

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**PRIMEIRO RELATO DA BIOSÍNTESE EXTRACELULAR DE
NANOPARTÍCULAS DE PRATA DO FUNGO NEMATÓFAGO *Duddingtonia*
*flagrans***

LARYSSA PINHEIRO COSTA SILVA

VILA VELHA
FEVEREIRO / 2017

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**PRIMEIRO RELATO DA BIOSÍNTESE EXTRACELULAR DE
NANOPARTÍCULAS DE PRATA DO FUNGO NEMATÓFAGO *Duddingtonia*
*flagrans***

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

LARYSSA PINHEIRO COSTA SILVA

VILA VELHA
FEVEREIRO / 2017

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UUV-ES

S586p

Silva, Laryssa Pinheiro Costa.

Primeiro relato da biossíntese extracelular de nanopartículas de prata do fungo nematófago *Duddingtonia flagrans* / Laryssa Pinheiro Costa Silva. – 2017.

37 f.: il.

Orientador: Fábio Ribeiro Braga .

Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Vila Velha, 2017.

Inclui bibliografias.

1. Fungos 2. Sistemas biológicos. I. Braga, Fábio Ribeiro. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 579.9

LARYSSA PINHEIRO COSTA SILVA

**PRIMEIRO RELATO DA BIOSÍNTESE EXTRACELULAR DE
NANOPARTÍCULAS DE PRATA DO FUNGO NEMATÓFAGO *Duddingtonia
flagrans***

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 20 de fevereiro, 2017,

Banca Examinadora:

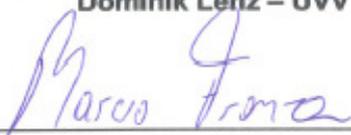
Banca Examinadora:



Jairo Pinto de Oliveira – UFES



Dominik Lenz – UVV



Márcio Fronza – UVV

x 

Fábio Ribeiro Braga – UVV
Orientador

A Deus e aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que me ajudaram a realizar este trabalho.

Ao Prof^o Dr^o Tadeu Uggere de Andrade, pela oportunidade de fazer parte da família UVV; ao Prof. Dr^o Fábio Ribeiro Braga, por me orientar e receber de braços abertos em sua equipe de pesquisa; ao Prof^o Dr^o Marco Cesar C. Guimarães e Dr^o Jairo P. de Oliveira, da Universidade Federal do Espírito Santo-UFES, por compartilharem conhecimentos científicos importantes que fizeram diferença neste trabalho; as equipes dos laboratórios de parasitologia da UVV, LUCCAR e LabPetro que me acolheram com muito carinho.

Aos amigos que foram essenciais nesta caminhada, que compartilharam medos, alegrias e expectativas.

À minha família, que por diversas vezes tiveram que compreender a minha ausência. Ao meu pai, José Ronaldo Pinheiro Costa, ainda que apenas em minhas doces lembranças fez se presente, com suas frases motivadoras e seu exemplo de fé e caráter. À minha mãe, Audestina Patrícia da Silva Costa, pelo amor, incentivo e apoio incondicional.

Por fim, gostaria de agradecer a Deus, pois Ele colocou as pessoas certas no momento certo da minha vida, além de sempre ter me dado força necessária para prosseguir nesta caminhada.

A todos,
Muito obrigado!

SUMÁRIO

RESUMO.....	xiii
ABSTRACT	ix
1. Introdução	10
2.Revisão Bibliográfica.....	12
2.1 Nanopartículas (NP's)	12
2.1.1 Nanopartículas de prata (AgNP's)	12
2.1.2 Síntese das AgNP's	13
2.1.2.1 Síntese química AgNP's.....	13
2.1.2.2 Síntese biológica AgNP's	13
2.1.3 Caracterização das NP's	15
2.1.3.1 Espectroscopia UV-Visível	15
2.1.3.2 Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	15
2.1.3.3 Espalhamento de luz dinâmico (DLS)	15
2.1.3.4 Espectroscopia de infravermelhos transformada de Fourier (FTIR).....	16
2.1.3.5 Espalhamento Raman	16
2.1.4 Aplicações das NP's metálicas, biossintetizada a partir de fungos	16
2.2 Fungos nematófagos.....	17
3. Materiais e métodos	19
3.1.Obtenção do filtrado fúngico.....	19
3.2. Análise do filtrado fúngico – Teor de proteínas	19
3.3. Biossíntese das AgNP's a partir do filtrado fúngico	19
3.4. Caracterização das AgNP's.....	20
4. Resultados e discussão.....	23
5. Conclusão	31
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32

RESUMO

SILVA, LARYSSA PINHEIRO COSTA, M.Sc, Universidade Vila Velha – ES, fevereiro de 2017. **Primeiro relato da biossíntese extracelular de nanopartículas de prata do fungo nematófago *Duddingtonia flagrans***. Orientador: Fábio Ribeiro Braga.

