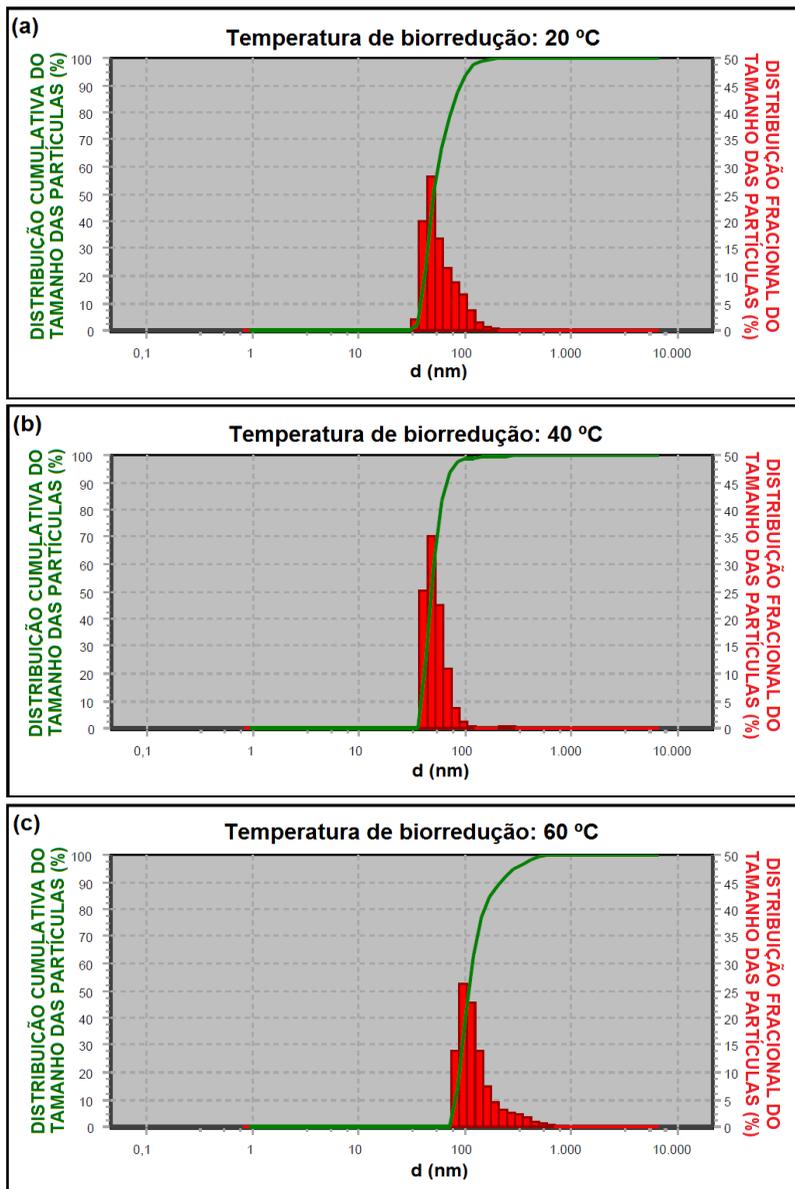


Tabela 13 - Tamanho médio das AgNPs em função da variação da temperatura de biorredução.

Tamanho médio das nanopartículas/Temperatura de biorredução	20 °C	40 °C	60 °C
d₅₀ (nm)	51,0	49,4	109,3

Os resultados da variação do potencial zeta em função do pH para as nanopartículas de prata biossintetizadas em diferentes temperaturas são mostradas na Tabela 14. No tratamento a 60 °C, as nanopartículas apresentaram maior tamanho, e também menor nível de estabilidade em relação às demais temperaturas. Nos ensaios empregando as temperaturas de 20 e 40 °C, como mostrado na Figura 25, as respectivas suspensões apresentaram valores de potencial zeta inicial inferiores às AgNPs tratadas a 60 °C (Tabela 14). Pôde-se notar também que, à medida que os valores de pH atingiram níveis alcalinos, os valores de potencial zeta para o tratamento com as nanopartículas de prata em diferentes temperaturas diminuíram, atingindo assim valores característicos para suspensões defloculadas, o que correspondem a um maior nível de estabilidade das nanopartículas (MIRHOSSEINI et al., 2008).

Figura 25 - Variação do potencial zeta em função do pH para as AgNPs biossintetizadas em diferentes temperaturas de biorredução

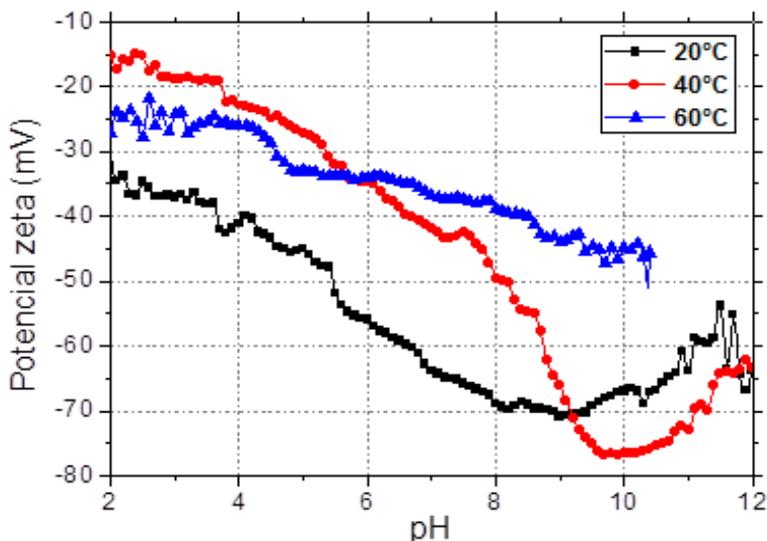


Tabela 14 - Valores numéricos do PZi e pH inicial das AgNPs produzidas em diferentes temperaturas de biorredução.

Temperatura de biorredução	Potencial zeta após 5 dias de biorredução (PZ _i) (mV)	pH inicial
20 °C	-51,9	5,5
40 °C	-42,6	5,5
60 °C	-33,9	5,4

5.3.4 Variação do tamanho e estabilidade das AgNPs biossintetizadas em função da idade do fungo

A penúltima análise de avaliação da variação do tamanho e estabilidade das AgNPs foi verificada variando-se a idade da estirpe fúngica. Para esse tratamento, cultivou-se a mesma estirpe (*Fusarium oxysporum*) nas mesmas condições de crescimento e recolheu-se a biomassa em períodos de 10, 20 e 30 dias de crescimento. Os resultados

mostraram que, de acordo com a idade do fungo, a biossíntese utilizando cepas mais jovens resultou na produção de nanopartículas com tamanho médio menor, como mostrado na Figura 26 (a, b, c), no qual pode-se observar que o menor tamanho médio apresentado foi de 37,7 nm para a estirpe com 10 dias de crescimento (Tabela 15). Os resultados concordam com os apresentados por Husseiny et al. (2015), ao qual demonstra que as nanopartículas de prata biossintetizadas por *Fusarium oxysporum* com estirpes mais jovens mostraram maior eficiência na biossíntese em termos de menor tamanho e estabilidade via potencial zeta (Figura 27) quando comparadas com cepas com maior tempo de incubação.

Figura 26 - Distribuição cumulativa e percentual do tamanho das AgNPs biossintetizadas com variação na idade do fungo *Fusarium oxysporum*: (a) 10 dias; (b) 20 dias e (c) 30 dias

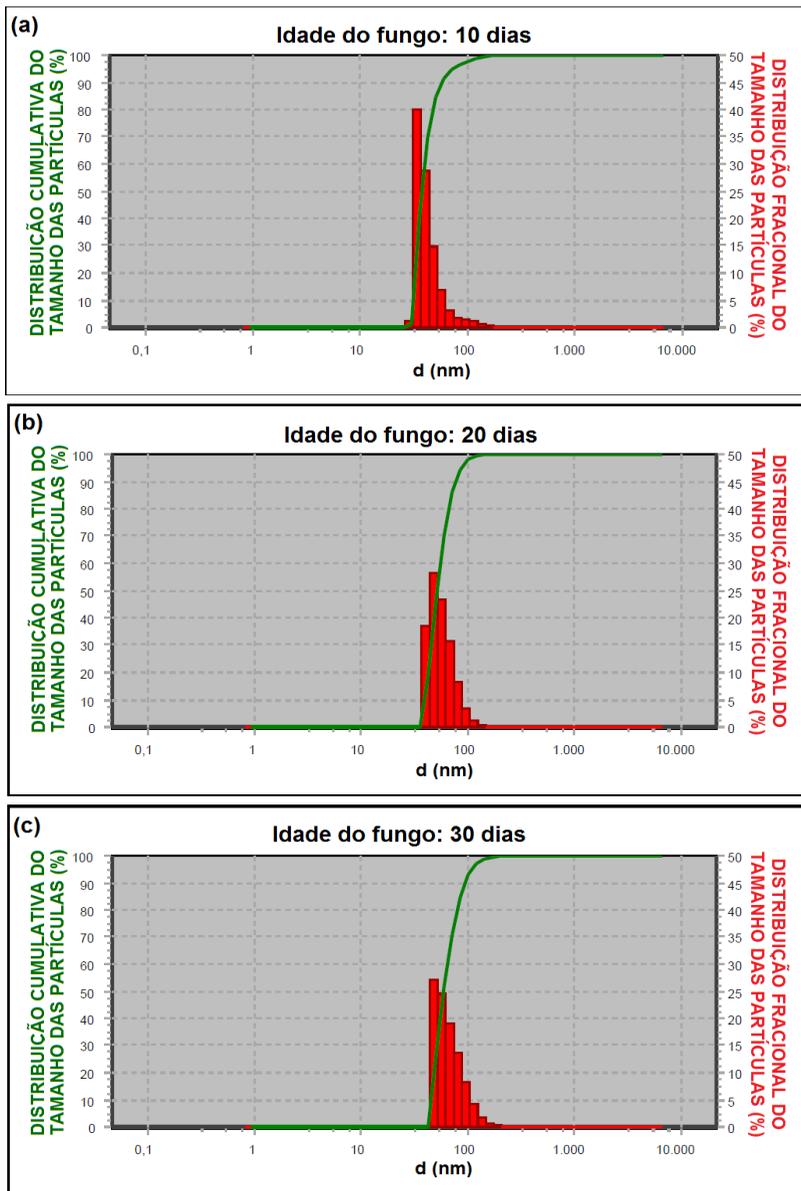


Tabela 15 - Tamanho médio das AgNPs em função da variação na idade do fungo *Fusarium oxysporum*.

Tamanho médio das nanopartículas/Idade do fungo	10 dias	20 dias	30 dias
d₅₀ (nm)	37,7	52,1	60,0

Os resultados da análise do potencial zeta em função do pH para a biossíntese das AgNPs variando a idade de crescimento do *Fusarium oxysporum* são mostrados na Figura 27. De acordo com os resultados obtidos, nota-se que em valores de pH entre médio e alcalino (entre 7,0 e 12,0) os valores de potencial zeta permaneceram em uma faixa caracterizada para suspensões estáveis: -42,1, -39,1 e -44,2 mV para os tratamentos com o *Fusarium oxysporum* com 10, 20 e 30 dias de idade de crescimento, respectivamente (Tabela 16). Pode-se concluir, nesse caso, que as nanopartículas de prata permaneceram estáveis mesmo com o uso da estirpe fúngica de até 30 dias de crescimento, confirmando que o *Fusarium oxysporum* é um microrganismo eficiente para a biossíntese de AgNPs nas condições executadas.

Figura 27 - Variação do potencial zeta em função do pH para as AgNPs biossintetizadas com variação da idade de crescimento do *Fusarium oxysporum*

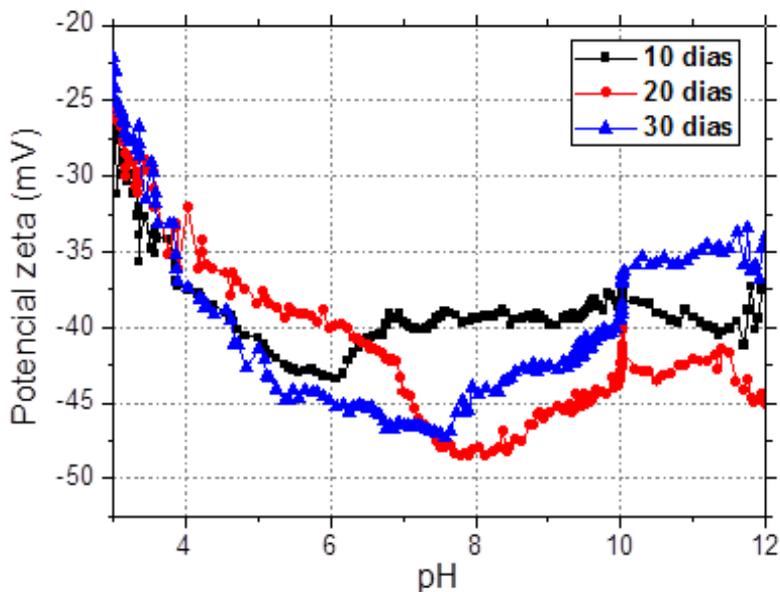


Tabela 16 - Valores numéricos do PZ_i e pH inicial das AgNPs produzidas variando a idade do fungo *Fusarium oxysporum*.

