

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E PATOLOGIA  
CURSO DE BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

Laísa Adriana de Paula Luizon Garcia

**POTENCIAL DE APLICAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA  
PRODUZIDAS PELA SÍNTESE VERDE UTILIZANDO OS FUNGOS  
ENDOFÍTICOS *Fusarium* sp. E *Penicillium* sp.**

São Carlos - SP

2024

Laísa Adriana de Paula Luizon Garcia

**POTENCIAL DE APLICAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA  
PRODUZIDAS PELA SÍNTESE VERDE UTILIZANDO OS FUNGOS  
ENDOFÍTICOS *Fusarium* sp. E *Penicillium* sp.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
junto à Universidade Federal de São Carlos  
como requisito para obtenção do título de  
Bacharel em Biotecnologia.

**Orientadora:** Prof<sup>ª</sup> Dra. Cristina Paiva de Sousa

**São Carlos - SP  
2024**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas maravilhosas bênçãos que me concedeu ao longo da vida.

Aos meus pais, Adriana e Richard, meu marido, Henrique, e minhas irmãs, Lísia e Luara, pelo incondicional apoio e incentivo. Por estarem presentes nos piores e melhores momentos.

Aos meus avós e tios, pelas orações e palavras de carinho.

À minha orientadora, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Cristina Paiva de Sousa, por me conceder a oportunidade de me desenvolver academicamente sob sua mentoria.

Aos meus queridos amigos, Aninha, Izabella, Marcelo e Mayumi pela companhia e compreensão, e ao meu querido amigo Saulo, que me apresentou à síntese verde e esteve sempre disponível para me auxiliar em todas as etapas da pesquisa.

Aos meus queridos colegas de laboratório, que tornaram minha experiência tão agradável com as conversas e discussões.

Ao técnico do LaMiB, Paulo Henrique Marques de Andrade, pelas instruções e direcionamentos.

Ao Prof. Dr. Elson Longo da Silva e à Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Fernanda de Freitas Anibal por me cederem espaço em seus laboratórios, LIEC e LIDI, para realização de meus experimentos com auxílio de seus grupos de pesquisadores.

À FAPESP, pelo apoio financeiro ao projeto de pesquisa Processo n° 2/12836-5.

## RESUMO

No cenário pós-pandemia, em que a preocupação com formas de se proteger de bactérias e vírus aumentou, a aplicação de nanopartículas de prata (AgNPs) em tecidos se destaca como uma abordagem pouco suscetível à resistência microbiana. Esses materiais podem ser incorporados em roupas, máscaras e equipamentos de proteção (EPs), oferecendo barreiras adicionais contra infecções por patógenos e aumentando a qualidade e o tempo de vida dos tecidos. No contexto de produção sustentável, a síntese verde de AgNPs representa uma alternativa sustentável e eficiente para a produção de materiais com propriedades antimicrobianas. Este trabalho investigou o potencial de fabricação de AgNPs a partir dos caldos de fermentação dos fungos endofíticos *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp. isolados da planta *Polygala paniculata*, da Mata Atlântica. A síntese verde conduzida com o caldo do *Fusarium* sp. produziu AgNPs (NPs-F) com um diâmetro médio de 59 nm, ao passo que as AgNPs produzidas pelo caldo do *Penicillium* sp. (NPs-P) apresentaram um diâmetro médio de 85 nm. No que diz respeito a atividade antimicrobiana, as NPs-F apresentaram maior potencial bactericida e antibiofilme, sendo necessária uma concentração muito maior de NPs-P para obter o mesmo resultado observado no tratamento com NPs-F. Também foi observado que o caldo de fermentação do *Penicillium* sp. apresentou uma eficiência de síntese muito maior, produzindo cerca de  $2,54 \times 10^{10}$  partículas/mL, o dobro de AgNPs produzidas pelo caldo do *Fusarium* sp.. Apesar disso, a eficiência da síntese verde ainda é um desafio a ser superado, com conversões relativamente baixas de  $\text{AgNO}_3$  em AgNPs, exigindo otimizações para viabilizar sua produção em escala industrial.

**Palavras-chave:** Endófitos, síntese verde, nanopartículas de prata, antimicrobianos, fungos.

## ABSTRACT

In the post-pandemic scenario, where concern about ways to protect against bacteria and viruses has increased, the application of silver nanoparticles (AgNPs) in fabrics stands out as an approach less susceptible to microbial resistance. These materials can be incorporated into clothing, masks, and personal protective equipment (PPE), providing additional barriers against pathogen infections and enhancing the quality and lifespan of fabrics. In the context of sustainable production, the green synthesis of AgNPs represents a sustainable and efficient alternative for producing materials with antimicrobial properties. This study investigated the potential for fabricating AgNPs using fermentation broths of the endophytic fungi *Fusarium sp.* and *Penicillium sp.* isolated from the plant *Polygala paniculata*, native to the Atlantic Forest. The green synthesis conducted with the broth of *Fusarium sp.* produced AgNPs (NPs-F) with an average diameter of 59 nm, while the AgNPs produced by the *Penicillium sp.* broth (NPs-P) had an average diameter of 85 nm. Regarding antimicrobial activity, NPs-F showed greater bactericidal and antibiofilm potential, requiring a much higher concentration of NPs-P to achieve the same results observed with NPs-F. It was also noted that the fermentation broth of *Penicillium sp.* demonstrated much higher synthesis efficiency, producing approximately  $2,54 \times 10^{10}$  particles/mL, double the amount of AgNPs produced by the *Fusarium sp.* broth. Despite this, the efficiency of green synthesis remains a challenge to be addressed, with relatively low conversions of  $\text{AgNO}_3$  into AgNPs, requiring optimizations to enable its production on an industrial scale.

**Keywords:** Endophytes, green synthesis, silver nanoparticles, antimicrobials, fungi.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> (A) Fungo <i>Fusarium</i> sp. após 7 dias de incubação a 28°C e (B) fungo <i>Penicillium</i> sp. após 10 dias de incubação a 28°C.....	<b>20</b>
<b>Figura 2.</b> Caldo de fermentação do <i>Fusarium</i> sp. (A) e do <i>Penicillium</i> sp. (C) após filtragem da massa micelial dos fungos. Solução reacional do <i>Fusarium</i> sp. (B) e do <i>Penicillium</i> sp. (D) após 9 dias da adição do AgNO <sub>3</sub> . A mudança da coloração para marrom indica a síntese das nanopartículas.....	<b>20</b>
<b>Figura 3.</b> Espectro UV-vis com a leitura da absorbância em diferentes períodos de incubação.....	<b>21</b>
<b>Figura 4.</b> Espectro UV-vis com a leitura da absorbância em diferentes períodos de incubação.....	<b>22</b>
<b>Figura 5.</b> Estruturas obtidas a partir da solução reacional do <i>Fusarium</i> sp. (A) e <i>Penicillium</i> sp. (C). Levando em conta a escala das imagens, é possível inferir que as estruturas são aglomerados de NPs ou, ainda, partículas de escala micrométrica formadas. Os pontos vermelhos indicam a presença da prata nas estruturas do <i>Fusarium</i> sp. (B) e <i>Penicillium</i> sp. (D).....	<b>24</b>
<b>Figura 6.</b> AgNPs produzidas pela síntese verde a partir do fungo <i>Fusarium</i> sp. (NPs-F) representadas em (A) e <i>Penicillium</i> sp. (NPs-P) representadas em (B).....	<b>26</b>
<b>Figura 7.</b> Distribuição de tamanhos das NPs-F pela concentração produzida.....	<b>28</b>
<b>Figura 8.</b> Distribuição de tamanhos das NPs-P pela concentração produzida.....	<b>28</b>
<b>Figura 9.</b> Atividade antimicrobiana das NPs-F (A.1 e C.1), caldo de fermentação do <i>Fusarium</i> sp. (A.2 e C.2) e AgNO <sub>3</sub> (A.3 e C.3) contra <i>E. coli</i> (A) e <i>S. aureus</i> (C) e atividade antimicrobiana das NPs-P (B.1 e D.1), caldo de fermentação do <i>Penicillium</i> sp. (B.2 e D.2) e AgNO <sub>3</sub> (B.3 e D.3) contra <i>E. coli</i> (B) e <i>S. aureus</i> (D).....	<b>29</b>
<b>Figura 10.</b> Esquema utilizado para a determinação da CIM utilizando microplacas de 96 poços.....	<b>30</b>
<b>Figura 11.</b> Microplaca para determinação da concentração inibitória mínima de <i>E. coli</i> .....	<b>30</b>
<b>Figura 12.</b> Microplaca para determinação da concentração inibitória mínima de <i>S. aureus</i> .	<b>31</b>
<b>Figura 13.</b> Avaliação da viabilidade do biofilme após aplicação das NPs-F.....	<b>34</b>
<b>Figura 14.</b> Avaliação da viabilidade do biofilme após aplicação das NPs-P.....	<b>35</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Diâmetro da zona de inibição (mm) de bactérias gram-negativa e gram-positiva..	<b>29</b>
<b>Tabela 2.</b> Concentração inibitória mínima (CIM) das AgNPs contra bactérias gram-negativa e gram-positiva.....	<b>32</b>

**ABREVIATURAS E SIGLAS**

**Ag<sup>+</sup>**: Íons de prata

**AgNO<sub>3</sub>**: Nitrato de prata

**AgNPs**: Nanopartículas de prata

**ATCC**: American Type Culture Collection

**D.O**: Densidade ótica

**CIB**: Concentração Inibitória de Biofilme

**CIM**: Concentração Inibitória Mínima

**EPIs**: Equipamentos de Proteção Individual

**ISP2**: International Streptomyces Project 2

**LaMiB**: Laboratório de Microbiologia e Biomoléculas

**LIEC**: Laboratório Interdisciplinar Eletroquímica Cerâmica

**LIDI**: Laboratório de Inflamação e Doenças Infeciosas

**MH**: Müller-Hinton

**NaCl**: Cloreto de sódio

**NPs**: Nanopartículas

**NPs-F**: Nanopartículas produzidas pelo *Fusarium* sp.

**NPs-P**: Nanopartículas produzidas pelo *Penicillium* sp.

**Rpm**: Rotações por minuto

**TSB**: Tryptic Soy Broth

**UFC.mL<sup>-1</sup>**: Unidade formadora de colônia por mL

**v/v**: Volume por volume

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>9</b>
1.1 Nanotecnologia.....	10
1.2 Microrganismos endofíticos.....	12
1.3 Tecidos antimicrobianos.....	12
<b>2 OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>15</b>
2.1 Objetivos específicos.....	15
<b>3 METODOLOGIA.....</b>	<b>15</b>
3.1 Obtenção do caldo de fermentação.....	15
3.2 Biossíntese das AgNPs.....	16
3.3 Caracterização das AgNPs.....	16
3.4 Avaliação da atividade antimicrobiana das AgNPs.....	17
3.5 Avaliação da atividade antibiofilme das AgNPs.....	18
3.6 Avaliação da atividade citotóxica das AgNPs.....	19
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>19</b>
4.1 Biossíntese e caracterização das AgNPs.....	19
4.2 Atividade antimicrobiana das AgNPs.....	28
4.3 Atividade antibiofilme das AgNPs.....	34
4.4 Atividade citotóxica das AgNPs.....	37
<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>38</b>
<b>6 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>41</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A nanotecnologia é um campo que começou a ser amplamente explorado nas últimas décadas, sobretudo após a criação de programas como o “*National Nanotechnology Initiative*” (NNI) dos Estados Unidos. Com variados tamanhos, formatos e materiais, as nanopartículas de prata (AgNPs) são partículas em escala nanométrica feitas de prata e capazes de desempenhar um papel muito importante no combate aos microrganismos patogênicos, propriedade que atraiu muita atenção durante a pandemia da COVID-19 no ano de 2020 (RUIZ-HITZKY et al., 2020).

Com a demanda dos consumidores por materiais com propriedades antimicrobianas, o mercado passou a ofertar uma gama de produtos com a capacidade de inibir e/ou destruir microrganismos tais como o SARS-CoV-2 (BETTENHAUSEN, 2022). O mercado têxtil soube explorar essa demanda com maestria e aumentou a produção dos chamados “tecidos antimicrobianos” que, até o momento, restringia-se a produtos destinados ao setor da saúde, como jalecos e máscaras (IVANOSKA-DACIKJ et al., 2023). Contudo, atualmente, é possível encontrar, sem dificuldade, camisetas produzidas com essa mesma tecnologia.

Apesar da popularidade das nanopartículas metálicas ter aumentado nos últimos anos, não é possível ignorar que sua produção envolve substâncias químicas tóxicas e poluentes, como o borohidreto de sódio e N,N-dimetilformamida (DMF)(BAIG & KAMMAKAKAM, 2021). Para remediar essa problemática, um novo campo passou a ser explorado: a síntese verde, também chamada de síntese biológica. Trata-se de uma alternativa aos meios convencionais que faz uso de fontes biológicas, como plantas e microrganismos, para a produção de agentes redutores e estabilizadores utilizados na síntese de nanopartículas. Nesse contexto, a bioprospecção de microrganismos é uma grande aliada.

