



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

JULIANA ALMERINO SILVA

Investigação de diferentes condições de cultivo de *Beauveria bassiana* para micossíntese de nanopartículas de prata

Maceió – AL,

2019

JULIANA ALMERINO SILVA

Investigação de diferentes condições de cultivo de *Beauveria bassiana* para micossíntese de nanopartículas de prata

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para obtenção de título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Camila Braga Dornelas

Coorientador: Prof^o. Dr. Valter Alvino

Maceió – AL,

2019

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

S586i Silva, Juliana Almerino.
Investigação de diferentes condições de cultivo de *Beauveria bassiana* para
microsíntese de nanopartículas de prata / Juliana Almerino Silva. – 2019.
58 f. : il.

Orientadora: Camila Braga Dornelas.
Co-orientador: Valter Alvino.
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de
Alagoas. Instituto de Ciências Farmacêuticas. Maceió, 2019.

Bibliografias: f. 52-58.

1. Nanopartículas metálicas. 2. Biossíntese. 3. *Beauveria*. 4. Metabólitos. I.
Título.

CDU: 615.282



Ata de Exame de Dissertação

Aos dezessete dias mês de outubro de 2019, às treze horas e trinta minutos, reuniu-se na sala 206 do PPGCF, a banca examinadora composta pelas docentes doutoras, Camila Braga Dornelas, Lara Mendes de Almeida e Fabiane Caxico de Abreu Galdino, e pelos docentes doutores Valter Alvino da Silva e Ticiano Gomes do Nascimento, para o exame de defesa da dissertação intitulada: "Investigação de diferentes condições de cultivo de *Beauveria bassiana* para micossíntese de nanopartículas de prata", elaborada pela mestranda **Juliana Almerino Silva**, regularmente matriculada no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Nível Mestrado, sob a orientação da **Profa. Dra. Camila Braga Dornelas**, que presidiu os trabalhos. Após apresentação por 35 minutos, a mestranda foi arguida pela banca. Em seguida, reunidos em sessão secreta às 16:15 horas, os/as examinadores(as) consideram a dissertação APROVADA OU () APROVADA COM RESTRIÇÃO, emitindo o seguinte parecer: efetuar as correções conforme
correções da Banca.

Nada mais havendo a tratar, a sessão foi encerrada às 16:30 horas e eu, Daniel de Brito Ricarte, Secretário do PPGCF, Mestrado, lavrei a presente ata que segue assinada pela Banca Examinadora e pela Mestranda.

Maceió, 21 de outubro de 2019

Presidente (Orientadora): Profa. Dra. Camila Braga Dornelas

Camila B Dornelas

Co-orientador: Prof. Dr. Valter Alvino da Silva

Valter Alvino

Examinador Interno: Prof. Dr. Ticiano Gomes do Nascimento

Ticiano Gomes do Nascimento

Examinadora Interna: Profa. Dra. Lara Mendes de Almeida

Lara Mendes de Almeida

Examinadora Externa: Profa. Dra. Fabiane Caxico de Abreu Galdino

Fabiane Caxico de Abreu Galdino

Mestranda: Juliana Almerino Silva

Juliana Almerino Silva

AGRADECIMENTOS

A Deus, pois a ele ofereço toda honra e glória. Obrigada Senhor, por me abençoar, iluminar e guiar.

Aos meus pais Nívea e Givonildo, por todo carinho, amor e cuidado. A minha irmã Giordânia e minha sobrinha Melissa, a toda a minha família, em especial as minhas tias (Erodir, Ivanilda e Marinise), por suas orações.

A todos os meus amigos de graduação, especialmente as minhas amigas Daniele Costa, Naiany Mergulhão, Maria Prudente e Rafaela Rodrigues por todo apoio oferecido. A todos os professores que compartilharam seus conhecimentos.

Aos colegas do laboratório TecNano pelos momentos de aprendizado e alegria compartilhados, em especial a Valcilaine.

Aos meus colegas do laboratório de pesquisas e tratamento de feridas por todo apoio e companheirismo, em especial ao Rodrigo, Uriel e Jorge.

A minha orientadora Prof^ª. Dr^ª. Camila Braga Dornelas e coorientador Prof. Dr. Valter Alvino por aceitarem me orientar e estarem sempre presentes durante toda a execução do trabalho.

Ao Prof. Dr. Ticiano Gomes do Nascimento do laboratório de análises farmacêuticas e alimentícias pelo o apoio no processo de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Ao Prof. Dr. Luciano Aparecido Meireles Grillo do laboratório de Biologia e Fisiologia de Insetos por disponibilizar o aparelho para a realização da técnica de espectrofotometria por UV-Vis.

A Prof^ª. Dr^ª. Maria Lysete de Assis Bastos pela gentileza de ceder espaço no laboratório de pesquisas e tratamento de feridas.

Aos membros da banca examinadora Prof^ª. Dr^ª. Fabiane Caxico de Abreu Galdino, Prof^ª. Dr^ª. Lara Mendes de Almeida e o Prof. Dr. Ticiano Gomes do Nascimento, que se propuseram a contribuir com este trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do ICF pela oportunidade.

Ao secretário do programa PPGCF, Daniel Ricarte por sempre se dispor a ajudar no andamento do mestrado.

Aos meus amigos distantes, porém não esquecidos, Cristiane, Lucas e Odete.

A todos que contribuíram com o meu crescimento pessoal e acadêmico.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes.”

Marthin Luther King

RESUMO

A investigação de nanopartículas metálicas (NPMs) vem crescendo amplamente em áreas de contato direto com os seres humanos. No entanto, ainda são poucas as informações sobre sua biocompatibilidade e toxicidade. Desta forma, há uma busca por métodos de síntese menos tóxicos, sem uso de solventes e produção de resíduos químicos como a síntese biológica que utiliza materiais biológicos como o fungo na obtenção de nanopartículas de prata (NPsAg), sendo esse método chamado de micossíntese. A depender das condições de cultivo, diferentes metabólitos podem ser produzidos pelos fungos e, assim, interferir de diferentes maneiras na formação das nanopartículas. Nesse contexto, o presente trabalho objetivou submeter o fungo *Beauveria bassiana* a diferentes condições de cultivo com a finalidade de obter diferentes metabólitos para verificar os efeitos destes na micossíntese de NPsAg. Para isso foram avaliadas as variáveis luminosidade, agitação, pH e nutrientes. As condições com os melhores potenciais para redução foram selecionadas através do potencial de oxirredução (ORP). Para detectar os metabólitos produzidos, os filtrados miceliais das condições selecionadas foram submetidos à análise em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Logo após, os filtrados celulares obtidos diretamente dos cultivos (Filtrado 1) e filtrados dos micélios (Filtrado 2) foram utilizados para realização da micossíntese, sendo testadas em pH natural e pH 9,5, obtendo-se 40 formas de sintetizar NPsAg. Em seguida, realizou-se caracterização da suspensão coloidal por espectrofotometria Ultra-Violeta na região do visível (UV-Vis) e espalhamento de luz dinâmico (DLS). Como resultados, foram selecionadas 10 condições com os melhores potenciais para redução. Referindo-se a identificação foram detectados 19 picos, que juntamente com os resultados do comportamento dos cultivos indicam a presença de metabólitos como aminoácidos, ácidos graxos e bases orgânicas como as aminas biogênicas. Tratando-se da micossíntese, foram identificadas 17 condições de micossíntese que promoveram a formação de NPsAg. Com relação a caracterização da suspensão coloidal, observou-se a banda que representa a SPR da prata que ocorreu entre 350 – 485 nm. A partir do DLS foram constatados tamanhos médios entre 32 – 452 nm, com índices de polidispersividades (PDI) entre 0,316 – 0,830. Desta forma, as melhores condições de síntese foram NP10 (F2 em pH= 9,5, índice de polidispersão (PDI) = 0,461 e potencial Zeta= - 31 mV) e NP18 (F2 em pH natural, PDI= 0,397 e potencial Zeta= - 28 mV). Assim, concluímos que a *B. bassiana* foi capaz de produzir diferentes substâncias frente às condições de cultivo selecionadas as quais possibilitaram a micossíntese de NPsAg, sendo consideradas as melhores condições de síntese NP10 e NP18. Como perspectivas espera-se realizar a caracterização do material sólido através de Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), Difração de Raios X (DRX) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) para comparar com a literatura e demonstrar vantagens e desvantagens das condições selecionadas, e avaliar atividade antimicrobiana de NPsAg obtidas a partir das melhores condições de síntese selecionadas.

Palavras-chave: Nanopartículas de prata. Síntese biológica. *Beauveria bassiana*. Metabólitos secundários.

ABSTRACT

The investigation of metallic nanoparticles (MNPs) has been growing widely in areas of direct contact with humans. However, there is still little information about its biocompatibility and toxicity. Thus, there is a search for less toxic synthesis methods, without the use of solvents and production of chemical residues such as biological synthesis that uses biological materials such as the fungus to obtain silver nanoparticles (AgNPs), this method being called mycosynthesis. Depending on the culture conditions, different metabolites can be produced by the fungi and, thus, interfere in different ways in the formation of nanoparticles. In this context, the present work aimed to subject the fungus *Beauveria bassiana* to different cultivation conditions in order to obtain different metabolites to verify their effects on the AgNPs mycosynthesis. For this, the variables luminosity, agitation, pH and nutrients were evaluated. The conditions with the best potential for reduction were selected through the redox potential (ORP). In order to detect the produced metabolites, the mycelial filtrates of the selected conditions were submitted to analysis in high performance liquid chromatography (HPLC). Soon after, the cell filtrates obtained directly from the cultures (Filtrate 1) and mycelium filtrates (Filtrate 2) were used to perform mycosynthesis, being tested at natural pH and pH 9.5, obtaining 40 ways to synthesize AgNPs. Then, the colloidal suspension was characterized by Ultra-Violet spectrophotometry in the visible region (UV-Vis) and dynamic light scattering (DLS). As a result, 10 conditions were selected with the best potential for reduction. Referring to the identification, 19 peaks were detected, which together with the results of the cultivation behavior indicate the presence of metabolites such as amino acids, fatty acids and organic bases such as biogenic amines. In the case of mycosynthesis, 17 conditions of mycosynthesis were identified that promoted the formation of AgNPs. Regarding the characterization of the colloidal suspension, it was observed the band that represents the SPR of the silver that occurred between 350 - 485 nm. From the DLS, mean sizes between 32 - 452 nm were found, with polydispersity indices (PDI) between 0.316 - 0.830. Thus, the best synthesis conditions were NP10 (F2 at pH = 9.5, polydispersion index (PDI) = 0.461 and Zeta potential = - 31 mV) and NP18 (F2 at natural pH, PDI = 0.397 and Zeta potential = - 28 mV). Thus, we conclude that *B. bassiana* was able to produce different substances in relation to the selected culture conditions which enabled the mycosynthesis of AgNPs, being considered the best synthesis conditions NP10 and NP18. As perspectives it is expected to perform the characterization of the solid material through Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), X-Ray Diffraction (XRD) and Transmission Electron Microscopy (TEM) to compare with the literature and demonstrate advantages and disadvantages of selected conditions, and evaluate antimicrobial activity of AgNPs obtained from the best selected synthetic conditions.

Key words: Silver nanoparticles. Biological synthesis. *Beauveria bassiana*. Secondary metabolites

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Nanomateriais com diferentes morfologias: (A) NPs de Pd não porosas (0D); (B) Nanobastões de Ag (1D); (C) Nanofolhas de grafeno (2D).....	16
Figura 2 - A <i>Taça de Lycurgus</i> (ROMA).....	17
Figura 3 - Esquema de oscilação de <i>plasmom</i> ressonante para partículas metálicas de dimensões nanométricas, mostrando o deslocamento da nuvem de carga de elétrons de condução em relação aos núcleos.....	18
Figura 4 - Esquema ilustrativo dos métodos <i>Top-down</i> e <i>Bottom-up</i> para obtenção de nanopartículas.....	19
Figura 5 - Abordagens para a síntese de nanopartículas.....	20
Figura 6 - Mecanismos de síntese biológica de nanopartículas metálicas.....	22
Figura 7 - Cultivo de <i>B. bassiana</i> em meio BDA.....	24
Figura 8 - Fluxograma com as etapas da metodologia.....	28
Figura 9 - Fluxograma para micossíntese de NPsAg utilizando <i>B. bassiana</i>	32
Figura 10 - Condições selecionadas para a micossíntese de NPsAg.....	32
Figura 11 - Potencial de redução e pH obtidos do cruzamento das variáveis luz e agitação para o cultivo de <i>B. bassiana</i> durante 15 dias.....	35
Figura 12 - Potencial de redução e pH obtidos do cruzamento das variáveis luz, agitação e pH para o cultivo de <i>B. bassiana</i> durante 15 dias.....	36
Figura 13 - Potencial de redução e pH obtidos do cruzamento das variáveis luz, agitação e nutrientes para o cultivo de <i>B. bassiana</i> durante 15 dias.....	37
Figura 14 - Potencial de redução e pH obtidos do cruzamento das variáveis luz, agitação, pH = 3 e nutrientes para o cultivo de <i>B. bassiana</i> durante 15 dias.....	39
Figura 15 - Potencial de redução e pH obtidos do cruzamento das variáveis luz, agitação, pH= 6 e nutrientes para o cultivo de <i>B. bassiana</i> durante 15 dias.....	40
Figura 16 - Perfil cromatográfico das substâncias produzidas por <i>B. bassiana</i> em amostras dos lavados dos micélios selecionados para micossíntese de nanopartículas de prata. Cromatogramas obtidos no comprimento de onda de 242 nm. Filtrados de micélios: a) Cultivo convencional; b) Condição 10; c) Condição 17; d) Condição 18; e) Condição 30; f) Condição 33 e g) Condição 34...44	44
Figura 17 - Micossíntese de NPsAg a partir das condições selecionadas. Em a) Filtrado 1 em pH natural; b) NPsAg; c) Filtrado 1 em pH 9,5; d) NPsAg; e) Filtrado 2 em pH natural; f) NPsAg; g) Filtrado 2 em pH 9,5 e h) NPsAg.....	45
Figura 18 - Espectros UV-Vis de NPsAg. Dados obtidos por DLS do raio hidrodinâmico (Rh) das partículas, PDI e potencial Zeta de superfície referentes às NPsAg sintetizadas com <i>B. bassiana</i> encontram-se juntos ao seu respectivo gráfico.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lista de alguns metabólitos produzidos por <i>B. bassiana</i>	26
Tabela 2 - Diferentes condições para o cultivo de <i>B. bassiana</i>	29
Tabela 3 - Condições selecionadas para a micossíntese de NPsAg com o dia onde foi obtido melhor potencial de redução e o desvio padrão (SD – Standard Desviation).....	41
Tabela 4 - Determinação das áreas cromatográficas dos metabólitos detectados por CLAE em amostras dos lavados dos micélios selecionados para micossíntese de nanopartículas de prata.....	43
Tabela 5 - Resultados obtidos por DLS do raio hidrodinâmico (Rh) das partículas, PDI e potencial Zeta de superfície referentes às NPsAg sintetizadas com <i>B. bassiana</i>	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CLAE	Cromatografia Líquida de Alto Eficiência
DLS	Espalhamento de Luz Dinâmico (do inglês: “Dynamic Light Scattering”)
DRX	Difração de Raios X (Do inglês: “X-Ray Diffraction”)
FTIR	Espectroscopia por Transformada de Fourier (do inglês: “Fourier-transform infrared spectroscopy”)
HPLC-MS	Cromatografia líquida de alta eficiência com espectrometria de massas
LC-MS	Cromatografia líquida com espectrometria de massas
mV	Milivolts
nm	Nanômetro
NPsAg	Nanopartículas de Prata
ORP	Potencial de oxirredução (do inglês: “Oxidation Reduction Potential”)
PDA	Ágar Dextrose de Batata
PDI	Índice de polidispersão (do inglês: “Polydispersity Index”)
pH	Potencial hidrogeniônico
SPR	Ressonância Plasmônica de Superfície (do inglês: “Surface Plasmon Resonance”)
TEM	Microscopia Eletrônica de Transmissão (do inglês: “Transmission Electronic Microscopy”)
UV-Vis	Ultravioleta-Visível

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1. Nanomateriais	15
2.2. Nanopartículas metálicas	16
2.2.1. Nanopartículas de prata (NPsAg)	18
2.3. Síntese de nanopartículas metálicas	19
2.3.1. Síntese de nanopartículas de prata (NPsAg)	20
2.3.1.1. Método químico	20
2.3.1.2. Método físico	21
2.3.1.3. Método biológico	21
2.3.2. Micossíntese de nanopartículas de prata	22
2. 4. <i>Beauveria bassiana</i>	24
3 OBJETIVOS	27
3.1. Objetivo geral	27
3.2. Objetivos específicos	27
4. MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1. Material	28
4.2. Métodos	28
4.2.1. Cultura do fungo <i>B. bassiana</i>	28
4.2.2. Produção de diferentes condições de cultivo	29
4.2.3. Perfil cromatográfico das condições de cultivo em CLAE	30
4.2.4. Micossíntese de nanopartículas de prata	31
4.3. Caracterização	33
4.3.1. Caracterização de NPsAg na forma de suspensão coloidal	33
4.3.1.1. Espectrofotometria de UV-Vis	33
4.3.1.2. Espalhamento de luz dinâmico (DLS)	33
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1. Produção de diferentes condições de cultivo	35
5.2. Perfil cromatográfico das condições de cultivo em CLAE	41
5.3. Micossíntese de nanopartículas de prata	45
5.3.1. Caracterização de NPsAg em suspensão coloidal	45
6. CONCLUSÃO	51
REFERÊNCIAS	52

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o estudo sobre nanopartículas metálicas (NPMs), especialmente os metais nobres ouro e prata, ganharam muita atenção dos pesquisadores em áreas de contato direto com os seres humanos, na medicina, em alimentos, no meio ambiente, vestimentas, produtos de higiene pessoal e cosméticos (SINHA et al., 2009). O interesse por nanopartículas de ouro e prata é devido às suas propriedades, óticas, elétricas, catalíticas, magnéticas e por sua destacada atividade antimicrobiana (GORUP, 2010).

A prata é um mineral extraído da natureza, reconhecida há muito tempo como um agente antimicrobiano eficaz que apresenta baixa toxicidade em humanos e possui diversas aplicações *in vitro* e *in vivo*. Porém na forma de nanopartículas apresenta uma área de superfície de contato maior, e assim, suas propriedades biológicas podem ser aumentadas proporcionalmente (DIPANKAR; MURUGAN, 2012).

As nanopartículas de prata (NPsAg) podem ser obtidas através de rotas sintéticas de preparação classificadas em químicas, físicas, fotoquímicas e biológicas. O método biológico consiste na utilização de organismos procarióticos, eucarióticos ou partes deles contendo moléculas capazes de reduzir íons metálicos a nanopartículas em apenas uma etapa (SINHA et al., 2009). A síntese biológica tende a produzir nanopartículas sem a utilização de solventes tóxicos, geração de resíduos químicos, diminuindo com isso os riscos à saúde e ao meio ambiente (ROCHA, 2010). O custo de produção é geralmente baixo e pode-se obter um alto rendimento do produto de interesse.