Idade do fungo	Potencial zeta após 5 dias de biorredução (PZ _i) (mV)	pH inicial
10 dias	-42,1	5,2
20 dias	-39,2	5,5
30 dias	-44,2	5,4

5.3.5 Variação do tamanho e estabilidade das AgNPs em função do tempo após a biossíntese (idade das nanopartículas)

A última análise de avaliação da variação do tamanho e estabilidade das AgNPs em diferentes condições de biossíntese foi verificada comparando o tamanho e estabilidade das nanopartículas após diferentes intervalos de tempo pós-biossíntese, ou seja, variando a idade

das nanopartículas de prata a fim de se verificar se ocorreria um aumento abrupto no tamanho e aglomeração das nanopartículas mesmo após 30 dias da adição do sal de prata no filtrado fúngico, caracterizando assim o 1º dia de biossíntese.

Os resultados da distribuição cumulativa e percentual do tamanho das nanopartículas são apresentados na Figura 28. Pôde-se notar um aumento gradual no tamanho médio das AgNPs de acordo com a idade das nanopartículas. Para as nanopartículas com tempo pós-biossíntese de 10, 20 e 30 dias, os tamanhos médios apresentados foram de 38,9; 49,5 e 78,50 nm, respectivamente (Tabela 17). O aumento gradativo no tamanho médio das AgNPs era esperado. De acordo com Ledwith et al. (2007) e Rai, Yadav, & Gade (2009), os principais agentes responsáveis pelo mecanismo de estabilização e consequentemente repulsão entre as nanopartículas de prata biológicas são as proteínas biossintetizadas pelo próprio microrganismo, permitindo que as nanopartículas permaneçam separadas uma das outras evitando assim a aglomeração das mesmas. Com o passar do tempo, é inevitável que tais biomoléculas que circundam as nanopartículas percam sua atividade, acarretando assim na interação entre as nanopartículas e, consequentemente elevando o seu tamanho médio das mesmas.

Figura 28 - Distribuição cumulativa e percentual do tamanho das AgNPs biossintetizadas com variação na idade das nanopartículas (intervalo pós-biossíntese): (a) 10 dias; (b) 20 dias e (c) 30 dias

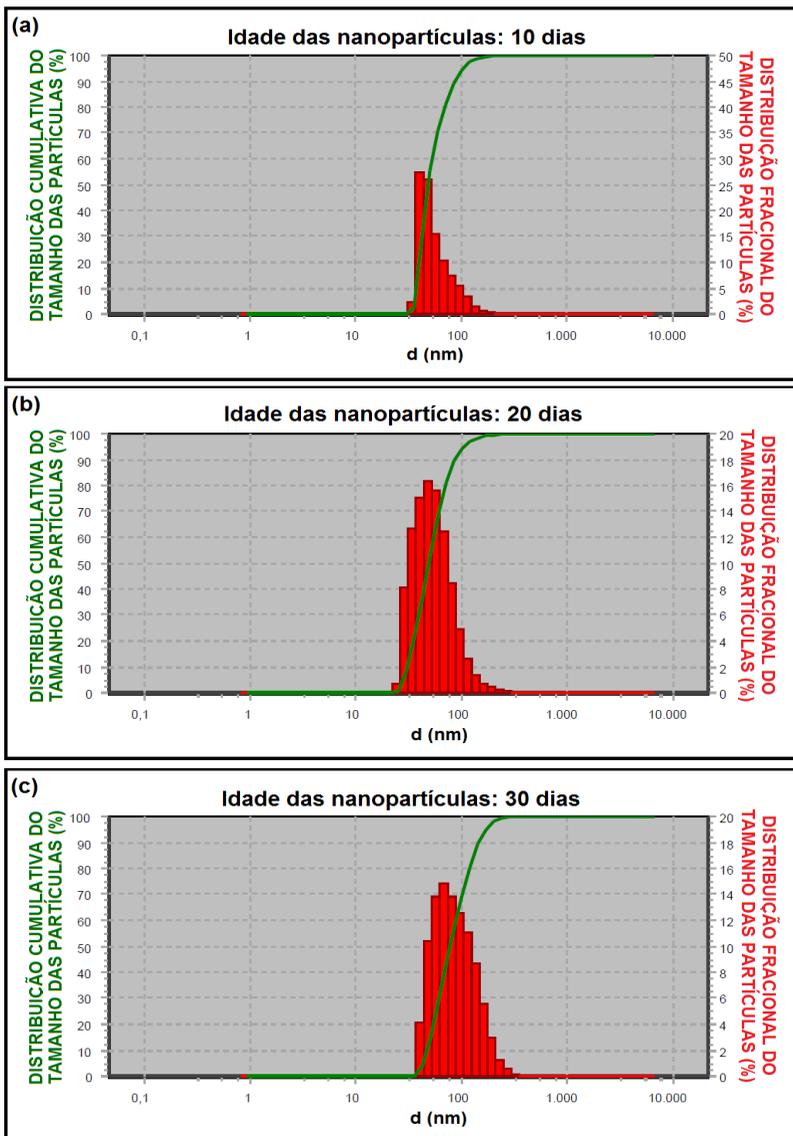


Tabela 17 - Tamanho médio das AgNPs em função da variação na idade das nanopartículas.

Tamanho médio das nanopartículas/Idade das nanopartículas	10 dias	20 dias	30 dias
d₅₀ (nm)	38,9	49,5	78,5

O PZ medido em diferentes intervalos de tempo após a biossíntese, corrobora a tese de que as biomoléculas responsáveis pelo mecanismo de estabilização das AgNPs vão perdendo a atividade com o passar do tempo, acarretando em uma aglomeração progressiva das AgNPs. A Figura 29 mostra a variação do PZ em função do pH para as AgNPs medidas em diferentes intervalos de tempo pós-biossíntese. Nota-se que, nas condições de biossíntese empregadas no ensaio, mesmo após 30 dias de biorredução, as AgNPs apresentaram um valor de PZ_i característico para nanopartículas estáveis nos valores de pH aplicados na elaboração do meio reacional. Os valores do potencial zeta (PZ_i) para as AgNPs biossintetizadas após 10, 20 e 30 dias foram respectivamente -60,3; -46,9 e -36,7 mV, (Tabela 18) valores esses considerados dentro da faixa de estabilidade para as nanopartículas (MIRHOSSEINI et al., 2008; MOHANRAJ & CHEN, 2006).

Figura 29 - Variação do potencial zeta em função do pH para as AgNPs biossintetizadas com variação da idade das nanopartículas (intervalo pós-biossintese)

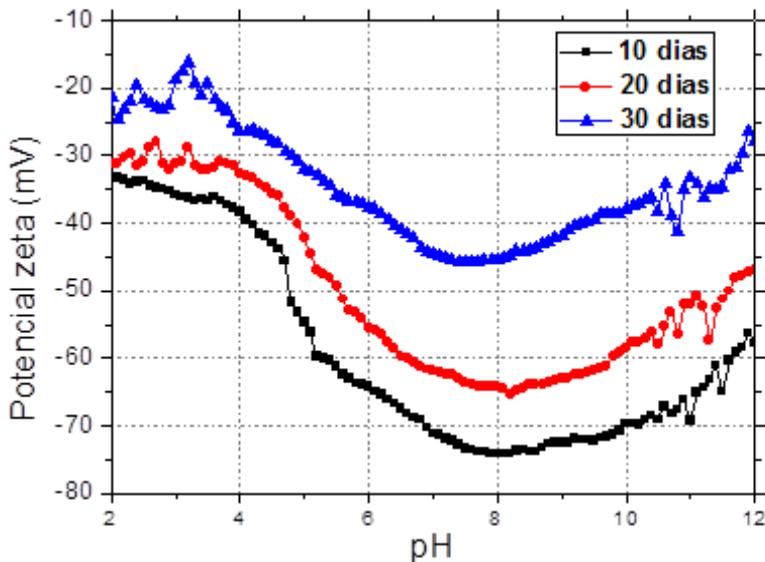


Tabela 18 - Valores numéricos do PZi e pH inicial das AgNPs produzidas variando a idade nanopartículas (intervalo pós-biossintese).

Idade das nanopartículas	Potencial zeta após 5 dias de biorredução (PZi) (mV)	pH inicial
10 dias	-60,3	5,4
20 dias	-46,9	5,2
30 dias	-36,7	5,7

Um resumo dos resultados numéricos do tamanho médio bem como do potencial zeta inicial para todos os ensaios envolvendo a produção das AgNPs com a variação dos parâmetros de biossintese são apresentados na Tabela 19.

Tabela 19 - Resumo dos valores numéricos do tamanho médio e potencial zeta após o intervalo de biorredução (PZ_i) das AgNPs biossintetizadas por intermédio do *Fusarium oxysporum*.

Parâmetros de biossíntese	Tamanho médio da nanopartícula (nm)	Potencial zeta após 5 dias de biorredução (PZ_i) (mV)	pH inicial
Controle padrão	34	-45,9	4,4
Concentração de AgNO₃ (M)			
0.1	1187	-3,1	5,9
0.01	81,6	-19,6	5,8
0.001	45,1	-66,2	5,7
Quantidade de biomassa (g)			
5	30,2	-33,2	5,3
10	47,7	-50,8	5,8
15	71,7	-73,4	5,2
Temperatura de biorredução (°C)			
20	51	-51,9	5,5
40	49,4	-42,6	5,5
60	109,3	-33,9	5,4
Idade do fungo (dias)			
10	37,7	-42,1	5,2
20	52,1	-39,1	5,5
30	60	-44,2	5,4
Idade das nanopartículas (dias)			
10	38,9	-60,3	5,4
20	49,5	-46,9	5,2
30	78,5	-36,7	5,7

De acordo com a Tabela 19 nota-se que diante de todas as análises envolvendo a síntese das AgNPs com variação nas condições de biossíntese, em todos os ensaios as nanopartículas apresentaram valores de tamanho médio abaixo de 100 nm, e valores de potencial zeta abaixo de -30 mV, ambas as avaliações tornam as AgNPs passíveis a aplicação. A exceção foi no ensaio envolvendo uma alta concentração do sal redutor

de prata (0,1 M de AgNO_3), onde as nanopartículas apresentaram-se aglomeradas com tamanho médio de 1187 nm.

5.4 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA

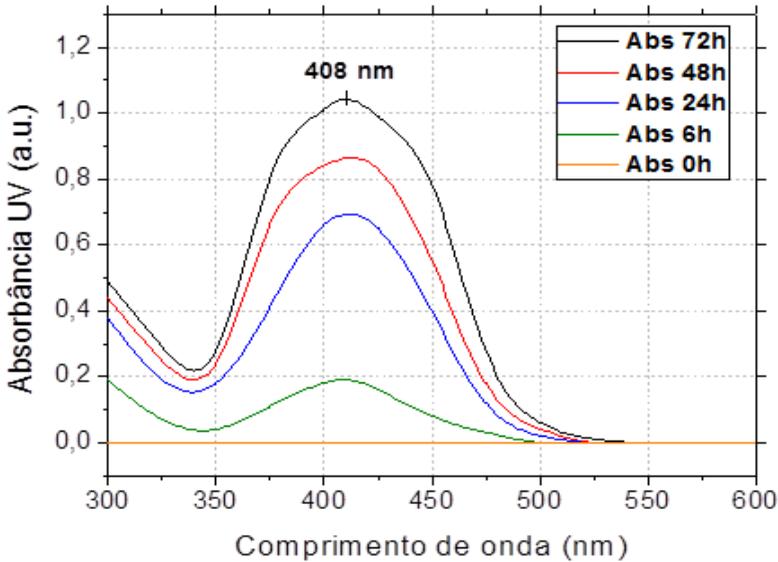
Antes de dar início a descrição dos resultados referentes a caracterização das AgNPs, torna-se importante ressaltar que todas as técnicas de caracterização foram realizadas nas amostras contendo as nanopartículas pertencente ao controle padrão de biossíntese (10^{-3} M de AgNO_3 ; 10 g de biomassa fúngica; temperatura de biorredução de 28 °C e tempo de crescimento do fungo de 5 dias).