Dentre os territórios de exploração da biodiversidade microbiana brasileira temos a Mata Atlântica. Trata-se da maior floresta pluvial tropical do continente americano, com cerca de 8 mil espécies endêmicas (Fundação SOS Mata Atlântica & INPE, 2001). Por ser considerado um dos hotspots mundiais de biodiversidade (MYERS et al., 2000), sua bioprospecção é altamente justificada. Deste habitat, Cruz et al. (2018) isolaram da planta *Polygala paniculata* os endofíticos utilizados neste trabalho.

## 1.1 Nanotecnologia

As nanopartículas (NPs) são definidas como partículas sólidas com um tamanho que pode variar de 10 até 100 nm, podem ser aplicadas em uma gama de campos que vão desde a química, física e biologia, até a medicina, engenharia e eletrônica. O conceito de nanociência, área de estudo e manipulação das nanopartículas, foi apresentado para a comunidade pela primeira vez em 1959 pelo ganhador do prêmio Nobel Richard P. Feynman durante sua palestra “*There’s Plenty of Room at the Bottom*” na reunião anual da Sociedade Americana de Física no *California Institute of Technology*. Posteriormente, sua palestra foi transcrita e publicada pela primeira vez em 1960 na revista *Engineering and Science do Caltech*. Apenas 15 anos depois da palestra de Feynman, o termo “nanotecnologia” foi utilizado pela primeira vez pelo cientista Norio Taniguchi (TANIGUCHI et al., 1974).

As propriedades das nanopartículas são variadas e dependem de algumas características intrínsecas, tais como material, tamanho e formato. Em 1990, um grupo de cientistas analisou a Taça Licurgo do Museu Britânico, um artefato do século 4 d.C. que ilustra a morte do rei Licurgo da Trácia (BARBER & FREESTONE, 1990). Essa taça é conhecida por seu vidro dicróico, ou seja, ela é capaz de refletir diferentes cores a depender da incidência de luz, variando de vermelho a verde. A análise revelou que o fenômeno se deve a presença de NPs formadas pela liga de ouro (Au) e prata (Ag). Enquanto a cor vermelha era explicada pela absorção de luz pelas partículas maiores de Au, a cor verde foi atribuída à dispersão de luz pelas nanopartículas de Ag com um tamanho menor que 40 nm (FREESTONE et al., 2007). Esse fenômeno de interação entre a luz e o material é conhecido como ressonância plasmônica e permite distinguir o material, o tamanho e até o formato das NPs metálicas.

Devido à gama de especificidades das NPs, suas aplicações são exploradas em diversos setores, por exemplo, na agricultura como promotores de crescimento (ZHAO et al., 2020) e na medicina como *drug delivery* (DANG & GUAN, 2020). Uma aplicação que tem chamado a atenção dos estudiosos é a propriedade antimicrobiana das NPs de prata (AgNPs). Desde a Antiguidade, a prata era utilizada para tratamento de feridas devido à sua atividade bactericida. A descoberta da penicilina mudou esse cenário, resultando na difusão dos antibióticos por todo o mundo, deixando a prata de lado por décadas. Porém, com o desenvolvimento de

cepas bacterianas multirresistentes, a prata volta a atrair o interesse da comunidade científica (ECKHARDT et al., 2013). A vantagem da utilização de AgNPs em virtude dos antimicrobianos convencionais é seu mecanismo de ação que não causa a pressão seletiva responsável pelo desenvolvimento da resistência microbiana (RAI et al., 2012).

As AgNPs utilizam de diversos mecanismos para contornar a resistência bacteriana aos antimicrobianos (HINDI et al., 2009; KNETSCH et al., 2011). Os íons de  $\text{Ag}^+$  interagem com as proteínas que contêm enxofre e fósforo da parede e da membrana celular das bactérias (BLECHER et al., 2011; KNETSCH et al., 2011), essa ligação com a porção negativa da membrana cria fendas por onde as NPs conseguem adentrar o espaço intracelular. Além disso, a desestabilização da membrana causa o efluxo do conteúdo citoplasmático e a dissipação do gradiente de  $\text{H}^+$ , causando a morte celular (KNETSCH et al., 2011).

No espaço intracelular, as NPs são capazes de causar danos ainda mais significativos como: a) inibição da cadeia de transporte de elétrons (HUANG et al., 2011), b) danificação do DNA e do RNA microbiano (KNETSCH et al., 2011; LARA et al., 2010), c) inibição da replicação e da divisão celular (HUANG et al., 2011), d) desnaturação da subunidade 30S do ribossomo, inibindo a tradução (LARA et al., 2010), e) formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (KNETSCH et al., 2011) e f) inibição da síntese da parede celular em bactérias gram-positivas (LARA et al., 2010). O mecanismo bactericida utilizado pelas AgNPs é fortemente impactado por suas propriedades, como tamanho e formato.

Apesar da eficiência das AgNPs no controle microbiano, a síntese química desses materiais envolve solventes orgânicos, agentes redutores e estabilizadores, muitas vezes tóxicos, além da geração de resíduos potencialmente nocivos para o meio ambiente (BAIG & KAMMAKAKAM, 2021). Neste contexto, a síntese verde se destaca como uma abordagem ecologicamente vantajosa, que não traz prejuízos para o meio ambiente, além de ser mais barata, utilizando solventes como a água e redutores como a glicose. Outra vantagem da síntese verde é a possibilidade de potencializar a ação das NPs por meio da adesão de moléculas bioativas, demonstrando um possível sinergismo entre os metabólitos secundários e as NPs (HELMY et al., 2020).

## 1.2 Microrganismos endofíticos

Os endófitos são microrganismos, normalmente fungos e bactérias, que colonizam os tecidos vegetais inter e/ou intracelularmente de forma simbiótica. Essa associação entre plantas e microrganismos tem sido estudada há décadas, e ainda não foi possível elucidar inteiramente sua complexa relação. O que se sabe é que esses microrganismos são inofensivos para seus hospedeiros e podem aumentar a resistência das plantas por meio da produção de fitohormônios e compostos bioativos contra insetos e patógenos (HARDOIM et al., 2008).

Existe um paralelo entre as propriedades medicinais das plantas e os metabólitos produzidos por esses microrganismos que torna a bioprospecção endófitos bastante atrativa. É o caso do taxol, um produto natural com propriedade antitumoral muito utilizado no tratamento de cânceres de mama e ovário. Por muito tempo a principal fonte de produção deste composto foi a árvore *Taxus brevifolia* (STIERLE et al., 1993). Todavia, o cultivo dessa planta requer tempo e investimento. A descoberta do *Taxomyces andreanae*, um fungo endofítico encontrado na *T. brevifolia*, como organismo produtor do taxol tornou o composto muito mais acessível.

Acredita-se que a capacidade dos microrganismos de produzirem compostos vegetais, e vice e versa, tenha resultado de uma possível transferência horizontal de genes durante a evolução (CASSADY et al., 2004). Por essa razão, a bioprospecção de produtos naturais é tão relevante e explorada (BOGAS et al., 2020), pois trata-se de uma fonte inesgotável de conhecimento vital para o desenvolvimento da sociedade.

## 1.3 Tecidos antimicrobianos

Em 2020, o mundo foi abalado pela pandemia de COVID-19, a primeira da era digital. A disseminação do vírus e as medidas de prevenção adotadas causaram impactos políticos, sociais e econômicos no mundo todo. Um desses impactos foi o crescimento da demanda por produtos com propriedades antimicrobianas, como tecidos e produtos de limpeza (BETTENHAUSEN, 2022). A indústria têxtil desempenhou um papel de grande importância no combate à pandemia com a produção massiva de máscaras e EPIs.

De janeiro a abril de 2020, a produção da indústria têxtil na Europa havia caído 16,8% em comparação com 2019, contudo, a urgência por máscaras e jalecos abriu uma janela de oportunidade para a inovação deste setor, demonstrando a importância dos têxteis no combate a epidemias (IVANOSKA-DACIKJ et al., 2023). Por outro lado, a produção extensiva de máscaras de proteção descartáveis rapidamente se tornou um problema ambiental (LI et al., 2022), levantando uma nova necessidade: máscaras reutilizáveis com propriedades antimicrobianas (SEIDI et al., 2021).

A demanda por tecidos antimicrobianos não findou com a pandemia. Atualmente é possível encontrar no mercado, além de EPIs, roupas que fazem uso do mesmo tipo de tecnologia antimicrobiana. Existem, hoje, tecidos com as mais variadas funcionalidades, tais como regulação térmica (CAI et al., 2019), resistência a fogo (ILLEPERUMA et al., 2016) e monitoramento cardíaco (ARQUILLA et al., 2020); estes são denominados *smart fabrics*, ou tecidos inteligentes. Apesar das inúmeras funcionalidades, a propriedade antimicrobiana dos tecidos inteligentes é a mais comercializada no setor de vestuários atual. As famosas “*tech T-shirts*” ganharam o mercado brasileiro nos últimos anos e prometem uma tecnologia “desfavorável à proliferação de bactérias do mau cheiro” - Insider® (Insider Comércio e Confecção de Peças do Vestuário LTDA, São Paulo, SP., Brasil).

Embora muito utilizadas, as fibras de algodão apresentam uma baixa resistência aos microrganismos (SEVENTEKIN & UCARCI, 1993). A infestação microbiana nas fibras causa mau cheiro, descoloração e perda de propriedades como resistência à tração e elasticidade, diminuindo a vida útil das roupas (GUPTA, 2010). Para aumentar o tempo de vida dos produtos, as indústrias têxteis aderiram à “moda antimicrobiana” e passaram a aplicar tratamentos de finalização antimicrobianos aos tecidos.

Normalmente, a propriedade antimicrobiana das roupas é adquirida por meio da aplicação de uma solução coloidal de AgNP diretamente nas fibras do tecido pelo método *pad-dry-cure*. No Brasil encontramos, por exemplo, a NANOX® (NANOX Tecnologia S/A, São Carlos, SP., Brasil) que fornece os nanoaditivos antimicrobianos utilizados na fabricação das camisetas da Basicamente® (BASICAMENTE, Jaraguá do Sul, SC., Brasil), informação encontrada no próprio site da marca (Disponível em: <https://basicamente.com/>. Acesso em: 23/11/2024.).

O mercado de nanomateriais antimicrobianos têm crescido consideravelmente no país. Nas últimas duas décadas foram realizadas diversas iniciativas governamentais para fomentar e fortalecer esse setor. A parceria entre empresas e instituições públicas resultou na consolidação de empresas nacionais com atuação internacional, como a NANOX®, evidenciando o potencial do mercado brasileiro na área (DIAS et al., 2021).

## 2 OBJETIVO GERAL

Investigar o potencial antimicrobiano das nanopartículas de prata (AgNPs) biossintetizadas a partir do caldo de fermentação dos fungos endofíticos *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp., isolados da *Polygala paniculata*, da Mata Atlântica (SisGen – registration number: AF1A75A).

### 2.1 Objetivos específicos

- Obter o caldo de fermentação dos fungos *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp.;
- Realizar a biossíntese e caracterização das AgNPs;
- Avaliar *in vitro* a atividade antimicrobiana das AgNPs por meio da técnica da difusão em meio sólido a partir de orifício;
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) das AgNPs contra os patógenos;
- Avaliar a atividade antibiofilme das AgNPs;
- Avaliar a citotoxicidade das AgNPs.

## 3 METODOLOGIA

### 3.1 Obtenção do caldo de fermentação

Os fungos endofíticos foram reativados a partir do cultivo em placas de Petri contendo 15 mL de meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA), na ausência de luz, à temperatura de 28°C. Para a ativação do *Fusarium* sp., 7 dias foram suficientes, enquanto para o *Penicillium* sp. foram necessários 10 dias de incubação. Após o crescimento das colônias, as cepas foram cultivadas em quadruplicata em *Erlenmeyers* de 250 mL contendo 100 mL de meio líquido Batata-Dextrose (BD) e 10 discos de 5 mm de diâmetro da cultura em cada um dos frascos. Em seguida, foram incubados no agitador orbital a 120 rpm em uma temperatura próxima dos 26°C durante 72 horas. A massa micelial dos fungos foi separada utilizando filtros de papel e lavada com água destilada para retirar quaisquer resquícios do substrato. Cerca de 10 g de peso fresco da massa micelial foi recuperada e adicionada a *Erlenmeyers* de 250 mL contendo 100 mL de água destilada. Por fim, a massa micelial foi novamente incubada por 72 horas no agitador orbital a 120 rpm e 26°C.

### 3.2 Biossíntese das AgNPs

Para 100 mL de caldo de fermentação foi adicionado 1 mL de solução de nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ), visando a concentração final de 1 mM ( $1 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ ), tendo em vista o estudo conduzido por Veerasamy et al. (2011) que demonstrou que a concentração de  $\text{AgNO}_3$  que promoveu a maior eficiência na biossíntese de AgNPs foi de 1mM. As soluções reacionais dos fungos *Fusarium* sp. (NPs-F) e *Penicillium* sp. (NPs-P) foram mantidas em agitador orbital a temperatura de 24°C no escuro a 120 rpm, durante nove dias. Uma das amostras contendo o caldo de fermentação sem o  $\text{AgNO}_3$  foi utilizada como controle.