A biossíntese de nanopartículas metálicas, utilizando sistemas biológicos como fungos, tem evoluído para se tornar uma importante área da nanobiotecnologia. Neste estudo, relatamos pela primeira vez a síntese extracelular de nanopartículas de prata (AgNP's) altamente estáveis utilizando o fungo nematófago *Duddingtonia flagrans* (AC001). O fungo foi cultivado em um meio líquido pobre em nutrientes e enriquecido com uma fonte natural de quitina e incubado a 25 ° C durante 10 dias sob agitação orbital (120 rpm). O filtrado isento de células fúngicas foi utilizado para sintetizar as AgNP's na presença de uma solução de AgNO₃ 1 mM. A formação e estabilidade das nanopartículas foram analisadas a partir dos estudos de espectroscopia UV-Visível e espalhamento de luz dinâmico (DLS). Para obter medidas quantitativas das partículas, distribuição de tamanhos e morfologia das AgNP's, imagens por microscopia eletrônica de transmissão (MET) foram realizadas. O método de Bradford e técnicas espectroscópicas (UV-Visível, Infravermelho acoplada de Fourier - FTIR, espalhamento Raman) foram aplicadas para entender quais moléculas estariam envolvidas na formação destas nanopartículas. Os resultados obtidos indicaram que as AgNP's biossintetizadas são estáveis e principalmente de forma esférica. O tamanho das AgNP's foi afetado pela concentração do filtrado fúngico utilizado na síntese coloidal, sendo a solução menos concentrada do filtrado (1:100) com maior quantidade de partículas menores. Além disso, observou-se que possivelmente a quitinase estaria envolvida no processo de formação e estabilização das AgNP's através do revestimento das partículas. Os nanomateriais sintetizados neste trabalho são candidatos promissores para aplicações terapêuticas, tais como no combate a helmintos parasitos gastrointestinais nocivos à saúde humana e animal, uma vez que as AgNP's biossintetizadas e funcionalizadas apresentaram boa estabilidade e alto rendimento. AgNP's podem apresentar propriedades antibacterianas, antifúngicas, antivirais, anti-inflamatórias e anti-câncer; sendo portanto uma estratégia promissora para o aplicações terapêuticas o que potencializa novos delineamentos experimentais utilizando o fungo *D. flagrans* para a síntese destas nanopartículas.

Palavras chaves: nanopartículas, fungos nematófagos, biossíntese, terapia coadjuvante.

ABSTRACT

SILVA, LARYSSA PINHEIRO COSTA, M.Sc, University of Vila Velha – ES, february 2017. **First report of the extracellular biosynthesis of silver nanoparticles of nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans*.** Advisor: Fábio Ribeiro Braga.

The biosynthesis of metallic nanoparticles, using biological systems such as fungi, has evolved to become an important area of nanobiotechnology. In this study, we report for the first time the extracellular synthesis of highly stable silver nanoparticles (AgNPs) using the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* (AC001). The fungus was cultivated in a nutrient-poor liquid medium enriched with a natural source of chitin, and incubated at 25°C for 10 days under orbital agitation (120 rpm). The fungal cell-free filtrate was used to synthesize the AgNPs in the presence of a 1 mM AgNO₃ solution. The formation and stability of the nanoparticles was analyzed using UV-Visible spectroscopy and dynamic light scattering (DLS). To obtain quantitative measurements of the particles, size distribution and morphology of AgNP, images by transmission electron microscopy (TEM) were performed. The Bradford method and spectroscopic techniques (UV-Visible, Fourier Coupled Infrared - FTIR, Raman scattering) were used to understand which molecules are involved in the formation of the nanoparticles. The results indicated that AgNPs biosynthesized are stable and mainly spherical. The AgNPs size was affected by the concentration of the fungal filtrate used in colloidal synthesis, being a less concentrated solution of the filtrate (1:100) with more of smaller particles. In addition, it was observed that possibly a chitinase was possibly involved in the process of formation and stabilization of the AgNPs through the coating of the particles. The nanomaterials synthesized in this study promising candidates for therapeutic applications, such as in combatting gastrointestinal helminth parasites that are harmful to human and animal health, since as biosynthesized and functionalized AgNP's presented good stability and high yield. AgNPs may exhibit antibacterial, antifungal, anti-viral, anti-inflammatory and anti-cancer properties; they therefore represent a promising strategy for therapeutic applications, which potentiates new experimental designs involving the fungus *D. flagrans* for a synthesis of these nanoparticles.