5.4.1 Espectroscopia UV-Vis

A biossíntese extracelular das nanopartículas de prata por intermédio do *Fusarium oxysporum* envolve a biorredução de íons de prata no filtrado biológico. O filtrado fúngico após adição de AgNO_3 (1 mM) foi submetido a medições ópticas por espectrofotômetro UV-Vis. Os espectros em UV-Vis foram registrados a partir das amostras contidas nas cubetas em diferentes intervalos de tempo de reação e estão apresentados na Figura 30.

A análise em UV-Vis mostrou que o pico de ressonância plasmônica de superfície encontra-se fortemente acentuada em 408 nm e aumenta claramente em intensidade com o tempo até 72 h de reação. Esse resultado concorda com Gajbhiye et al. (2009), que constataram que esse pico da banda de plasmon medido em absorvância é específico para nanopartículas de prata biossintetizadas por *F. oxysporum* nas mesmas condições descritas nesse trabalho (10^{-3} M de AgNO_3 ; 10 g de biomassa fúngica; temperatura de biorredução de 28 °C e tempo de crescimento do fungo de 5 dias).

Figura 30 - Espectros em UV-Vis registrados em função do tempo de reação de biossíntese de nanopartículas de prata mediados por *Fusarium oxysporum*. O pico da banda de plasmon encontra-se na região de 408 nm



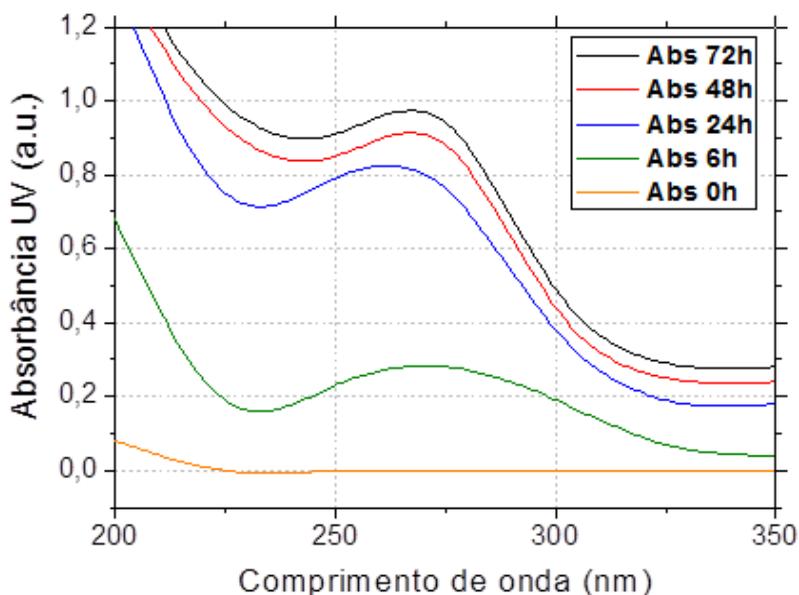
Um espectro UV-Vis em uma região de baixo comprimento de onda também foi registrado a partir do meio reacional em diferentes tempos de reação de biossíntese. Uma banda de plasmon de absorção na região de 260 nm é claramente visível e é atribuída a excitações eletrônicas em resíduos de triptofano e tirosina das proteínas biossintetizadas pelo *Fusarium oxysporum* (Figura 31) (AHMAD et al., 2003; EFTINK & GHIRON, 1981).

O comprimento de onda registrado na Figura 31 (260 nm após 72 horas) indica a liberação de proteínas extracelulares na solução coloidal. Assim, não somente a enzima redutase dependente de NADPH (forma reduzida de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) específica para *F. oxysporum*, como sugerido por Fayaz et al. (2010), está envolvida na redução de Ag^+ para Ag^0 , mas também outros complexos de natureza proteica participam do mecanismo de biorredução.

Embora ainda não totalmente esclarecida, a teoria mais aceita atualmente para o mecanismo exato da biossíntese de nanopartículas de prata pressupõe que os íons de prata gerados pela adição de AgNO_3 ao

filtrado fúngico requerem a enzima nitrato redutase dependente de NADPH para a sua redução (Ag^+ a Ag^0) (LABRENZ et al., 2000; ROH et al., 2001). Nesse caso, o complexo enzimático responsável pelo processo de biorredução de íons de prata foi sintetizado e liberado pelo *Fusarium oxysporum* para o seu ambiente extracelular. Portanto, conforme descrito por Fayaz et al. (2010) e Ahmad et al. (2003), os resultados indicam que o possível mecanismo de redução de Ag^+ para Ag^0 e consequentemente a formação das AgNPs ocorre por meio da conjugação entre os elétrons liberados pelos íons de prata juntamente com a participação da enzima redutase dependente de NADPH.

Figura 31 - Espectro de absorção UV-Vis em função do tempo de reação registrado em valores de baixo comprimento de onda para as AgNPs biossintetizadas mediado pelo *Fusarium oxysporum*



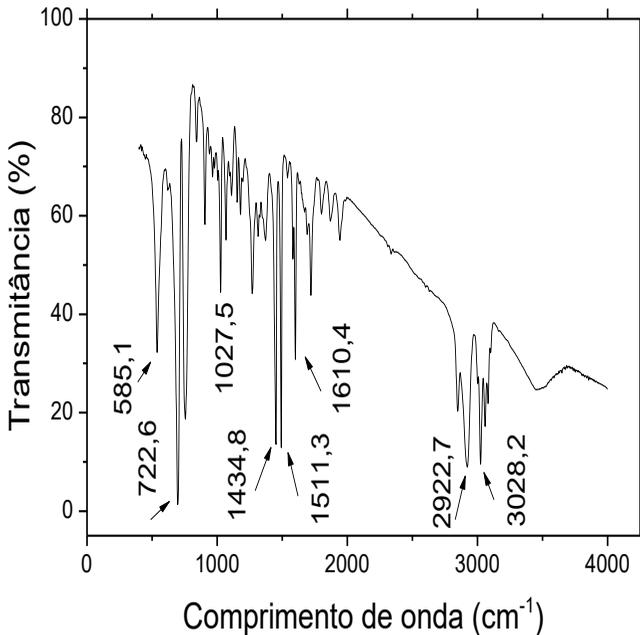
5.4.2 Espectroscopia FTIR

As amostras contendo as nanopartículas de prata em pó seco foram analisadas em FTIR para identificar as possíveis biomoléculas responsáveis pela redução dos íons Ag^+ com a consequente formação das

AgNPs no filtrado fúngico. O espectro de FTIR é apresentado na Figura 32.

As medições em FTIR das amostras de AgNPs secas e em pó mostraram a presença de oito bandas a 585,1; 722,6; 1027,5; 1434,8; 1511,3; 1610,4; 2922,7 e 3028,2 cm^{-1} (Figura 39). As faixas em 1511,3 e 1610,4 cm^{-1} foram identificadas como bandas amida II e amida I, respectivamente, que surgiram devido à vibrações de estiramento carbonílico e de vibrações de estiramento nas ligações tipo -N-H nos grupos amida das proteínas (BIRLA et al., 2013; GAJBHIYE et al., 2009).

Figura 32 - Espectro em FTIR das AgNPs biossintetizadas por intermédio do *Fusarium oxysporum*



Além disso, o pico em torno de 1025 cm^{-1} pode ser atribuído à absorção característica de ligações do tipo -C-O-C- ou -C-O- (BIRLA et al., 2013). Finalmente, as bandas em 585,1 e 722,6 cm^{-1} foram

identificadas como hidrocarbonetos aromáticos e ligações do tipo -C-H- de benzenos substituídos, respectivamente (KATHIRESAN et al., 2010). A presença de grupos aromáticos contidos no filtrado fúngico corrobora a presença dos aminoácidos aromáticos tirosina e triptofano responsáveis pelo espectro na região de baixo comprimento de onda previamente descrita nos resultados da análise por espectroscopia UV-Vis. As bandas restantes correspondem ainda à presença de outros grupos funcionais tais como alcanos cíclicos, ciclo-hexano e metileno com alongamento assimétrico.

Os resultados obtidos por FTIR suportam os resultados descritos por Gole et al. (2001) e Gajbhiye et al. (2009), que relataram que as proteínas biossintetizadas pelo fungo na síntese da nanopartícula podem se ligar a nanopartículas por meio de grupos amina livres, resíduos de cisteína ou por meio da atração eletrostática de grupos carboxilato carregados negativamente em enzimas presentes na parede celular do *F. oxysporum*. Essa evidência sugere que a liberação de moléculas de proteínas extracelulares possivelmente desempenha a função de formação e estabilização das AgNPs no filtrado fúngico (AHMAD et al., 2003; FAYAZ et al., 2010; HUSSEINY et al., 2015). A Tabela 20 resume os principais picos obtidos no FTIR no extrato obtido na biossíntese das nanopartículas de prata.

Tabela 20 - Espectros no FTIR e seus respectivos grupos funcionais encontrados no filtrado fúngico as AgNPs biossintetizadas.

Grupo funcional	Comprimento de onda detectado (cm⁻¹)	Comprimento de onda referencial (cm⁻¹)	Referência
Alcanos cíclicos	3028,2	3100 – 2990	Silverstein; Webster; Kiemle, (2006)
Grupos metileno com estiramento assimétrico (CH₂)	2922,7	2925	Silverstein; Webster; Kiemle, (2006)
Amida I e II	1610,4 e 1511,3	1630 – 1513	Birla et al., (2013); Gajbhiye et al., (2009)
Ciclohexanos	1434,8	1436	Silverstein; Webster; Kiemle, (2006)
Éteres e ligações do tipo -C-O-	1027,5	1025	Birla et al., (2013); Husseiny; Salah; Anter, (2015)
Hidrocarbonetos aromáticos	722,6	900 – 675	Kathiresan et al., (2010); Silverstein; Webster; Kiemle, (2006)
Ligações tipo -C-H- de benzenos substituídos	585,1	600 – 420	Silverstein; Webster; Kiemle, (2006)

5.4.3 Espectroscopia de absorção atômica por chama (FAAS)

A presença de íons de prata biorreduzidos bem como a sua quantidade foram detectados por FAAS. A análise foi realizada nas amostras contendo as AgNPs variando a concentração de AgNO_3 (10^{-3} , 10^{-2} e 10^{-1} M) – as mesmas amostras utilizadas na avaliação de tamanho e estabilidade com variação na concentração de AgNO_3 – mantendo as demais condições de biossíntese de acordo com o controle padrão.

De acordo com a análise em FAAS, a presença de AgNPs biorreduzidas foi detectada. Os resultados quantitativos em mg/L das nanopartículas de prata formadas estão dispostos na Tabela 21.

Tabela 21 - Resultados numéricos da análise realizado em FAAS das concentrações de prata reduzidas em função da concentração inicial de nitrato de prata adicionada ao filtrado fúngico.

Amostra	Concentração de AgNO_3 (M)	Concentração de nanopartículas de prata (mg/L)
I	0,001	110
II	0,01	948
III	0,1	9500

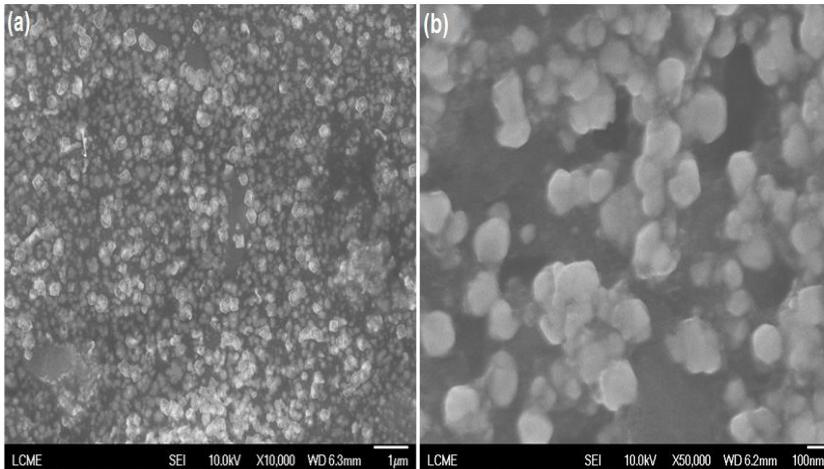
Os resultados obtidos corroboram o trabalho desenvolvido por Hussein et al. (2015) e Birla et al. (2013). No presente estudo, as maiores concentrações de AgNO_3 no filtrado fúngico resultaram em maior quantidade de nanopartículas de prata formadas (Tabela 21). Isso é devido a uma condição em que a presença de uma maior quantidade de substrato resulta em uma biorredução rápida e, conseqüentemente, na formação de maiores quantidades de nanopartículas de prata. As análises em FAAS nas amostras contendo AgNO_3 em concentrações de 10^{-3} , 10^{-2} e 10^{-1} M resultaram nas respectivas concentrações de AgNPs formadas: 110; 948 e 9500 mg/L (Tabela 21).