Diante disso, sistemas biológicos, microrganismos como fungos e bactérias, são potencialmente úteis na preparação de nanopartículas metálicas sob temperatura e pressão normais (SINHA et al., 2009). A abordagem da síntese biológica mediada por fungos ou micossíntese para a fabricação de nanopartículas tem muitas vantagens, como, método de escala simples, viabilidade econômica, fácil processamento e manuseio de biomassa (SASTRY et al., 2003). Além disso, a obtenção de metabólitos fúngicos é mais vantajosa em relação a outras fontes, pois esses microrganismos podem ser cultivados em larga escala sem haver danos ao ecossistema (TAKAHASHI; LUCAS, 2008).

A produção de nanopartículas através da micossíntese pode ser reforçada ou otimizada por diferentes condições de cultivos de fungos. A espécie *Beauveria bassiana* é um fungo entomopatogênico e endofítico, largamente utilizado no controle biológico de importantes pragas da agricultura e de insetos vetores de doenças animais e humanas, possuindo ampla variedade de metabólitos secundários (WANG; XU, 2012). Além do interesse como agente

biológico para controle de pragas, é conhecido que algumas linhagens de *B. bassiana* podem catalisar reações de hidroxilação, oxidação e redução (ANDRIOLI, 2012).

Estudos anteriores realizados por Prabakaran et al. (2016), Banu; Balasubramanian (2014) e Joseph et al. (2012), onde nanopartículas de prata foram micossintetizadas pelo fungo entomopatogênico *B. bassiana*, demonstraram que esse fungo pode ser usado como um agente redutor para a síntese de NPsAg. No entanto, não há um estudo que correlacione o efeito de variações nas condições de cultivo desse fungo sobre sua produção de metabólitos e conseqüentemente as características das nanopartículas formadas.

Nesse sentido, o presente trabalho buscou, através da investigação de diferentes condições de cultivo de *B. bassiana*, obter diferentes metabólitos e observar os efeitos destes na micossíntese de nanopartículas de prata. Portanto, a proposta do trabalho é justificada pela capacidade de *B. bassiana* em produzir diferentes metabólitos com potencial redutor, quando exposto a variadas condições de cultivo (RAO et al., 2006; VAHABI et al., 2011).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Nanomateriais

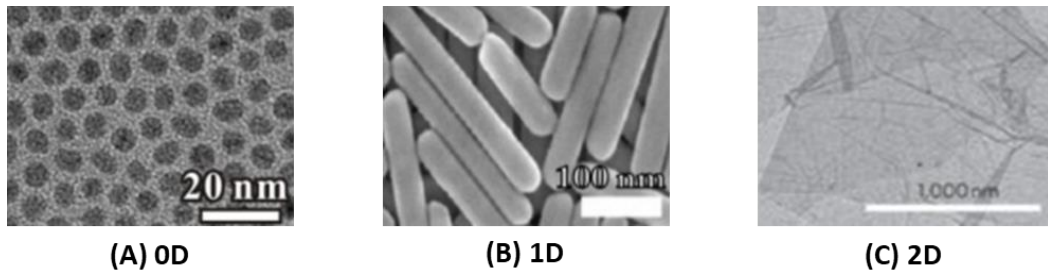
O estudo de nanomateriais teve início há mais de cem anos. Dois importantes precursores da nanociência foram Faraday, em 1857, desenvolveu alguns experimentos com nanopartículas de ouro (BLACKMAN, 2008) e Richard Feynman, ganhador do prêmio Nobel de Física em 1965, que propôs a manipulação de átomos individuais para fornecer um novo material com propriedades novas, prevendo o potencial tecnológico das nanoestruturas (RÓZ et al., 2015). Nos últimos anos o interesse por essa área está progredindo, isso devido a sua importância tecnológica.

Em 2011 a Comissão Europeia emitiu uma recomendação, onde definiu nanomaterial como um material natural, incidental ou produzido, que apresenta nanopartículas num estado desagregado ou na forma de um agregado ou de um aglomerado, e em cuja distribuição o número-tamanho 50% ou mais das partículas têm uma ou mais dimensões externas na faixa de tamanho de 1 a 100 nm (LOURO et al., 2013).

De acordo com Petrii (2015) e Narendar; Gopalakrishnan (2010), a classificação de materiais nanoestruturados está sendo atualizada à medida que as novas classes de nanopartículas aparecem. Desta forma, os nanomateriais podem ser classificados de acordo com a dimensionalidade:

- **Zero-dimensional (0D):** são materiais em que todas as três dimensões estão em nanoescala (por exemplo, pontos quânticos, adatoms, arranjos heterogêneos de nanopartículas e nanofios esféricos);
- **Unidimensional (1D):** são materiais que possuem duas dimensões físicas na faixa nanométrica, enquanto a terceira dimensão pode ser como no nanotubo de carbono (por exemplo, nanofios, nanobastões, nanotubos e nanofitas);
- **Bidimensional (2D):** possuem uma dimensão na faixa nanométrica e são utilizados no processamento de óxido de metal transistores de semicondutores (por exemplo, ilhotas contínuas, estruturas planas ramificadas, monocamadas automontadas, nanoplacas, nanofolhas, nanowalls e nanodiscos).

Figura 1 - Nanomateriais com diferentes morfologias: (A) NPs de Pd não porosas (0D); (B) Nanobastões de Ag (1D); (C) Nanofolhas de grafeno (2D)



Fonte: Adaptado de Jeevanandam et al. (2018).

Segundo Jeevanandam et al., (2018), as nanopartículas e os materiais nanoestruturados (NSMs) também são organizados em quatro categorias baseadas no material utilizado:

- **Nanomateriais à base de carbono:** geralmente, esses nanomateriais (NMs) contêm carbono e são encontrados em morfologias como tubos ocos, elipsoides ou esferas. Os fulerenos (C₆₀), os nanotubos de carbono (CNTs), as nanofibras de carbono e o grafeno (Gr) estão incluídos na categoria NMs baseada em carbono;
- **Nanomateriais de compósitos:** os nanomateriais compostos são NPs e NSMs multifásicos com uma fase na dimensão nanoscópica que pode combinar NPs com outras NPs ou NPs combinadas com materiais maiores ou com materiais a granel (por exemplo, nanofibras híbridas) ou estruturas mais complicadas, como estruturas metalorgânicas. Os compósitos podem ser quaisquer combinações de NMs à base de carbono, à base de metal ou à base de orgânicos com qualquer forma de materiais a granel de metal, cerâmica ou polímero;
- **Nanomateriais de base orgânica:** incluem NMs feitos principalmente de matéria orgânica. A utilização de interações não covalentes (fracas) para a automontagem e o projeto de moléculas ajuda a transformar os NMs orgânicos em estruturas desejadas, como dendrímeros, micelas, lipossomas e NPs poliméricas;
- **Nanomateriais de base inorgânica:** estes NMs incluem NPs de metal e óxido de metal e materiais nanoestruturados. Estes NMs podem ser sintetizados em NPs com metais tais como Au ou Ag, óxidos metálicos tais como TiO₂ e ZnO, e semicondutores tais como silício e cerâmica.

2.2 Nanopartículas metálicas

As nanopartículas metálicas são utilizadas há muito tempo na humanidade. A literatura relata preparação de ouro solúvel (nanopartículas de ouro) a partir dos séculos IV e V a.C., no

Egito e na China. Um dos exemplos desses sistemas nanoestruturados é a famosa *Taça de Lycurgus* (Figura 2), que faz parte do acervo do *British Museum* (Londres), trabalhada pelos romanos no século IV d.C. Essa taça é considerada a primeira descoberta arqueológica a conter nanopartículas (MOORES; GOETTMANN, 2006).

Figura 2 - A Taça de Lycurgus (ROMA)



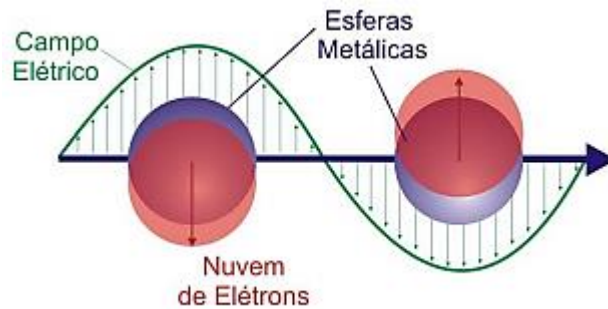
Fonte: Albernaz, 2014.

A *Taça de Lycurgus* é composta de um tipo muito especial de vidro, conhecido como vidro dicróico, que muda de cor conforme a luz incide sobre o material. A análise do vidro revelou a presença de uma pequena quantidade de uma fina camada de cristais metálicos de prata (Ag) e ouro (Au) com uma relação molar de 14:1, que confere as suas propriedades ópticas não usuais. A presença destes nanocristais confere à *Taça de Licurgo* as cores verde e vermelha (HORIKOSHI; SERPONE, 2013).

As nanopartículas metálicas possuem propriedades físicas e químicas diferenciadas como, por exemplo, maiores áreas superficiais específicas, propriedades ópticas específicas, pontos de fusão mais baixos, resistências mecânicas e magnetizações específicas. Um aspecto interessante das nanopartículas metálicas é o comportamento óptico observado em decorrência das alterações do tamanho e da forma das partículas (LOPES, 2017).

Nanopartículas metálicas apresentam absorções intrínsecas em regiões distintas do espectro visível, denominadas bandas plasmônicas, ressonância de superfície plasmônica (*surface plasmon resonance* – SPR) (LOPES, 2017). A banda de superfície plasmônica (SPR) é uma banda forte e ampla observada no espectro UV-Visível para NPs metálicas maiores que 2 nm. Essa ressonância é uma oscilação em conjunto dos elétrons de condução de superfície que foram excitados por radiação eletromagnética de luz (SIGNORI et al., 2010).

Figura 3 – Esquema de oscilação de *plasmom* ressonante para partículas metálicas de dimensões nanométricas, mostrando o deslocamento da nuvem de carga de elétrons de condução em relação aos núcleos



Fonte: Kelly et al. (2003) e Sonai (2008).

Todos os metais apresentam essa propriedade. No entanto, as séries Au-Ag-Cu exibem SPR muito intensas que explicam em parte, ao lado da facilidade de sua síntese e sua robustez, o sucesso das NPs de ouro e prata neste campo (MOORES; GOETTMANN, 2006).

2.2.1 Nanopartículas de prata (NPsAg)

A prata tem sido utilizada por milhares de anos como um metal precioso pelos humanos em diferentes aplicações como joias, ferramentas, moedas, materiais fotográficos ou explosivos. Nos séculos XVII e XVIII, o nitrato de prata foi utilizado no tratamento de úlcera e sua atividade antimicrobiana foi estabelecida no século XIX, sendo especialmente empregado no tratamento de queimaduras. No entanto, após a descoberta dos antibióticos em 1940, o uso dos sais de prata diminuiu (OLIVEIRA, 2014).

Todavia, as bactérias se tornam cada vez mais resistentes aos antibióticos disponíveis no mercado, forçando assim a síntese constante de novos fármacos. Na busca por novos medicamentos antimicrobianos, os coloides de prata também voltaram a despertar o interesse na comunidade científica e, nesta linha, inúmeros trabalhos (RHIM et al., 2006; SANPUI et al., 2008; SAHNI et al., 2013) sobre nanocompósitos contendo prata têm sido publicados, sendo o estudo focado no tratamento de doenças provocadas por bactérias como *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, respectivamente (SANPUI et al., 2008).

No início do século XX, a prata começou a ser usada sob um novo e mais interessante formato: o nanoparticulado. Soluções de prata desenvolvidas sob a luz da nanotecnologia possuem partículas com tamanho na escala nanométrica, que caracterizam uma maior superfície de contato, ampliando assim as conhecidas ações antimicrobianas da prata (CARREIRA, 2009).

As nanopartículas de prata (NPsAg) são uma das nanopartículas mais usadas nos

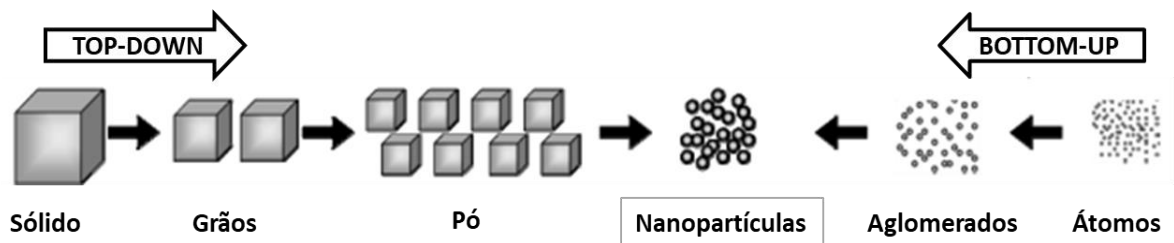
últimos anos, isso devido as suas propriedades únicas em comparação com materiais a granel, o que permite a funcionalização de diferentes produtos. Elas têm sido amplamente utilizadas em produtos biomédicos, adicionando-as aos curativos de feridas, sprays antissépticos e cremes tópicos devido à sua capacidade de romper a membrana de organismos patogênicos, perturbando assim as atividades enzimáticas do microrganismo (DURÁN et al., 2016; FRANCI et al., 2015).

2.3 Síntese de nanopartículas metálicas

Segundo Dendisová et al. (2018), existem duas abordagens para produzir nanopartículas metálicas e, nanomateriais em geral, *Top-down* (de objetos maiores para menores) e *Bottom-up* (de objetos menores para maiores). Figura 4.

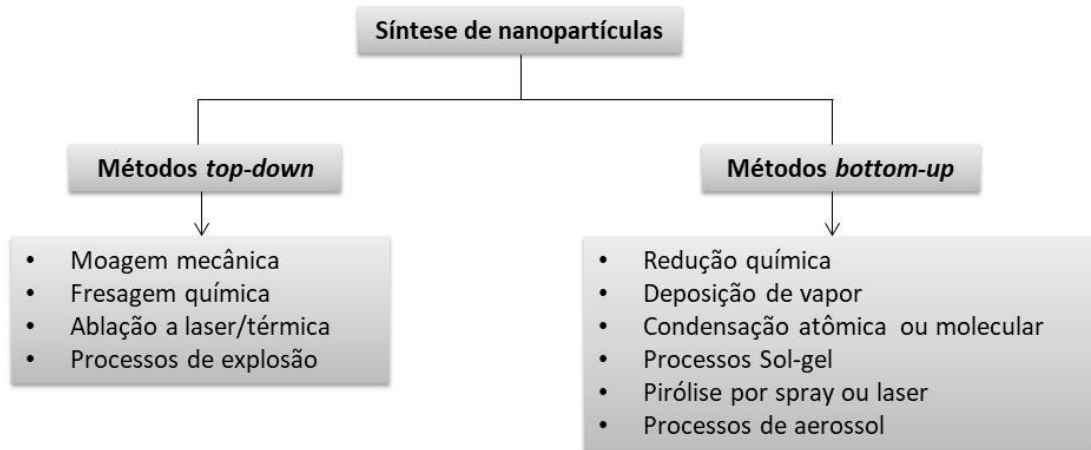
Top-down (no português, de cima para baixo), baseia-se na desconstrução de estruturas maiores, utilizando materiais a granel e, através de processos mecânicos, físicos ou químicos, reduzi-los até atingir a nanoescala. Um exemplo ilustrativo seria quebrar uma parede em seus componentes individuais. Essa abordagem é comumente utilizada para produção em escala, mas são observadas dificuldades em obter-se uma homogeneidade nas características do produto final. A outra abordagem, *Bottom-up* (no português, de baixo para cima), segue o caminho oposto, explora as propriedades químicas de moléculas/átomos individuais para fazer com que estes se organizem e formem uma estrutura em nanoescala (MITTAL et al., 2013). Os principais métodos utilizados nas duas abordagens estão ilustrados na figura 5.

Figura 4 – Esquema ilustrativo dos métodos *Top-down* e *Bottom-up* para obtenção de nanopartículas



Fonte: Adaptado de Gorup (2010).

Figura 5 - Abordagens para a síntese de nanopartículas



Fonte: Adaptado de Mittal et al. (2013).

2.3.1 Síntese de nanopartículas de prata (NPsAg)

Usualmente, as NPsAg são sintetizadas através de métodos químicos, físicos e biológicos (RAI, 2013). Essas rotas de síntese apresentam vantagens e desvantagens que estão associadas a alguns problemas intrínsecos aos métodos, como, por exemplo, estabilidade, diâmetro das partículas e distribuição de tamanho para as NPsAg, custos e a impossibilidade de o método de síntese ser utilizado na produção em escala industrial (LOPES, 2017). As sínteses físicas e químicas possuem consumo intensivo de energia e às vezes podem envolver substâncias químicas tóxicas, enquanto as técnicas biológicas são rentáveis, limpas, atóxicas e ecologicamente corretas (RAI, 2013).

2.3.1.1 Método químico

Os métodos químicos são bastante usados na síntese de NPsAg. Como em qualquer reação de oxirredução, os valores dos potenciais padrões de redução (E^0) determinam os pares de reagentes adequados para que a conversão química aconteça de forma apropriada. Para que a reação de oxirredução aconteça, a energia livre na reação, ΔG^0 , deve ser negativa ($\Delta G^0 < 0$) ou potencial padrão da reação de oxirredução positivo ($\Delta E^0 > 0$). O potencial padrão de redução da prata em água é relativamente alto ($Ag^+ \rightarrow Ag^0$, $E^0 = + 0,799$ V), o que permite a utilização de diversos agentes redutores como citrato de sódio ($C_6H_5Na_3O_7$, $E^0 = - 0,180$ V), hidrazina (N_2H_4 , $E^0 = - 0,230$ V), borohidreto de sódio ($NaBH_4$, $E^0 = - 0,481$ V) e hidroquinona ($C_6H_6O_2$, $E^0 = - 0,699$ V) (PACIONI et al., 2015).

2.3.1.2 Método físico

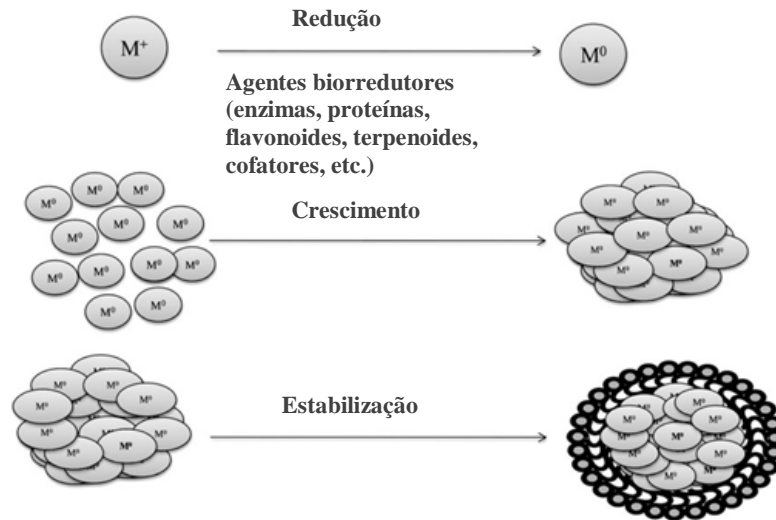
Métodos físicos não utilizam substâncias químicas tóxicas, mas para a produção de nanopartículas metálicas é necessária uma alta quantidade de energia e alto custo operacional em rotas geralmente complexas e com múltiplos passos. Alguns dos diferentes processos são: deposição física de vapor (Physical Vapour Deposition – PVC) e descarga de arco são os métodos físicos mais utilizados na preparação dessas nanopartículas (PACIONI et al., 2015).