### 3.3 Caracterização das AgNPs

A etapa de caracterização das AgNPs foi realizada no Laboratório Interdisciplinar de Eletroquímica e Cerâmica (LIEC) do Centro de Desenvolvimento de Materiais Funcionais (CDMF) da UFSCar, São Carlos/SP. As soluções reacionais dos fungos *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp. foram submetidas à espectroscopia de UV-Vis com duplo feixe operando entre 200 e 800 nm em três momentos distintos da incubação (72h, 144h e com 216h de incubação) e utilizando água destilada como branco (zero). Para visualização das AgNPs, foi conduzida a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), realizada também no LIEC.

A técnica utilizada para a quantificação de AgNPs foi a Análise de Rastreamento de Nanopartículas, também denominada NTA (do inglês, Nanoparticle Tracking Analysis). Ela foi realizada no Grupo de Nanomedicina e Nanotoxicologia (GNano) do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo (USP).

### 3.4 Avaliação da atividade antimicrobiana das AgNPs

As propriedades antimicrobiana, antibiofilme e citotóxica das AgNPs foram testadas contra os patógenos *Escherichia coli* ATCC 11775 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 pertencentes ao Laboratório de Microbiologia e Biomoléculas (LaMiB) do Departamento de Morfologia e Patologia (DMP) da UFSCar, São Carlos/SP. As cepas, mantidas em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ , foram transferidas para o caldo *Mueller Hinton* (MH) por 24 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ . Em seguida, as colônias bacterianas foram isoladas e, após 24 horas, ajustadas em uma solução salina esterilizada (0,9%). Utilizou-se o espectrofotômetro para a padronização do inóculo bacteriano no comprimento de onda de 620 nm para aferir a densidade óptica (DO) até obter um valor entre 0,08 e 0,10. Para os testes, os caldos de fermentação e as amostras contendo as AgNPs foram filtrados com filtros de seringas estéreis com 25 mm de diâmetro e poros de 0,22  $\mu\text{m}$  para retirada de contaminantes.

Para o teste qualitativo do efeito antimicrobiano das AgNPs sobre as cepas de patógenos escolhidos, as bactérias patogênicas foram distribuídas sobre a superfície das placas de Petri contendo o Ágar MH. Em cada placa foram feitos 3 orifícios equidistantes, com diâmetro de aproximadamente 1 cm, nos quais foram depositadas alíquotas de 200  $\mu\text{L}$  da solução reacional contendo as NPs. Em seguida, as placas foram incubadas por 24 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ . Foram utilizadas alíquotas de 200  $\mu\text{L}$  de  $\text{AgNO}_3$  a 1mM e do caldo de fermentação puro a título de comparação.

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi conduzida utilizando a metodologia da *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012). Alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  de caldo MH foram distribuídas em cada um dos poços da microplaca. Alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  da amostra de NPs foram adicionadas ao primeiro poço e, após homogeneização, transferidas para o segundo poço e assim sucessivamente até a finalização da diluição seriada. Em seguida, 5  $\mu\text{L}$  dos inóculos patogênicos foram adicionados em cada um dos poços da microplaca contendo as diluições de AgNPs. As microplacas foram incubadas a  $28^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. Adicionou-se 10  $\mu\text{L}$  de resazurina em cada poço e incubou-se as microplacas novamente por 4 horas. Como controle negativo foi utilizado 100  $\mu\text{L}$  de caldo MH e como controle positivo 100  $\mu\text{L}$  de MH mais 5  $\mu\text{L}$  de inóculo patogênico.

A resazurina é utilizada como um indicador de viabilidade celular. Esse composto, que apresenta coloração azul, é reduzido à resorufina ao entrar em contato com as células viáveis e passa a apresentar a cor vermelha altamente fluorescente (LAVOGINA et al., 2022).

### **3.5 Avaliação da atividade antibiofilme das AgNPs**

Para o teste da atividade antibiofilme utilizou-se a bactéria produtora de biofilme *S. aureus* ATCC 29213 de acordo com o trabalho desenvolvido por Stepanović et al. (2000). Alíquotas de 100 µL do caldo de tripticaseína de soja (TSB) enriquecido com glicose 1% foram adicionadas a cada um dos poços de uma microplaca de 96 poços. Em seguida, alíquotas de 100 µL da solução de AgNPs foi adicionada a primeira coluna e a diluição seriada foi realizada da mesma forma do teste de CIM. Alíquotas de 10 µL do inóculo bacteriano foram adicionadas e a microplaca foi incubada por 72 horas a 37°C. Após este período, a microplaca foi lavada com tampão de fosfato salino (PBS) três vezes para remoção das células em suspensão. Em cada um dos poços foi adicionado 100 µL de cristal violeta 1%, em seguida a lavagem foi novamente realizada.

Por fim, adicionou-se 100 µL de etanol 95% para a solubilização do biofilme e aguardou-se 45 minutos. A placa teve sua absorbância aferida em um espectrofotômetro a 570 nm. Foi utilizado como controle negativo apenas o caldo TSB enriquecido com glicose 1% e como controle negativo o caldo e o inóculo bacteriano.

### 3.6 Avaliação da atividade citotóxica das AgNPs

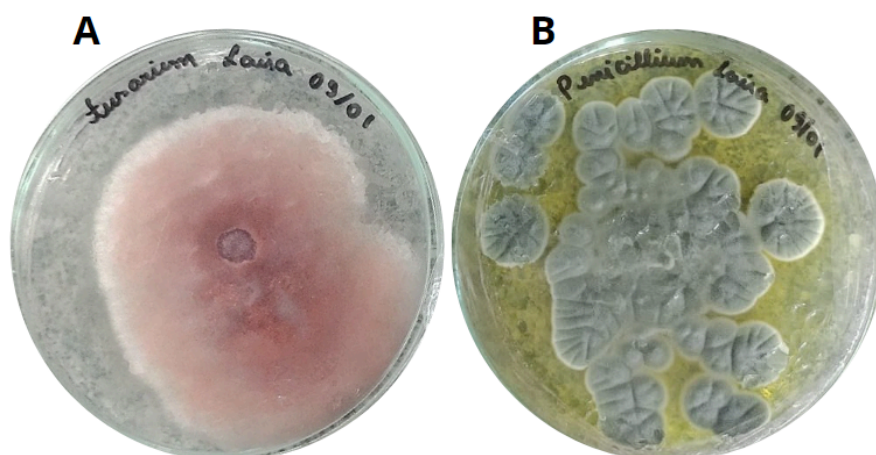
Foram utilizadas células da linhagem HDFn (*Human Dermal Fibroblasts*, neonatal) cedidas pela Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Fernanda de Freitas Anibal do Laboratório de Inflamação e Doenças Infecciosas (LIDI) do Departamento de Morfologia e Patologia (DMP). Para a avaliação da viabilidade celular foi utilizado o método colorimétrico pelo 3-(4,5-dimetil tiazol 2-il) 2,5-difenil brometo de tetrazólio (MTT), conhecido como ensaio do MTT. Este ensaio baseia-se na capacidade de conversão do MTT a formazan pelas enzimas desidrogenases presentes nas mitocôndrias (MOSMANN, 1983). Assim, a produção de formazan pode ser relacionada à presença de desidrogenases ativas, ou seja, células viáveis, possibilitando sua utilização em testes de citotoxicidade. A leitura da absorbância foi realizada em leitor de microplacas no comprimento de onda de 570 nm.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

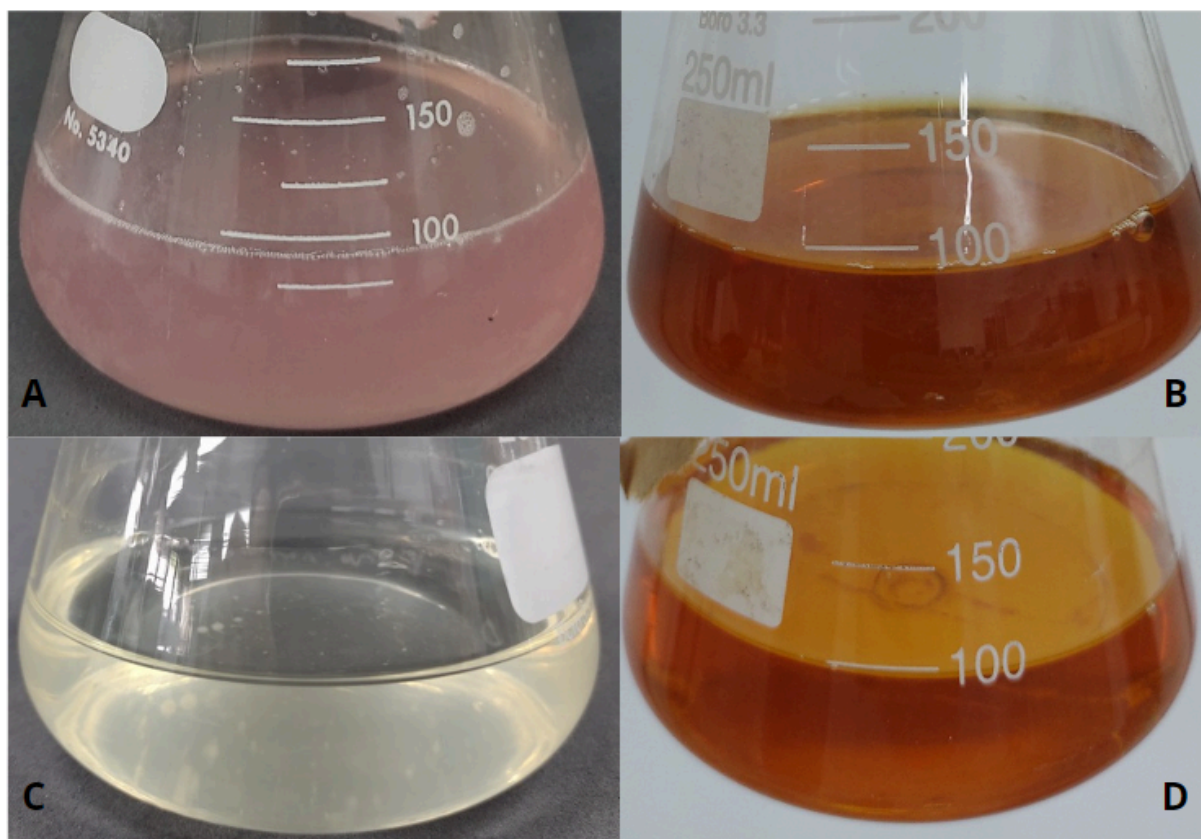
### 4.1 Biossíntese e caracterização das AgNPs

A Figura 1 ilustra a morfologia dos fungos obtida após cultivo em meio sólido. Após a filtração do micélio, o caldo de fermentação do *Fusarium* sp. apresentou a coloração rosada (Figura 2.A), passado os 9 dias da adição do AgNO<sub>3</sub> a coloração passou a ser amarronzada (Figura 2.B). O mesmo aconteceu com o caldo de fermentação do *Penicillium* sp. que passou de amarelada (Figura 2.C) para amarronzada (Figura 2.D). A mudança da cor da solução reacional é um bom indicador qualitativo da formação das AgNPs.

**Figura 1.** (A) Fungo *Fusarium* sp. após 7 dias de incubação a 28°C e (B) fungo *Penicillium* sp. após 10 dias de incubação a 28°C.

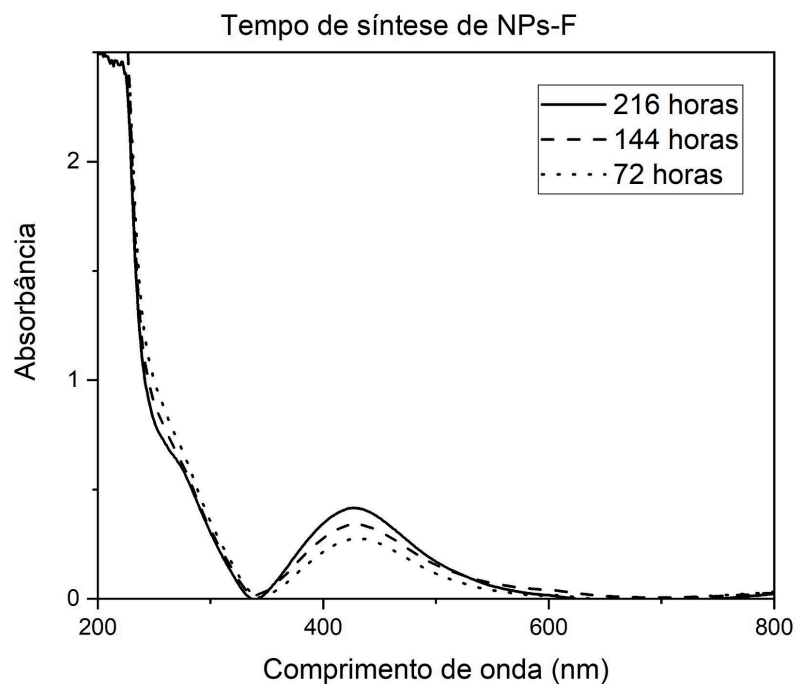


**Figura 2.** Caldo de fermentação do *Fusarium* sp. (A) e do *Penicillium* sp. (C) após filtragem da massa micelial dos fungos. Solução reacional do *Fusarium* sp. (B) e do *Penicillium* sp. (D) após 9 dias da adição do  $\text{AgNO}_3$ . A mudança da coloração para marrom indica a síntese das nanopartículas.