5.4.4 Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (MEV-EC) e Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

As análises em MEV-EC e MET foram utilizadas para determinar o formato e o tamanho das nanopartículas de prata. As imagens em MEV-EC estão apresentadas na Figura 33. A partir dos resultados obtidos pelo MEV-EC, pode-se observar a presença das

AgNPs com morfologia variável. A partir da ampliação em 50000× (Fig. 33b), pode-se concluir que as nanopartículas possuem formato predominantemente esférico.

Figura 33 - Micrografia em MEV-EC das nanopartículas de prata biossintetizadas por intermédio do *Fusarium oxysporum*: (a) aumento em 10000x; (b) aumento em 50000x



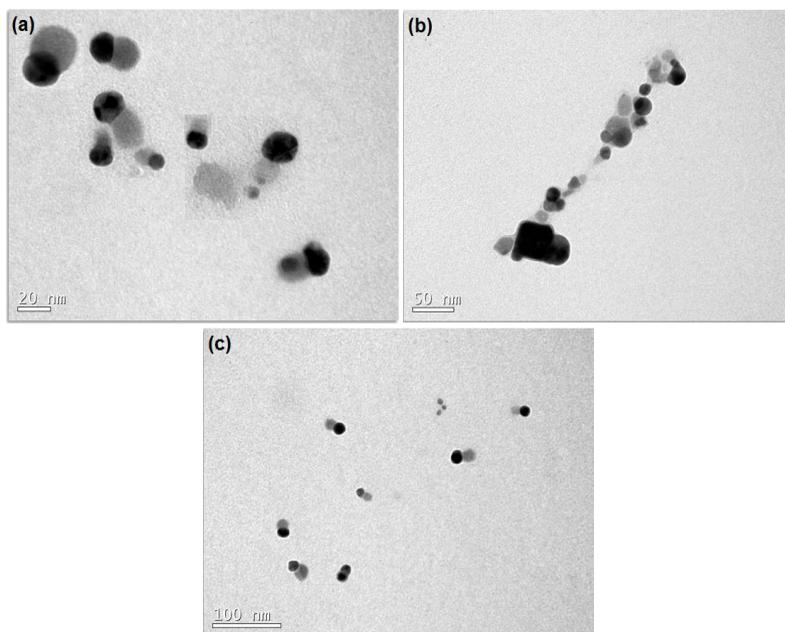
Fonte: Do autor

Os resultados da análise em MET é mostrado na Figura 34 (a, b, c). As imagens em MET confirmam a presença de nanopartículas de prata apresentando também formato esferoidal e uniformemente distribuídos (monodispersos) sem a detecção de aglomeração. O tamanho médio das nanopartículas foi de 38 nm, resultado esse aproximado ao apresentado pela análise em DLS do controle padrão: 34 nm. Segundo Bhainsa & D'Souza (2006), a variação na forma e tamanho das nanopartículas sintetizadas por sistemas biológicos, assim como apresentadas nas imagens no MET (Figura 34) é bastante comum.

Muitos relatos forneceram evidências de AgNPs biossintetizadas extracelularmente por microrganismos em imagens de MET. Basavaraja et al. (2008), relataram em um estudo envolvendo a biossíntese de AgNPs por intermédio do fungo *Fusarium semiseptum* que as nanopartículas de prata variaram em tamanho de 8 a 60 nm, com polidispersidade onde as AgNPs apresentaram formato esferoidal. El-Rafie et al. (2012), também relataram a biossíntese de nanopartículas de prata por intermédio do

fungo *Fusarium solani*. Nesse estudo, as nanopartículas apresentaram tamanho médio na de 8-15 nm, com formato arredondado.

Figura 34 - Micrografias em MET das nanopartículas de prata biossintetizadas por intermédio do fungo *Fusarium oxysporum*, em três escalas diferentes: (a) 20 nm; (b) 50 nm e (c) 100 nm

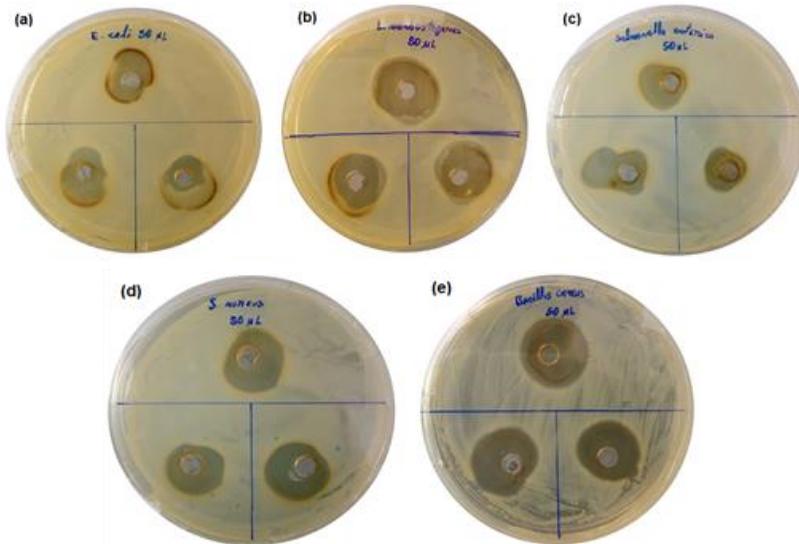


Fonte: Do autor

5.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA

A atividade antimicrobiana das nanopartículas de prata foi verificada pela medição dos halos de inibição em placas de Petri das cepas bacterianas tratadas com diferentes quantidades da solução contendo as AgNPs. A Figura 42 mostra as fotografias dos testes de perfuração em ágar mostrando as zonas de inibição para o tratamento em cada quantidade da solução contendo as AgNPs.

Figura 35 - Testes de medição dos halos de inibição pelo método de perfuração em ágar para as cepas bacterianas tratadas com 50 μ L da solução contendo as AgNPs. São ilustradas as seguintes cepas: (a) *E. coli*, (b) *Listeria monocytogenes*, (c) *Salmonella enterica*, (d) *Staphylococcus aureus* e (e) *Bacillus cereus*



Fonte: Do autor

Pode-se observar que para o tratamento com volume de 50 μ L da solução contendo as nanopartículas de prata, todas as cepas bacterianas foram sensíveis ao teste, formando halos de inibição ao redor dos poços perfurados no ágar. Pôde-se comprovar também que o diâmetro da zona de inibição aumentou gradativamente à medida em que se elevou as quantidades da solução contendo as AgNPs. A Tabela 22 apresenta os resultados numéricos dos diâmetros dos halos de inibição para cada cepa bacteriana em comparação com o controle positivo, lembrando que, como no controle negativo foi utilizada água destilada estéril, para este tratamento não houve a aparência de halos de inibição.

Tabela 22 - Tamanho médio dos halos de inibição dos ensaios contendo as cepas bacterianas tratadas com diferentes quantidades da solução contendo as AgNPs. Os resultados foram comparados com o controle positivo.

Microorganismos utilizados	Tamanho médio dos halos de inibição (mm)				
	Controle (+) (50 µL do antibiótico)	20 µL (AgNPs)	30 µL (AgNPs)	40 µL (AgNPs)	50 µL (AgNPs)
<i>Escherichia coli</i>	22,4	15,6	20,7	22,1	23
<i>L. monocytogenes</i>	25,2	15,9	15,9	19,4	26,7
<i>S. aureus</i>	22,7	19	22,2	22,3	23,2
<i>Salmonella enterica</i>	22,2	16,5	18,7	18,9	19,7
<i>Bacillus cereus</i>	24,8	17,3	20,2	25,3	26,8

De acordo com os resultados expostos na Tabela 22, observou-se que para a mesma quantidade do antibiótico utilizado no tratamento (50 µL) com as bactérias, todos os ensaios executados com 50 µL da solução contendo as nanopartículas de prata obtiveram tamanhos médio dos halos maiores do que o controle positivo. A única exceção foi para a *Salmonella enterica*, cujo tratamento com 50 µL de AgNPs, resultou em um halo de inibição foi de 19,7 mm, sendo menor do que com o tratamento com amoxicilina, que apresentou tamanho médio do halo de 22,2 mm.

Os resultados são satisfatórios para o tratamento das cepas bacterianas com as AgNPs, visto que estes apresentaram tamanhos de halos significativos para o tratamento com as nanopartículas. Os resultados de outros autores mostraram que as células bacterianas tratadas com as nanopartículas apresentaram danos significativos, que se caracterizou principalmente pela formação de poros tanto nas paredes celulares quanto na membrana plasmática das cepas bacterianas tratadas (KHATOON et al., 2015). Parashar et al. (2011), verificaram a eficiência da atividade antimicrobiana de nanopartículas de prata no tratamento com *E. coli*, foi observado também que a partir das análises de medição do tamanho médio dos halos de inibição em testes de disco difusão juntamente com micrografias em MET, a ocorrência de danos celulares devido à aparição de poros na parede celular da célula microbiana.

Outros autores que corroboram os resultados obtidos nesse trabalho são relatados. Cho et al. (2005), verificaram a eficiência antimicrobiana de AgNPs a partir de testes de medição do tamanho de halos de inibição por perfuração em ágar contra *E. coli* e *S. aureus*. Nesse estudo, foi possível verificar a concentração inibitória mínima de 5 e 10 mg/L de AgNPs, respectivamente. Em outro estudo, Khatoon et al. (2015), analisaram a eficiência antimicrobiana de AgNPs biossintetizadas por *Artemisia annua* por testes de perfuração de poços a partir da medição do tamanho médio dos halos de inibição no tratamento utilizando entre outras cepas bacterianas, a *E. coli* e *S. aureus*. Aqui, o maior tamanho médio de halo obtido foi de 13 e 16,5 mm para *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente, após tratamento com 20 µg de AgNPs.

Outro teste de avaliação do potencial antimicrobiano das nanopartículas de prata foi a avaliação do crescimento de *E. coli* e *L. monocytogenes* tratados com diferentes concentrações de nanopartículas de prata, seguido da determinação da CIM para ambas bactérias utilizadas. A escolha das cepas utilizadas basearam-se no fato das diferenças estruturais da parede celular em ambas as bactérias, caracterizando o *E. coli* e *L. monocytogenes* como gram-negativa e gram-positiva, respectivamente.

É importante ressaltar que a variação no valor da concentração inibitória mínima pode ser devido à diferença na morfologia estrutural de cada estirpe. Consequentemente, a disposição estrutural da parede celular da célula bacteriana possui grande influência no mecanismo bioquímico de interação e adsorção das nanopartículas de prata no interior da célula bacteriana e em sua ação danosa antimicrobiana na célula (KHATOON et al., 2015).

Os gráficos com o comportamento das curvas de crescimento descritos em termos de densidade ótica (DO) de *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes* tratados com diferentes concentrações de nanopartículas de prata são mostrados nas Figuras 43 e 44, respectivamente. A curva representando o controle negativo foi inserida com o objetivo de comparar o efeito nocivo das nanopartículas sobre os microrganismos juntamente com um tratamento com a ausência das nanopartículas.

Figura 36 - Curva de crescimento de *Escherichia coli* em função do tempo para as células tratadas com diferentes concentrações de nanopartículas de prata

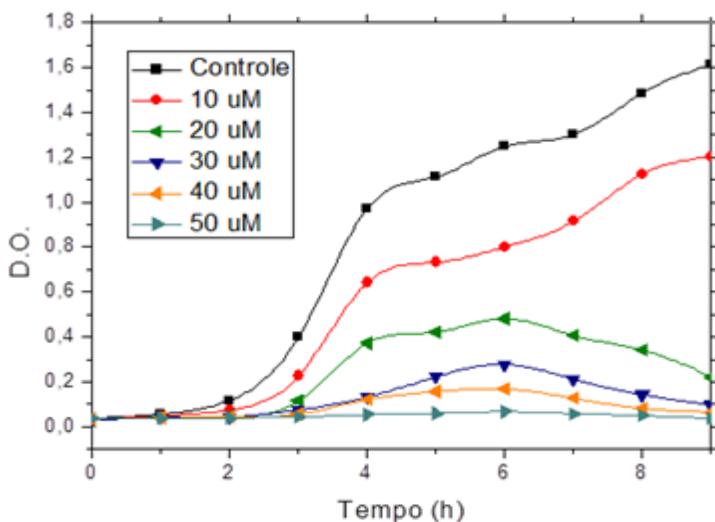
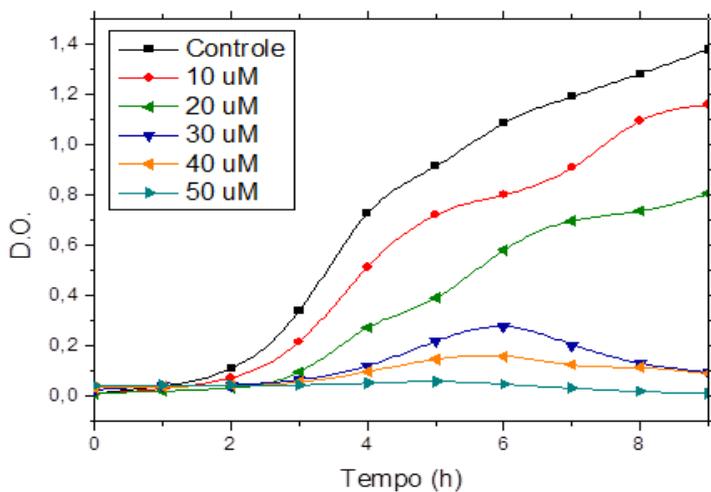


Figura 37 - Curva de crescimento de *Listeria monocytogenes* em função do tempo para as células tratadas com diferentes concentrações de nanopartículas de prata.