Usualmente esses métodos de obtenção de nanopartículas metálicas utilizam produtos químicos tóxicos, são métodos de síntese com custos elevados e potencialmente perigosos para o meio ambiente. Diante disso vários países no mundo estão reduzindo os resíduos perigosos gerados e a “química verde”, juntamente com os processos químicos estão, progressivamente, se integrando ao desenvolvimento da ciência e da indústria (LENARDÃO et al., 2003). Diante desse contexto, é necessário o desenvolvimento de processos que visem à obtenção desses nanoestruturados com ampla aplicabilidade tecnológica. Uma abordagem promissora para alcançar esse objetivo é explorar a vasta gama de recursos biológicos disponíveis na natureza por meio da chamada síntese biológica (ZHANG et al., 2011; SHUKLA et al., 2012).

2.3.1.3 Método biológico

Para a síntese ecologicamente correta de nanopartículas são utilizados termos como síntese verde, síntese biológica e síntese biogênica (RAI, 2013). Na síntese biológica são utilizados produtos atóxicos, biodegradáveis e de baixo custo para sintetizar nanomateriais, tendo como fonte primária ou iniciador da rota um organismo biológico ou partes dele (órgãos, tecidos, células, biomoléculas ou metabólitos) (SHARMA et al., 2009; MITTAL et al., 2013). Dentre os recursos biológicos disponíveis, os produtos vegetais e animais, algas, fungos e bactérias são organismos que apresentam um grande potencial na produção de nanopartículas metálicas, por meio de processos de oxirredução em meio aquoso (FARAMARZI; SADIGHI, 2013). Em detrimento disso, os métodos biológicos utilizam biomoléculas em substituição de agentes redutores/estabilizadores utilizados em outros métodos de preparação de nanopartículas. Organismos vivos como bactérias, fungos e plantas apresentam um grande potencial na produção de nanopartículas metálicas (Figura 6).

Figura 6 - Mecanismos de síntese biológica de nanopartículas metálicas



Fonte: Adaptado de Mittal et al. (2013).

2.3.2 Micossíntese de nanopartículas de prata

Nos últimos anos, a atenção tem sido focada em sistemas biológicos, incluindo microrganismos, como fontes de células para a obtenção de nanopartículas através da redução de íons metálicos (SONI; PRAKASH, 2014). É sabido que alguns microrganismos, tais como bactérias (BANU; BALASUBRAMANIAN, 2014) e fungos (SONI; PRAKASH, 2014) são potencialmente úteis na preparação de nanopartículas metálicas sob temperatura e pressão normais.

A primeira síntese de NPsAg utilizando bactérias foi apresentada em 1999. Klaus e colaboradores produziram NPsAg com tamanho inferior a 200 nm, a partir de *Pseudomonas stutzeri* AG259. Em 2008, a síntese biológica de nanocristais de prata foi realizada com *Bacillus licheniformis*. A redução dos íons de prata e a consequente formação de NPsAg ocorreu após exposição da solução aquosa de íons metálicos Ag^+ a biomassa da bactéria (GHORBANI et al., 2011).

Entre os agentes biológicos, os fungos são candidatos potenciais para a micossíntese de nanopartículas metálicas, pois possuem alta capacidade de tolerar e bioacumular metais (HEMATH et al., 2010). Esse microrganismo também apresenta facilidade no cultivo, manipulação simples e viabilidade econômica em grande escala (CHAN; MASHITAH, 2012; HONARY et al., 2013; INGLE et al., 2008; VALA et al., 2014).

Os fungos são organismos eucarióticos, heterotróficos, formados por uma parede celular rígida, que produz células com força mecânica para resistir a alterações na pressão osmótica e estresse ambiental (BOWMAN; FREE, 2006; DURÁN; NOMBELA, 2004). A

parede celular fúngica é constituída de glicoproteínas e polissacarídeos, destacando-se o glucano e a quitina (BOWMAN; FREE, 2006; FARKAS, 1979).

A maioria dos fungos são filamentosos (5 a 10 μm de dimensão transversal). Cada filamento tubular recebe o nome de hifa e o conjunto destas compõe o corpo do fungo, denominado micélio que pode ser uma rede frouxa ou um tecido compacto. Desenvolvem-se numa ampla faixa de temperatura, com um ótimo desenvolvimento entre 22 e 30 $^{\circ}\text{C}$ para a maioria das espécies. Como heterotróficos, a disponibilidade de uma fonte de carboidrato (glicose, sacarose, maltose, etc.) permite que os fungos sintetizem suas próprias proteínas utilizando fontes de nitrogênio inorgânico ou orgânico e sais minerais essenciais para seu crescimento (RODRIGUES, 2006).

Os fungos têm a capacidade de produzir metabólitos extracelulares que servem como agentes para sua própria sobrevivência quando expostos a diferentes estresses ambientais, como materiais tóxicos (como íons metálicos), predadores e variações de temperatura (MEHRA; WINGE, 1991). Possuem a habilidade de produzir uma variedade de enzimas, toxinas, e grandes e diversas classes de metabólitos secundários, isso devido a sua diversificação de estarem presentes em substratos orgânicos e inorgânicos (RODRIGUES, 2006).

Existem muitos relatos de micossínteses (síntese via fungos) de nanopartículas metálicas usando diferentes espécies de *Fusarium*, nomeadas como *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Fusarium acuminatum*, *Fusarium culmorum*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus tamarii*, *Phoma glomerata*, *Alternaria alternata* e fungos endofíticos *Pestalotia sp* (RAI, 2013). Em 2001, o fungo *Verticillium sp.* mostrou uma redução eficiente dos íons prata, levando a síntese biológica de nanopartículas de prata. (MUKHERJEE et al., 2001).

Durante a síntese de nanopartículas metálicas por fungo, o micélio fúngico é exposto à solução de sal metálico, que leva o fungo a produzir enzimas e metabólitos para sua própria sobrevivência. Nesse processo, os íons metálicos tóxicos são reduzidos às nanopartículas sólidas metálicas não-tóxicas através do efeito catalítico da enzima extracelular e dos metabólitos do fungo (VAHABI et al., 2011). Desta forma, o mecanismo da micossíntese de nanopartículas de prata corresponde a duas etapas principais: a captura de íons Ag^+ na superfície de células fúngicas e subsequente redução desses íons por enzimas presentes na biomassa fúngica (MOHANPURIA et al., 2008).

Em um estudo realizado por Durán et al. (2005), nanopartículas de prata foram sintetizadas na presença de antraquinona e nitrato redutase (NADPH), o elétron necessário

para suprir a deficiência de íons aquosos de prata (Ag^+) e convertê-lo em Ag neutro (Ag^0) foi doado pela quinona e pelo NADPH. Em um trabalho realizado por Prabakaran e colaboradores (2016) foram relatadas algumas proteínas de alto peso molecular, incluindo a enzima redutase dependente de NADH, que são liberadas pela biomassa fúngica na síntese de nanopartículas e na estabilização. Esses complexos enzimáticos, NADPH e NADH também atuam na proteção e estabilização das NPsAg sintetizadas (PRABAKARAN et al., 2016).

As nanopartículas podem ser sintetizadas intra e extracelularmente (GHOLAMI-SHABANI et al., 2013; LI et al., 2012). Na síntese intracelular, as nanopartículas são sintetizadas dentro da célula fúngica (CHAN; MASHITAH, 2012; VALA et al., 2014). Nesse método, a biomassa fúngica é tratada com uma solução de sal metálico e incubada por 24 horas no escuro. Na síntese extracelular, o filtrado fúngico é tratado com uma solução de sal metálico e incubado para a síntese de nanopartículas (DURÁN et al. 2005, 2007; MUKHERJEE et al. 2008; NANDA; MAJEED, 2014).

2.4 *Beauveria bassiana*

O fungo *Beauveria bassiana* possui distribuição mundial, sendo capaz de viver como um saprófito no solo, como um endofítico nas plantas, ou como um entomopatógeno que afeta uma ampla gama de artrópodes (QAMANDAR; SHAFEEQ, 2017; BOOMSMA et al., 2014). Esse fungo é conhecido por ser utilizado como uma estratégia comercial para o controle biológico de importantes pragas na agricultura, além disso, algumas de suas linhagens podem catalisar reações de hidroxilação, redução e oxidação (ANDRIOLI, 2012).

Figura 7 - Cultivo de *B. bassiana* em meio BDA



Fonte: Elaborada pelo autor.

De acordo com a literatura, fungos entomopatogênicos e endofíticos possuem grande capacidade para secretar ampla gama de metabólitos em meios de culturas artificiais

(ALMEIDA, 2019; ANDRIOLI, 2012). Em geral, os fungos entomopatogênicos secretam uma grande variedade de metabólitos quando cultivados em meios artificiais ou quando infectam seus hospedeiros (RUSTIGUEL, et al., 2017). Esses metabólitos secundários são geralmente peptídeos cíclicos com propriedades antibiótica e inseticida (STRASSER et al., 2000).

B. bassiana é bem conhecido por produzir uma grande variedade de metabólitos secundários biologicamente ativos incluindo pigmentos não peptídicos e policetídeos (por exemplo, oosporina, bassianina e tenelina), peptídeos sintetizados não ribossomicamente (por exemplo, beauvericina, bassianolidos e beauveriólidos) e metabólitos secretados envolvidos na patogênese e virulência (por exemplo, ácido oxálico) que tem potencial ou real uso industrial, farmacêutico e agrícola (ZIMMERMANN, 2007).

De acordo com Rao et al. (2006), é conhecido que a produção de protease extracelular em microrganismos foi grandemente influenciada por componentes de meios, especialmente fontes de carbono e nitrogênio, fatores físicos como pH, temperatura, densidade de inóculo, oxigênio dissolvido e incubação térmica. Portanto, não é surpreendente que os fungos entomopatogênicos, como a *B. bassiana* também sejam capazes de produzir diferentes metabólitos. Na tabela 1 podem ser observados metabólitos produzidos por *B. bassiana* em condições de cultivo convencionais, utilizando o meio de cultura batata dextrose.

Tabela 1 - Lista de alguns metabólitos produzidos por *Beauveria bassiana*

Takahashi, S. et al. (1998)	Luo, F. et al. (2013)	Luo, Z. et al. (2014)	Liu, H. et al. (2015)	Ragavendran, C. et al. (2017)	Rustiguel, C. B. et al. (2017)
Piridovericina e Piridomacrolidina	Glioxilato Ácido pirúvico Fumarato Betaína Purina Ribulose Carnitina Acetilcarnitina Ergotioneína Ácido palmítico Glicerofosfolina Ácido linoleico Ribonucleótido 5-aminoimidazol Ácido 8-hidroxi-linoleico Éster etílico do ácido linoléico Éster etílico do ácido linoleico Ácido 7,8-dihidroxi-oleico Micosporina-glutâmico; Ácido 5'-carboxílico, 1'-amida Trealose Condriлина 1-hexadecanoil-glucitol Ácido cítrico; Éster 2-octadecílico Mono-9-octadecenoil glucitol Beauverolide B Beauverolide C Fosfatidiletanolamina Fosfatidilcolina Fosfatidilserina Fosfatidilinositol Beauverolide Ka Anidrido succínico Ácido piroglutâmico Ácido glutâmico Ribulose Arginina Manitol Ácido oleico Ácido 3-hidroxi-esteárico Esfingosina Dimetil-guanosina 2-amino-6-metil-1,3,4-heptadecanotriol 2-amino-1,3-eicosanodiol 2-amino-1,3,4-eicosanetriol Ácido fosfatídico	Oosporina	Glioxilato Piruvato Alanina Fumarato Succinato Betaína Dihidrotimina Oxaloacetato Ribulose Carnitina Acetilcarnitina Ergotioneína Ácido palmítico Glicerofosfolina Ácido linoleico Ácido 8-hidroxi-linoleico Ribonucleótido 5-aminoimidazol Éster etílico do ácido linoleico Dimetil-guanosina Micosporina-glutâmico Frutose -1,6-bisfosfato Fosfatidiletanolamina Fosfatidilcolina Fosfatidilserina Fosfatidilinositol Beauverolide Ka Anidrido succínico Diidrouacil Ácido piroglutâmico Ácido glutâmico Arginina Manitol Ácido 3-hidroxi-esteárico Esfingosina 2-amino-1,3-eicosanodiol Ácido fosfatídico	Ácido n-hexadecanoico Ácido (Z,Z)-9,12-octadecadienoico Ácido octadecanoico Éster fenilmetílico Esqualeno	Beauvericina, Bassianolida, Oosporina, Tenelina, Destruixinas, Bassiacridine, Ácido oxálico

Fonte: Elaborada pelo autor.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Sintetizar e caracterizar nanopartículas de prata obtidas a partir de diferentes condições de cultivo de *Beauveria bassiana*.

3.2 Objetivos específicos

- Estabelecer as condições de cultivo de *B. bassiana* capazes de produzir metabólitos com potencial redutor;
- Identificar os metabólitos produzidos por *B. bassiana*;
- Produzir nanopartículas de prata a partir de diferentes condições de cultivo de *B. bassiana*;
- Caracterizar as nanopartículas de prata.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

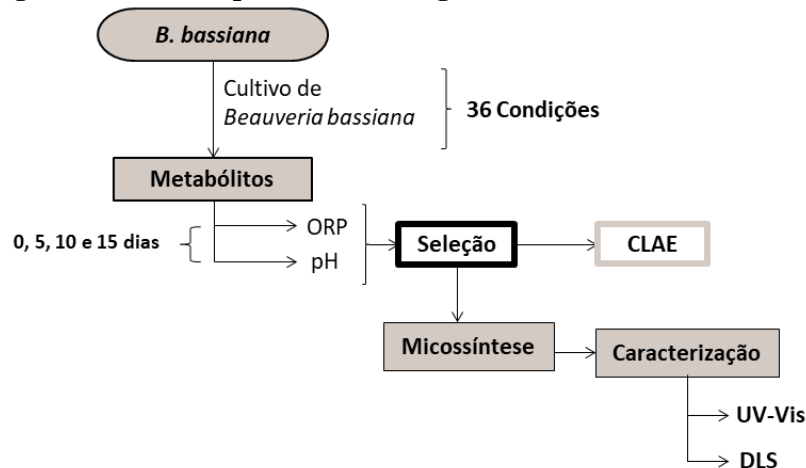
Para a síntese de nanopartículas de prata foi utilizado o fungo isolado *Beauveria bassiana*, cepa CPATC032, gentilmente cedido pela Embrapa Tabuleiros Costeiros (Aracaju-SE), nitrato de prata PA (Dinâmica, Brasil), ácido clorídrico (Vetec, Brasil) e hidróxido de sódio (Vetec, Brasil).

O meio de cultura Ágar Dextrose de Batata - PDA (Himedia, Índia) foi utilizado como substrato para crescimento fúngico. Os nutrientes utilizados foram glicose (Yoki, Brasil) obtida comercialmente e o soro de leite obtido em laboratório através do processo de coagulação do leite integral (Valedourado, Brasil). Todas as soluções foram preparadas utilizando água deionizada.

4.2 Métodos

As metodologias desenvolvidas estão representadas na figura 8.

Figura 8 – Fluxograma com as etapas da metodologia



ORP - Pontencial de oxirredução; pH - Potencial hidrogeniônico; CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência; UV-Vis - Ultravioleta-visível; DLS - Espalhamento de Luz Dinâmico Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2.1 Cultura do fungo *B. bassiana*

As colônias puras de *B. bassiana* utilizadas foram obtidas a partir do semeio do fungo liofilizado em placas de *Petri* contendo meio Ágar Dextrose de Batata (PDA), o meio foi esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos. As placas com *B. bassiana* foram incubadas a 25 °C por um período de 14 dias (ALVES et al., 1996; LI et al., 2011).

4.2.2 Produção de diferentes condições de cultivo

Para produzir diferentes condições de cultivo foram utilizados como base os trabalhos de Pham et al. (2009) e Santoro et al. (2005). A variabilidade no cultivo foi obtida a partir do cruzamento das variáveis luminosidade e agitação (com e sem), pH (3 e 6) e nutrientes (fonte de carbono: glicose e fonte de nitrogênio: soro de leite), resultando em 36 condições de cultivo (Tabela 1). As condições foram organizadas em 5 grupos.

No grupo 1 (condições 1 – 4) foram avaliados quanto a presença ou ausência de luz e agitação. Para o grupo 2 (5 – 6) as variáveis foram luz, agitação e pH (3 e 6). Além das variações luz e agitação para o grupo 3 foram adicionados nutrientes glicose e soro de leite, 5 mL de nutriente para 50 mL de meio batata dextrose. Para os grupos 5 e 6 foram cruzadas as 4 variáveis estudadas no trabalho, grupo 5 (luz, agitação, pH= 3, nutrientes glicose ou soro de leite) e grupo 6 (luz, agitação, pH= 6, nutrientes glicose ou soro de leite).

Às condições de cultivo estéreis e em temperatura ambiente foram adicionados 1 mL de suspensão de *B. bassiana*. Essa suspensão foi preparada com solução fisiológica estéril e esporos do fungo para obtenção de aproximadamente $1,5 \times 10^8$ conídios/mL na escala McFarland (0,5). As condições foram incubadas durante 15 dias a 25 °C.

Tabela 2 – Diferentes condições para o cultivo de *B. bassiana*

Condição	Luz		Agitação		pH		Nutrientes	
	Com	Sem	Com	Sem	3	6	Glicose	Soro de leite
G1	C1	X		X				
	C2		X		X			
	C3	X		X				
	C4		X	X				
G2	C5	X		X	X			
	C6		X		X			
	C7	X		X	X			
	C8		X	X	X			
	C9	X			X		X	
	C10		X		X		X	
	C11	X		X			X	
	C12		X	X			X	
G3	C13	X		X			X	
	C14		X		X		X	
	C15	X		X			X	
	C16		X	X			X	
	C17	X			X			X
	C18		X		X			X
	C19	X		X				X
	C20		X	X				X
G4	C21	X		X	X		X	
	C22		X		X		X	
	C23	X		X	X		X	
	C24		X	X	X		X	
	C25	X			X			X
	C26		X		X			X
	C27	X		X				X
	C28		X	X				X
G5	C29	X		X		X	X	
	C30		X		X	X	X	
	C31	X		X		X	X	
	C32		X	X		X	X	
	C33	X			X			X
	C34		X		X			X
	C35	X		X			X	X
	C36		X	X			X	X

G – Grupo. Fonte: Elaborada pelo autor.