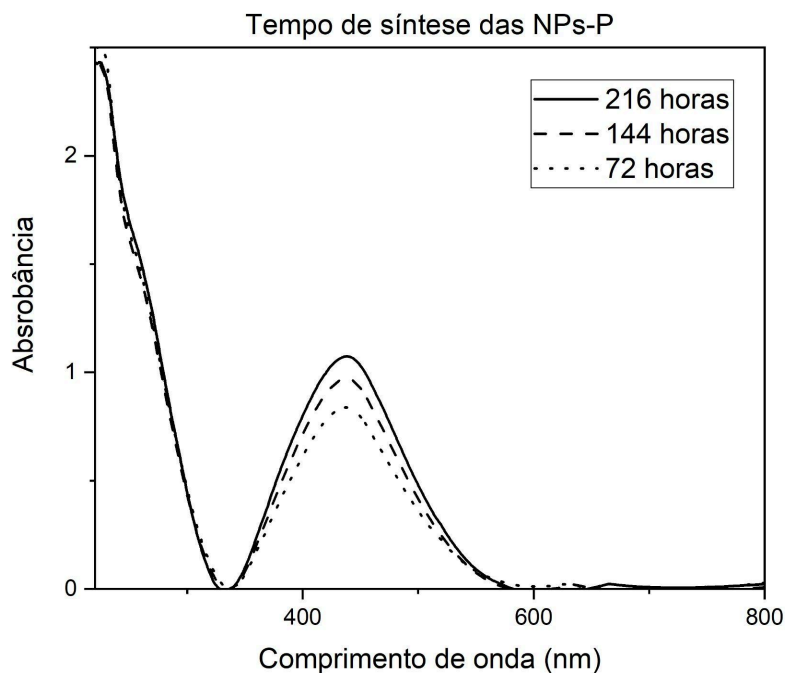
A partir da análise da espectroscopia foi possível comprovar a presença das AgNPs e o desempenho da síntese verde pelo caldo de fermentação do *Fusarium* sp. e do *Penicillium* sp. em função do tempo de incubação.

**Figura 3.** Espectro UV-vis com a leitura da absorbância em diferentes períodos de incubação.



A Figura 3 mostra o aumento da amplitude da curva no comprimento de onda próximo a 440 nm que pode ser interpretado como o aumento da concentração de AgNPs no caldo de fermentação do *Fusarium* sp..

**Figura 4.** Espectro UV-vis com a leitura da absorbância em diferentes períodos de incubação.



A Figura 4 também mostra o aumento da amplitude da curva no comprimento de onda próximo a 440 nm, indicando o aumento da concentração de AgNPs no caldo de fermentação do *Penicillium* sp..

As AgNPs exibem propriedades ópticas únicas que dependem do tamanho e da forma das nanopartículas, esse fenômeno é conhecido como ressonância de plásmon de superfície (MOORES & GOETTMANN, 2006; JANA, GANGULY & PAL, 2016). O fóton incidente é responsável pela excitação dos elétrons do material metálico que passam a ressoar. Os elétrons ressoantes são chamados de plásmons de superfície, e causam a perda da intensidade de reflexão do fóton. A leitura de ambas as AgNPs exibiram a absorção da radiação na região visível do espectro eletromagnético no intervalo de 400 a 450 nm, espectro associado à ressonância plasmônica de superfície do metal de prata em escala nanométrica.

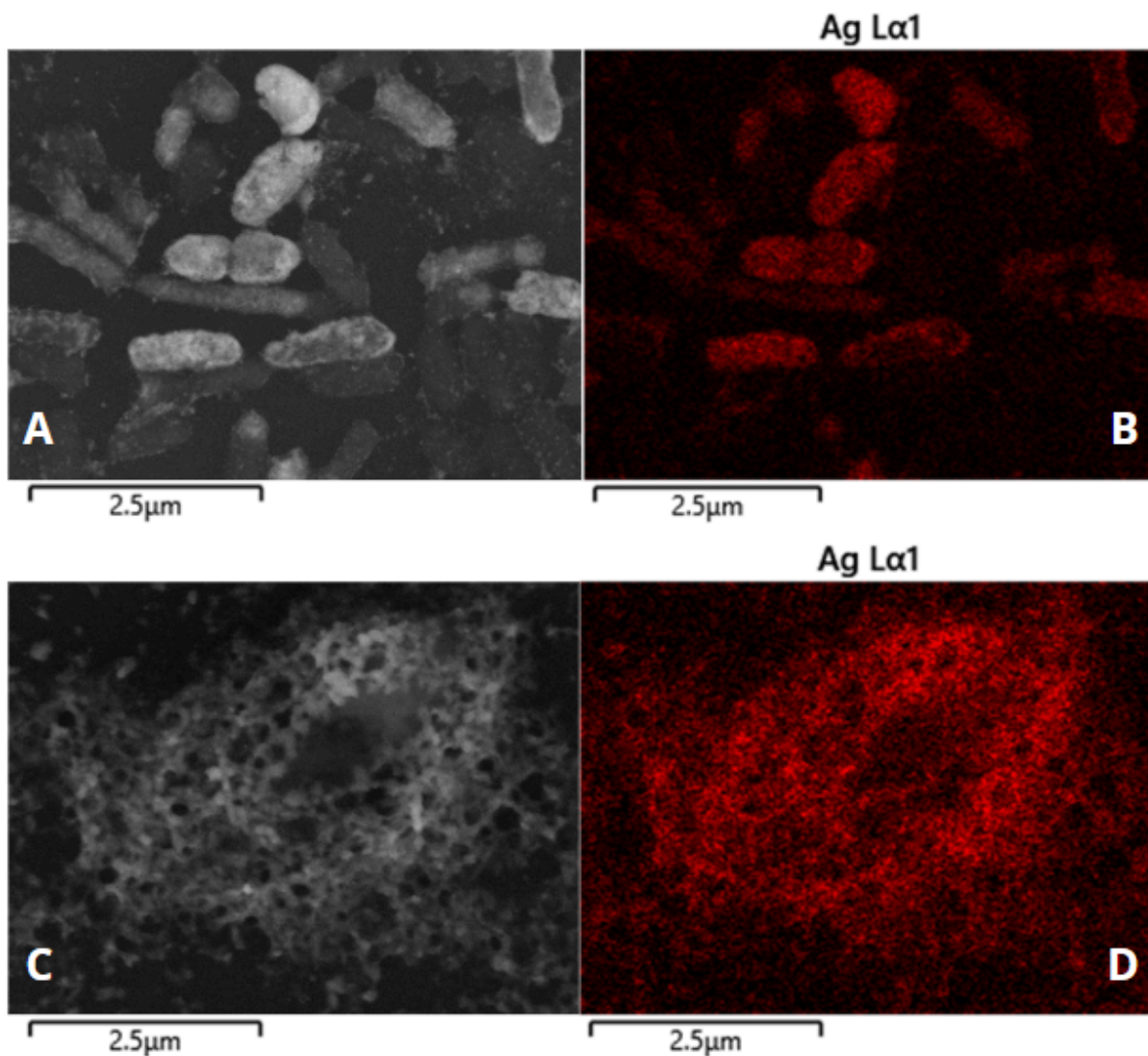
Comparando as Figuras 4 e 5, nota-se que o pico obtido pelas NPs-P é quase duas vezes maior que o pico obtido pelas NPs-F, sendo possível inferir que a concentração de AgNPs presentes na amostra do fungo *Penicillium* sp. é maior que a concentração presente na amostra do *Fusarium* sp.. Essa hipótese foi, posteriormente, confirmada pela análise de rastreamento de nanopartículas (NTA).

A banda de absorção próximo ao intervalo de 200-300 nm em ambos os caldos, indica a presença de resíduos de aminoácidos aromáticos presentes nas proteínas produzidas pelos fungos, como o triptofano e a tirosina (EFTINK & GHIRON, 1981). Essas proteínas são secretadas para o ambiente extracelular, compondo uma das muitas substâncias presentes no caldo de fermentação. Sua presença corrobora a teoria de que o produto secretado pelos fungos é o responsável pela redução extracelular dos  $Ag^+$ .

O trabalho conduzido por Ahmad et al. (2003) indica que uma das principais proteínas responsáveis pela síntese extracelular realizada pelo fungo *Fusarium* sp. faz parte da família das redutases NADH-dependentes. Apesar da teoria enzimática ter uma grande adesão da comunidade científica quando nos referimos à redução extracelular da  $Ag^+$ , o trabalho de Maliszewska et al. (2014) mostrou que a redução ocorria mesmo em altas temperaturas, indicando que o método enzimático não é necessário para síntese, uma vez que a atividade enzimática depende da estrutura da proteína que se desnatura em altas temperaturas.

Por essa razão, acredita-se que a interação entre os aminoácidos redutores e os íons metálicos seja a verdadeira responsável pela síntese de NPs metálicas (MALISZEWSKA et al., 2014). O aminoácido redutor mais provável presente nas proteínas é a cisteína, que apresenta um grupo tiol na cadeia lateral capaz de interagir com os íons metálicos. Dessa forma, qualquer proteína contendo o resíduo de cisteína seria capaz de reduzir  $Ag^+$ , tanto em sua forma terciária como em sua forma desnaturada (RANGNEKAR et al., 2007).

**Figura 5.** Estruturas obtidas a partir da solução reacional do *Fusarium* sp. (A) e *Penicillium* sp. (C). Levando em conta a escala das imagens, é possível inferir que as estruturas são aglomerados de NPs ou, ainda, partículas de escala micrométrica formadas. Os pontos vermelhos indicam a presença da prata nas estruturas do *Fusarium* sp. (B) e *Penicillium* sp. (D).



A Figura 5.A ilustra a imagem obtida por meio do MEV de bancada da solução reacional do *Fusarium* sp. e demonstra várias estruturas com formato de bastonetes contendo prata em sua composição. A Figura 5.C ilustra a imagem obtida da solução reacional do *Penicillium* sp. e demonstra uma estrutura formada pela agregação de estruturas menores, também contendo prata em sua composição. Contudo, não foi possível capturar imagens na escala nanométrica com esse equipamento, dificultando a visualização das NPs isoladas.

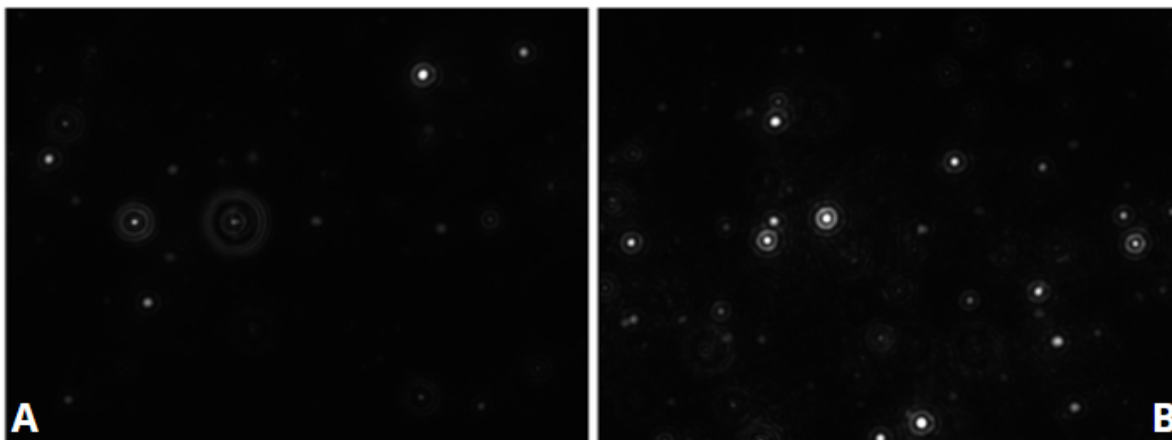
Acredita-se que a estabilidade das AgNPs na solução reacional possa ser atribuída à presença de proteínas no caldo de fermentação fúngico que interagem

com a superfície da partícula. Estudos indicam que as NPs podem ser encapsuladas e, conseqüentemente, estabilizadas por proteínas com grupos amina e/ou carboxila livres, resíduos de cisteína e fosfoproteínas ligadas à superfície. A estabilidade excepcional das AgNPs produzidas a partir do *Fusarium* sp. é um fato já relatado na literatura (DURÁN et al., 2005) que propõem uma forte presença de proteínas estabilizadoras no caldo de fermentação desses fungos, impedindo a agregação das NPs. Por outro lado, as imagens obtidas pelo MEV demonstraram que as nanopartículas produzidas pelo *Penicillium* sp. (NPs-P) podem apresentar menor estabilidade em comparação com as produzidas pelo fungo *Fusarium* sp. (NPs-F.) Essa análise resulta da observação da estrutura presente na solução reacional do *Penicillium* sp. que é formada pela agregação de estruturas menores, indicando uma menor concentração de agentes estabilizadores no caldo de fermentação deste fungo.