Nessa etapa do trabalho foi estudado o efeito bactericida das AgNPs em duas bactérias representativas, *E. coli* e *L. monocytogenes*, e como o crescimento de ambas é afetado pela presença das nanopartículas. O crescimento bacteriano foi medido utilizando DO. A utilização da DO para monitorar o crescimento sofre de certas limitações, nomeadamente porque não discrimina as células vivas e mortas. Porém, apesar disso, continua a ser uma técnica amplamente utilizada devido à sua velocidade e simplicidade dos resultados (MYERS, CURTIS, & CURTIS, 2013). Como o objetivo nessa etapa do trabalho foi estudar o efeito das AgNPs sobre o crescimento bacteriano, a utilização da DO atua como uma ferramenta mais direta.

A partir dos resultados obtidos do comportamento do crescimento microbiano das bactérias tratadas com as AgNPs, observa-se um crescimento acentuado em ambas as cepas no tratamento sem as nanopartículas, nesse caso o controle adotado (Figura 36 e 37). Para ambas as bactérias, *E. coli* e *L. monocytogenes*, mesmo após 9 h, o microrganismo ainda estava em fase exponencial de crescimento, conforme as curvas representativas do controle. Nota-se a partir dos valores de DO que, para o tratamento sem a presença das nanopartículas, o crescimento do *E. coli* foi mais acentuado do que apresentado pela *L. monocytogenes*, visto que após 9 h após o inóculo, o *E. coli* atingiu valores mais elevados de DO.

Os resultados também indicam o efeito gradativo do aumento da concentração das AgNPs na interrupção do crescimento microbiano. Em ambos os ensaios com *E. coli* e *L. monocytogenes*, nota-se que, com o aumento da concentração das nanopartículas, o crescimento microbiano é retardado. Isso pode ser visto claramente no tratamento de ambas as bactérias com 20 μM da solução contendo as AgNPs (Figura 36 e 37). Percebe-se que para *E. coli*, essa concentração de nanopartículas (20 μM) possuiu um efeito danoso à célula microbiana em comparação com *L. monocytogenes*, visto que para *E. coli* a fase exponencial entrou em declínio após 4 h com o tratamento com 20 μM (Figura 36). Em compensação, para *L. monocytogenes*, tratada com os mesmos 20 μM da solução contendo as AgNPs, a fase exponencial prosseguiu.

Nos demais tratamentos, em ambas as cepas *E. coli* e *L. monocytogenes*, a elevação na concentração da solução contendo as AgNPs proporcionou uma alta interrupção no crescimento microbiano. Em ambas as cepas, os tratamentos com 30, 40 e 50 μM resultaram em

um baixo crescimento dos microrganismos. sendo praticamente nulo no tratamento com 50 μM para ambas as bactérias (Figura 36 e 37).

A concentração inibitória mínima das AgNPs sobre o crescimento de *E. coli* e *L. monocytogenes* pode ser determinada e foi adotada como sendo a menor concentração do antibiótico (nanopartículas) suficiente para interromper o crescimento microbiano. A partir dos resultados obtidos pelas curvas de crescimento (Figura 36 e 37), dentre as duas cepas utilizadas, a que apresentou maior sensibilidade às AgNPs foi *E. coli*, mesmo que este tenha apresentado um crescimento mais acentuado em termos de DO no tratamento com o controle quando comparado com *L. monocytogenes*.

Pode-se observar em ambos os gráficos de crescimento microbiano (Figura 36 e 37) que 20 μM da solução contendo as AgNPs foi suficiente para interromper o crescimento em *E. coli* após 4 h. Já para *L. monocytogenes*, os mesmos 20 μM não foram suficientes para promover a interrupção do crescimento, ocorrendo apenas quando a quantidade das AgNPs foi elevada para 30 μM . Logo, pode-se concluir que para o tratamento com *Escherichia coli* a concentração inibitória mínima (CIM) das AgNPs necessária para promover a interrupção do crescimento foi de 20 μM já para a *Listeria monocytogenes* a CIM foi de 30 μM .

Como já descrito, em um meio contendo AgNPs atuantes como agente antimicrobiano contra uma determinada célula bacteriana, o “primeiro obstáculo” encontrado pelas nanopartículas nesse meio é exatamente a parede celular do microrganismo. Logo, a disposição estrutural da parede é um importante aspecto ao se analisar a efetividade antimicrobiana das nanopartículas (CHATTERJEE et al., 2014).

Na maioria das bactérias gram-positivas, a parede celular consiste em muitas camadas de peptidoglicana, formando uma estrutura espessa e rígida. Em contraste, as paredes celulares de gram-negativas contêm somente uma camada fina de -peptidoglicana. (TORTORA et al., 2012). Logo, o conceito de que bactérias gram-negativas apresentam uma parede celular menos espessa do que bactérias gram-positivas, justifica o fato da *E. coli* ter apresentado maior sensibilidade às AgNPs quando comparado à *L. monocytogenes*, visto que devido à *E. coli* apresentar sua membrana esquelética (parede celular) menos robusta quando comparada à *L. monocytogenes*, a adsorção e penetração das nanopartículas será mais rápida.

6 CONCLUSÕES

Neste trabalho foi avaliada a biossíntese de nanopartículas de prata mediada pelo fungo *Fusarium oxysporum* bem como verificado o potencial antimicrobiano das nanopartículas produzidas. As conclusões principais estão apresentadas a seguir:

- Considerando os parâmetros de biossíntese adotados para a produção das nanopartículas de prata por intermédio do *Fusarium oxysporum*, pode-se concluir que a biossíntese foi satisfatória já que o fungo demonstrou ser hábil para promover a biossíntese;
- Nos ensaios envolvendo a biossíntese das nanopartículas com variação da concentração de AgNO_3 , pôde-se constatar que o aumento da concentração do sal de prata resultou na aglomeração das nanopartículas devido à insuficiência da disponibilidade do substrato responsável pelo mecanismo de biorredução das nanopartículas;
- No tratamento envolvendo variação na temperatura de biossíntese, a temperatura ótima de atuação das proteínas e demais biomoléculas responsáveis pela biorredução situa-se entre 20 e 40 °C. Nesse intervalo de temperatura, as nanopartículas permaneceram estáveis em níveis de pH próximos da neutralidade, de acordo com os resultados obtidos por potencial zeta. Em contrapartida, o aumento da temperatura de biorredução resultou na elevação do tamanho médio das nanopartículas bem como na aglomeração das mesmas;
- A idade do fungo utilizado exerce forte influência no tamanho e estabilidade das nanopartículas. Pôde-se constatar que o *Fusarium oxysporum* com menor tempo de crescimento, 10 dias, produziu nanopartículas com tamanho médio menor e maior estabilidade determinada por potencial zeta, quando foram comparadas com maiores períodos de crescimento. 20 e 30 dias;
- Diante dos parâmetros experimentais utilizados para biossíntese das AgNPs, em todos os ensaios envolvendo mudanças nas variáveis de biossíntese, as nanopartículas apresentaram valores de tamanho médio abaixo de 100 nm, o que as classificam como um nanomaterial. Os valores de potencial zeta inicial apresentado pelas nanopartículas estiveram abaixo de -30 mV, consequentemente dentro da faixa de estabilidade para as nanopartículas. A única exceção foi exatamente o ensaio

envolvendo uma alta concentração de AgNO_3 , onde as nanopartículas apresentaram-se aglomeradas com tamanho médio na escala micrométrica;

- A caracterização via UV-Vis e FTIR constatou a presença de proteínas e grupos funcionais específicos responsáveis pelo mecanismo de biorredução e estabilidade das nanopartículas, sendo um forte indício da presença e atuação da enzima nitrato redutase na biotransformação dos íons de prata com consequente formação das nanopartículas;
- As análises em FAAS, MEV-EC e MET comprovaram a presença das nanopartículas de prata biorreduzidas no filtrado fúngico, sendo que as nanopartículas apresentaram formato aproximadamente esférico, dispersas em solução;
- As análises do potencial antimicrobiano das AgNPs via medição do tamanho médio dos halos de inibição pela técnica de perfuração em ágar constataram a efetividade das nanopartículas como um agente biocida. Comparado ao controle positivo, o antibiótico amoxicilina, apenas a bactéria *Salmonella enterica* não apresentou tamanho médio de halo maior, concluindo assim que as AgNPs apresentaram efeito antimicrobiano em todas as cepas utilizadas;
- De acordo com a curva de crescimento microbiano obtida a partir do tratamento com *E. coli* e *L. monocytogenes* variando a concentração das AgNPs, a cepa que apresentou maior sensibilidade as nanopartículas foi a *E. coli*, visto que a CMI para esta espécie foi menor quando comparada com a *L. monocytogenes*. Tal fato se deve à composição da parede celular da *E. coli*; que por ser gram-negativa, apresenta sua parede celular menos espessa e rígida quando comparada com a *L. monocytogenes*, que é gram-positiva.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

De acordo com os resultados obtidos, o *Fusarium oxysporum* foi eficiente na biossíntese das nanopartículas de prata, sendo o grande foco do trabalho verificar a influência da variação das condições de biossíntese no tamanho e estabilidade das nanopartículas. Para futuros trabalhos, sugere-se o estudo da variação de outros parâmetros de biossíntese como: luminosidade, efeito de diferentes meios de cultura, aeração, pH do meio, entre outros, com o objetivo de promover um detalhamento de quais fatores efetivamente influenciam no tamanho e na estabilidade das nanopartículas. Um planejamento estatístico é sugerido para essa finalidade.

Considerando a caracterização via espectroscopia UV-Vis e FTIR, os resultados demonstram um indicativo útil para a presença da enzima nitrato redutase no filtrado fúngico. Sugere-se a inclusão de processos específicos de separação e purificação do produto para o isolamento e confirmação da presença da enzima, principal responsável pelo mecanismo de biorredução das AgNPs.

Os resultados das análises do potencial antimicrobiano das nanopartículas de prata foram satisfatórios. Porém, a utilização de técnicas alternativas de avaliação pode revelar a real amplitude desse potencial visando a transformação dessas nanopartículas em um produto de utilidade para a saúde humana. Sendo assim, uma ampliação de escala do processo produtivo torna-se necessária afim de se obter um produto de maior valor agregado com possível aplicação na saúde humana.

7 REFERÊNCIAS

AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. Fifth Edit ed. London: Elsevier Academic Press, 2005.

AHMAD, A.; MUKHERJEE, P.; SENAPATI, S.; MANDAL, D.; KHAN, M. I.; SASTRY, M. **Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium oxysporum***. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 28, p. 313–318, 2003.

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory mycology**. 4th. ed. New York: Wiley, 1996.

AMORIM, F. A. C.; LOBO, I. P.; SANTOS, V. L. C. S.; FERREIRA, S. L. C. **Espectrometria de absorção atômica: O caminho para determinações multi-elementares**. *Quimica Nova*, v. 31, n. 7, p. 1784–1790, 2008.

APPIAGYEI, K. A.; MESSING, G. L.; DUMM, J. Q. **Aqueous slip casting of transparent yttrium aluminum garnet (YAG) ceramics**. *Ceramics International*, v. 34, n. 5, p. 1309–1313, 2008.

BASAVARAJA, S.; BALAJI, S. D.; LAGASHETTY, A.; RAJASAB, A. H.; VENKATARAMAN, A. **Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium semitectum***. *Materials Research Bulletin*, v. 43, n. 5, p. 1164–1170, 2008.

BECKMAN, C. H. **The nature of wilt diseases of plants**. [s.l.] St Paul, M.N., 1987.

BERA, A.; BELHAJ, H. **Application of nanotechnology by means of nanoparticles and nanodispersions in oil recovery - A comprehensive review**. *Journal of Natural Gas Science and Engineering*, v. 34, p. 1284–1309, 2016.

BERNARDO, L. M. **Histórias da luz e das cores**. 1. ed. [s.l.] Editora UP, 2005.