O potencial de oxirredução (ORP) e pH foram verificados em todas as condições de cultivo no 0, 5, 10 e 15 dias. Foram utilizados, medidor portátil (AKSO, Brasil) para mensurar o potencial de oxirredução e pHmetro (TecnoPON mPA210, Brasil) para determinar o pH. O pH foi verificado para ajudar na elucidação dos dados encontrados na CLAE. A avaliação do potencial oxirredução foi utilizada para verificar a habilidade que os metabólitos produzidos por *B. bassiana* têm de reagir como “doadores” de elétrons. As condições foram testadas em triplicata. Foram selecionados para a micossíntese os cultivos que apresentaram menor ORP em um menor tempo, isso devido à tendência dessas condições em doar elétrons para converter íons Ag^+ em Ag^0 .

As condições de cultivo selecionadas com os melhores potenciais de redução foram submetidas à análise cromatográfica e micossíntese, sendo utilizados para isso os filtrados celulares obtidos diretamente dos cultivos (Filtrado 1) e os filtrados dos micélios (Filtrado 2). Para obtenção do filtrado 1, após o período de incubação as condições selecionadas foram filtradas com filtro de papel Whatman nº 1. Em seguida, o filtrado celular foi armazenado a 25 °C para posterior etapa (QAMANDAR; SHAFEEQ, 2017). O filtrado 2 foi obtido a partir do micélio produzido por algumas condições selecionadas. Após o período de incubação, o micélio foi coletado posteriormente a filtração com filtro de papel Whatman nº 1, seguido de uma lavagem extensa, 3 vezes com água destilada. Quatro gramas de micélio foram levados para um frasco Erlenmeyer contendo 40 mL de água deionizada. O Erlenmeyer foi incubado a 25 °C por 120 h. Após a incubação, o filtrado celular foi obtido por filtração com filtro de papel Whatman nº 1 e armazenado a 25 °C para posterior uso (PRABAKARAN et al., 2016).

4.2.3 Perfil cromatográfico das condições de cultivo em CLAE

Para a análise através da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram utilizados os filtrados dos micélios (Filtrado 2), pois a partir desses filtrados podem ser observados apenas os picos que representam as substâncias produzidas por *B. bassiana*, já nos filtrados celulares obtidos diretamente dos cultivos (Filtrado 1) ocorre a presença de picos que representam substâncias pertencentes ao meio de cultura e produzidas pelo fungo. As análises foram realizadas utilizando o cromatógrafo da marca Shimadzu. O sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) consistia de uma bomba de alta pressão LC-20ADXR, desgaseificador DGU - 20A3R, auto injetor modelo SIL - 20AXR, forno CTO-20AD para coluna cromatográfica modelo júpiter C18 (250 x 4,60 mm; 5 μ m/300A), um detector de UV SPD-20AD, um módulo controlador CMB-20AD acoplado a um microcomputador através de

um software da Shimadzu LC-solution para aquisição dos dados.

As condições cromatográficas empregadas foram adaptadas do trabalho de Luo et al. (2013). A fase móvel consistia de um sistema gradiente (ácido fórmico:acetonitrila). O solvente A contendo ácido fórmico:água (1:19 v/v) e o solvente B acetonitrila grau HPLC. A separação foi alcançada numa coluna júpiter C18 (250,0mm×4.6mm de diâmetro interno; 5,0µm/300A) mantida numa temperatura de 40,0°C, a taxa de fluxo foi mantida em 0,3 mL/min (LUO et al., 2013). O detector de fluorescência ajustado para monitorar 4 comprimentos de excitação e seus respectivos comprimentos de emissão simultaneamente, sendo eles: 242 nm de Excitação – 450 nm de Emissão; 264 nm de Excitação – 450 nm de Emissão; 285 nm de Excitação – 450 nm de Emissão; 320 nm de Excitação – 450 nm de Emissão. Um sistema gradiente foi programado da seguinte forma: 50,0% de B no intervalo entre 0,01 e 10,50 minutos; 65,0% de B no intervalo entre 10,50 e 20,50 minutos; 90,0% de B no intervalo entre 20,50 e 27,50 minutos e redução para 35% de B a partir de 30,50 minutos, mantendo-se nesta condição isocrática até o tempo de 34,5 minutos. Os resultados obtidos com a corrida das amostras foram capturados pelo software e expressos em forma de gráficos.

4.2.4 Micossíntese de nanopartículas de prata

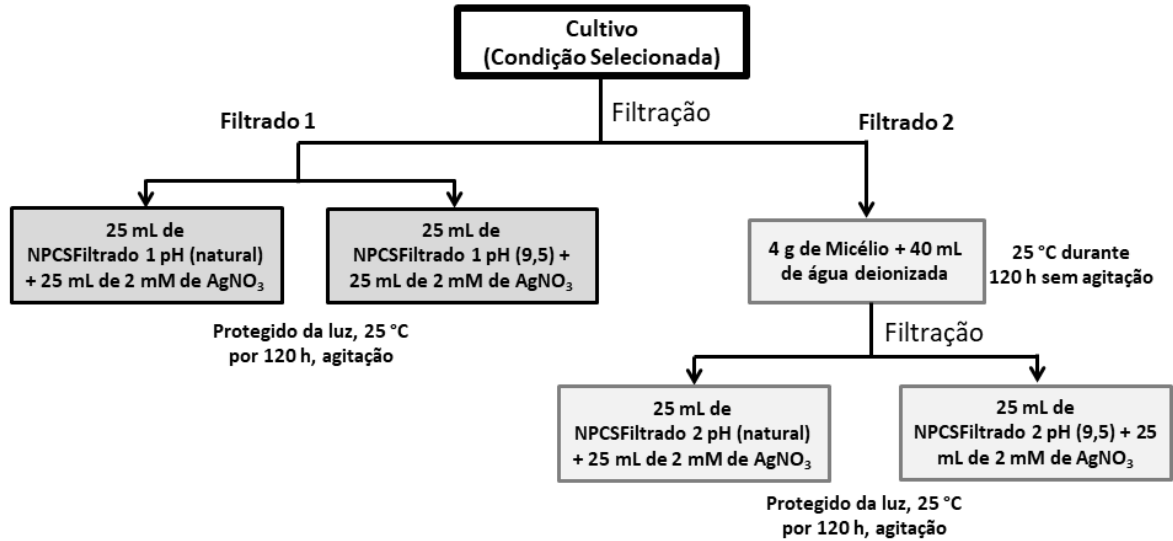
A micossíntese foi realizada a partir da seleção das condições de cultivo de *B. bassiana* que apresentaram os melhores potenciais de redução. As sínteses foram realizadas com todas as condições de cultivo selecionadas. As NPsAg foram obtidas através de duas vias de síntese. Utilizando-se os filtrados celulares diretamente dos cultivos das condições selecionadas (Filtrado 1) e a outra via utilizou os filtrados celulares dos cultivos dos micélios dessas condições (Filtrado 2).

As NPsAg foram sintetizadas utilizando os filtrados celulares 1 e 2, o filtrado foi separado em duas partes, 25 mL cada, isso para que a síntese fosse avaliada em pH natural e pH ajustado (NaOH 0,1 M) para 9,5 (JOSEPH et al., 2012; KAMIL et al., 2017). Em seguida, foi acrescentado 25 mL de solução aquosa de AgNO₃ 2 mM em um Erlenmeyer de 100 mL. A mistura inteira foi incubada a temperatura ambiente 25 °C a 200 rpm durante 5 dias sob condições escuras (PRABAKARAN et al., 2016). Como controle a solução de AgNO₃, sem a adição de filtrado celular, foi mantida nas mesmas condições citadas anteriormente.

Para as análises na forma de suspensão coloidal, o produto formado foi utilizado logo após o processo de síntese já descrito. Todas as amostras foram preparadas por centrifugação, uma alíquota (2 mL) de cada produto foi submetida a 3.000 rpm por 10 min. a 26 °C para a

remoção do excesso de componentes do filtrado celular. O sobrenadante obtido foi uma suspensão castanha-amarelada homogênea de NPsAg.

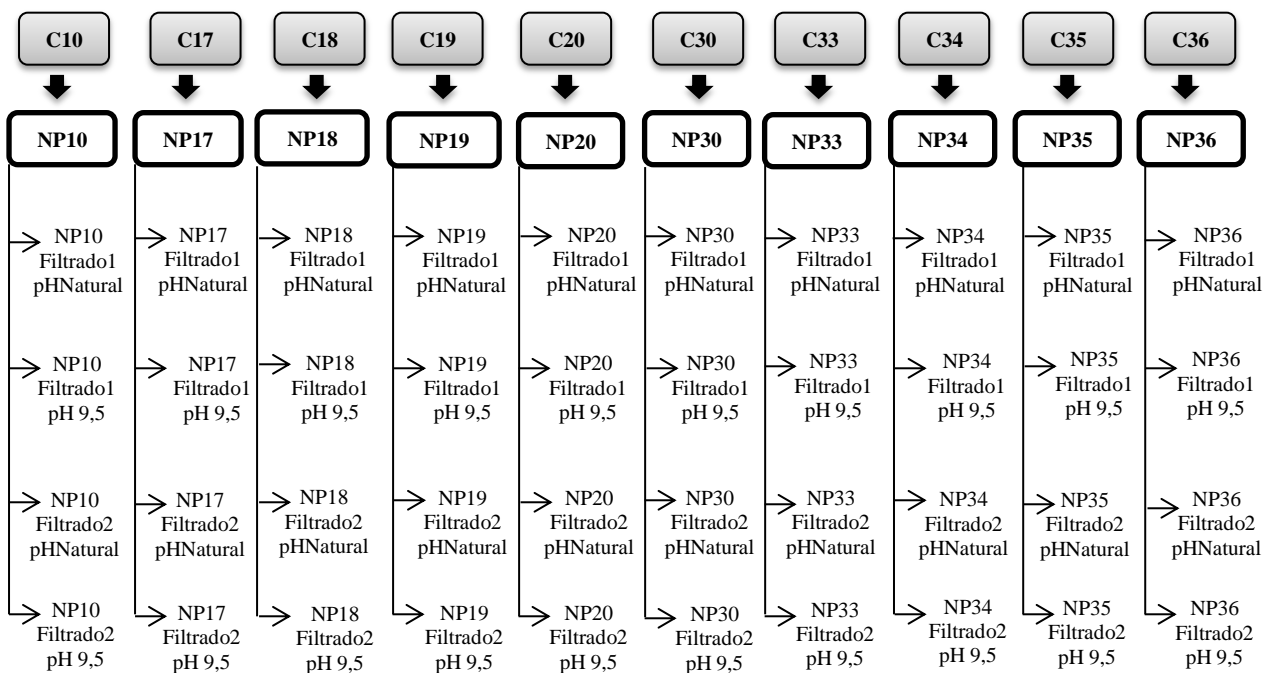
Figura 9 – Fluxograma para micossíntese de NPsAg utilizando *B. bassiana*



Fonte: Elaborada pelo autor.

Como pode ser observado através do fluxograma, foram testadas 4 condições de micossíntese de NPsAg para cada condição de cultivo seleccionada, com um total de 40 produtos de micossíntese.

Figura 10 – Condições seleccionadas para a micossíntese de NPsAg



C – Condição; NP – Nanopartícula. Fonte: Elaborada pelo autor.

4.3 Caracterização

A suspensão coloidal das NPsAg foi caracterizada através de técnicas físico-químicas como espectrofotometria de UV-Visível (UV-Vis) e espalhamento de luz dinâmico (DLS).

4.3.1 Caracterização de NPsAg na forma de suspensão coloidal

4.3.1.1 Espectrofotometria de UV-Vis

A técnica de espectrofotometria no UV-Vis foi utilizada para observar a formação de nanopartículas de prata, a obtenção dessas NPs foi identificada através da formação de bandas plasmônicas características. Isso porque as NPsAg apresentam absorção de luz em um comprimento de onda específico referente às suas bandas de SPR. O espectro de absorção da amostra foi registrado em um leitor de placas (Flexstation[®] 3, EUA) pertencente ao Laboratório de Biologia e Fisiologia de Insetos, localizado no Instituto de Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal de Alagoas.

As amostras foram analisadas a cada 24 horas durante cinco dias, a fim de detectar a formação das nanopartículas de prata. A absorbância foi observada entre comprimentos de onda de 200 a 800 nm em placa de poliestireno de 96 poços com fundo chato. A biorredução foi monitorada registrando os espectros de absorção no UV-Vis em função do tempo reacional. De acordo com a literatura, o pico de absorção de UV que caracteriza a formação das nanopartículas de prata é observado em 420 nm (KAMIL et al., 2017).

A formação das NPsAg também foi realizada através de monitoramento visual da coloração da solução, sendo verificada mudança na tonalidade dos filtrados 1 e 2 para as tonalidades de castanho claro ou escuro, quando produzidas NPsAg.

4.3.1.2 Espalhamento de luz dinâmico (DLS)

A técnica de espalhamento de luz dinâmico permite determinar o diâmetro hidrodinâmico das partículas em suspensão pelo espalhamento de luz decorrido do movimento Browniano das partículas. Além disso, destaca-se que partículas com o tamanho maior do que 1 µm estarão sujeitas ao movimento gravitacional, além do Browniano, o que faz com que essa técnica seja adequada apenas para a caracterização de partículas < 1 µm (ALBERNAZ, 2014).

Através dessa técnica também foi possível determinar a carga de superfície das partículas por meio da medida do potencial Zeta de superfície. De acordo com Albernaz

(2014), esse valor se refere à carga da bicamada elétrica que recobre a partícula sendo, então, um indicativo da estabilidade coloidal, pois quanto maior o valor das cargas em módulo, maior a repulsão eletrostática entre as partículas e menor o estado de agregação e a probabilidade de floculação ou sedimentação. Segundo Haider e Mehdi (2014) valores maiores que 30 mV, em módulo, são considerados estáveis.

No mesmo aparelho foram obtidas informações sobre a distribuição das populações de tamanho das partículas analisadas por meio da determinação do índice de polidispersividade (PdI). O PdI se refere à variedade do tamanho da amostra relativo à sua distribuição por intensidade (Malvern). Esse valor varia de 0 a 1 e, quanto menor, mais monodispersa e, conseqüentemente, mais homogênea é a amostra. O aparelho utilizado foi Zetasizer Nano ZS90 (Malvern, Inglaterra), o mesmo pertence ao Laboratório de Tecnologia de Nanossistemas Carreadores de Substâncias Ativas localizado no Instituto de Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal de Alagoas. As leituras ocorreram com índice de refração 1,390 e absorção 0,002 com 30 corridas.

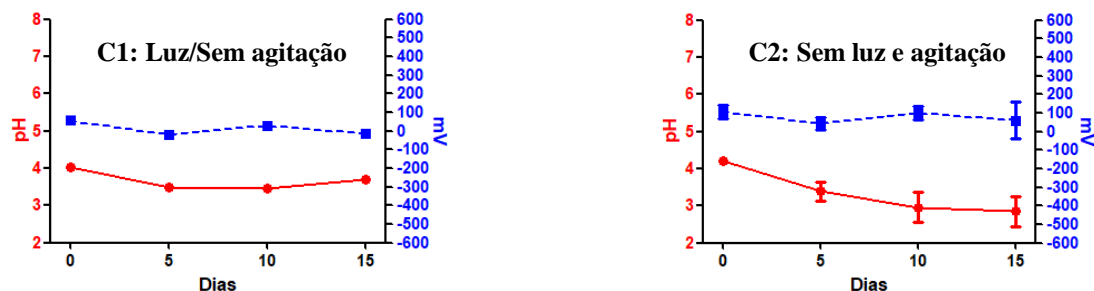
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

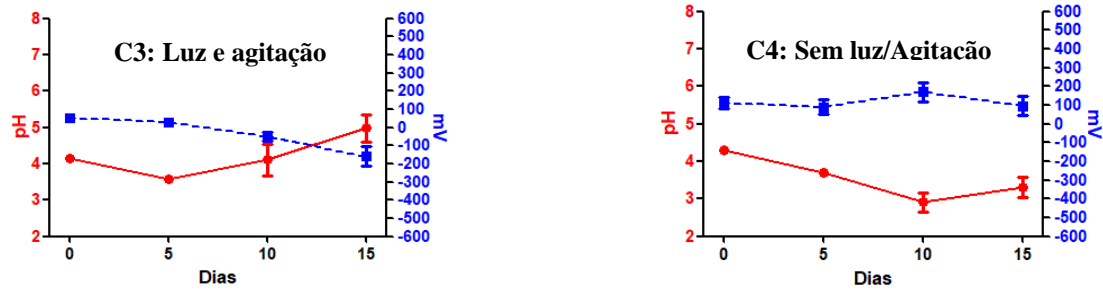
5.1 Produção de diferentes condições de cultivo

A fim de selecionar as condições de cultivo mais aptas à redução da prata, ou seja, as que levam à produção de metabólitos que podem doar elétrons, as figuras 11 a 15 a seguir apresentam o acompanhamento temporal das condições avaliadas frente a pH e potencial de oxirredução.

Com relação às variáveis luminosidade e agitação (Figura 11, C1 a C4), apenas a condição C3, luz e agitação, favoreceu a produção de metabólitos com potencial redutor. Isto foi notado a partir do quinto dia e acompanhado do aumento do pH, chegando até 5,2 no décimo quinto dia. Observando-se que essas variáveis não demonstraram influência significativa na obtenção do potencial de redução nos meios avaliados. Já PHAM et al. (2009), avaliaram a variável agitação no cultivo de *B. Bassiana* e identificaram que a agitação de 200 rpm contribuiu para melhorar o desenvolvimento micelial do fungo. Nesse mesmo trabalho também foi avaliado o efeito do pH na esporulação, pH 3,0, 4,0, 4,5, 6,0, no qual o fungo *B. bassiana* teve maior produção de esporos em pH de 5,2, que era o pH natural do meio de cultura utilizado (Ágar Dextrose de Batata). Esta melhor produção de esporos pode estar relacionada à produção de metabólitos que interfiram no potencial de oxirredução. O trabalho de Rao et al. (2006), também fez um estudo sobre a influência da agitação na produção de protease por *B. bassiana* e observaram que a produção dessa enzima foi favorecida com a agitação de 150 rpm.