Para a NTAs, as amostras de NPs-F e NPs-P foram diluídas em água destilada na proporção 1:20 e submetidas à leitura no equipamento. Essa análise permite determinar o tamanho das partículas em meio líquido através da taxa de movimento browniano capturado em vídeo pelo equipamento, ou seja, o movimento aleatório resultante da colisão de partículas com moléculas do meio líquido. A concentração da amostra é estimada pela contagem das partículas encontradas no campo de visão, para partículas com diâmetro entre 10 a 1000 nm.

A Figura 6 refere-se à captura do movimento das AgNPs. Os pontos luminescentes representam as AgNPs e os anéis em torno delas representam o movimento browniano. A partir das figuras é possível afirmar que a amostra do fungo *Penicillium* sp. apresenta maior concentração devido ao elevado número de pontos brilhantes presentes no campo de visão do equipamento.

**Figura 6.** AgNPs produzidas pela síntese verde a partir do fungo *Fusarium* sp. (NPs-F) representadas em (A) e *Penicillium* sp. (NPs-P) representadas em (B).



No que tange a concentração de AgNPs, a amostra de NPs-F possui cerca de  $1,29 \times 10^{10}$  partículas/mL, ao passo que a amostra de NPs-P possui cerca de  $2,54 \times 10^{10}$  partículas/mL. Indicando que a eficiência da síntese verde utilizando o caldo de fermentação do fungo *Penicillium* sp. é quase duas vezes maior que a eficiência da síntese utilizando o caldo do fungo *Fusarium* sp..

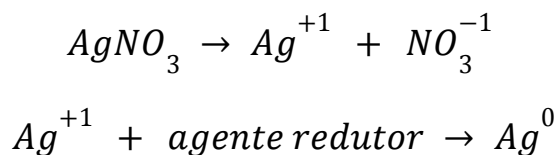
Para determinar a concentração de AgNPs com base na massa foi realizado o cálculo representado na Equação 1 considerando que as AgNPs apresentam o formato circular, sendo o raio das NPs-F  $\approx 29,5 \text{ nm}$ , o raio das NPs-P  $\approx 42,5 \text{ nm}$  e a densidade da prata  $\approx 10,49 \text{ g/cm}^3$ .

$$\text{Concentração} = \frac{\text{Número de AgNPs} \times \text{Volume da AgNPs} \times \text{Densidade da Ag}}{\text{Volume da solução}}$$

**Equação 1.** Cálculo da concentração de AgNPs produzidas

Dessa forma, a concentração de NPs-F produzida foi igual a  $14,5 \mu\text{g/mL}$  e a concentração de NPs-P foi igual a  $85,5 \mu\text{g/mL}$ .

Para calcular o fator de conversão do  $\text{AgNO}_3$  a AgNPs, deve-se levar a conta a fórmula da reação (Equação 2), ou seja, para 1 mol de  $\text{AgNO}_3$  tem-se 1 mol de  $\text{Ag}^+$ .



**Equação 2.** Reação de redução do AgNO<sub>3</sub>

A concentração inicial de Ag<sup>+1</sup> foi de 1,08 x 10<sup>4</sup> ug/mL. Para calcular a eficiência da reação de redução, utilizou-se a Equação 3, resultando em um coeficiente de 0,1% para a síntese verde a partir do fungo *Fusarium* sp. e 0,8% *Penicillium* sp..

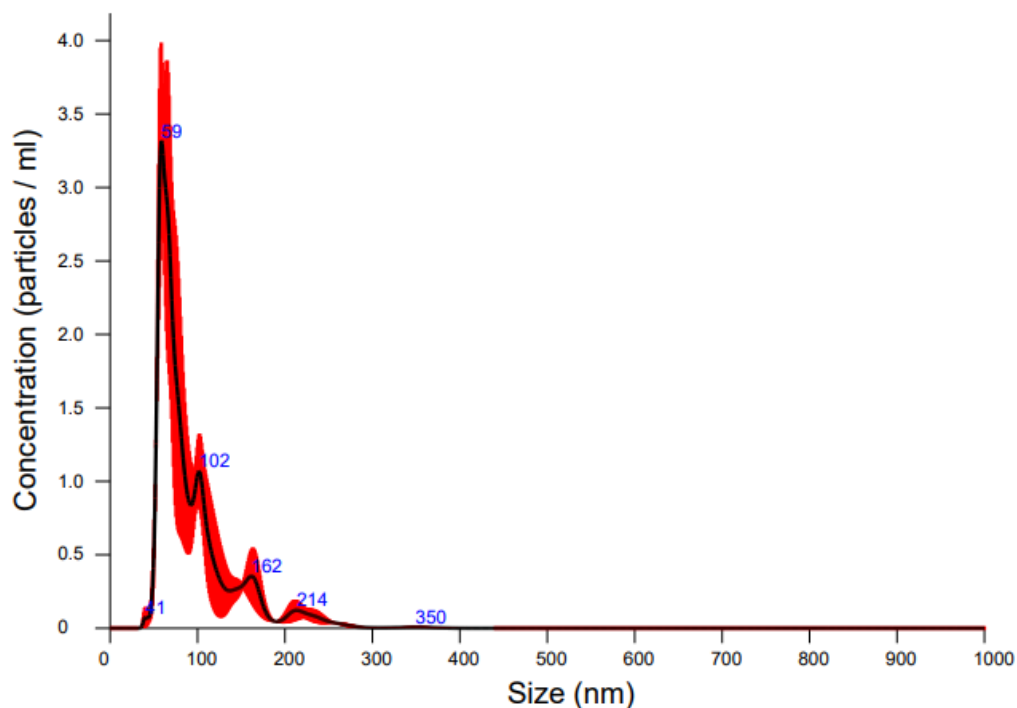
$$Coeficiente\ de\ conversão = \frac{Massa\ final\ de\ Ag}{Massa\ inicial\ de\ Ag}$$

**Equação 3.** Cálculo da eficiência da síntese verde

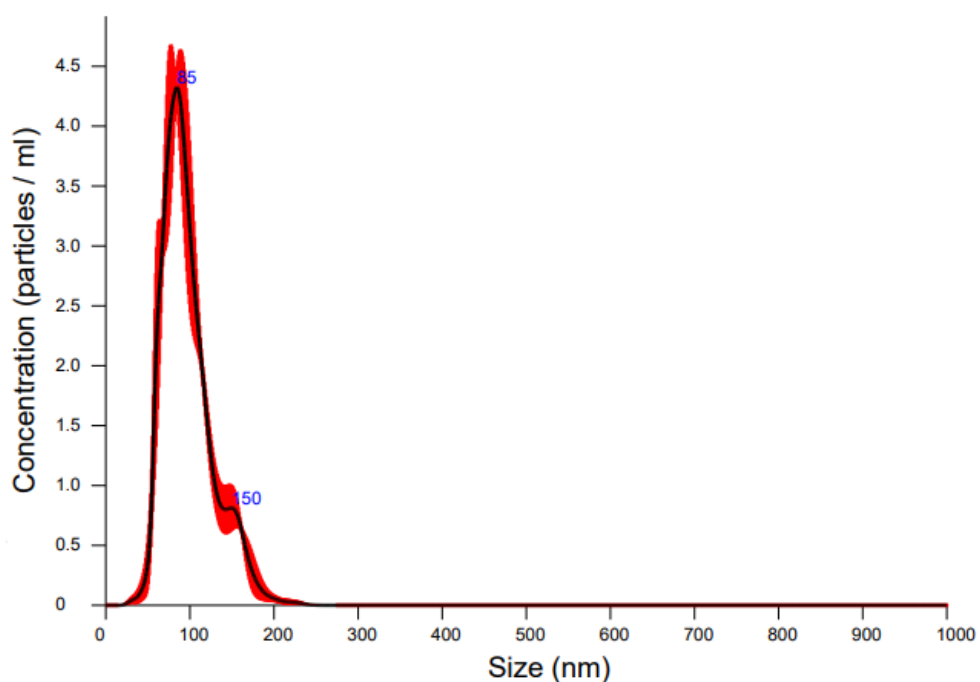
Foram encontrados dados na literatura que propõem a otimização da síntese por meio da incidência de luz durante a redução. Tal hipótese não foi testada neste trabalho (LIU et al., 2014; ZHANG et al., 2016), mas não impede que descartemos a síntese verde como método de escala industrial. É necessário investigar quais parâmetros podem ser utilizados para aumentar a eficiência e garantir um bom desempenho de produção.

Outra importante informação obtida através da NTA diz respeito ao tamanho das AgNPs produzidas. De acordo com a análise, a maior parte das AgNPs presentes na amostra de NPs-F apresenta cerca de 59 nm de diâmetro (Figura 7), enquanto na amostra de NPs-P a maior parte apresenta cerca de 85 nm de diâmetro (Figura 8). Além disso, o caldo do *Fusarium* sp. foi capaz de produzir uma maior variedade de tamanhos em comparação com o caldo *Penicillium* sp..

**Figura 7.** Distribuição de tamanhos das NPs-F pela concentração produzida.



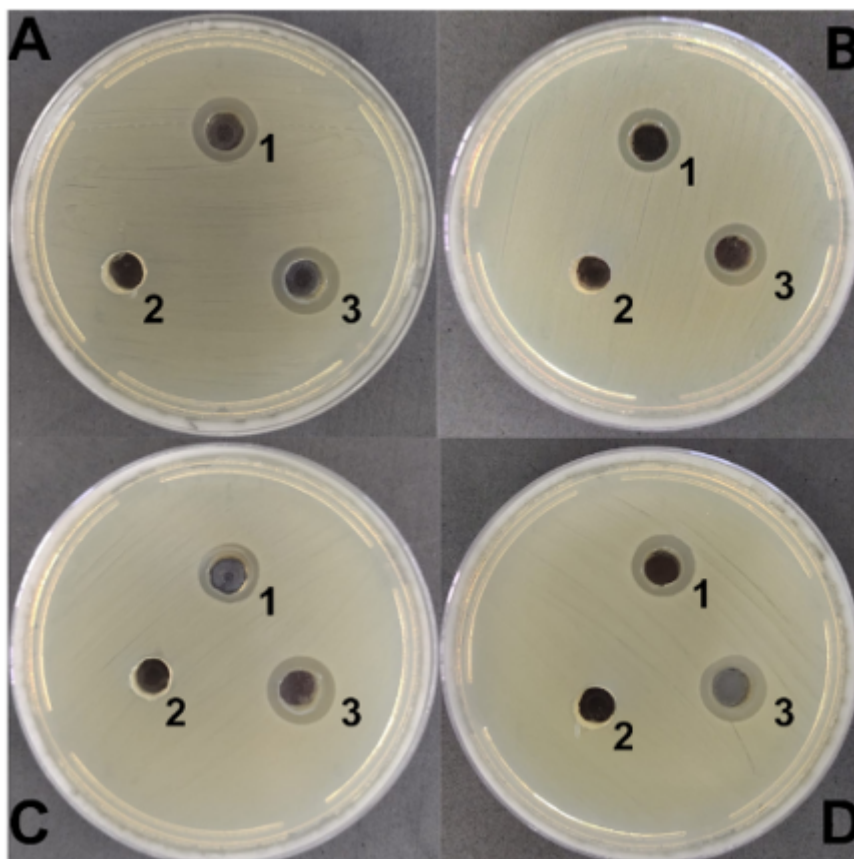
**Figura 8.** Distribuição de tamanhos das NPs-P pela concentração produzida.



#### 4.2 Atividade antimicrobiana das AgNPs

As Figuras 9 ilustram o resultado da técnica de difusão em meio sólido a partir de orifício para os patógenos *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente. O poço utilizado apresenta 8 mm de diâmetro e foi considerado no aferimento da zona de inibição.

**Figura 9.** Atividade antimicrobiana das NPs-F (A.1 e C.1), caldo de fermentação do *Fusarium* sp. (A.2 e C.2) e  $\text{AgNO}_3$  (A.3 e C.3) contra *E. coli* (A) e *S. aureus* (C) e atividade antimicrobiana das NPs-P (B.1 e D.1), caldo de fermentação do *Penicillium* sp. (B.2 e D.2) e  $\text{AgNO}_3$  (B.3 e D.3) contra *E. coli* (B) e *S. aureus* (D).



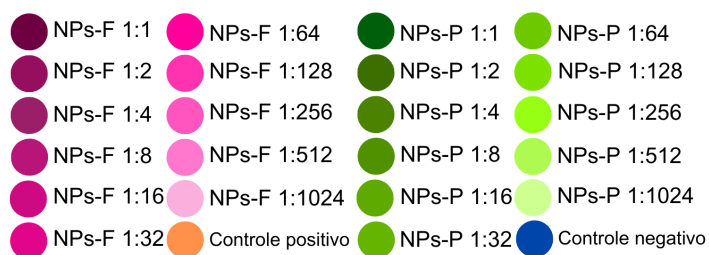
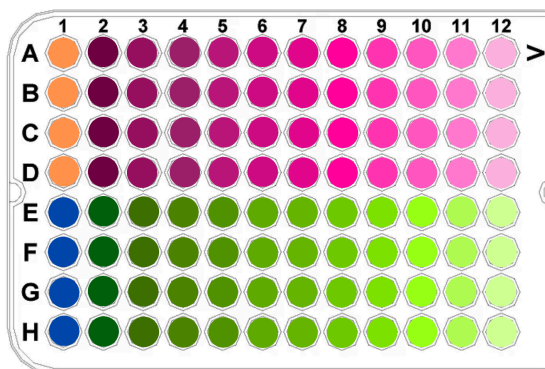
O caldo de fermentação puro dos fungos não foi capaz de apresentar atividade antimicrobiana significativa contra a *E. coli* ou *S. aureus*. Conforme observado na Tabela 1, a atividade antimicrobiana das NPs-F foi superior à atividade antimicrobiana das NPs-P para ambos os patógenos.