Keywords: nanoparticles, nematophagous fungi, biosynthesis, adjuvant therapy.

1. INTRODUÇÃO

As nanopartículas de prata (AgNP's) têm sido intensamente estudadas, uma vez que demonstram amplo espectro de atividades antimicrobianas para bactérias (1), fungos (2) e vírus (3); pois penetram facilmente através das membranas celulares e prejudicam diretamente as funções dos componentes vitais dos microorganismos (4). Além disso, AgNP's também tem sido utilizadas para administrar fármacos, como antibióticos, ao local do processo patológico (*drug delivery*) (5).

Estruturas nanométricas metálicas já demonstraram ação tóxica em algumas células de mamíferos, uma vez que seu tamanho reduzido as permite atingir mitocôndrias e núcleos celulares, danificando estruturas do DNA (6; 7; 8). A utilização combinada de nanopartículas metálicas com antibióticos reduz a toxicidade de ambos os agentes em relação às células humanas, pois melhora sinergicamente as suas atividades antimicrobianas e assim diminui a necessidade de dosagens elevadas de prata e antibiótico(5).

Vários métodos físicos e químicos foram adotados para síntese de nanopartículas metálicas. Entretanto, produtos e subprodutos químicos, prejudiciais à saúde, são produzidos durante estes processos de síntese, como: amônia e aerossol metálico (2, 9, 10).

Métodos biológicos para a síntese de nanopartículas (NP's) surgiram como uma opção simples, rápida, não tóxica e reprodutível, uma vez que podem produzir partículas de tamanho e morfologia bem definidos em condições otimizadas (10). Microrganismos (bactérias, leveduras e fungos) são utilizados na síntese de NP's metálicas, pois são capazes de agregar material inorgânico dentro ou fora da célula, além de produzirem bio-extratos, que na síntese podem atuar como agente redutor de materiais inorgânicos e agente estabilizador (11, 14).

Duddingtonia flagrans é um fungo nematófago é considerado uma espécie adequada para o controle biológico de parasitos gastrintestinais, pois além da capacidade predatória e a produção de estruturas fúngicas de resistência, que garantem a propagação e sobrevivência destes organismos em condições ambientais, é inofensivo à saúde animal, humana e ao meio-ambiente (15,16). No

extrato bruto do *D. flagrans* é possível identificar enzimas extracelulares produzidas pelo próprio fungo, como proteases e quitinases, capazes de hidrolisar a cutícula do nematoide, facilitando a predação do parasito, ou seja, tem sua aplicabilidade da extensivamente estudada (17,18). Nesse sentido, Braga et al. (15,17) tem demonstrado que a utilização de metabólitos primários e secundários deste fungo pode ser mais explorada no contexto da nanobiotecnologia, sugerindo também o seu emprego na produção de NP's com vistas a uma aplicabilidade potencial. Essa "aplicabilidade" poderia ser potencializada no contexto do "ataque" ao organismo alvo de maneira coadjuvante, no caso os helmintos, justamente no seu habitat natural, o organismo humano e ou animal (19). Neste estudo, uma nova abordagem de aplicação destes organismos foi avaliada, envolvendo a biossíntese de AgNP's, uma vez que até o presente momento existem poucos relatos, sobre a utilização fungos nematófagos na síntese de NP's metálicas (20).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Nanopartículas (NP's)

Pesquisas envolvendo nanopartículas (NP's) são atualmente uma área de intensa investigação científica. Nos últimos 12 anos, de acordo com o banco de dados do pubMed, utilizando a palavra chave “*nanoparticles*”, o número de publicações científicas tem ocorrido de forma exponencial, no ano de 2004 foram 1.463 publicações e em 2016, 16.752 publicações. Isso ocorre devido a grande variedade de aplicações em diversos campos da ciência, como: eletrônica, ciências ambientais, biotecnologia, engenharia, biomedicina e agricultura (14, 21- 23).

A produção, manipulação e aplicação de partículas de nano-escala são áreas em crescimento na ciência e na tecnologia de hoje. Como consequência das suas dimensões que variam de 1 a 100 nanômetros (nm) de diâmetro, as NP's exibem propriedades óticas e eletrônicas únicas e podem ser facilmente sintetizadas a partir de diversas matérias-primas (24, 25), como: ouro (26), prata (27), zinco, magnésio e titânio (28, 29).