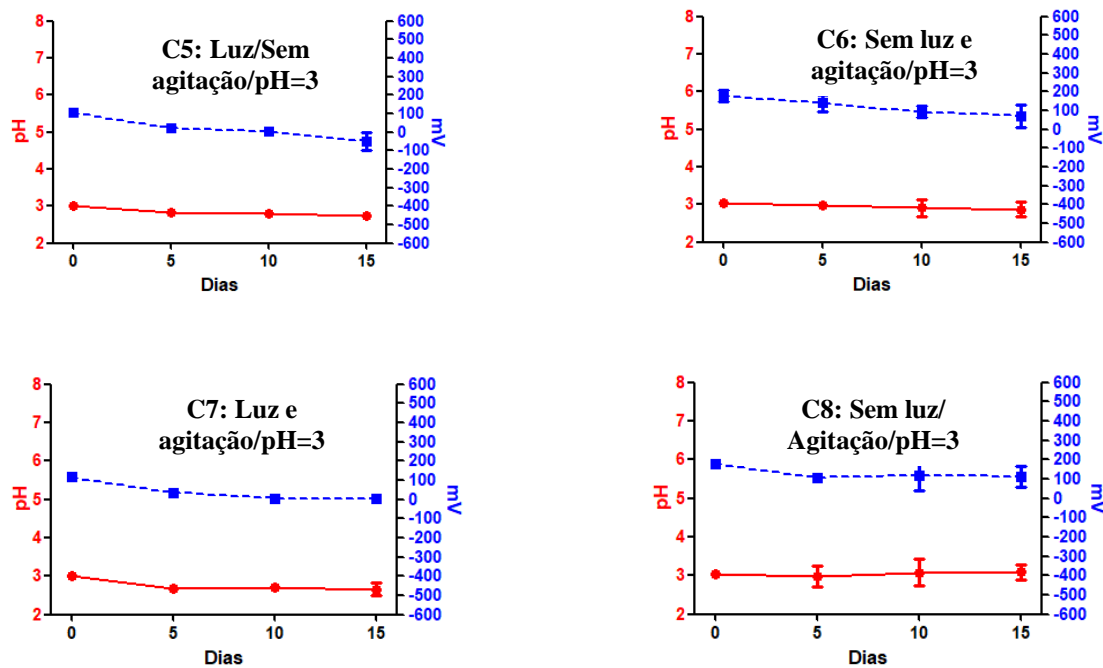
Figura 11 – Potencial de redução e pH obtidos do cruzamento das variáveis luz e agitação para o cultivo de *B. bassiana* durante 15 dias

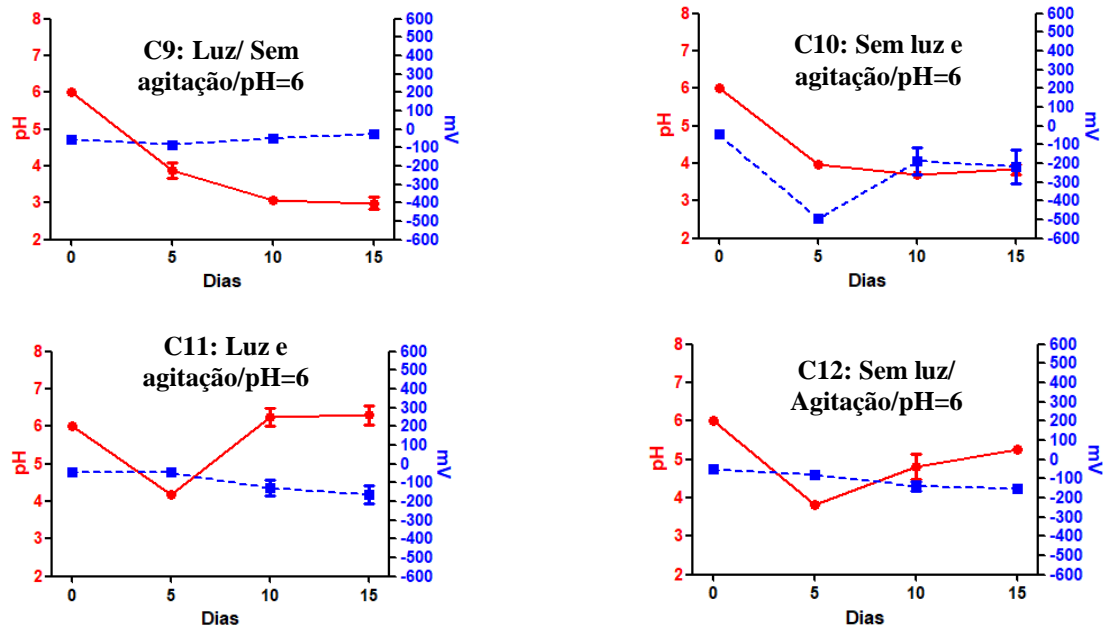




A figura 12 ilustra o resultado da variação de luz, agitação e pH, condições designadas por C5 a C12. Embora as condições C9 (luz, sem agitação, pH 6), C10 (sem luz e agitação, pH 6), C11 (luz, agitação, pH 6) e C12 (sem luz, agitação, pH 6) tenham apresentado redução de pH, apenas os metabólitos produzidos pela C10 implicaram em valores de potencial de oxirredução negativos, o que, possivelmente torna esta condição capaz de reduzir a prata. Resultados semelhantes foram encontrados por Karthikeyan et al. (2008), que estudaram o efeito de uma faixa variada de pH de 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9 no caldo batata dextrose e observaram que o pH mais adequado para o crescimento de *B. bassiana* foi de 6 - 8.

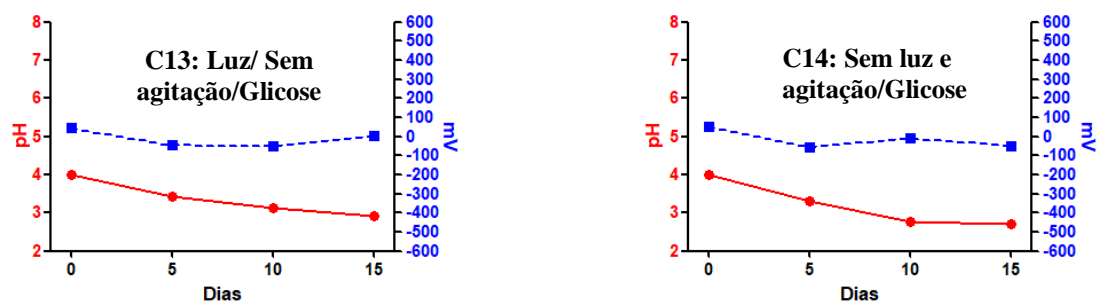
Figura 12 – Potencial de redução e pH obtidos do cruzamento das variáveis luz, agitação e pH para o cultivo de *B. bassiana* durante 15 dias

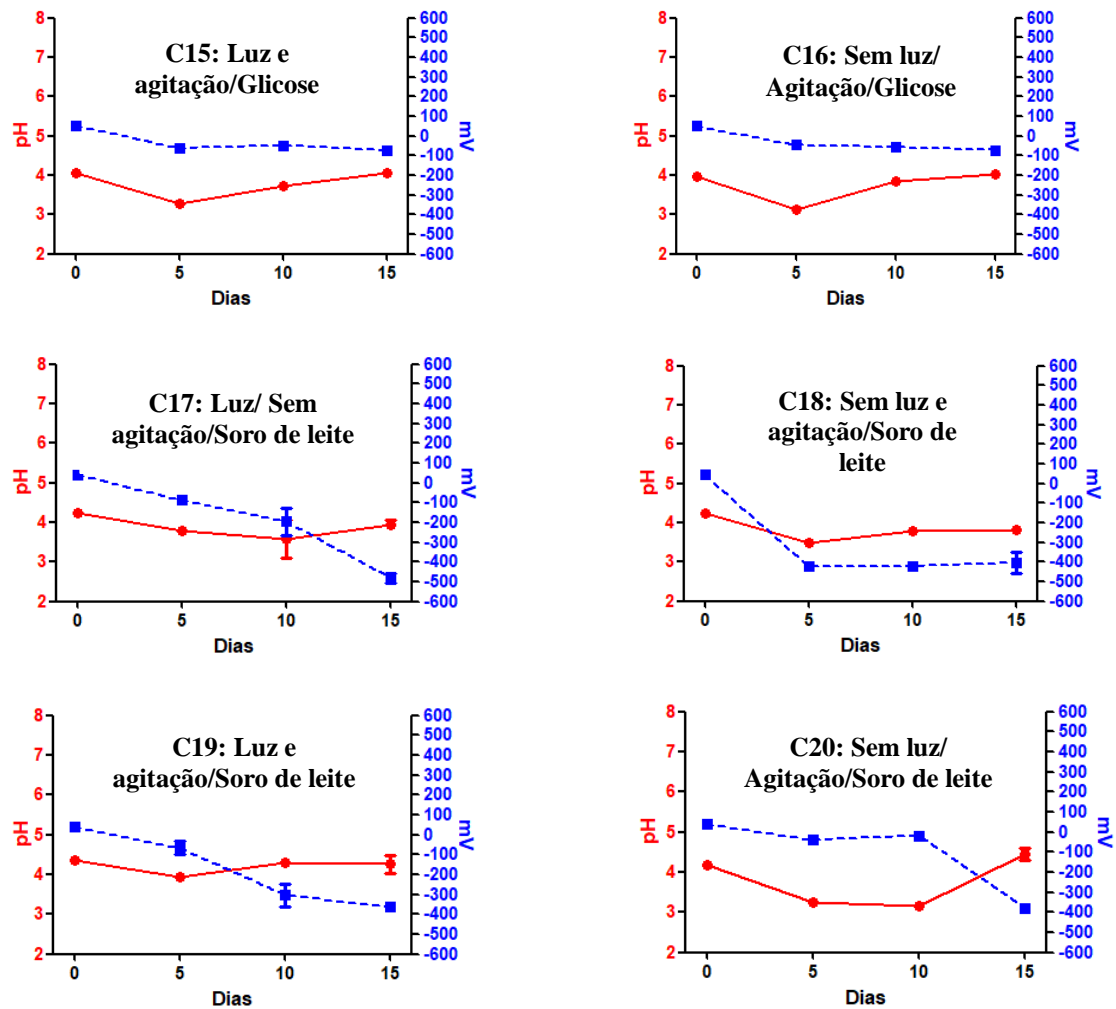




Analisando a figura 13, C13 a C20, que reúne os resultados das variáveis luz, agitação e nutrientes, destacam-se as condições de C17 a C20 em relação ao potencial de oxirredução. Em C17 (luz, sem agitação, soro de leite), C18 (sem luz e agitação, soro de leite) e C19 (luz, agitação, soro de leite) o potencial de oxirredução começa a reduzir logo a partir do quinto dia, diferente de C20, onde isto foi observado no décimo quinto dia. Pode-se notar que a variável responsável pelos potenciais de oxirredução negativos foi o nutriente soro de leite, o mesmo está presente nas quatro condições que apresentaram potencial de oxirredução negativo. Não há variação significativa de pH em C18, cujo valor de 4,2 se mantém ao longo dos quinze dias. Rao et al. (2009) encontraram resultados semelhantes quando estudaram o efeito das fontes de carbono (glicose, maltose, amido de milho e casca de camarão em pó) e nitrogênio (pó de soja, proteína de soja, levedura em pó, extrato de levedura e peptona) para a produção de protease por parte de *B. Bassiana*, observaram que a produção máxima dessa enzima foi obtida através de fontes de nitrogênio.

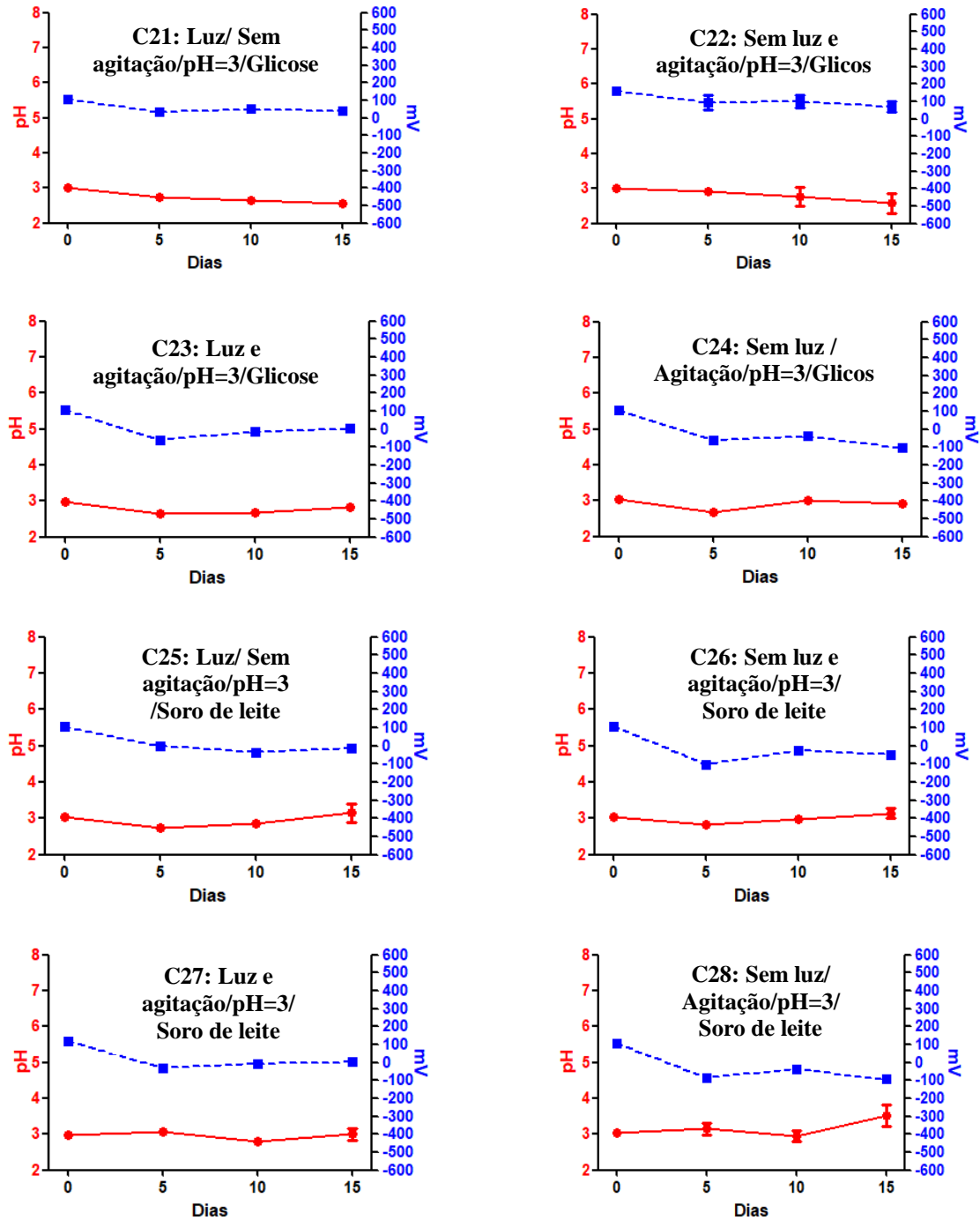
Figura 13 – Potencial de redução e pH obtidos do cruzamento das variáveis luz, agitação e nutrientes para o cultivo de *B. bassiana* durante 15 dias





A figura 14 apresenta o resultado das condições frente à variação de luz, agitação e nutrientes em pH fixado em 3, designadas por C21 a C28. Em nenhuma delas foi observada diferença notória dos valores de potencial de oxirredução. Anteriormente na figura 12 também foi observado que em pH ajustado para 3 nenhuma alteração significativa foi notada no pH e potencial de oxirredução, demonstrando que essa variável, pH 3, mesmo quando combinada com a variável de nutrientes, fontes de carbono ou nitrogênio, não contribui para a produção de metabólitos que produzam potencial de oxirredução negativo. Como anteriormente mencionado, no trabalho de PHAM et al. (2009), eles observaram que o pH 3 não foi o melhor em beneficiar o desenvolvimento de *B. bassiana*.

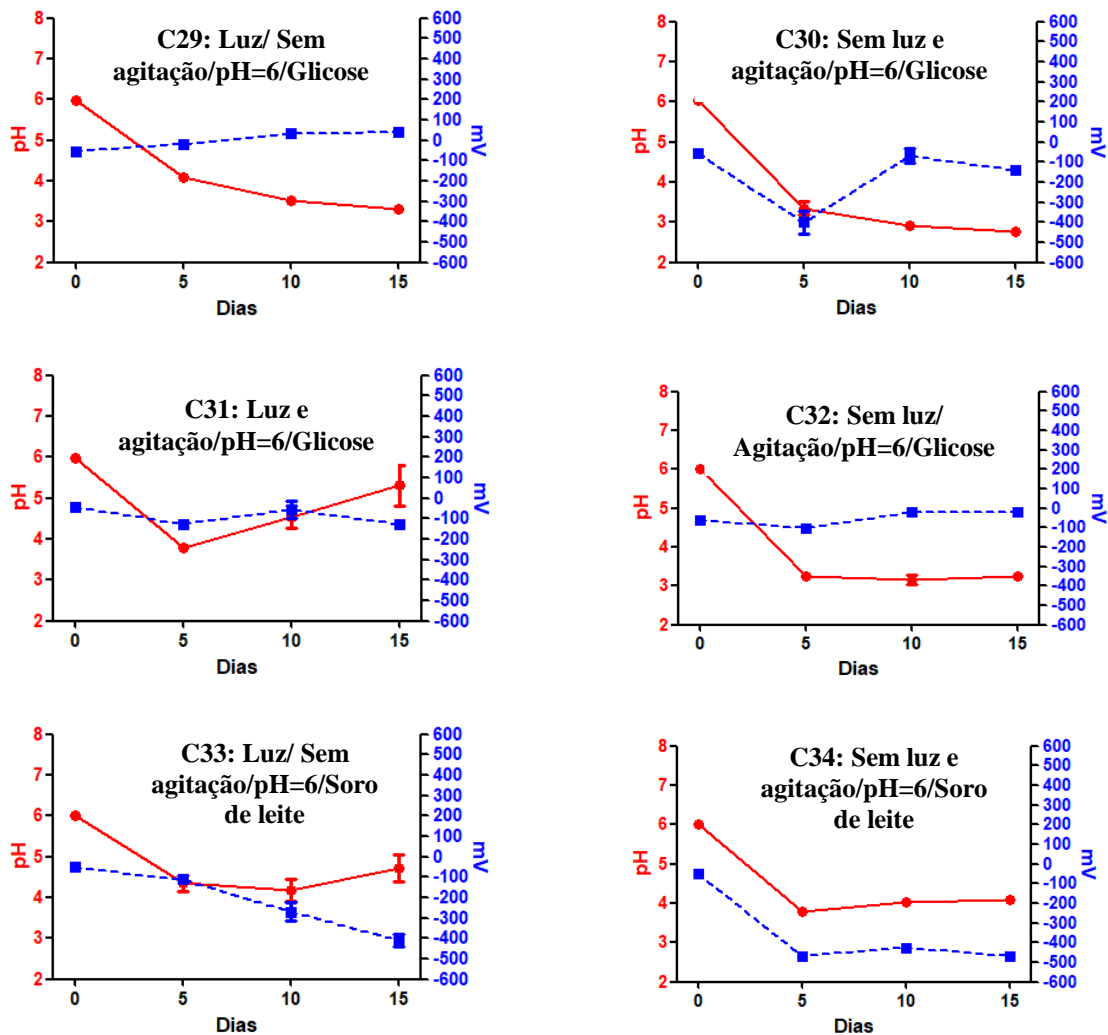
Figura 14 – Potencial de redução e pH obtidos do cruzamento das variáveis luz, agitação, pH=3 e nutrientes para o cultivo de *B. bassiana* durante 15 dias

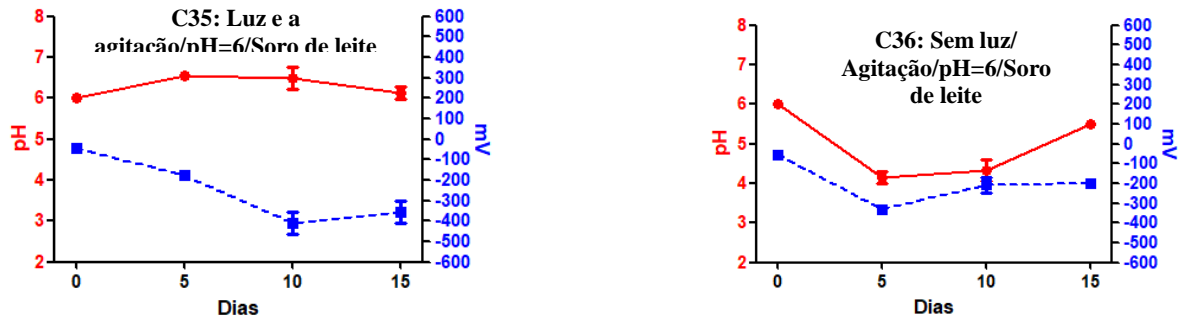


Na figura 15, agora com pH fixado em 6, condições C29 a C36, destacam-se C30 (sem luz e agitação, pH 6, glicose), C33 (luz, sem agitação, pH 6, soro de leite), C34 (sem luz e agitação, pH 6, soro de leite), C35 (luz e a agitação, pH 6, soro de leite) e C36 (sem luz, agitação, pH 6, soro de leite) quanto ao potencial de oxirredução. De acordo com WANG, Q.; XU (2012), pesquisas de fontes de carbono e nitrogênio para a produção do metabólito secundário beauvericina indicaram que as melhores fontes de carbono e nitrogênio são glicose

e peptona, respectivamente. Na presente pesquisa, as condições selecionadas com os melhores potenciais de redução tinham como fonte de nutrientes o soro de leite, podendo isso ser devido a presença de peptona. Já a glicose não demonstrou influência significativa para o objetivo proposto. Em uma pesquisa realizada por Iskandarov e colaboradores (2006), a suplementação de água com sacarose ou glicose como única fonte de carbono não estimulou a germinação de esporos de *B. bassiana*, mesmo após 48 horas de incubação.