**Tabela 1.** Diâmetro da zona de inibição (mm) de bactérias gram-negativa e gram-positiva.

	<b>NPs-F</b>	<b>NPs-P</b>	<b><math>\text{AgNO}_3</math></b>
<i>E. coli</i>	$16,7 \pm 0,06$	$14,3 \pm 0,12$	$14,5 \pm 0,08$
<i>S. aureus</i>	$15,0 \pm 0,1$	$13,7 \pm 0,16$	$1,50 \pm 0,1$

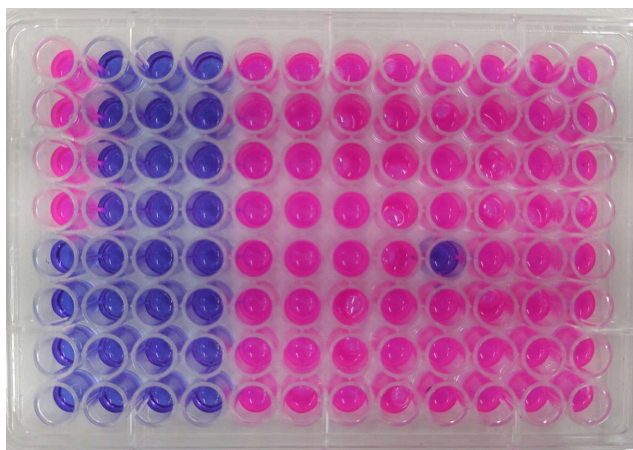
Para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) das AgNPs, foi utilizado o esquema da Figura 10, no qual estão representadas no gradiente da cor rosa as concentrações utilizadas de NPs-F, no gradiente da cor verde as concentrações utilizadas de NPs-P, na cor laranja o controle positivo e na cor azul o controle negativo.

**Figura 10.** Esquema utilizado para a determinação da CIM utilizando microplacas de 96 poços.



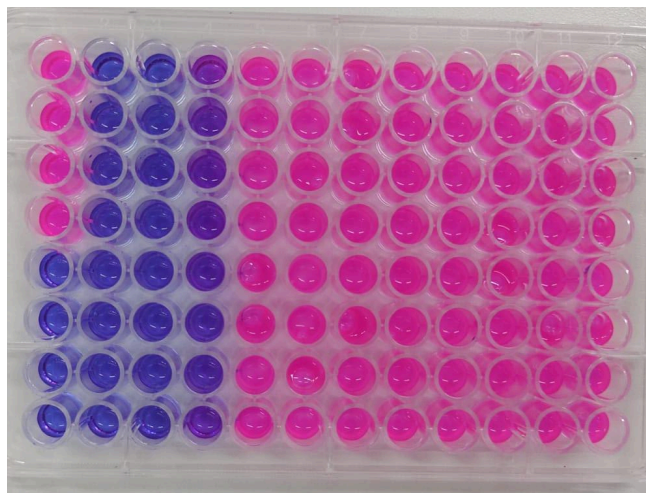
A Figura 11 ilustra os resultados obtidos com a *E. coli*. A CIM encontra-se entre as concentrações 1:4 e 1:8 tanto para as NPs-F quanto para as NPs-P.

**Figura 11.** Microplaca para determinação da concentração inibitória mínima de *E. coli*.



A Figura 12 ilustra os resultados obtidos com a *S. aureus*. A CIM encontra-se entre as concentrações 1:4 e 1:8 tanto para as NPs-F quanto para as NPs-P.

**Figura 12.** Microplaca para determinação da concentração inibitória mínima de *S. aureus*.



A CIM é identificada pela coloração roxa dos poços, indicando a inibição do crescimento das bactérias pela presença de células vivas e mortas nos poços. Essa concentração está claramente visível na diluição seriada para a *S. aureus*, onde é possível observar os poços com a coloração roxa, ou seja, uma mistura de células bacterianas vivas e mortas. A equação utilizada para estimar as concentrações de NPs-F e NPs-P utilizadas na diluição seriada do teste de CIM está ilustrada na Equação 4.

$$\text{Concentração inicial} \times \text{Volume inicial} = \text{Concentração final} \times \text{Volume final}$$

**Equação 4.** Cálculo da concentração de AgNPs utilizada na diluição seriada.

Para as NPs-F, a concentração inicial utilizada na diluição seriada de NPs-F foi de  $7,24 \mu\text{g/mL}$  e na diluição seriada de NPs-P foi de  $42,76 \mu\text{g/mL}$ . Portanto, a CIM de NPs-F para inibir o crescimento de *E. coli* está entre  $1,81 \mu\text{g/mL}$  e  $0,90 \mu\text{g/mL}$ , para a *S. aureus* é de  $1,81 \mu\text{g/mL}$ . Para as NPs-P a concentração necessária para inibir o crescimento de *E. coli* está entre  $10,69 \mu\text{g/mL}$  e  $5,34 \mu\text{g/mL}$ , para *S. aureus* é de  $10,69 \mu\text{g/mL}$ .

**Tabela 2.** Concentração inibitória mínima (CIM) das AgNPs contra bactérias gram-negativa e gram-positiva.

<b>Patógeno</b>	<b>CIM (<math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>) - NPs-F</b>	<b>CIM (<math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>) - NPs-P</b>
<i>E. coli</i>	0,9 - 1,81	5,34 - 10,69
<i>S. aureus</i>	1,81	10,69

Isso demonstra que as células de *S. aureus* são mais resistentes ao efeito antimicrobiano das AgNPs quando comparadas às células de *E. coli*. Esse resultado pode ser explicado pela composição da parede celular das bactérias. As bactérias gram-negativas apresentam uma dupla camada composta por peptidoglicanos e lipopolissacarídeos constituídos por lipídios e polissacarídeos ligados covalentemente com uma carga negativa (MADIGAN & MARTINKO, 2005). Dessa forma, as AgNPs com carga positiva não têm grande dificuldade em se fixarem na parede celular e penetrarem o espaço intracelular (SUI et al, 2006). As gram-positivas, por outro lado, apresentam uma parede celular de camada única, mas rígida, composta de peptidoglicanos de cadeias polissacarídicas lineares e peptídeos curtos (BARON, 1996). Por essa razão, a *E. coli*, uma bactéria gram-negativa, foi mais suscetível ao efeito antimicrobiano das AgNPs.

Existem algumas teorias que buscam explicar o mecanismo de ação antibacteriano das AgNPs. Sabe-se que as AgNPs interagem com a membrana celular da bactéria, aumentando sua permeabilidade e adentrando o espaço intracelular (ANDLEEB et al., 2021). O trabalho de Tamboli et. al (2013) observou fragmentos de DNA de *E. coli* em eletroforese após o tratamento com AgNPs, sugerindo um dos mecanismos bactericidas dessas partículas, contudo o mesmo não ocorreu com a *S. aureus* tratada (TAMBOLI & LEE, 2013). Para as gram-positivas, o mecanismo mais provável deve estar entre um dos três mecanismos possíveis sugeridos: 1) absorção de íons de prata que culmina na interrupção da produção de ATP e da replicação de DNA por meio da interação com enzimas e proteínas transportadoras, 2) geração de espécies ROS e radicais livres no espaço intracelular resultando em estresse oxidativo, ou 3) rompimento da membrana celular por dano direto (MARAMBIO-JONES & HOEK, 2010).

Outro fator importante que não deve ser ignorado é que, apesar do caldo de fermentação do *Penicillium* sp. ter demonstrado maior eficiência na síntese verde, foi necessária uma maior concentração de NPs-P para impedir o crescimento das bactérias, indicando que a atividade antimicrobiana das NPs-F é superior. Tal fato pode ser explicado pela superfície de contato das NPs produzidas. O caldo de fermentação do fungo *Fusarium* sp. produziu AgNPs com 59 nm de diâmetro, enquanto o caldo do *Penicillium* sp. produziu AgNPs com 85 nm de diâmetro. Sendo assim, a superfície de contato das NPs-F é maior, ou seja, existe mais superfície externa para interagir com a parede celular das bactérias, o que pode ter resultado na maior atividade antimicrobiana apontada nos testes conduzidos.

A diferença entre os tamanhos de AgNPs produzidas pelo *Fusarium* sp. e pelo *Penicillium* sp. pode ser atribuída à estabilidade das partículas produzidas. Supõem-se que a estabilidade das NPs-P seja menor e, portanto, ocorreu um processo de agregação que resultou em NPs de maior diâmetro e consequente menor superfície de contato. Tal hipótese sugere que um ou mais componentes presentes no caldo de fermentação do *Fusarium* sp. e ausentes no caldo do *Penicillium* sp. tenha atuado como agente estabilizante, evitando que as NPs-F se aglomerassem. Outra explicação possível também diz respeito à composição do caldo de fermentação fúngico. É possível que o caldo produzido pelo *Fusarium* sp. contivesse componentes que potencializam a atividade antimicrobiana, atuando sinergicamente no aumento da permeabilidade da parede celular bacteriana e facilitando a entrada das NPs no ambiente intracelular.

### 4.3 Atividade antibiofilme das AgNPs

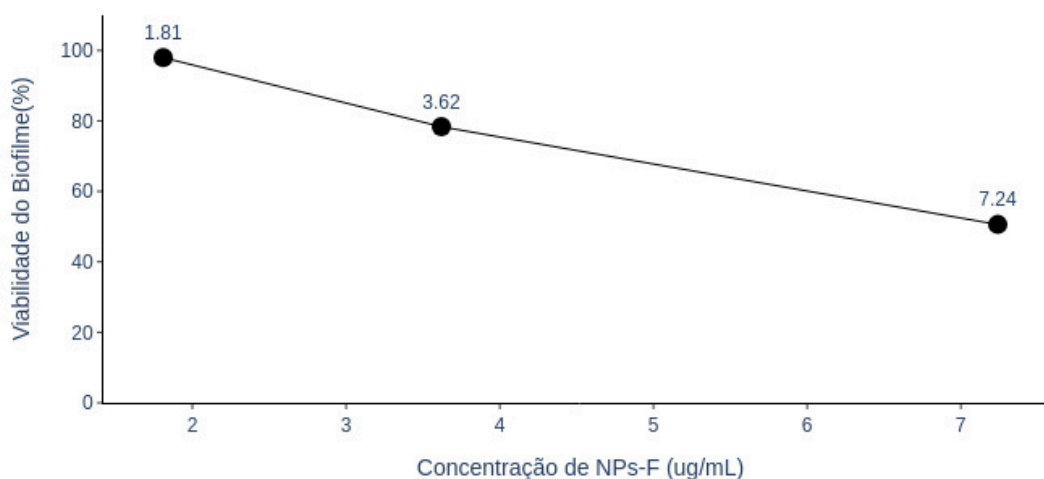
As bactérias são capazes de causar contaminações indiretas e recorrentes devido à produção do biofilme e de sua alta aderência a superfícies. Uma preocupação constante que permeia a produção bacteriana de biofilmes em tecidos é a dispersão de patógenos oportunistas por meio do ar e do líquido da lavagem de EPIs não descartáveis, como jalecos de algodão, presentes em hospitais e laboratórios (FIJAN & ŠOSTAR TURK, 2012). Contudo, a qualidade e durabilidade das roupas também dependem da capacidade do tecido em evitar a proliferação de microrganismos. Por essas razões, foi decidido avaliar a atividade antibiofilme das AgNPs produzidas neste trabalho. A viabilidade do biofilme bacteriano após o tratamento com AgNPs foi calculada a partir da Equação 5.

$$\text{Viabilidade do biofilme} = \frac{\text{Absorbância do tratado}}{\text{Absorbância do controle positivo}} \times 100$$

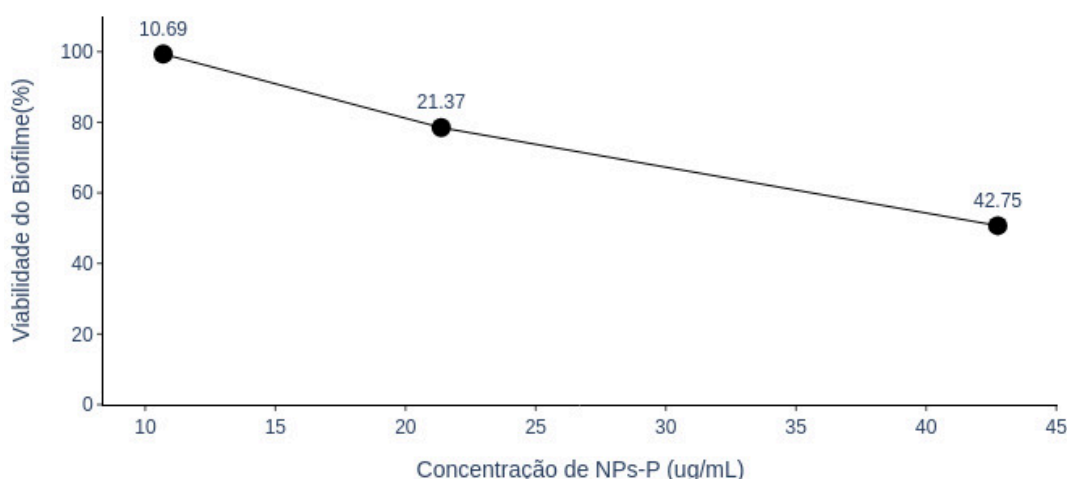
**Equação 5**

Para as NPs-F, a concentração inicial utilizada foi de  $7,24 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ , o suficiente para inibir cerca de 40% da formação de biofilme pela *S. aureus*, seguida de 20% de inibição por  $3,62 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ . As demais concentrações não foram capazes de inibir.