BERNE, B.; PECORA, R. **Dynamic light scattering: with applications to chemistry, biology, and physics**. Dover Book ed. [s.l.] Dover

Publications; Unabridged edition, 2000.

BHAINSA, K. C.; D'SOUZA, S. F. **Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Aspergillus fumigatus***. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, v. 47, n. 2, p. 160–164, 2006.

BIRLA, S. S.; GAIKWAD, S. C.; GADE, A. K.; RAI, M. K. **Rapid Synthesis of Silver Nanoparticles from *Fusarium oxysporum* by optimizing physiocultural conditions**. The Scientific World Journal, v. 2013, 2013.

BOOTH, C. **The genus fusarium**. [s.l.] C.A.B., 1971.

CAO, G. Physical Chemistry of Solid Surfaces. In: **Nanostructures and Nanomaterials - Synthesis, Properties, and Applications**. 2. ed. [s.l.] World Scientific Series in Nanoscience and Nanotechnology, 2011. 2p. 19–60.

CASTRO-LONGORIA, E.; VILCHIS-NESTOR, A. R.; AVALOS-BORJA, M. **Biosynthesis of silver, gold and bimetallic nanoparticles using the filamentous fungus *Neurospora crassa***. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, v. 83, n. 1, p. 42–48, 2011.

CHALOUPKA, K.; MALAM, Y.; SEIFALIAN, A. M. **Nanosilver as a new generation of nanoprodukt in biomedical applications**. Trends in Biotechnology, v. 28, n. 11, p. 580–588, 2010.

CHATTERJEE, T.; CHATTERJEE, B. K.; MAJUMDAR, D.; CHAKRABARTI, P. **Antibacterial effect of silver nanoparticles and the modeling of bacterial growth kinetics using a modified Gompertz model**. Biochimica et biophysica acta, v. 1850, n. 2, p. 299–306, 2014.

CHEN, G.; FENG, Q. L.; WU, J.; CHEN, G. Q.; CUI, F. Z.; KIM, T. N.; KIM, J. O. **A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus***. Journal of Biomedical Materials Research, v. 52, n. 4, 2000.

CHO, K. H.; PARK, J. E.; OSAKA, T.; PARK, S. G. **The study of**

antimicrobial activity and preservative effects of nanosilver ingredient. *Electrochimica Acta*, v. 51, n. 5, p. 956–960, 2005.

CLARK, D. P.; PAZDERNIK, N. J. **Nanobiotechnology.** *Biotechnology*, p. 219–248, 2016.

COSTA, E. M. M. de B.; BARBOSA, A. S.; ARRUDA, T. A. de; OLIVEIRA, P. T. de; DAMETTO, F. R.; CARVALHO, R. A. de; MELO, M. das D. **Estudo in vitro da ação antimicrobiana de extratos de plantas contra *Enterococcus faecalis*.** *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 46, n. 3, p. 175–180, 2010.

DANIEL, M. C. M.; ASTRUC, D. **Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size Related Properties and Applications toward Biology, Catalysis and Nanotechnology.** *Chemical Reviews*, v. 104, n. 1, p. 293–346, 2004.

DANILCZUK, M.; LUND, A.; SADLO, J.; YAMADA, H.; MICHALIK, J. **Conduction electron spin resonance of small silver particles.** *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 63, n. 1, p. 189–191, 2006.

DAR, M. A.; INGLE, A.; RAI, M. **Enhanced antimicrobial activity of silver nanoparticles synthesized by *Cryphonectria sp.* evaluated singly and in combination with antibiotics.** *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, v. 9, n. 1, p. 105–110, 2013.

DARROUDI, M.; AHMAD, M. Bin; ABDULLAH, A. H.; IBRAHIM, N. A. **Green synthesis and characterization of gelatin-based and sugar-reduced silver nanoparticles.** *International Journal of Nanomedicine*, v. 6, n. 1, p. 569–574, 2011.

DAS, V. L.; THOMAS, R.; VARGHESE, R. T.; SONIYA, E. V.; MATHEW, J.; RADHAKRISHNAN, E. K. **Extracellular synthesis of silver nanoparticles by the *Bacillus* strain CS 11 isolated from industrialized area.** *3 Biotech*, v. 4, n. 2, p. 121–126, 2013.

DASTJERDI, R.; MONTAZER, M. **A review on the application of inorganic nano-structured materials in the modification of textiles:**

Focus on anti-microbial properties. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, v. 79, n. 1, p. 5–18, 2010.

DE MORAIS, M. G.; MARTINS, V. G.; STEFFENS, D.; PRANKE, P.; DA COSTA, J. A. V. **Biological applications of nanobiotechnology.** Journal of nanoscience and nanotechnology, v. 14, n. 1, p. 1007–17, 2014.

DEEPAK, V.; KALISHWARALAL, K. **An Insight into the Bacterial Biogenesis of Silver Nanoparticles, Industrial Production and Scale-up.** In: Metal Nanoparticles in Microbiology. [s.l: s.n.]p. 17–36.

DERJAGYUIN, B. & LANDAU, L. **Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solution of electrolytes.** Acta. Physicochim, v. 14, p. 633–662, 1941.

DEVI, L. S.; JOSHI, S. R. **Ultrastructures of silver nanoparticles biosynthesized using endophytic fungi.** Journal of Microscopy and Ultrastructure, v. 3, n. 1, p. 29–37, 2015.

DIAS, P. P.; BERBARA, R. L. L.; FERNANDES, M. D. C. D. A. **Controle de *Rhizoctonia solani* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* por biopreparados de isolados de *Trichoderma* spp.** Summa Phytopathologica, v. 39, n. 4, p. 258–262, 2013.

DURASAMY, N.; HONG, S. J.; CHOI, K. H. **Deposition and characterization of silver nanowires embedded PEDOT: PSS thin films via electrohydrodynamic atomization.** Chemical Engineering Journal, v. 225, p. 887–894, 2013.

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

DURÁN, N.; MARCATO, P. D.; DURÁN, M.; YADAV, A.; GADE, A.; RAI, M. **Mechanistic aspects in the biogenic synthesis of extracellular metal nanoparticles by peptides, bacteria, fungi, and plants.** Applied Microbiology and Biotechnology, v. 90, n. 5, p. 1609–1624, 2011.

EDWARDS-JONES, V. **The benefits of silver in hygiene, personal care and healthcare.** Letters in Applied Microbiology, v. 49, n. 2, p. 147–152, 2009.

EFTINK, M. R.; GHIRON, C. A. **Fluorescence quenching studies with proteins.** Analytical Biochemistry, v. 114, n. 2, p. 199–227, 1981.

EL-RAFIE, M. H.; SHAHEEN, T. I.; MOHAMED, A. A.; HEBEISH, A. **Bio-synthesis and applications of silver nanoparticles onto cotton fabrics.** Carbohydrate Polymers, v. 90, n. 2, p. 915–920, 2012.

FAGHRI ZONOOZ, N.; SALOUTI, M. **Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using cell filtrate of *Streptomyces sp.*** ERI-3. Scientia Iranica, v. 18, n. 6, p. 1631–1635, 2011.

FAYAZ, A. M.; BALAJI, K.; GIRILAL, M.; YADAV, R.; KALAIHELWAN, P. T.; VENKETESAN, R. **Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against gram-positive and gram-negative bacteria.** Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine, v. 6, n. 1, p. 103–109, 2010.

FEYNMAN, R. P. **There's Plenty of Room at the Bottom.** Journal of Microelectromechanical Systems, v. 1, n. 1, p. 60–66, 1992.

FORTINA, P.; KRICKA, L. J.; SURREY, S.; GRODZINSKI, P. **Nanobiotechnology: The promise and reality of new approaches to molecular recognition.** Trends in Biotechnology, v. 23, n. 4, p. 168–173, 2005.

FRENS, G. **Particle size and sol stability in metal colloids.** Kolloid-Zeitschrift & Zeitschrift Polymere, v. 250, n. 7, p. 736–741, 1972.

GADE, A.; INGLE, A.; WHITELEY, C.; RAI, M. **Mycogenic metal nanoparticles: Progress and applications.** Biotechnology Letters, v. 32, n. 5, p. 593–600, 2010.

GADE, A. K.; BONDE, P.; INGLE, A. P.; MARCATO, P. D.; DURÁN, N.; RAI, M. K. **Exploitation of *Aspergillus niger* for synthesis of silver nanoparticles.** Journal of Biobased Materials and Bioenergy, v. 2, n. 3, p. 243–247, 2008.

GAJBHIYE, M.; KESHARWANI, J.; INGLE, A.; GADE, A.; RAI, M. **Fungus-mediated synthesis of silver nanoparticles and their activity against pathogenic fungi in combination with fluconazole.** *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, v. 5, n. 4, p. 382–386, 2009.

GHOLAMI-SHABANI, M.; AKBARZADEH, A.; NOROUZIAN, D.; AMINI, A.; GHOLAMI-SHABANI, Z.; IMANI, A.; CHIANI, M.; RIAZI, G.; SHAMS-GHAHFAROKHI, M.; RAZZAGHI-ABYANEH, M. **Antimicrobial activity and physical characterization of silver nanoparticles green synthesized using nitrate reductase from *Fusarium oxysporum*.** *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 172, n. 8, p. 4084–4098, 2014.

GIBBS, R. J. **Silver Colloids - Do they work ?** *British Medical Journal*, 1999.

GOLE, A.; DASH, C.; RAMAKRISHNAN, V.; SAINKAR, S. R.; MANDALE, A. B.; RAO, M.; SASTRY, M. **Pepsin-gold colloid conjugates: Preparation, characterization, and enzymatic activity.** *Langmuir*, v. 17, n. 5, p. 1674–1679, 2001.

GUPTA, A.; SILVER, S. **Silver as a biocide: will resistance become a problem?** *Nature biotechnology*, 1998. .

GURUNATHAN, S.; KALISHWARALAL, K.; VAIDYANATHAN, R.; VENKATARAMAN, D.; PANDIAN, S. R. K.; MUNIYANDI, J.; HARIHARAN, N.; EOM, S. H. **Biosynthesis, purification and characterization of silver nanoparticles using *Escherichia coli*.** *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 74, n. 1, p. 328–335, 2009.

GUZMAN, M.; DILLE, J.; GODET, S. **Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria.** *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, v. 8, n. 1, p. 37–45, 2012.

HAEFELI, C.; FRANKLIN, C.; HARDY, K. **Plasmid-determined silver resistance in *Pseudomonas stutzeri* isolated from a silver mine.** *Journal of Bacteriology*, v. 158, n. 1, p. 389–392, 1984.

HARADA, M.; KIMURA, Y.; SAIJO, K.; OGAWA, T.; ISODA, S.

Photochemical synthesis of silver particles in Tween 20/water/ionic liquid microemulsions. Journal of Colloid and Interface Science, v. 339, n. 2, p. 373–381, 2009.

HARADA, M.; YAMADA, M.; KIMURA, Y.; SAIJO, K. **Influence of the organization of water-in-ionic liquid microemulsions on the size of silver particles during photoreduction.** Journal of Colloid and Interface Science, v. 406, p. 94–104, 2013.

HONARY, S.; BARABADI, H.; GHARAEI-FATHABAD, E.; NAGHIBI, F. **Green synthesis of silver nanoparticles induced by the Fungus *Penicillium citrinum*.** Tropical Journal of Pharmaceutical Research, v. 12, n. 1, p. 7–11, 2013.

HOSSEINI, M. R.; SCHAFFIE, M.; PAZOUKI, M.; DAREZERESHKI, E.; RANJBAR, M. **Biologically synthesized copper sulfide nanoparticles: Production and characterization.** Materials Science in Semiconductor Processing, v. 15, n. 2, p. 222–225, 2012.

HOTZA, D. **Artigo revisão: colagem de folhas cerâmicas.** Cerâmica, v. 43, n. 283–284, p. 159–166, 1997.

HULKOTI, N. I.; TARANATH, T. C. **Biosynthesis of nanoparticles using microbes-A review.** Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, v. 121, p. 474–483, 2014.

HUNTER, R. J. **The Calculation of Zeta Potential.** In: Zeta Potential in Colloid Science: Principles and applications. London: Academic Press Limited, 1981. p. 59–124.

HUNTER, R. J.; OTTEWILL, R. H.; ROWELL, R. L. **Zeta potential in colloid science.** [s.l.: s.n.]

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

JAFELICCI JR, M.; VARANDA, L. C. **O Mundo dos Colóides.** Química Nova na Escola, n. 9, p. 9–13, 1999.

JAIDEV, L. R.; NARASIMHA, G. **Fungal mediated biosynthesis of silver nanoparticles, characterization and antimicrobial activity.** Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, v. 81, n. 2, p. 430–433, 2010.