Figura 15 – Potencial de redução e pH obtidos do cruzamento das variáveis luz, agitação, pH= 6 e nutrientes para o cultivo de *B. bassiana* durante 15 dias





Fonte: Elaborada pelo autor.

Como resultados, foram selecionadas para a micossíntese as condições C10, C17, C18, C19, C20, C30, C33, C34, C35 e C36, pois apresentaram os melhores potenciais de oxirredução (ORP) negativo, demonstrando dessa forma, habilidade para transferir elétrons para a redução do íon metálico Ag^+ a Ag^0 , redução essa que caracteriza a formação de NPsAg.

Tabela 3 - Condições selecionadas para a micossíntese de NPsAg com o dia onde foi obtido melhor potencial de redução e o desvio padrão (SD – Standard Deviation)

			Potencial de oxirredução (mV \pm SD)
G2	C10	5°	- 494 \pm 7,54
	C17	15°	- 480 \pm 24,78
G3	C18	5°	- 423 \pm 13,27
	C19	15°	- 365 \pm 6,50
	C20	15°	- 378 \pm 5,13
G5	C30	5°	- 400 \pm 57,95
	C33	15°	- 410 \pm 28,93
	C34	5°	- 468 \pm 17,75
	C35	10°	- 410 \pm 55,00
	C36	5°	- 330 \pm 7,21

G – Grupo. Fonte: Elaborada pelo autor.

5.2 Perfil cromatográfico das condições de cultivo em CLAE

A partir da tabela 4 e figura 16 podem ser observadas as interferências das variações de cultivo sobre as condições 10, 17, 18, 30, 33 e 34 para a produção de metabólitos, podendo ser identificadas as semelhanças e diferenças na composição dessas condições. Quando os resultados dos perfis cromatográficos das condições estudadas foram comparados com os resultados do cultivo convencional, condição de cultivo sem variação nos componentes, foi observado que os picos 1, 2 e 3 presentes no cultivo convencional não foram detectados nas condições selecionadas com os melhores potenciais redutores, indicando que essas substâncias podem ter se metabolizado em outros componentes. Contudo, também foi observado que os

picos 8, 9, 10, 17 e 19 presentes nas condições analisadas representam substâncias que não foram produzidas através do cultivo convencional.

A comparação entre as condições selecionadas (filtrados micelares) e o cultivo convencional também demonstra que algumas condições de cultivo proporcionam um aumento na concentração de algumas substâncias, isso em consequência da adição ou modificação nas variáveis. Esse fato se apresenta com destaque nos picos 4 (condições 10, 17, 30 e 33), 5 (condição 17), 6 (condições 10, 18, 33 e 34), 11 (condição 33), 12 (condições 18 e 33), 14 (condição 18) e 15 (condições 18 e 33). Pode ser observado também que os picos 4, 6, 7, 11 e 16, incluindo o cultivo convencional, se repetem em todas as condições de cultivo. O aparecimento desses picos em todas as condições analisadas indica que essas substâncias são essenciais a sobrevivência de *B. bassiana* e que possivelmente sejam elas que contribuam para a micossíntese de nanopartículas de prata.

O comportamento de *B. bassiana* em relação a produção de metabólitos pode ser notado através das figuras 12, 13 e 15 que apresentam modificação no pH do meio aos quais o fungo foi submetido. Os 19 picos encontrados por CLAE, tabela 4, indicam que as condições selecionadas por meio do potencial de oxirredução podem favorecer a produção de metabólitos como aminoácidos, ácidos graxos e bases orgânicas como as aminas biogênicas. Os picos apresentados pelas condições 10, 18, 30 e 34 possivelmente representam aminoácidos e ácidos graxos, pois durante o cultivo o meio tornou-se mais ácido. Estudos realizados por Luo et al. (2013), onde investigaram o perfil metabólico de micélios e conídios de *B. bassiana* por cromatografia líquida com espectrometria de massas (LC-MS), identificaram metabólitos como ácido pirúvico, ácido palmítico e ácido linoleico.

Ragavendran et al. (2017), detectaram a presença de metabólitos secundários de *B. bassiana* através de análises como cromatografia gasosa-espectrofotometria de massa (GC-MS) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Foram identificados ácido n-hexadecanoico, ácido (Z,Z)-9,12-octadecadienoico, ácido octadecanoico e ácido oxálico. Esses dados confirmam os resultados apresentados pelo potencial de oxirredução e pH, onde os metabólitos produzidos por *B. bassiana* modificaram o meio tornando-o mais ácido, indicando que o fungo estudado quando nos meios testados tem tendência de produzir substâncias ácidas.

Com relação aos picos detectados nas condições 17 e 33 sugere-se que tais condições

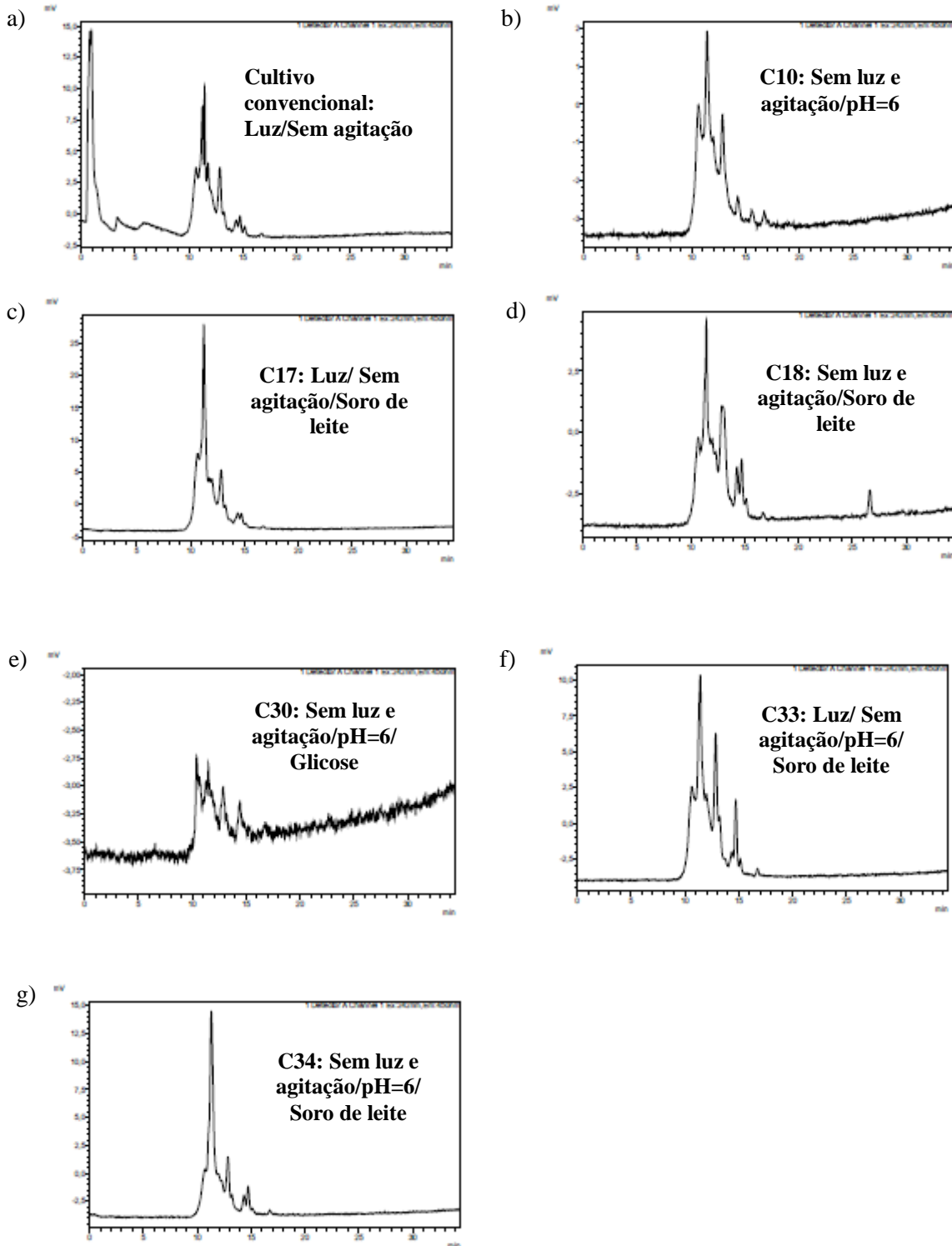
também favoreçam a produção de metabólitos como aminoácidos e ácidos graxos e bases orgânicas como as aminas biogênicas, pois durante o cultivo o meio se acidificou e em seguida reduziu sua acidez. Liu et al. (2015) realizaram um estudo sobre o crescimento e o metabolismo de esporos e micélios de *B. bassiana*. Para o estudo o fungo foi cultivado em meio clássico, BDA, e as análises foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência com espectrometria de massas (HPLC-MS), nesse estudo também foram detectados alguns metabólitos como ácido piroglutâmico, ácido glutâmico e ácido fosfatídico. A literatura também relata a produção de aminas biogênicas tanto em soro de leite como em outros diversos alimentos, essas aminas são formadas principalmente por descarboxilação microbiana de aminoácidos e transaminação de aldeídos e cetonas (PINTADO et al.,2008).

Tabela 4 - Determinação das áreas cromatográficas dos metabólitos detectados por CLAE em amostras dos lavados dos micélios selecionados para micossíntese de nanopartículas de prata

Pico	Tempo de retenção (min.)	Conc. (%): C. conv.	Conc. (%) Micélio: condição 10	Conc. (%) Micélio: condição 17	Conc. (%) Micélio: condição 18	Conc. (%) Micélio: condição 30	Conc. (%) Micélio: condição 33	Conc. (%) Micélio: condição 34
1	0,806	18,002	-	-	-	-	-	-
2	0,958	19,199	-	-	-	-	-	-
3	3,356	0,864	-	-	-	-	-	-
4	10,654	11,058	26,884	19,042	13,936	20,288	18,374	11,922
5	11,247	14,318	4,103	42,200	1,593	13,174	-	-
6	11,454	7,674	32,149	4,963	29,874	3,402	34,069	54,677
7	11,778	12,669	1,611	10,185	8,000	9,707	13,435	7,103
8	11,900	-	9,674	-	-	2,846	-	-
9	12,389	-	2,953	-	5,339	10,167	-	1,311
10	12,542	-	0,629	0,825	-	3,748	-	3,862
11	12,864	8,221	16,288	11,777	12,491	10,71	16,059	10,530
12	13,245	1,949	-	3,901	10,996	-	5,877	2,335
13	13,776	0,268	-	1,276	0,782	-	0,896	-
14	14,373	1,397	1,939	2,946	5,551	-	2,306	2,620
15	14,737	1,216	1,185	1,927	5,041	-	5,896	3,634
16	15,153	0,521	1,003	0,474	1,603	1,714	1,136	0,549
17	16,670	-	-	-	0,199	9,740	-	-
18	16,727	0,350	-	0,219	0,234	1,670	0,589	0,735
19	26,627	-	-	-	2,315	2,290	-	-

C. conv. – Cultivo convencional; Conc. – Concentração; min. – minutos. Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 16 – Perfil cromatográfico das substâncias produzidas por *B. bassiana* em amostras dos lavados dos micélios selecionados para micossíntese de nanopartículas de prata. Cromatogramas obtidos no comprimento de onda de 242 nm. Filtrados de micélios: a) Cultivo convencional; b) Condição 10; c) Condição 17; d) Condição 18; e) Condição 30; f) Condição 33 e g) Condição 34.



Fonte: Elaborada pelo autor.

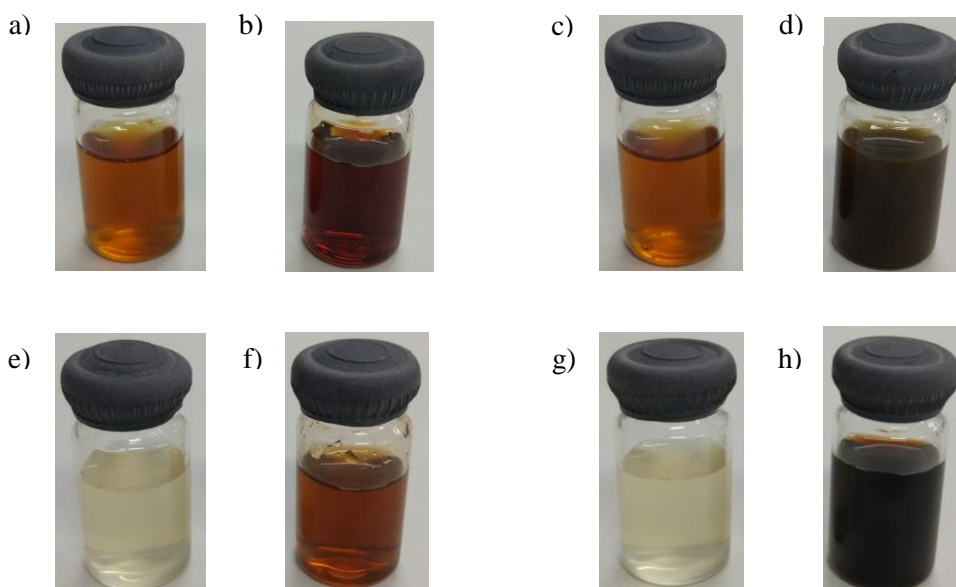
5.3 Micossíntese de nanopartículas de prata

5.3.1 Caracterização de NPsAg na forma de suspensão coloidal

Para a realização da micossíntese foram testados 32 métodos de síntese, pois nas condições com agitação não houve formação de micélio, assim não foram obtidos filtrados do micélio (F2) nessas condições. A formação de nanopartículas de prata pôde ser observada através da mudança de coloração. No início da reação a solução de AgNO_3 e filtrado apresenta cor amarelo escuro, filtrado 1, e amarelo pálido, filtrado 2. A reação é observada com a mudança nas colorações para castanho claro ou escuro, que indicam a formação de nanopartículas de prata, como podemos observar na figura 17.

Esses resultados também foram observados por Banu; Balasubramanian (2014), Prabakaran et al. (2016) e Kamil et al. (2017), eles relataram a mudança de coloração da reação de amarelo pálido para marrom, indicando a formação de NPsAg. De acordo com Link e El-Sayed (2003) e Ibrahim (2015), a mudança na coloração deve-se à excitação da superfície de ressonância plasmônica. A origem física da forte absorção de luz por nanopartículas de metais nobres é a oscilação coerente de elétrons da banda de condução induzida por interação com o campo eletromagnético. Quando à frequência do campo eletromagnético se torna ressonante com o movimento dos elétrons, uma forte absorção dos elétrons ocorre e resulta na cor observada.

Figura 17 - Micossíntese de NPsAg a partir das condições selecionadas. Em a) Filtrado 1 em pH natural; b) NPsAg; c) Filtrado 1 em pH 9,5; d) NPsAg; e) Filtrado 2 em pH natural; f) NPsAg; g) Filtrado 2 em pH 9,5 e h) NPsAg.



Fonte: Elaborada pelo autor.

A obtenção das nanopartículas de prata foi identificada através do aparecimento de bandas de absorção na região do UV-Vis, que ocorreram entre 350 – 485 nm, com absorção máxima entre 407 – 437 nm (Figura 15). A intensidade da banda de SPR e a sua posição são dependentes das condições experimentais utilizadas para a síntese (Lopes, 2017). De acordo com Jeong; Park (2014), as NPsAg apresentam uma intrínseca absorção SPR na região UV-Visível, com uma banda ao redor de 400 nm. A banda em torno de 400 nm é atribuída à densidade eletrônica de superfície (banda plasmônica). O alargamento das bandas de SPR ocorreu possivelmente pela agregação ou presença de nanopartículas com tamanhos variados.

Pode-se também visualizar na figura 15 o aparecimento de uma banda em aproximadamente 252 nm, presente em NP10, NP17, NP34 e NP35, com a formação de um ombro no espectro UV-Visível. Segundo Lopes (2017) essa banda pode ser atribuída ao modo vibracional quadrupolar, comumente notado em nanopartículas de prata assimétricas. No entanto, o aparecimento dessas bandas também pode ser associado a componentes secretados pelo fungo. Em um trabalho realizado por Bhainsa e D'Souza (2006), a ocorrência de dois picos de absorbância na faixa UV correspondentes a 220 e 280 nm foi relacionada a presença de amida e proteína. O pico 220 nm pode ser em consequência à absorção pela ligação amida e 280 nm pode ser causado por resíduos de triptofano e tirosina presentes na proteína. Essas substâncias proteicas podem estar envolvidas na redução e aumento da estabilidade das nanopartículas formadas.

Os resultados obtidos corroboram com os trabalhos realizados por Prabakaran et al. (2016), Banu; Balasubramanian (2014) e Joseph et al. (2012), onde observaram uma banda de absorção de plasmon de superfície característica a 420 nm. Em um estudo realizado por Qamandar; Shafeeq (2017) as NPsAg obtidas com o uso de *B. bassiana* como agente redutor mostrou através de análise de espectroscopia UV-VIS uma banda de absorção característica a 420 nm, que pode ser atribuída à presença de nanopartículas Ag⁰ devido as bandas de SPR.