**Figura 13.** Avaliação da viabilidade do biofilme após aplicação das NPs-F.



A concentração inicial de NPs-P foi de  $42,75 \mu\text{g}/\text{mL}$  e também inibiu cerca de 40% da formação de biofilme, seguida de 20% de inibição por  $21,37 \mu\text{g}/\text{mL}$ . As demais concentrações não foram capazes de inibir.

**Figura 14.** Avaliação da viabilidade do biofilme após aplicação das NPs-P.

Assim como o potencial antimicrobiano, o potencial antibiofilme das NPs-F também foi maior que o potencial das NPs-P. No que diz respeito à comparação entre o potencial das AgNPs, é possível que o caldo de fermentação do *Fusarium* sp. contenha componentes que interagem com a substância polimérica extracelular (EPS), facilitando a entrada da NPs no ambiente da matriz.

Os biofilmes bacterianos são produzidos por alguns tipos de bactérias como a *S. aureus* (IDREES et al., 2021). Trata-se de uma superfície aderente composta por camadas de bactérias embebidas em uma EPS. O biofilme atua como uma barreira física com alta seletividade que impede a entrada de antibióticos e outros fatores prejudiciais, um mecanismo de proteção altamente eficiente dessas bactérias (FLEMMING & WINGENDER, 2010).

A formação do biofilme pode ser motivada pela privação de nutrientes, variações de temperatura e desidratação (RIZZATO et al., 2019). Estudos indicam que células bacterianas cobertas por biofilme apresentam uma resistência a antibióticos de 10 a 1.000 vezes maior em comparação com aquelas fora do biofilme (REFFUVEILLE et al., 2017). Além disso, indivíduos com dermatite atópica apresentam uma alta suscetibilidade à colonização por *S. aureus* (SONESSON, et al., 2017), fazendo com que o uso de roupas contaminadas traga muito desconforto e complicações para esse grupo.

De maneira geral, a formação de biofilme pelas bactérias apresenta três estágios: adesão, maturação e dispersão. Porém, diferentemente das demais bactérias, a *S. aureus* apresenta um processo que pode ser dividido em cinco estágios: (1) adesão, (2) multiplicação, (3) êxodus, (4) maturação e (5) dispersão (O'TOOLE et al., 2000). A formação do biofilme inicia-se com a adesão da bactéria à uma superfície biótica ou abiótica; na multiplicação as células aderentes se proliferaram e produzem proteínas e eDNA (do inglês, environmental DNA); na etapa de êxodus, ocorre a liberação de células precocemente para a formação de microcolônias; na maturação ocorre uma intensa atividade de divisão celular que resultam na formação e agregação das microcolônias, utilizadas para ampliar a área de superfície usada na troca de nutrientes; por fim, na etapa de dispersão o quórum passa a modular a matriz do biofilme (MOORMEIER et al., 2014).

A EPS não aumenta apenas a resistência aos antibióticos, mas também aos agentes de limpeza (GILBERT et al., 2002). A formação de biofilmes em roupas e tecidos é relativamente comum devido ao suor e umidade produzidos durante o uso. Além disso, algumas fibras são altamente suscetíveis à contaminação por microrganismos, podendo causar manchas, odores desagradáveis e a decomposição precoce do material têxtil (TEUFEL et al., 2006; VISHWAKARMA, V. 2020). Todos esses fatores são agravados na presença do biofilme.

É importante salientar que o biofilme é um ambiente dinâmico (PETOSA et al., 2010) e por essa razão é difícil prever seu comportamento na presença de NPs. Podemos sintetizar essa interação em dois mecanismos: adesão das NPs à superfície do biofilme e migração pela ESP; portanto, as características físico-químicas de ambos, biofilme e NPs, são responsáveis pela forma em que ocorrerão esses mecanismos.

As interações mais importantes entre biofilme e NPs são a eletrostática, hidrofóbica e estérica. No que diz respeito à interação eletrostática, a adesão de NPs carregadas positivamente à superfície do biofilme é favorecida devido à carga negativa das substâncias presentes no EPS, como proteínas e DNA (FLEMMING, 2000; HUANGFU et al., 2019). Da mesma forma, as NPs hidrofóbicas apresentam maior afinidade com as células bacterianas dentro do biofilme (MITZEL et al, 2016). Por fim, as interações estéricas impedem a agregação das NPs, favorecendo a interação biofilme-NPs e bactéria-NPs (HUANGFU et al., 2019).

#### **4.4 Atividade citotóxica das AgNPs**

Todas as concentrações de NPs-F e NPs-P testadas apresentaram alta toxicidade, resultando na morte de todas as células. A menor concentração testada de NPs-F foi  $2,12 \times 10^{-4}$  ug/mL e de NPs-P foi de  $1,33 \times 10^{-3}$  ug/mL. Apesar desse resultado impossibilitar a aplicação das NPs como fármaco, sua alta toxicidade pode ser explorada na nano-oncologia pelo seu potencial antitumoral.

Muitos estudos apontam que a toxicidade das AgNPs depende não só da sua concentração, mas também do seu tamanho e formato (PAL, TAK & SONG, 2007; MORONES et al., 2005). Se assumirmos que a liberação dos íons de prata pelas NPs é a razão para a propriedade bactericida intrínseca da prata (NAVARRO et al., 2008), podemos assumir também que a liberação exacerbada desses íons é a causa da toxicidade em células de mamíferos. As AgNPs, assim como qualquer outra droga, causam danos aos tecidos em grandes quantidades. Portanto, para diminuir a toxicidade em células de mamíferos e manter a atividade antimicrobiana das AgNPs, é necessário dosar a concentração de íons liberada no sistema biológico em determinado intervalo de tempo. Para isso, um conhecimento muito mais amplo dos mecanismos de ação das NPs metálicas é crucial.

Existem alguns métodos de tratamento das NPs que buscam reduzir essa toxicidade através do revestimento das partículas com polissacarídeos (SCHRAND, et al., 2008.), mas podem resultar na diminuição da atividade antimicrobiana. Outros métodos incluem a sulfitação das NPs (LEVARD et al., 2013.) ou, ainda, a adição de citrato à estrutura nanométrica (POKHREL et al., 2013.). A razão por trás da diminuição da toxicidade nos dois últimos casos, deve-se à redução na concentração de  $Ag^+$  livres na solução por meio diminuição da solubilidade das AgNPs, resultando na redução da toxicidade.

## 5 CONCLUSÃO

Este trabalho demonstrou a viabilidade da síntese verde para a produção de AgNPs a partir do caldo de fermentação dos fungos *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp.. A síntese foi confirmada pela mudança de coloração da solução reacional, pelas análises de espectroscopia UV-vis e MEV. A espectroscopia revelou um pico de absorção próximo a 440 nm, característico da ressonância plasmônica de superfície das AgNPs. Comparando os dois caldos de fermentação, o caldo do *Penicillium* sp. apresentou maior eficiência de síntese, produzindo cerca de  $2,54 \times 10^{10}$  partículas/mL, aproximadamente o dobro da obtida pelo caldo do *Fusarium* sp. que produziu cerca de  $1,29 \times 10^{10}$  partículas/mL. Por outro lado, as NP-F apresentam maior atividade antimicrobiana e antibiofilme em comparação com as NPs-P.

A análise de rastreamento de nanopartículas (NTA) demonstrou que a maior parte das AgNPs produzidas pelo caldo do *Fusarium* sp. apresentaram um diâmetro médio de 59 nm, ao passo que o caldo do *Penicillium* sp. produziu AgNPs com cerca de 85 nm de diâmetro. Esse fator impactou diretamente na atividade antimicrobiana das NPs produzidas, uma vez que AgNPs menores oferecem maior superfície de contato, potencializando a interação com as células bacterianas e resultando na atividade antimicrobiana demonstrada nos testes de difusão em meio sólido e nas análises de CIM contra os patógenos *E. coli* e *S. aureus*. Além disso, o caldo de fermentação do *Fusarium* sp. conseguiu produzir NPs com maior variedade de tamanhos, enquanto o caldo do *Penicillium* sp. conseguiu produzir uma quantidade relevante de NPs em apenas duas variedades de diâmetro.

Em relação à atividade antibiofilme, as AgNPs produzidas apresentaram potencial relevante contra a formação e manutenção dos biofilmes bacterianos. Essa

capacidade tem se mostrado cada vez mais necessária diante da crescente resistência bacteriana, dado que os biofilmes atuam como barreiras protetoras com uma alta seletividade que dificulta a ação de antimicrobianos tradicionais (RUSSELL et al., 1999). Foi necessário cerca de 7,24 ug/mL de NPs-F e cerca de 42,75 ug/mL de NPs-P para inibir 50% da formação de biofilme pela *S. aureus*. Evidenciando, mais uma vez, que a atividade antibiofilme das NPs-F é superior à atividade das NPs-P.

A síntese verde foi conduzida satisfatoriamente. Contudo, deve-se trabalhar para otimizar sua eficiência, que foi relativamente baixa em termos de conversão de  $\text{AgNO}_3$  em AgNPs, cerca de 0,1% para o *Fusarium* sp. e 0,8% para o *Penicillium* sp.. Existem indícios de que a incidência de luz durante a síntese pode aumentar consideravelmente a produção de AgNPs. A otimização dos demais parâmetros da síntese podem colocá-la em pé de igualdade com os outros métodos utilizados para produção em escala industrial de NPs, sobretudo por seu baixo custo médio de produção e alta sustentabilidade que tornam essa abordagem tão atrativa.

É importante ressaltar que as sínteses foram conduzidas concomitantemente e com os mesmos parâmetros para ambos os fungos, portanto a variação na composição do caldo de fermentação dos fungos é a principal razão para explicar a diferença entre os resultados obtidos na síntese verde. Ademais, é necessário aprofundar no entendimento dos mecanismos de síntese e ação antimicrobiana das AgNPs. Apesar das evidências de que grupos tiol presentes em aminoácidos, como cisteína, sejam responsáveis pela redução do  $\text{Ag}^+$  na síntese biológica, ainda não há elucidações a respeito da participação de outros componentes do caldo de fermentação fúngico.

Dessa forma, este trabalho reforça o potencial biotecnológico dos fungos na síntese verde de nanopartículas metálicas, oferecendo um método ambientalmente sustentável e economicamente viável. As AgNPs obtidas mostraram propriedades ópticas e antimicrobianas promissoras, com potencial de aplicação em diversas áreas. Em particular, a indústria têxtil pode se beneficiar significativamente dessa tecnologia, incorporando AgNPs em fibras para conferir propriedades antimicrobianas aos tecidos usados na confecção de EPIs e roupas convencionais. Essa aplicação tem ganhado destaque no contexto pós-pandemia, onde a demanda

por materiais de proteção contra bactérias e vírus aumentou substancialmente. O entendimento e aprimoramento das condições e dos mecanismos envolvidos na produção são essenciais para a aplicação da síntese verde em escala industrial, tornando viável a fabricação de tecidos antimicrobianos inovadores, ambientalmente responsáveis e com menor custo, tornando essa tecnologia mais acessível.

## 6 REFERÊNCIAS

AHMAD, Absar et al. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium oxysporum*. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, v. 28, n. 4, p. 313-318, 2003.

ANDLEEB, Anisa et al. A systematic review of biosynthesized metallic nanoparticles as a promising anti-cancer-strategy. *Cancers*, v. 13, n. 11, p. 2818, 2021.

ARQUILLA, Katya; WEBB, Andrea K.; ANDERSON, Allison P. Textile electrocardiogram (ECG) electrodes for wearable health monitoring. *Sensors*, v. 20, n. 4, p. 1013, 2020.

BAIG, Nadeem; KAMMAKAKAM, Irshad; FALATH, Wail. Nanomaterials: A review of synthesis methods, properties, recent progress, and challenges. *Materials advances*, v. 2, n. 6, p. 1821-1871, 2021.

BETTENHAUSEN, C. (2022). "Demand for cleaning and hygiene products surged during the pandemic and continues to affect the chemical industry." *Chemical & Engineering News*.

Disponível em:

<https://cen.acs.org/business/consumer-products/Cleaning-changed-during-pandemic-change/100/i3>. Acesso em: 04/12/2024.