JAIN, D.; KACHHWAHA, S.; JAIN, R.; SRIVASTAVA, G.; KOTHARI, S. L. **Novel microbial route to synthesize silver nanoparticles using spore crystal mixture of bacillus thuringiensis.** Indian Journal of Experimental Biology, v. 48, n. 11, p. 1152–1156, 2010.

JAIN, K. K. **Nanotechnology in clinical laboratory diagnostics.** Clinica Chimica Acta, v. 358, n. 1–2, p. 37–54, 2005.

JAIN, K. K. **Applications of nanobiotechnology in clinical diagnostics.** Clinical Chemistry, v. 53, n. 11, p. 2002–2009, 2007.

JAIN, K. K. **Nanobiotechnology.** Comprehensive Biotechnology, p. 599–614, 2011.

JAIN, P. K.; HUANG, X.; EL-SAYED, I. H.; EL-SAYED, M. A. **Noble metals on the nanoscale: Optical and photothermal properties and some applications in imaging, sensing, biology, and medicine.** Accounts of Chemical Research, v. 41, n. 12, p. 1578–1586, 2008.

JENA, J.; PRADHAN, N.; NAYAK, R. R.; DASH, B. P.; SUKLA, L. B.; PANDA, P. K.; MISHRA, B. K. **Microalga *Scenedesmus sp.*: A potential low-cost green machine for silver nanoparticle synthesis.** Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 24, n. 4, p. 522–533, 2014.

JIANG, H.; MOON, K. S.; LI, Y.; WONG, C. P. **Surface functionalized silver nanoparticles for ultrahigh conductive polymer composites.** Chemistry of Materials, v. 18, n. 13, p. 2969–2973, 2006.

KALIMUTHU, K.; SURESH BABU, R.; VENKATARAMAN, D.; BILAL, M.; GURUNATHAN, S. **Biosynthesis of silver nanocrystals by *Bacillus licheniformis*.** Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, v. 65, n. 1, p. 150–153, 2008.

KALISHWARALAL, K.; DEEPAK, V.; RAM KUMAR PANDIAN, S.; KOTTAISAMY, M.; BARATHMANIKANTH, S.; KARTIKEYAN, B.;

GURUNATHAN, S. **Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using *Brevibacterium casei***. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 77, n. 2, p. 257–262, 2010.

KALISHWARALAL, K.; DEEPAK, V.; RAMKUMARPANDIAN, S.; NELLAIAH, H.; SANGILYANDI, G. **Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles by the culture supernatant of *Bacillus licheniformis***. *Materials Letters*, v. 62, n. 29, p. 4411–4413, 2008.

KATHIRESAN, K.; ALIKUNHI, N. M.; PATHMANABAN, S.; NABIKHAN, A.; KANDASAMY, S. **Analysis of antimicrobial silver nanoparticles synthesized by coastal strains of *Escherichia coli* and *Aspergillus niger***. *Canadian journal of microbiology*, v. 56, n. 12, p. 1050–9, 2010.

KHATOON, N.; AHMAD, R.; SARDAR, M. **Robust and fluorescent silver nanoparticles using *Artemisia annua*: Biosynthesis, characterization and antibacterial activity**. *Biochemical Engineering Journal*, v. 102, p. 91–97, 2015.

KIM, J. S.; KUK, E.; YU, K. N.; KIM, J. H.; PARK, S. J.; LEE, H. J.; KIM, S. H.; PARK, Y. K.; PARK, Y. H.; HWANG, C. Y.; KIM, Y. K.; LEE, Y. S.; JEONG, D. H.; CHO, M. H. **Antimicrobial effects of silver nanoparticles**. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, v. 3, n. 1, p. 95–101, 2007.

KIMATI, H. Doenças do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). In: **Manual de fitopatologia: doença das plantas cultivadas**. 2. ed. São Paulo: Agronomica Ceres, 1978. p. 297–318.

KLASSEN, H. J. A historical review of the use of silver in the treatment of burns. *Burns*, v. 26, p. 117–130, 2000.

KOOPMANS, R. J.; AGGELI, A. **Nanobiotechnology - quo vadis?** *Current Opinion in Microbiology*, v. 13, n. 3, p. 327–334, 2010.

KOWSHIK, M.; ASHTAPUTRE, S.; KHARRAZI, S.; VOGEL, W.; URBAN, J.; KULKARNI, S. K.; PAKNIKAR, K. M. **Extracellular synthesis of silver nanoparticles by a silver-tolerant yeast strain MKY3**. *Nanotechnology*, v. 14, n. 1, p. 95–100, 2002.

KUMAR, S. A.; ABYANEH, M. K.; GOSAVI, S. W.; KULKARNI, S. K.; PASRICHA, R.; AHMAD, A.; KHAN, M. I. **Nitrate reductase-**

mediated synthesis of silver nanoparticles from AgNO₃. *Biotechnology Letters*, v. 29, n. 3, p. 439–445, 2007.

KUMAR, S.; SINGH, M.; HALDER, D.; MITRA, A. **Mechanistic study of antibacterial activity of biologically synthesized silver nanocolloids.** *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 449, n. 1, p. 82–86, 2014.

LEDWITH, D. M.; WHELAN, A. M.; KELLY, J. M. **A rapid, straightforward method for controlling the morphology of stable silver nanoparticles.** *Journal of Materials Chemistry*, v. 17, n. 23, p. 2459, 2007.

LOWE, C. R.; LOWE, C. R. **Nanobiotechnology: the fabrication and applications of chemical and biological nanostructures.** *Current Opinion in Structural Biology*, v. 10, n. 4, p. 428–434, 2000.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Brock biology of microorganisms.** 14. ed. [s.l.] Benjamin Cummings, 2014.

MAHDIEH, M.; ZOLANVARI, A.; AZIMEE, A. S.; MAHDIEH, M. **Green biosynthesis of silver nanoparticles by *Spirulina platensis*.** *Scientia Iranica*, v. 19, n. 3, p. 926–929, 2012.

MALISZEWSKA, I. **Microbial Synthesis of Metal Nanoparticles.** In: *Metal Nanoparticles in Microbiology*. [s.l.: s.n.]p. 153–175.

MALISZEWSKA, I.; SZEWCZYK, K.; WASZAK, K. **Biological synthesis of silver nanoparticles.** *Journal of Physics: Conference Series*, v. 146, p. 12025, 2009.

MATSUMURA, Y.; YOSHIKATA, K.; KUNISAKI, S.; TSUCHIDO, T. **Mode of bactericidal action of silver zeolite and its comparison with that of silver nitrate.** *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, n. 7, p. 4278–4281, 2003.

MATTHIAS LABRENZ, GREGORY K. DRUSCHEL, TAMARA THOMSEN-EBERT, BENJAMIN GILBERT, SUSAN A. WELCH, KENNETH M. KEMNER, GRAHAM A. LOGAN, ROGER E.

SUMMONS, GELSOMINA DE STASIO, PHILIP L. BOND, BARRY LAI, SHELLY D. KELLY, J. F. B. **Formation of Sphalerite (ZnS) Deposits in Natural Biofilms of Sulfate-Reducing Bacteria.** *Science*, v. 290, n. 5497, p. 1744–1747, 2000.

MAYNARD, A. D. **Nanotechnologies: Overview and issues.** NATO Security through Science Series C: Environmental Security, p. 1–14, 2007.

MERIN, D. D.; PRAKASH, S.; BHIMBA, B. V. **Antibacterial screening of silver nanoparticles synthesized by marine micro algae.** *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, v. 3, n. 10, p. 797–799, 2010.

MIRHOSSEINI, H.; TAN, C. P.; HAMID, N. S. A.; YUSOF, S. **Effect of Arabic gum, xanthan gum and orange oil contents on ζ -potential, conductivity, stability, size index and pH of orange beverage emulsion.** *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 315, n. 1–3, p. 47–56, 2008.

MIRZADEH, S.; DAREZERESHKI, E.; BAKHTIARI, F.; FAZAEIPOOR, M. H.; HOSSEINI, M. R. **Characterization of zinc sulfide (ZnS) nanoparticles Biosynthesized by Fusarium oxysporum.** *Materials Science in Semiconductor Processing*, v. 16, n. 2, p. 374–378, 2013.

MITTAL, A. K.; BHAUMIK, J.; KUMAR, S.; BANERJEE, U. C. **Biosynthesis of silver nanoparticles: Elucidation of prospective mechanism and therapeutic potential.** *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 415, p. 39–47, 2014.

MOHANPURIA, P.; RANA, N. K.; YADAV, S. K. **Biosynthesis of nanoparticles: Technological concepts and future applications.** *Journal of Nanoparticle Research*, v. 10, n. 3, p. 507–517, 2008.

MOHANRAJ, V. J.; CHEN, Y. **Nanoparticles - A Review.** *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, v. 5, n. 1, p. 561–573, 2006.

MOHSENAZAR, M.; BARIN, M.; ZARREDAR, H.; ALIZADEH, S.; SHANEHBANDI, D. **Potential of microalgae and lactobacilli in biosynthesis of silver nanoparticles.** *BioImpacts*, v. 1, n. 3, p. 149–152,

2011.

MONTANARO, L.; JORAND, Y.; FANTOZZI, G.; NEGRO, A. **Ceramic foams by powder processing**. Journal of the European Ceramic Society, v. 18, n. 9, p. 1339–1350, 1998.

MONTAZER, M.; ALIMOHAMMADI, F.; SHAMEI, A.; RAHIMI, M. K. **In situ synthesis of nano silver on cotton using Tollens' reagent**. Carbohydrate Polymers, v. 87, n. 2, p. 1706–1712, 2012.

MONTAZER, M.; PAKDEL, E.; MOGHADAM, M. B. **Nano titanium dioxide on wool keratin as UV absorber stabilized by butane tetra carboxylic acid (BTCA): A statistical prospect**. Fibers and Polymers, v. 11, n. 7, p. 967–975, 2010.

MORONES, J. R.; ELECHIGUERRA, J. L. **The bactericidal effect of silver nanoparticles**. ..., v. 16, n. 10, p. 2346–53, 2005.

MUKHERJEE, P.; AHMAD, A.; MANDAL, D.; SENAPATI, S.; SAINKAR, S. R.; KHAN, M. I.; PARISHCHA, R.; AJAYKUMAR, P. V.; ALAM, M.; KUMAR, R.; SASTRY, M. **Fungus-Mediated Synthesis of Silver Nanoparticles and Their Immobilization in the Mycelial Matrix: A Novel Biological Approach to Nanoparticle Synthesis**. Nano Letters, v. 1, n. 10, p. 515–519, 2001.

MULVANEY, P. **Surface Plasmon Spectroscopy of Nanosized Metal Particles**. Langmuir, v. 12, n. 3, p. 788–800, 1996.

MYERS, J. a; CURTIS, B. S.; CURTIS, W. R. **Improving accuracy of cell and chromophore concentration measurements using optical density**. BMC biophysics, v. 6, n. 1, p. 4, 2013.

NAJITHA BANU, A.; BALASUBRAMANIAN, C.; MOORTHI, P. V. **Biosynthesis of silver nanoparticles using Bacillus thuringiensis against dengue vector, Aedes aegypti (Diptera: Culicidae)**. Parasitology Research, v. 113, n. 1, p. 311–316, 2014.

NANDA, A.; SARAVANAN, M. **Biosynthesis of silver nanoparticles**

from *Staphylococcus aureus* and its antimicrobial activity against MRSA and MRSE. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, v. 5, n. 4, p. 452–456, 2009.

NARAYANAN, K. B.; SAKTHIVEL, N. **Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes.** *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 156, n. 1–2, p. 1–13, 2010.

NAYAK, R. R.; PRADHAN, N.; BEHERA, D.; PRADHAN, K. M.; MISHRA, S.; SUKLA, L. B.; MISHRA, B. K. **Green synthesis of silver nanoparticle by *Penicillium purpurogenum* NPMF: The process and optimization.** *Journal of Nanoparticle Research*, v. 13, n. 8, p. 3129–3137, 2011.

NELSON, P. E.; DIGNANI, M. C.; ANAISSIE, E. J. **Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species.** *Clinical microbiology reviews*, v. 7, n. 4, p. 479–504, 1994.

OLIVEIRA, I. R.; STUDART, A. R.; PILEGGI, R. G.; PANDOLFELLI, V. C. **Dispersão e empacotamento de partículas: princípios e aplicações em processamento cerâmico.** São Paulo: Fazendo Arte, 2000.

OTARI, S. V.; PATIL, R. M.; NADAF, N. H.; GHOSH, S. J.; PAWAR, S. H. **Green biosynthesis of silver nanoparticles from an actinobacteria *Rhodococcus sp.*** *Materials Letters*, v. 72, p. 92–94, 2012.

PAIS, A. **The Light-Quantum.** In: *Einstein and the quantum theory*. 4. ed. [s.l.] Reviews of Modern Physics - American Physical Society, 1979. p. 867–877.