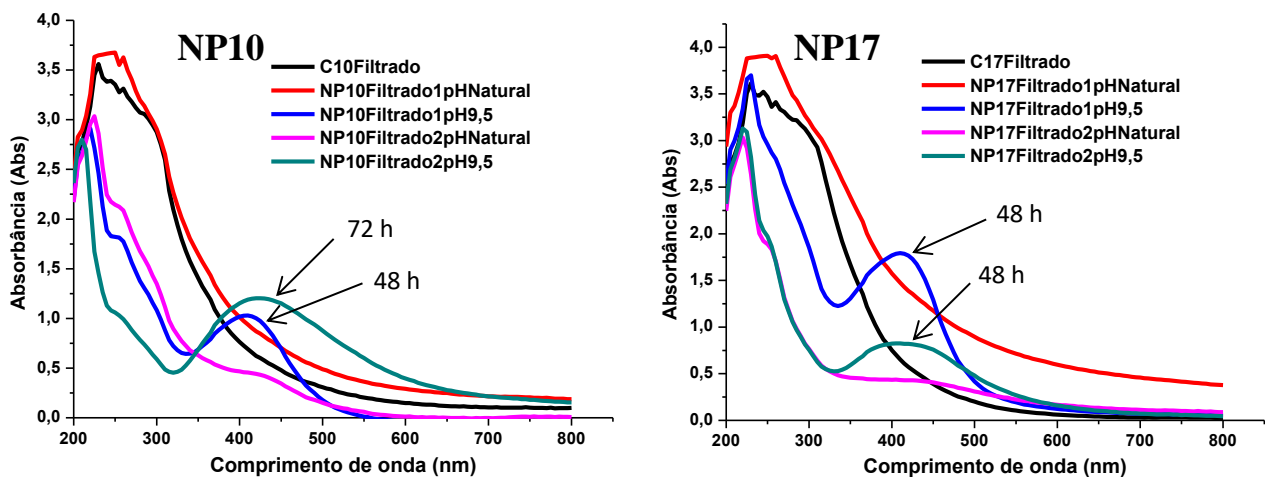
A análise por DLS das NPs avaliou o tamanho das partículas em suspensão. O diâmetro hidrodinâmico (DH) das NPs apresentou perfil bimodal para as NP10 (filtrado 1, pH= 9,5), NP17 (filtrado 1 e 2, pH= 9,5), NP18 (filtrado 1, pH= 9,5 e filtrado 2, pH natural), NP30 (filtrado 1 e 2, pH= 9,5), NP20 (filtrado 1, pH= 9,5) e NP35 (filtrado 1, pH natural), e polimodais para condições NP10 (filtrado 2, pH= 9,5), NP18 (filtrado 2, pH= 9,5), NP33 (filtrado 1, pH= 9,5), NP34 (filtrado 2, pH natural e 9,5), NP19 (filtrado 1, pH= 9,5), NP35 (filtrado 1, pH= 9,5) e NP36 (Filtrado 1, pH natural), ou seja, existe mais de uma população

de partículas presentes na amostra.

Os índices de polidispersividade (PDI) obtidos para as NPs produzidas foram de 0,316 – 0,830. Segundo Bonatto; Silva (2014) as NPsAg formadas por vias de síntese biológica geralmente possuem um PDI moderado, ou seja, uma monodispersividade moderada das NPsAg obtidas, variando de 0,3 a 0,5 (BONATTO; SILVA, 2014). Desta forma, em meio as 17 condições de micossíntese, 12 formaram NPsAg que demonstraram monodispersividade moderada. A importância em obter NPs monodispersas está atribuída à uniformidade das propriedades físicoquímicas das NPs do sistema em dispersão coloidal, o que permite a correlação direta das propriedades das NPs do sistema obtido com as propriedades das NPs individuais (SUGIMOTO, 1987). Dessa forma, quanto menor a dispersividade, maior a homogeneidade das propriedades da amostra obtida.

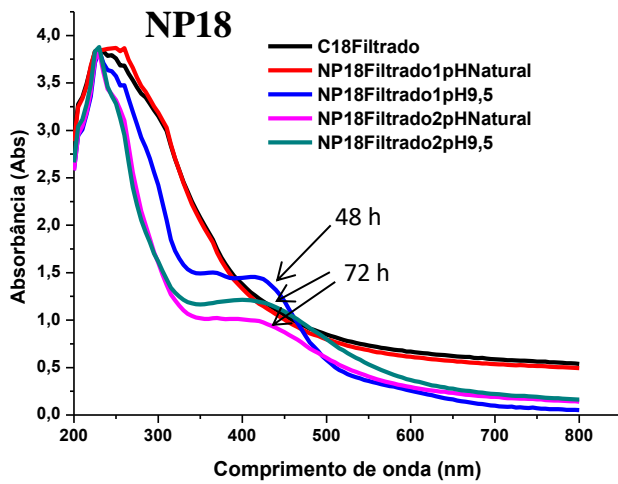
As NPsAg obtidas através 17 condições de micossíntese apresentaram valores do potencial Zeta de superfície entre - 14 e - 31 mV. As NPs NP10 (filtrado 2, pH= 9,5), NP18 (filtrado 2, pH natural), NP20 (filtrado 1, pH= 9,5), NP33 (filtrado 1, pH= 9,5) e NP34 (filtrado 2, pH natural e 9,5) apresentaram os maiores potenciais Zeta de superfície (em módulo) dentre as amostras selecionadas, indicativo de maior estabilidade coloidal dentre as condições testadas, as outras condições apresentaram os menores valores de potencial Zeta de superfície (em módulo), indicativo de menor estabilidade coloidal.

Figura 18 - Espectros UV-Vis de NPsAg. Dados obtidos por DLS do raio hidrodinâmico (Rh) das partículas, PDI e potencial Zeta de superfície referentes às NPsAg sintetizadas com *B. bassiana* encontram-se juntos ao seu respectivo gráfico

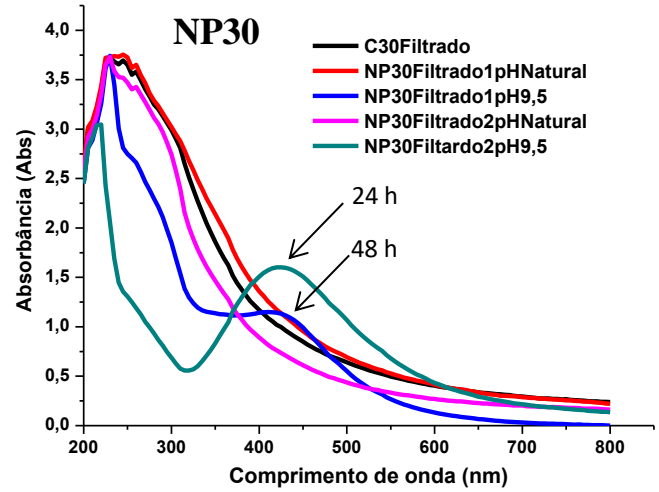


	Rh	PDI	Potencial Zeta
NP10Filtrado 1 pH nat. (4,1)	--	--	--
NP10Filtrado 1 (pH= 9,5)	47 nm	0,368	- 22
NP10Filtrado 2 pH nat. (5,5)	--	--	--
NP10Filtrado 2 (pH= 9,5)	110 nm	0,461	- 31

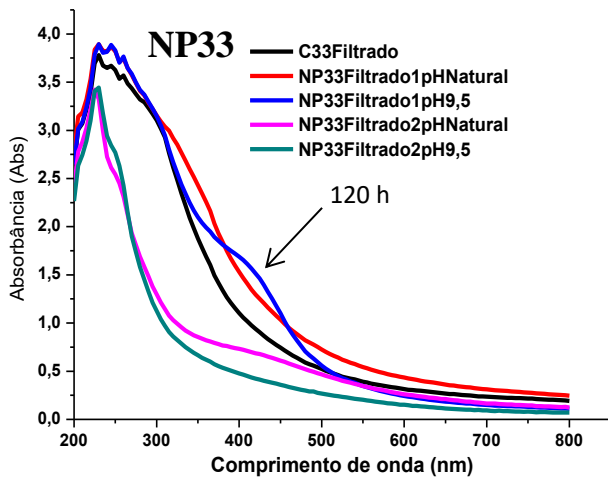
	Rh	PDI	Potencial Zeta
NP17Filtrado 1 pH nat. (4,2)	--	--	--
NP17Filtrado 1 (pH= 9,5)	43 nm	0,345	- 20
NP17Filtrado 2 pH nat. (5,9)	--	--	--
NP17Filtrado 2 (pH= 9,5)	41 nm	0,316	- 19



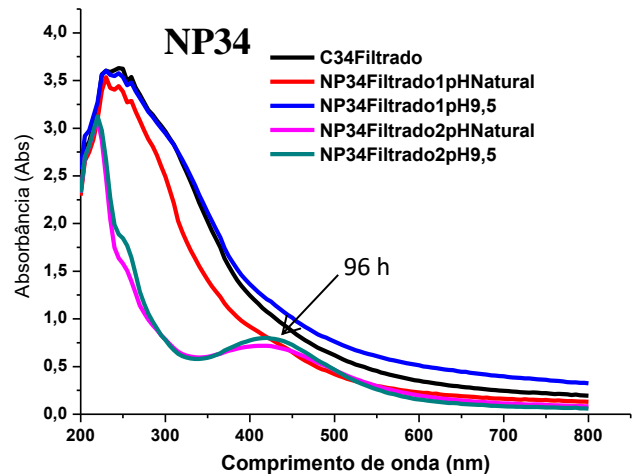
	Rh	PDI	Potencial Zeta
NP18Filtrado 1 pH nat. (3,5)	--	--	--
NP18Filtrado 1 (pH= 9,5)	32 nm	0,603	- 21
NP18Filtrado 2 pH nat. (6,5)	93 nm	0,397	- 28
NP18Filtrado 2 (pH= 9,5)	68 nm	0,537	- 23



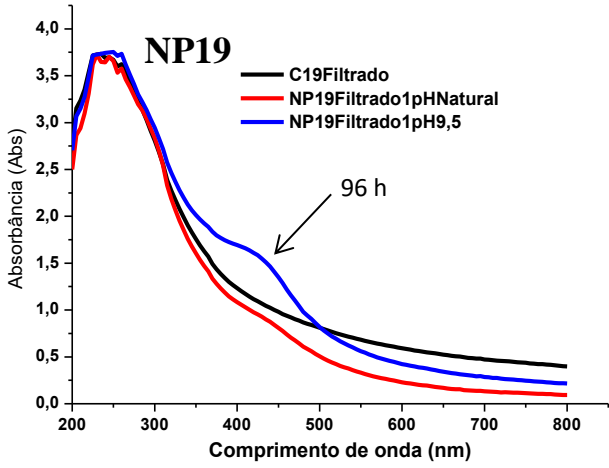
	Rh	PDI	Potencial Zeta
NP30Filtrado 1 pH nat. (3,4)	--	--	--
NP30Filtrado 1 (pH= 9,5)	147 nm	0,414	- 22
NP30Filtrado 2 pH nat. (5,1)	--	--	--
NP30Filtrado 2 (pH= 9,5)	78 nm	0,332	- 21



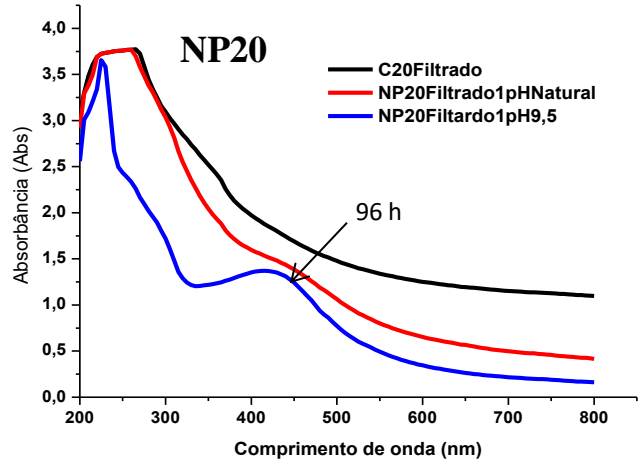
	Rh	PDI	Potencial Zeta
NP33Filtrado 1 pH nat. (4,8)	--	--	--
NP33Filtrado 1 (pH= 9,5)	452 nm	0,508	- 25
NP33Filtrado 2 pH nat. (5,7)	--	--	--
NP33Filtrado 2 (pH= 9,5)	--	--	--



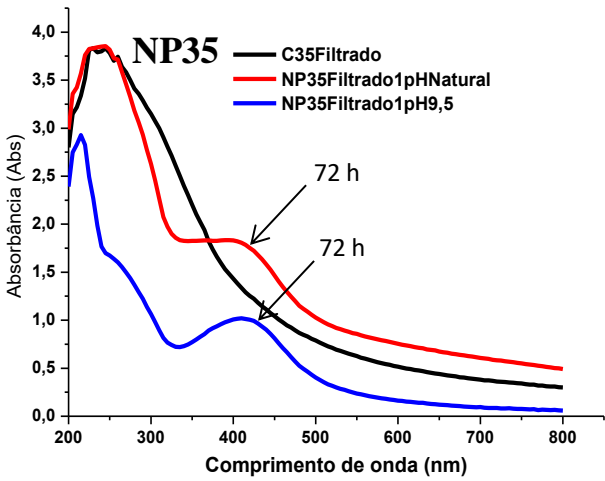
	Rh	PDI	Potencial Zeta
NP34Filtrado 1 pH nat. (3,9)	--	--	--
NP34Filtrado 1 (pH= 9,5)	--	--	--
NP34Filtrado 2 pH nat. (5,5)	378 nm	0,655	- 25
NP34Filtrado 2 (pH= 9,5)	135 nm	0,830	- 25



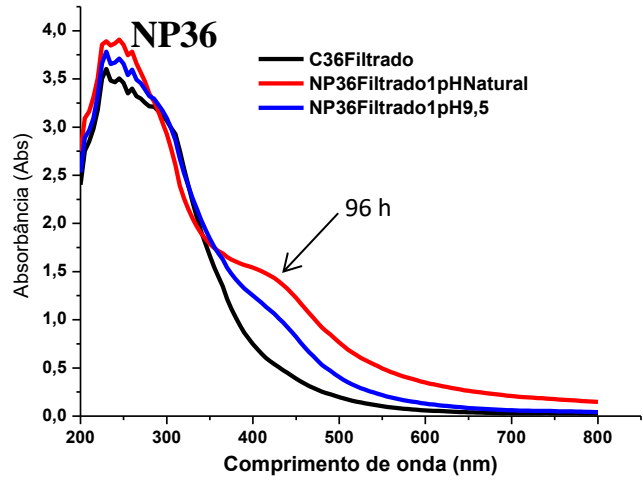
	Rh	PDI	Potencial Zeta
NP19Filtrado 1 pH nat. (4,2)	--	--	--
NP19Filtrado 1 (pH= 9,5)	290 nm	0,390	- 18
NP19Filtrado 2 pH nat. (--)	--	--	--
NP19Filtrado 2 (--)	--	--	--



	Rh	PDI	Potencial Zeta
NP20Filtrado 1 pH nat. (4,4)	--	--	--
NP20Filtrado 1 (pH= 9,5)	37nm	0,439	- 25
NP20Filtrado 2 pH nat. (--)	--	--	--
NP20Filtrado 2 (--)	--	--	--



	Rh	PDI	Potencial Zeta
NP35Filtrado 1 pH nat. (6,4)	136 nm	0,465	-14
NP35Filtrado 1 (pH= 9,5)	123 nm	0,415	- 17
NP35Filtrado 2 pH nat. (--)	--	--	--
NP35Filtrado 2 (--)	--	--	--



	Rh	PDI	Potencial Zeta
NP36Filtrado 1 pH nat. (4,2)	127 nm	0,360	- 20
NP36Filtrado 1 (pH= 9,5)	--	--	--
NP36Filtrado 2 pH nat. (--)	--	--	--
NP36Filtrado 2 (--)	--	--	--

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 5 - Resultados obtidos por DLS do raio hidrodinâmico (Rh) das partículas, PDI e potencial Zeta de superfície referentes às NPsAg sintetizadas com *B. bassiana*

		Tamanho hidrodinâmico	PDI	Potencial Zeta
NP10	F1, pH 9,5	47 nm	0,368	- 22 mV
	F2, pH 9,5	110 nm	0,461	- 31 mV
NP17	F1, pH 9,5	43 nm	0,345	- 20 mV
	F2, pH 9,5	41 nm	0,316	- 19 mV
NP18	F1, pH 9,5	32 nm	0,603	- 21 mV
	F2, pH nat.	93 nm	0,397	- 28 mV
	F2, pH 9,5	68 nm	0,537	- 23 mV
NP19	F1, pH 9,5	290 nm	0,390	- 18 mV
NP20	F1, pH 9,5	37 nm	0,439	- 25 mV
NP30	F1, pH 9,5	147 nm	0,414	- 22 mV
	F2, pH 9,5	78 nm	0,332	- 21 mV
NP33	F1, pH 9,5	452 nm	0,508	- 25 mV
	F2, pH nat.	378 nm	0,655	- 25 mV
NP34	F2, pH 9,5	135 nm	0,830	- 25 mV
NP35	F1, pH nat.	136 nm	0,465	- 14 mV
	F1, pH 9,5	123 nm	0,415	- 17 mV
NP36	F1, pH nat.	127 nm	0,360	- 20 mV

DLS - Espalhamento de Luz Dinâmico; PDI - Índice de polidispersividade; NPsAg - Nanopartícula de prata; NP - Nanopartícula; F1 - Filtrado 1; F2 - Filtrado 2; nm - nanômetro; mV - Milivolts. Fonte: Elaborada pelo autor.

De acordo com Bonatto; Silva (2014), devido o uso de um agente redutor natural é admissível os valores de PDI e potencial Zeta estarem diferentes do que é considerado como ótimo na literatura, < 0,3 e - 30 mV, respectivamente. A partir dos resultados obtidos, as condições NP10 e NP18 foram consideradas as melhores condições de micossíntese, pois produziram NPsAg com índice de polidispersão moderado e estáveis. NP10 com PDI (0,461) e potencial Zeta (- 31 mV) e NP18 com PDI (0,397) e potencial Zeta (- 28 mV).

5 CONCLUSÃO

As condições de cultivo que apresentaram maior capacidade de redução da prata foram 10, 17, 18, 19, 20, 30, 33, 34, 35 e 36. A luminosidade e a agitação não foram fatores determinantes para a redução do ORP, contudo a condição C10 em pH ajustado conseguiu reduzir ORP. Dos nutrientes utilizados o soro de leite favoreceu a obtenção de potencial de oxirredução negativo.

Os resultados cromatográficos dos 6 filtrados miceliais apresentaram um total de 19 metabólitos. Dentre estes, 5 novas substâncias foram produzidas pelas condições avaliadas e 15 apresentaram aumento na concentração, as quais são sugestivas de aminoácidos, ácidos graxos e aminas biogênicas.