BARBER, David J.; FREESTONE, Ian C. An investigation of the origin of the colour of the *Lycurgus Cup* by analytical transmission electron microscopy. *Archaeometry*, v. 32, n. 1, p. 33-45, 1990.

BARON, Samuel (Ed.). *Medical microbiology*. 1982.

BLECHER, Karin; NASIR, Adnan; FRIEDMAN, Adam. The growing role of nanotechnology in combating infectious disease. *Virulence*, v. 2, n. 5, p. 395-401, 2011.

BOGAS, A. C. ; RODRIGUES, S. H. ; GONCALVES, M. O. ; ASSIS, M. ; LONGO, E. ; PAIVA DE SOUSA, C. Endophytic microorganisms from the tropics as biofactories for the synthesis of metal-based nanoparticles: Healthcare applications. *Frontiers in Nanotechnology* , v. 1, p. 104522, 2022.

CAI, Lili et al. Temperature regulation in colored infrared-transparent polyethylene textiles. *Joule*, v. 3, n. 6, p. 1478-1486, 2019.

CASSADY, John M. et al. Recent developments in the maytansinoid antitumor agents. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v. 52, n. 1, p. 1-26, 2004.

DAKAL, Tikam Chand et al. Mechanistic basis of antimicrobial actions of silver nanoparticles. *Frontiers in microbiology*, v. 7, p. 1831, 2016.

DANG, Yu; GUAN, Jianjun. Nanoparticle-based drug delivery systems for cancer therapy. *Smart Materials in Medicine*, v. 1, p. 10-19, 2020.

DE PAULA, F. C. Isolation of the endophytic and rhizospheric microbiome associated to *Polygala* spp.: Evaluation of the biotechnological potential and antimicrobial activity (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal de São Carlos, p. 139. 2018.

DIAS, Bruna de Paula et al. A nanotecnologia no Brasil e o desenvolvimento de produtos com atividade antimicrobiana. *Química Nova*, v. 44, p. 1084-1092, 2021.

DURÁN, Nelson et al. Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains. *Journal of nanobiotechnology*, v. 3, p. 1-7, 2005.

ECKHARDT, Sonja et al. Nanobio silver: its interactions with peptides and bacteria, and its uses in medicine. *Chemical reviews*, v. 113, n. 7, p. 4708-4754, 2013.

EFTINK, Maurice R.; GHIRON, Camillo A. Fluorescence quenching studies with proteins. *Analytical biochemistry*, v. 114, n. 2, p. 199-227, 1981.

FERDOUS, Zannatul; NEMMAR, Abderrahim. Health impact of silver nanoparticles: a review of the biodistribution and toxicity following various routes of exposure. *International journal of molecular sciences*, v. 21, n. 7, p. 2375, 2020.

FIJAN, Sabina; ŠOSTAR TURK, Sonja. Hospital textiles, are they a possible vehicle for healthcare-associated infections?. *International journal of environmental research and public health*, v. 9, n. 9, p. 3330-3343, 2012.

FLEMMING, Hans-Curt; WINGENDER, Jost. The biofilm matrix. *Nature reviews microbiology*, v. 8, n. 9, p. 623-633, 2010.

FREESTONE, Ian et al. The *Lycurgus cup*—a roman nanotechnology. *Gold Bulletin*, v. 40, p. 270-277, 2007.

GILBERT, P.; ALLISON, D. G.; MCBAIN, A. J. Biofilms in vitro and in vivo: do singular mechanisms imply cross-resistance?. *Journal of applied microbiology*, v. 92, 2002.

GUPTA, Bhuvanesh; AGARWAL, Roopali; ALAM, M. S. Textile-based smart wound dressings. 2010.

HARDOIM, Pablo R.; VAN OVERBEEK, Leo S.; VAN ELSAS, Jan Dirk. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in microbiology*, v. 16, n. 10, p. 463-471, 2008.

FLEMMING, HC. Cohesiveness in biofilm matrix polymers. *Community structure and cooperation in biofilms*, p. 87-105, 2000.

HINDI, Khadijah M. et al. The antimicrobial efficacy of sustained release silver–carbene complex-loaded L-tyrosine polyphosphate nanoparticles: Characterization, in vitro and in vivo studies. *Biomaterials*, v. 30, n. 22, p. 3771-3779, 2009.

HUANG, Liyi et al. Synergistic combination of chitosan acetate with nanoparticle silver as a topical antimicrobial: efficacy against bacterial burn infections. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 55, n. 7, p. 3432-3438, 2011.

HUANGFU, Xiaoliu et al. A review on the interactions between engineered nanoparticles with extracellular and intracellular polymeric substances from wastewater treatment aggregates. *Chemosphere*, v. 219, p. 766-783, 2019.

IDREES, Muhammad et al. Staphylococcus aureus biofilm: Morphology, genetics, pathogenesis and treatment strategies. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 18, n. 14, p. 7602, 2021.

ILLEPERUMA, Widusha RK et al. Fire-resistant hydrogel-fabric laminates: a simple concept that may save lives. *ACS applied materials & interfaces*, v. 8, n. 3, p. 2071-2077, 2016.

IVANOSKA-DACIKJ, A. et al. Advanced and Smart Textiles during and after the COVID-19 Pandemic: Issues, Challenges, and Innovations. *Healthcare* 2023, 11 (8), 1115.

JANA, Jayasmita; GANGULY, Mainak; PAL, Tarasankar. Enlightening surface plasmon resonance effect of metal nanoparticles for practical spectroscopic application. *RSC advances*, v. 6, n. 89, p. 86174-86211, 2016.

KNETSCH, Menno LW; KOOLE, Leo H. New strategies in the development of antimicrobial coatings: the example of increasing usage of silver and silver nanoparticles. *Polymers*, v. 3, n. 1, p. 340-366, 2011.

LARA, Humberto H. et al. Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 26, p. 615-621, 2010.

LAVOGINA, Darja et al. Revisiting the resazurin-based sensing of cellular viability: Widening the application horizon. *Biosensors*, v. 12, n. 4, p. 196, 2022.

LEVARD, Clement et al. Sulfidation of silver nanoparticles: natural antidote to their toxicity. *Environmental science & technology*, v. 47, n. 23, p. 13440-13448, 2013.

LI, Bing et al. Environmental risks of disposable face masks during the pandemic of COVID-19: Challenges and management. *Science of the Total Environment*, v. 825, p. 153880, 2022.

LIU, Lihong et al. Less is more, greener microbial synthesis of silver nanoparticles. *Enzyme and microbial technology*, v. 67, p. 53-58, 2014.

MADIGAN, Michael T. et al. *Brock biology of microorganisms*. Upper Saddle River, NJ: Prentice hall, 1997.

MALISZEWSKA, Irena; JURASZEK, Anna; BIELSKA, Katarzyna. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using ascomycota fungi *Penicillium nalgiovense* AJ12. *Journal of Cluster Science*, v. 25, p. 989-1004, 2014.

MARAMBIO-JONES, Catalina; HOEK, Eric MV. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. *Journal of nanoparticle research*, v. 12, p. 1531-1551, 2010.

MITZEL, Michael R. et al. Hydrophobicity of biofilm coatings influences the transport dynamics of polystyrene nanoparticles in biofilm-coated sand. *Water research*, v. 92, p. 113-120, 2016.

MOORES, Audrey; GOETTMANN, Frederic. The plasmon band in noble metal nanoparticles: an introduction to theory and applications. *New Journal of Chemistry*, v. 30, n. 8, p. 1121-1132, 2006.

MOORMEIER, Derek E. et al. Temporal and stochastic control of *Staphylococcus aureus* biofilm development. *MBio*, v. 5, n. 5, p. 10.1128/mbio. 01341-14, 2014.

MORONES, Jose Ruben et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, v. 16, n. 10, p. 2346, 2005.

MORRIS, H.; MURRAY, R. Medical textiles. *Textile Progress*, v. 52, n. 1-2, p. 1-127, 2020.

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MYERS, Norman et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, v. 403, n. 6772, p. 853-858, 2000.

National Nanotechnology Initiative (NNI). National Science and Technology Council. Committee on Technology, Subcommittee on Nanoscale Science, National Technology Initiative Strategic Plan, [www.nano.gov](http://www.nano.gov) (2011, accessed 25 August 2015).

NAVARRO, Enrique et al. Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental science & technology*, v. 42, n. 23, p. 8959-8964, 2008.

O'TOOLE, George; KAPLAN, Heidi B.; KOLTER, Roberto. Biofilm formation as microbial development. *Annual Reviews in Microbiology*, v. 54, n. 1, p. 49-79, 2000.

PAL, Sukdeb; TAK, Yu Kyung; SONG, Joon Myong. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*, v. 73, n. 6, p. 1712-1720, 2007.

PETOSA, Adamo R. et al. Aggregation and deposition of engineered nanomaterials in aquatic environments: role of physicochemical interactions. *Environmental science & technology*, v. 44, n. 17, p. 6532-6549, 2010.

POKHREL, Lok R.; DUBEY, Brajesh; SCHEUERMAN, Phillip R. Impacts of select organic ligands on the colloidal stability, dissolution dynamics, and toxicity of silver nanoparticles. *Environmental science & technology*, v. 47, n. 22, p. 12877-12885, 2013.

RAI, Maharashtra K. et al. Silver nanoparticles: the powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria. *Journal of applied microbiology*, v. 112, n. 5, p. 841-852, 2012.

RANGNEKAR, Abhijit et al. Retention of enzymatic activity of  $\alpha$ -amylase in the reductive synthesis of gold nanoparticles. *Langmuir*, v. 23, n. 10, p. 5700-5706, 2007.

REFFUVEILLE, Fany et al. Biofilmes de *Staphylococcus aureus* e seu impacto no campo médico. O aumento da virulência e da resistência a antibióticos em *Staphylococcus aureus*, v. 11, p. 187, 2017.

- RIZZATO, Cosmeri et al. Potential role of biofilm formation in the development of digestive tract cancer with special reference to *Helicobacter pylori* infection. *Frontiers in Microbiology*, v. 10, p. 846, 2019
- RUIZ-HITZKY, Eduardo et al. Nanotechnology responses to COVID-19. *Advanced healthcare materials*, v. 9, n. 19, p. 2000979, 2020.
- RUSSELL, A. D.; SULLER, M. T. E.; MAILLARD, J.-Y. Do antiseptics and disinfectants select for antibiotic resistance?. *Journal of Medical Microbiology*, v. 48, n. 7, p. 613-615, 1999.
- SCHRAND, Amanda M. et al. Can silver nanoparticles be useful as potential biological labels?. *Nanotechnology*, v. 19, n. 23, p. 235104, 2008.
- SEIDI, Farzad et al. Functionalized masks: powerful materials against COVID-19 and future pandemics. *Small*, v. 17, n. 42, p. 2102453, 2021.
- SEVENTEKIN, N.; UCARCI, Ozlem. The damage caused by micro-organisms to cotton fabrics. *Journal of the Textile Institute*, v. 84, n. 3, p. 304-313, 1993.
- SONESSON, Andreas et al. Identificação de biofilme bacteriano e da protease derivada de *Staphylococcus aureus*, estafopaina, na superfície da pele de pacientes com dermatite atópica. *Relatórios científicos*, v. 7, n. 1, p. 8689, 2017.
- STEPANOVIĆ, Srdjan et al. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of microbiological methods*, v. 40, n. 2, p. 175-179, 2000.
- STIERLE, Andrea; STROBEL, Gary; STIERLE, Donald. Taxol and Taxane Production by *Taxomyces andreanae*, an Endophytic Fungus of Pacific Yew. *Science*, v. 260, p. 214-216, 1993.
- SUI, Z. M. et al. Capping effect of CTAB on positively charged Ag nanoparticles. *Physica E: Low-dimensional systems and nanostructures*, v. 33, n. 2, p. 308-314, 2006.
- TAMBOLI, Dhawal P.; LEE, Dae Sung. Mechanistic antimicrobial approach of extracellularly synthesized silver nanoparticles against gram positive and gram negative bacteria. *Journal of hazardous materials*, v. 260, p. 878-884, 2013.
- TANIGUCHI, N.; ARAKAWA, C.; KOBAYASHI, T. On the basic concept of nano-technology. In *Proceedings of the International Conference on Production Engineering*, Tokyo, Japan, 26–29 August 1974.
- TEUFEL, Linda; REDL, Bernhard. Improved methods for the investigation of the interaction between textiles and microorganisms. *JIS*, v. 50, p. 1902-1998, 2006.
- VEERASAMY, Ravichandran et al. Biosynthesis of silver nanoparticles using mangosteen leaf extract and evaluation of their antimicrobial activities. *Journal of Saudi Chemical Society*, v. 15, n. 2, p. 113-120, 2011.
- VISHWAKARMA, Vinita. Impact of environmental biofilms: Industrial components and its remediation. *Journal of basic microbiology*, v. 60, n. 3, p. 198-206, 2020.

ZHANG, Xin et al. Light-induced reduction of silver ions to silver nanoparticles in aquatic environments by microbial extracellular polymeric substances (EPS). *Water research*, v. 106, p. 242-248, 2016.

ZHAO, Lijuan et al. Nano-biotechnology in agriculture: use of nanomaterials to promote plant growth and stress tolerance. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 68, n. 7, p. 1935-1947, 2020.