PAL, S.; TAK, Y. K.; SONG, J. M. **Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 290, n. 42, p. 1712–1720, 2015.

PANACEK, A.; KVITEK, L.; PRUCEC, R.; KOLAR, M.; VECEROVÁ, R.; PIZUROVÁ, N.; SHARMA, V. K.; NEVECNÁ, T.; ZBORIL, R. **Silver Colloid Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Their Antibacterial Activity.** *J Physical Chemistry B*, v. 110, p. 16248–

16253, 2006.

PAPAZOGLU ELISABETH S. & PARTHASARATHY A. **Bionanotechnology: synthesis lectures on biomedical engineering.** [s.l: s.n.]

PARASHAR, U. K.; KUMAR, V.; BERA, T.; SAXENA, P. S.; NATH, G.; SRIVASTAVA, S. K.; GIRI, R.; SRIVASTAVA, A. **Study of mechanism of enhanced antibacterial activity by green synthesis of silver nanoparticles.** Nanotechnology, v. 22, n. 41, p. 415104, 2011.

PARIKH, R. Y.; SINGH, S.; PRASAD, B. L. V; PATOLE, M. S.; SASTRY, M.; SCHOUCHE, Y. S. **Extracellular synthesis of crystalline silver nanoparticles and molecular evidence of silver resistance from *Morganella sp.*: Towards understanding biochemical synthesis mechanism.** ChemBioChem, v. 9, n. 9, p. 1415–1422, 2008.

PATIL, V.; SASTRY M.; SAINKAR, R. S. **Electrostatically controlled diffusion of carboxylic acid derivatized Q-state CdS nanoparticles in thermally evaporated fatty amine films.** Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions, v. 93, n. 97, p. 4347–4353, 1997.

PEREIRA, M. J. Z.; RAMALHO, M. A. P.; ABREU, Â. D. F. B. **Reação de Linhagens de Feijoeiro ao *Fusarium oxysporum f. sp. phaseoli.*** Embrapa Arroz e Feijão, p. 3–5, 2007.

PINTO, T. J. A.; KANEIRO, T. M.; OHARA, M. T. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos.** 2. ed. [s.l: s.n.].

PRABHU, S.; POULOSE, E. K. **Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects.** International Nano Letters, v. 2, n. 1, p. 32, 2012.

QIAN, Y.; YU, H.; HE, D.; YANG, H.; WANG, W.; WAN, X.; WANG, L. **Biosynthesis of silver nanoparticles by the endophytic fungus *Epicoccum nigrum* and their activity against pathogenic fungi.** Bioprocess and Biosystems Engineering, v. 36, n. 11, p. 1613–1619, 2013.

QUESTER, K.; AVALOS-BORJA, M.; CASTRO-LONGORIA, E. **Biosynthesis and microscopic study of metallic nanoparticles**. *Micron*, v. 54–55, p. 1–27, 2013.

RABIE, C. J.; MARASAS, W. F. O.; THIEL, P. G.; LÜBBEN, A.; VLEGGAR, R. **Moniliformin production and toxicity of different *Fusarium* species from southern Africa**. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 43, n. 3, p. 517–521, 1982.

RAHAMAN, M. N. **Ceramic processing and sintering**. 2. ed. [s.l.] Boca Raton: Taylor & Francis, 2003.

RAHMAN, K. S. M. & GAKPE, E. **Production , characterisation and applications of biosurfactants - Review**. *Biotechnology*, v. 7, n. 2, p. 360–370, 2008.

RAI, M.; YADAV, A.; GADE, A. **Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials**. *Biotechnology Advances*, v. 27, n. 1, p. 76–83, 2009.

RATYAKSHI; CHAUHAN, R. P. **Colloidal synthesis of silver nanoparticles**. *Asian Journal of Chemistry*, v. 21, n. 10, p. 113–116, 2009.

ROCO, M. C.; BAINBRIDGE, W. S.; PRESSMAN, B.; ZUCKER, L. G.; DARBY, M. R.; DE LA CRUZ, F.; GADD, G. M.; DORDICK, J. S.; LEE, K. H.; CHAN, W. C. W.; FAKRUDDIN, M.; HOSSAIN, Z.; AFROZ, H.; WHITESIDES, G. M.; ON, S. **Nanobiotechnology**. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 12, n. 4, p. 172–179, 2006.

ROH, Y.; LAUF, R. J.; MCMILLAN, A. D.; ZHANG, C.; RAWN, C. J.; BAI, J.; PHELPS, T. J. **Microbial synthesis and the characterization of metal-substituted magnetites**. *Solid State Communications*, v. 118, n. 10, p. 529–534, 2001.

S, H. N. K.; KUMAR, G.; KARTHIK, L.; V, B. R. K. **Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the filamentous fungus *Penicillium sp.*** v. 2, n. 6, p. 161–167, 2010.

SAGAR, G.; ASHOK, B. **Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using *Aspergillus niger* and Its Efficacy Against Human Pathogens**. *European Journal of Experimental Biology*, v. 2, n. 5, p. 1654–1658,

2012.

SANGHI, R.; VERMA, P. **A facile green extracellular biosynthesis of CdS nanoparticles by immobilized fungus.** Chemical Engineering Journal, v. 155, n. 3, p. 886–891, 2009.

SCHMID, G. Large clusters and colloids. **Metals in the embryonic state.** Chemical Reviews, v. 92, p. 1709–1727, 1992.

SEGRÈ, P. N.; PUSEY, P. N. **Scaling of the Dynamic Scattering Function of Concentrated Colloidal Suspensions.** Physical Review Letters, v. 77, n. 4, p. 771–774, 1996.

SHAHVERDI, A. R.; FAKHIMI, A.; SHAHVERDI, H. R.; MINAIAN, S. **Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against Staphylococcus aureus and Escherichia coli.** Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine, v. 3, n. 2, p. 168–171, 2007.

SHALIGRAM, N. S.; BULE, M.; BHAMBURE, R.; SINGHAL, R. S.; SINGH, S. K.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. **Biosynthesis of silver nanoparticles using aqueous extract from the compactin producing fungal strain.** Process Biochemistry, v. 44, n. 8, p. 939–943, 2009.

SHARMA, V. K.; YNGARD, R. A.; LIN, Y. **Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities.** Advances in Colloid and Interface Science, v. 145, n. 1–2, p. 83–96, 2009.

SHAW, D. J. **Introdução à química dos colóides e de superfícies.** [s.l.] Edgard Blucher, Editora da USP, 1975.

SHAW, D. J. **Colloid stability.** In: Introduction to Colloid and Surface Chemistry. Fourth ed. [s.l.: s.n.]p. 210–243.

SHAW, D. J. **Introduction to colloid & surface chemistry.** 4. ed. [s.l.] Butterworth Heinemann, 1992b.

SHIVAJI, S.; MADHU, S.; SINGH, S. **Extracellular synthesis of antibacterial silver nanoparticles using psychrophilic bacteria.** Process Biochemistry, v. 46, n. 9, p. 1800–1807, 2011.

SI, G.; SHI, W.; LI, K.; MA, Z. **Synthesis of PSS-capped triangular silver nanoplates with tunable SPR.** *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 380, n. 1–3, p. 257–260, 2011.

SILVER, S.; PHUNG, L. T.; SILVER, G. **Silver as biocides in burn and wound dressings and bacterial resistance to silver compounds.** *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 33, n. 7, p. 627–634, 2006.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Spectrometric identification of organic compounds.** [s.l: s.n.].

SINGH, B. P.; MENCHAVEZ, R.; TAKAI, C.; FUJI, M.; TAKAHASHI, M. **Stability of dispersions of colloidal alumina particles in aqueous suspensions.** *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 291, n. 1, p. 181–186, 2005.

SINGH, D.; RATHOD, V.; NINGANAGOUDA, S.; HERIMATH, J.; KULKARNI, P. **Biosynthesis of silver nanoparticle by endophytic fungi *penicillium sp.* Isolated from *Curcuma longa* (turmeric) and its antibacterial activity against pathogenic gram negative bacteria.** *Journal of Pharmacy Research*, v. 7, n. 5, p. 448–453, 2013.

SINTUBIN, L.; VERSTRAETE, W.; BOON, N. **Biologically produced nanosilver: Current state and future perspectives.** *Biotechnology and Bioengineering*, v. 109, n. 10, p. 2422–2436, 2012.

SNYDER, W. C.; HANSEN, H. N. **The species concept in *Fusarium*.** *American Journal of Botany*, v. 27, p. 64–67, 1940.

SONDI, I.; SALOPEK-SONDI, B. **Silver nanoparticles as antimicrobial agent: A case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria.** *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 275, n. 1, p. 177–182, 2004.

SOUZA, J. S.; FERRÃO, M. F. **Aplicações da espectroscopia no infravermelho no controle de qualidade de medicamentos contendo diclofenaco de potássio. Parte I: dosagem por regressão**

multivariada. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v. 42, p. 437–445, 2006.

SRIVATSAN, T. S. *Nanomaterials: Synthesis, Properties, and Applications*, A. S. Edelstein and R. C. Cammarata, Editors. Materials and Manufacturing Processes, v. 27, n. 10, p. 1145–1145, 2012.

STEPANOV, A. L. **Nonlinear optical properties of implanted metal nanoparticles in various transparent matrixes: A review**. Rev. Adv. Mater. Sci, v. 27, p. 115–145, 2011.

SYED, A.; AHMAD, A. **Extracellular biosynthesis of CdTe quantum dots by the fungus Fusarium oxysporum and their anti-bacterial activity**. Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, v. 106, p. 41–47, 2013.

SYED, A.; SARASWATI, S.; KUNDU, G. C.; AHMAD, A. **Biological synthesis of silver nanoparticles using the fungus Humicola sp. And evaluation of their cytotoxicity using normal and cancer cell lines**. Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, v. 114, p. 144–147, 2013.

THAKKAR, K. N.; MHATRE, S. S.; PARIKH, R. Y. **Biological synthesis of metallic nanoparticles**. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine, v. 6, n. 2, p. 257–262, 2010.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. [s.l: s.n.].

VAHABI, K.; MANSOORI, G. A.; KARIMI, S. **Biosynthesis of Silver Nanoparticles by Fungus Trichoderma Reesei (A Route for Large-Scale Production of AgNPs)**. Insciences Journal, v. 1, n. 1, p. 65–79, 2011.

VERWEY, E. J. W. & OVERBEEK, J. T. G. **Theory of the stability of lyophobic colloids**. [s.l: s.n.].

VIGNESHWARAN, N.; ASHTAPUTRE, N. M.; VARADARAJAN, P. V.; NACHANE, R. P.; PARALIKAR, K. M.; BALASUBRAMANYA, R. H. **Biological synthesis of silver nanoparticles using the fungus Aspergillus flavus**. Materials Letters, v. 61, n. 6, p. 1413–1418, 2007.

WALKER, J. **The Amateur Scientist - The Colors Seen in the Sky Offer Lessons in Optical Scattering**. Scientific American, n. January, p. 102–105, 1989.

WANG, D.; SONG, C.; HU, Z.; ZHOU, X. **Synthesis of silver nanoparticles with flake-like shapes**. Materials Letters, v. 59, n. 14–15, p. 1760–1763, 2005.

WEI, X.; LUO, M.; LI, W.; YANG, L.; LIANG, X.; XU, L.; KONG, P.; LIU, H. **Synthesis of silver nanoparticles by solar irradiation of cell-free *Bacillus amyloliquefaciens* extracts and AgNO_3** . Bioresource Technology, v. 103, n. 1, p. 273–278, 2012.

XIE, J.; LEE, J. Y.; WANG, D. I. C.; TING, Y. P. **Silver nanoplates: From biological to biomimetic synthesis**. ACS Nano, v. 1, n. 5, p. 429–439, 2007.

ZAKI, S.; EL KADY, M. F.; ABD-EL-HALEEM, D. **Biosynthesis and structural characterization of silver nanoparticles from bacterial isolates**. Materials Research Bulletin, v. 46, n. 10, p. 1571–1576, 2011.

ZHANG, H.; LI, J. L. **Study on toxicological mechanism of moniliformin**. Journal of Toxicology: Toxin Reviews, v. 9, n. 1, p. 103, 1990.

ZHANG, L.; YU, J. C.; YIP, H. Y.; LI, Q.; KWONG, K. W.; XU, A. W.; WONG, P. K. **Ambient Light Reduction Strategy to Synthesize Silver Nanoparticles and Silver-Coated TiO_2 with Enhanced Photocatalytic and Bactericidal Activities**. Langmuir, v. 19, n. 24, p. 10372–10380, 2003.

ZHANG, X.; YAN, S.; TYAGI, R. D.; SURAMPALLI, R. Y. **Synthesis of nanoparticles by microorganisms and their application in enhancing microbiological reaction rates**. Chemosphere, v. 82, n. 4, p. 489–494, 2011.