Das 32 condições de micossíntese testadas 17 possibilitaram a formação de NPsAg. Em 13 dessas micossínteses foi necessário o ajuste de pH, 9,5, para que as NPsAg fossem formadas. A condição 18 apresentou menor tamanho de partícula (filtrado 1, pH 9,5, 32 nm). Já a condição 10 apresentou a melhor estabilidade (filtrado 2, pH 9,5, potencial Zeta - 31).

Assim, concluímos que a *B. bassiana* foi capaz de produzir diferentes substâncias frente às condições de cultivo selecionadas as quais possibilitaram a síntese de NPsAg, sendo consideradas as melhores condições de micossíntese NP10 e NP18.

Perspectivas:

- Realizar caracterização do material sólido através de Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), Difração de Raios X (DRX) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) para comparar com a literatura e demonstrar vantagens e desvantagens das condições selecionadas;
- Avaliar atividade antimicrobiana de NPsAg obtidas a partir das melhores condições de síntese selecionadas.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, A. et al. Extra-/Intracellular Biosynthesis of Gold Nanoparticles by an Alkalotolerant Fungus, *Trichothecium* sp. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v.1, n.1, p. 47 – 53, 2005.
- ALBERNAZ, V. L. **Síntese verde de nanopartículas de prata com extrato aquoso de folhas de *Brosimum gaudichaudii*, caracterização físicoquímica, morfológica e suas aplicações no desenvolvimento de um nanobiossensor eletroquímico**. 2014. 122 F. Dissertação (Mestrado em Nanociência e Nanobiotecnologia) – Universidade de Brasília, Brasília, 2014.
- ALMEIDA, A. F. **Síntese de nanopartículas de prata por fungos endofíticos isolados de guaranazeiro e o efeito contra fitopatógenos**. 2019. 111 F. Tese (Doutorado em Agronomia Tropical) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2019.
- ALVES, S. B. et al. Delayed Germination of *Beauveria bassiana* Conidia after Prolonged Storage at Low, Above-freezing Temperatures. **Biocontrol Science and Technology**, v. 6, n. 4, p. 575 - 581, 1996.
- ANDRIOLI, W. J. **Otimização das condições de cultivo de *Beauveria bassiana* e Mycoleptodiscus indicus visando à produção de metabólitos com atividade antimicrobiana, antiparasitária e antitumoral**. 2012. 252 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.
- BAHAINSA, 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.
- BANU, A. N.; BALASUBRAMANIAN, C. Myco-synthesis of silver nanoparticles using *Beauveria bassiana* against dengue vector, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Parasitol Res**, v. 113, n. 8, p. 2869 – 2877, 2014.
- BHAINSA, K. C; SOUZA, S. F. D. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Aspergillus fumigatus*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, V. 47, n. 2, p. 160 – 4, 2006.
- BLACKMAN, J. Metallic nanoparticles. **Elsevier**, Amsterdã, v. 5, n. 1, 2008.
- BONATTO, C. C.; SILVA, L. P. Higher temperatures speed up the growth and control the size and optoelectrical properties of silver nanoparticles greenly synthesized by cashew nutshells. **Industrial Crops and Products**, v. 58, p. 46 - 54, 2014.
- BOOMSMA, J. J. et al. Evolutionary interaction networks of insect pathogenic fungi. **Annual Rev Entomol**, v. 59, p. 467 – 485, 2014.
- BOTTAN, R. et al. Síntese e Caracterização de Nanocompósitos Esfoliados de Poliestireno – Hidróxido Duplo Lamelar Via Polimerização *In Situ*. **Polímeros**. v. 21, n. 1, p. 1 - 10, 2011.
- BOWMAN, S.M.; FREE, S.J. The structure and synthesis of the fungal cell wall. **Bioessays**, v. 28, n. 8, p. 799-808, 2006.
- CARREIRA, C. D. M. **Avaliação *in vitro* do controle microbiano e da neutralização de**

endotoxinas presentes em canais radiculares por nanopartículas de prata. Tese (Doutorado em Ciências Odontológicas) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

CHAN, Y.S.; MASHITAH, M.D. Instantaneous biosynthesis of silver nanoparticles by selected macro-fungi. **Australian Journal Basic and Applied Sciences**, v. 6, n. 1 p. 86 - 88, 2012.

DENDISOVÁ, M. et al. The use of infrared spectroscopic techniques to characterize nanomaterials and nanostructures: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 1031, p. 1 – 14, 2018.

DIPANKAR, C; MURUGAN, S. The green synthesis, characterization and evaluation of the biological activities of silver nanoparticles synthesized from *Iresine herbstii* leaf aqueous extracts. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 98, n. 1, p. 112 - 119, 2012.

DURÁN, A.; NOMBELA, C. Fungal cell-wall biogenesis: building a dynamic interface with the environment. **Microbiology**, v. 150, p. 3099 - 3103, 2004.

DURÁN, N. et al. Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 3, n. 8, 2005.

DURÁN, N. et al. Antibacterial Effect of Silver Nanoparticles Produced by Fungal Process on Textile Fabrics and Their Effluent Treatment. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 3, n. 2, p. 203 – 208, 2007.

DURÁN, N. et al. Silver nanoparticles: a new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. **Nanomedicine**, v. 12, n. 3, p. 789 - 799, 2016.

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

FARKAS, V. Biosynthesis of Cell Walls of Fungi. **Microbiological Reviews**, v. 43, n. 2, p. 117 – 144, 1979.

FRANCI, G A. et al. Silver nanoparticles as potential antibacterial agents. **Molecules**, v. 20, n. 5, p. 8856 – 8874, 2015.

GARCIA, M. A. Surface plasmons in metallic nanoparticles: fundamentals and applications. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 44, n. 44, p. 1 – 20, 2011.

GHOLAMI-SHABANI, M. H. et al. Evaluation of the antibacterial properties of silver nanoparticles synthesized with *Fusarium oxysporum* and *Escherichia coli*. **International Journal of Life Sciences Biotechnology and Pharma Research**, v. 2, n. 1, p. 333 – 348, 2013.

GHORBANI, H. R. et al. Biological and Non-biological Methods for Silver Nanoparticles Synthesis. **Chemical Biochemical Engineering Q**, v. 25, n. 3, p. 317 - 326, 2011.

GORUP, L. F. **Nanopartículas coloidais de ouro e prata e sua funcionalização com Dibutil-dicalcogenatos.** 2010. 142 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 2010.

HAIDER, M. J.; MEHDI, M. S. Study of morphology and Zeta Potencial analyzer for the Silver Nanoparticles. **International Journal of Scientific & Engineering Research**, v. 5, n. 7, 2014.

HEMATH, N. K.S. et al. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the filamentous fungus *Penicillium* sp. **Archives of Applied Science Research**, v. 2, n. 6, p. 161-167, 2010.

HOLLER, F. J. et al. Princípios de análise instrumental. Tradução de Celio Pasquini; Jarbas José Rodrigues Rohwedder; Ivo Milton Raimundo Jr.; Solange Cadore e Isabel Cristina Sales Fontes Jardim. 6. ed. – Porto Alegre: Bookman. 1056 p. ISBN 978-85-7780-460-3, 2009.

HONARY, S. et al. Green synthesis of silver nanoparticles induced by the fungus *Penicillium citrinum*. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 1, p. 7-11, 2013.

HORIKOSHI, S.; SERPONE, N. Introduction to Nanoparticles. **Microwaves in Nanoparticle Synthesis**. v. 1. n. 1, 2013.

Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/9783527648122.ch1>. Acesso em: 07 de janeiro de 2019.

IBRAHIM, H. M. M. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using banana peel extract and their antimicrobial activity against representative microorganisms. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 8, p. 265 – 275, 2015.

INGLE, A. et al. Mycosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium acuminatum* and its activity against some human pathogenic bacteria. **Current Nanoscience**, v. 4, p. 141-144, 2008.

ISKANDAROV, U. S. et al. Effects of Nutrient Medium Composition and Temperature on the Germination of Conidia and the Entomopathogenic Activity of the Fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 42, n. 1, 2006.

JEEVANANDAM, J. et al. Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations. **Beilstein J. Nanotechnol**, v. 9, p. 1050 – 1074, 2018.

JEONG, L.; PARK, W.H. Preparation and characterization of gelatina nanofibers containing silver nanoparticles. **International Journal of Molecular Sciences**, v.15, p. 6857-6879, 2014.

JOSEPH, E. et al. Protection of metal artifacts with the formation of metal–oxalates complexes by *Beauveria bassiana*. **Original Research Article**, v. 2, n. 270, 2012.

KAMIL, D. et al. Green synthesis of silver nanoparticles by entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* and their biofficacy against mustard aphid (*Lipaphis erysimi* Kalt.). **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 55, p. 555 – 561, 2017.

KARTHIKEYAN, A. et al. Effect of different media and pH on the growth of *Beauveria bassiana* and its parasitism on leaf eating caterpillars. **Research Journal of Agriculture and Biological Sciences**, v. 4, n. 2, p. 117-119, 2008.

KELLY, K. L. et al. The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric. **Journal of Physical Chemistry**, v.107, n. 3, p. 668 - 677, 2003.

- KLAUS, T. et al. Silver-based crystalline nanoparticles, microbially fabricated. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 96, n. 24, p. 13611 – 13614, 1999.
- LENARDÃO, E.J. et al. “Green Chemistry” – Os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. **Química Nova**, v. 26, n.1, p. 123 - 129, 2003.
- LI, G. et al. Fungus mediated green synthesis of silver nanoparticles using *Aspergillus terreus*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 1, p. 466 – 476, 2012.
- LI, H. et al. Potential of *Beauveria bassiana* for control of *Apriona germari*. **Frontiers of Agriculture in China**. v.5, n.4, p.666 - 670, 2011.
- LINK, S.; EL-SAYED, M.A. Optical properties and ultrafast dynamics of metallic nanocrystals. *Annual Review of Physical Chemistry*, v.54, p. 331-366, 2003.
- LIU, H. et al. Growth and metabolism of *Beauveria bassiana* spores and mycelia. *BMC Microbiol.*, v. 15, n. 267, 2015.
- LOPES, J. R. **Síntese de nanopartículas de prata (NpsAg) em soluções aquosas de fibroína de seda e gelatina**. 2017. 115 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica, na Área de Materiais e Processos de Fabricação) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2017.
- LOURO, H. et al. Nanomateriais manufacturados: novos desafios para a saúde pública. **Rev. Port. Saúde Pública**, Lisboa, v. 31, n. 2, p. 188 – 200, 2013.
- LUO, F. et al. Metabolic Effect of an Exogenous Gene on Transgenic *Beauveria bassiana* Using Liquid Chromatography–Mass Spectrometry–Based Metabolomics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 28, 2013.
- LUO, Z. et al. Bbmsn2 acts as a pH-dependent negative regulator of secondary metabolite production in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Environ Microbiol.**, v. 17, n. 4, 2014.
- MEHRA, R. K.; WINGE, D. R. Metal ion resistance in fungi: molecular mechanisms and their regulated expression. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 45, n. 1, p. 30 – 40, 1991.
- MELO, M. A. et al. Preparação de nanopartículas de prata e ouro: um método simples para a introdução da nanociência em laboratório de ensino. **Quim. Nova**, v. 35, n. 9, p. 1872 - 1878, 2012.
- MITTAL, A. K. et al. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 2, p. 346 – 356, 2013.
- MOHANPURIA, P. et al. Biosynthesis of nanoparticles: technological concepts and future applications. **Technology and Applications**, v. 10, n. 3, p. 507 – 517, 2008.
- MOORES, A; GOETTMANN, F. The plasmon band in noble metal nanoparticles: an introduction to theory and applications. **New Journal of Chemistry**, v. 30, p. 1121 – 1132, 2006.

MUKHERJEE, P. et al. Bioreduction of AuCl₄ - ions by the fungus *Verticillium* sp. and surface trapping of the gold nanoparticles formed. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 40, p. 3585 – 3588, 2001.

MUKHERJEE, P. et al. Green synthesis of highly stabilized nanocrystalline silver particles by a non-pathogenic and agriculturally important fungus *T. asperellum*. **Nanotechnology**, v. 19, n. 7, p. 103 – 110, 2008.

NANDA, A.; MAJEED, S. (2014) Enhanced antibacterial efficacy of biosynthesized AgNPs from *Penicillium glabrum* (MTCC1985) pooled with different drugs. **International Journal of PharmTech Research**, v. 6, n. 1, p. 217 – 223, 2014.

NARENDAR, S.; S.GOPALAKRISHNAN, S. Nonlocal scale effects on ultrasonic wave characteristics of nanorods. **Physica E**, v. 42, p. 1601–1604, 2010.

OLIVEIRA, J. F. A. **Funcionalização de nanopartículas de prata com antibióticos β-Lactâmicos: uma alternativa para a resistência bacteriana**. 2014. 174 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2014.

PACIONI, N.L. et al. Synthetic routes for the preparation of silver nanoparticles: A Mechanistic Perspective. **Springer International Publishing Switzerland**, p.13 – 46, 2015.

PETRII, O. A. Electrosynthesis of nanostructures and nanomaterials. **Russian Chemical Reviews**, v. 84, n. 2, p. 159 - 193, 2015.

PHAM, T. A. et al. Production of Blastospore of Entomopathogenic *Beauveria bassiana* in a Submerged Batch Culture. **The Korean Society of Mycology**, v. 37, n. 3, p. 218 - 224, 2009.

PRABAKARAN, K. et al. Mycosynthesis of silver nanoparticles from *Beauveria bassiana* and its larvicidal, antibacterial, and cytotoxic effect on human cervical câncer (HeLa) cells, **The Royal Society of Chemistry**, v. 6, p. 44972 – 44986, 2016.

PINTADO, A. I. E. et al. Microbiological, biochemical and biogenic amine profiles of Terrincho cheese manufactured in several dairy farms. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 631 – 640, 2008.

QAMANDAR, M. A.; SHAFEEQ, M. A. A. Biosynthesis and Properties of Silver Nanoparticles of Fungus *Beauveria bassiana*. **International Journal of ChemTech Research**, v. 10, n. 9, p. 1073 – 1083, 2017.

RAGAVENDRAN, C. et al. *Beauveria bassiana* (Clavicipitaceae): a potent fungal agent for controlling mosquito vectors of *Anopheles stephensi*, *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **The Royal Society of Chemistry**, v. 7, n. 7, p. 3838 – 3851, 2017.

RAO, Y. K. et al. Enhanced production of an extracellular protease from *Beauveria bassiana* by optimization of cultivation processes. **Biochemical Engineering Journal**, v. 28, p. 57 – 66, 2006.

RASTOGI, L.; ARUNACHALAM, J. Sunlight based irradiation strategy for rapid green synthesis of highly stable silver nanoparticles using aqueous garlic (*Allium sativum*) extract and their antibacterial potential. **Materials Chemistry and Physics**, v. 129, n. 1 – 2, p. 558 –

563, 2011.

RHIM, J.-W. et al. Preparation and characterization of chitosan-based nanocomposite films with antimicrobial activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 16, p. 5814 - 5822, 2006.

ROCHA, R. R. **Química verde: síntese de nanopartículas de prata utilizando extratos vegetais**. 2010. 47 f. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

RÓZ, A. L. et al. Nanoestruturas: Princípios e aplicações. **Elsevier**, Rio de Janeiro, v. 3, n. 1, 2015.

RODRIGUES, L. H. “**Análise de metabólitos secundários em culturas de *Pestalotiopsis* sp e *Arpergillus aculeatus***”. 2006. 111f. Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 2006.

RUSTIGUEL, C. B. Different strategies to kill the host presented by *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 64, n. 3, p. 191-200, 2017.

SAHNI, G. et al. A novel thermal decomposition approach to synthesize hydroxyapatite–silver nanocomposites and their antibacterial action against GFP expressing antibiotic resistant *E. coli*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 103, p. 441 - 447, 2013.

SANPUI, P. et al. The antibacterial properties of a novel chitosan–Ag-nanoparticle composite. **International Journal of Food Microbiology**, v. 124, p. 142-146, 2008.

SANTORO, P. H. et al. *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Spores production in biphasic process utilizing different liquid media. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 26, n. 3, p. 313 – 320, 2005.

SASTRY, M. et al. Biosynthesis of metal nanoparticles using fungi and actinomycete. **Research Account**, v. 85, n. 2, 2003.

SHARMA, V. K. et al. Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities, **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 145, p. 83 – 96, 2009.

SHUKLA, V. K. et al. Green synthesis of nanosilver as a sensor for detection of hydrogen peroxide in water. **Journal of Hazardous Materials**, v. 213, p. 16 – 166, 2012.

SIGNORI, A.M et al. Formation of Catalytic Silver Nanoparticles Supported on Branched Polyethyleneimine Derivatives. **Langmuir**, v. 26, n. 22, p. 17772 - 17779, 2010.

SINHA, S. et al. Nanoparticles fabrication using ambient biological Resources. **Journal of Applied Biosciences**, v. 19, p. 1113 – 1130, 2009.

SONAI, G. G. **Preparação e caracterização de nanopartículas de Prata em meio aquoso e orgânico, com impregnação em borrachas de silicone contendo trans-[RuCl₂(vpy)₄] para fins antimicrobiano**. 2008. 61 F. Relatório de disciplina (Bacharelado em Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

SONI, N; PRAKASH, S. Microbial synthesis of spherical nanosilver and nanogold for mosquito control. **Ann Microbiol**, v. 64, p. 1099 – 1111, 2014.

STRASSER, H. et al. Are there any risks in using entomopathogenic fungi for pest control,

with particular reference to the bioactive metabolites of *Metarhizium*, *Tolypocladium* and *Beauveria* species? **Biocontrol Science and Technology**, v. 10, n. 6, p. 717 – 735, 2000.

SUGIMOTO, T. Preparation of monodispersed colloidal particles. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 28, p. 65 - 108, 1987.

TAKAHASHI, J. A.; LUCAS, E. M. F. Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica. **Quim. Nova**, v. 31, n. 7, p. 1807 - 1813, 2008.

TAKAHASHI, S. et al. Pyridovericin and pyridomacrolidin: novel metabolites from entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana*. **Journal of antibiotics**, v. 51, n.6, p. 596 – 598, 1998.

VAHABI, K. et al. Biosynthesis of silver nanoparticles by fungus *Trichoderma reesei*. **Insciences Journal**, v. 1, n. 1, p. 65 – 79, 2011.

VALA, A.K. et al. Biogenesis of silver nanoparticles by marine derived fungus *Aspergillus flavus* from Bhavnagar coast, gulf of Khambat, India. **Journal of Marine Biology & Oceanography**, v. 3, n. 1, p. 1 - 3, 2014.

WANG, Q.; XU, L. Beauvericin, a Bioactive Compound Produced by Fungi: A Short Review. **Molecules**, v. 17, p. 367 – 2377, 2012.

ZHANG, Y. X. Et al. Biosynthesis of gold nanoparticles using chloroplasts. **International Journal of Nanomedicine**, v. 6, p. 2899 – 2906, 2011.

ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 17, n. 6, p. 553 – 596, 2007.

RAI, M. Nanobiotecnologia verde: biossínteses de nanopartículas metálicas e suas aplicações como nanoantimicrobianos. **Cienc. Cult.** v. 65, n. 3, p. 44 – 48, 2013.