2.1.1 Nanopartículas de prata (AgNP's)

Dentre as várias NP's metálicas, as nanopartículas de prata (AgNP's) têm sido intensamente estudadas, pois além de suas propriedades físico-químicas como condutividade elétrica, comportamento óptico, estabilidade química e atividade catalítica, são também uma ferramenta terapêutica em potencial para o tratamento de diversas doenças, devido a sua atividade antiplasmodial, antibacteriana, antifúngica, antiviral e anticancerígena (9, 13, 30, 31).

A eficácia antimicrobiana destas NP's ocorre em razão seu tamanho reduzido e elevada área de superfície, permite que as NP's tenham uma maior área de contato com microrganismos. São capazes de afetar diferentes estruturas

bacterianas, podendo prejudicar algumas funções das membranas celulares, tais como permeabilidade e respiração (5).

2.1.2 Síntese das AgNP's

2.1.2.1 Síntese química AgNP's

A síntese de AgNP's é possível a partir de diversos métodos: químico, eletroquímico, radiação UV, campos ultra-sônicos, métodos fotoquímicos, tecnologias de aerossóis e técnicas biológicas. Sendo a síntese química a abordagem mais explorada para a criação de AgNP's (28). De acordo com Shipway *et al.* (24), a preparação química mais simples e comumente utilizada para a formação das NP's de metal é uma reação de redução em meio aquoso, em que o citrato de sódio ou borohidreto de sódio é utilizado como agente redutor. Entretanto, a obtenção de suspensões coloidais estáveis é uma das principais dificuldades na síntese de NP's metálicas, uma vez que estas possuem uma alta energia superficial, que favorece termodinamicamente a imediata agregação das nanoestruturas (32).

Para evitar este fenômeno é necessária a presença de agentes estabilizadores poliméricos, como: poli(vinilpirrolidona) (PVP), poli(álcool vinílico) (PVA) e ácido poliacrílico (PAA), que possuem sítios básicos de Lewis presentes em suas estruturas, conferindo assim alta afinidade pelas NP's. Esses agentes estabilizadores possuem cadeias orgânicas suficientemente compridas que criam um impedimento estérico, evitando interações entre as NP's (32).

As vantagens da síntese química de NP's são a facilidade de produção, baixo custo e alto rendimento; entretanto, produtos e subprodutos químicos, prejudiciais aos organismos vivos são produzidos, como: amônia e aerosol metálico (2, 10).

2.1.2.2 Síntese biológica AgNP's

Métodos biológicos têm surgido como opções viáveis para a síntese de NP's, dado a necessidade de uma técnica que supere as deficiências dos métodos químicos. A síntese biológica de NP's tem se demonstrado simples, rentável, confiável e ambientalmente correta. Utilizando vários sistemas biológicos, incluindo extratos de plantas, bactérias e fungos (33, 34, 13, 12, 35, 10).

A capacidade de fungos filamentosos de crescer em substratos pobres em nutrientes e de baixo custo, bem como a sua capacidade de produzir uma grande variedade de metabólitos comercialmente interessantes, tem atraído um interesse considerável para a utilização destes microrganismos na produção de NP's (14). Além disso, para a síntese em grande escala de NP's, estes fungos são os melhores agentes para a produção de biomassa, em comparação com as algas e bactérias, uma vez que o micélio fúngico pode suportar a pressão de fluxo, agitação, e outras condições nos biorreatores (12).

Os fungos filamentosos apresentam características importantes para a síntese das NP's, uma vez que podem produzir proteínas ou compostos orgânicos capazes de atuarem como agente redutor e agente estabilizador na síntese das NP's, eliminando a necessidade de etapas extras de revestimento para estabilização das NP's (11, 36).

A síntese biológica pode ocorrer via intracelular, quando o material inorgânico é reduzido dentro da célula, e/ou via extracelular, quando a redução ocorre fora da célula, por meio da ação da nitrato redutase ou transporte de elétrons por quinonas (naftoquinonas e antraquinonas) presentes no fungo (12,14).

A síntese intracelular permite um melhor controle sobre as distribuições de tamanho e forma das NP's, entretanto a purificação do produto é exaustiva e dispendiosa. Já a síntese extracelular é mais adaptável à diversas sínteses de NP's e seus produtos são mais fáceis de purificar, podendo ser utilizadas diretamente em várias aplicações (36).

Diferentes espécies de fungos revelaram-se promissoras para a produção tanto intracelular quanto extracelular de NP's metálicas, tais quais: *Aspergillus* sp., *Verticillium* sp., *Penicillium* sp., *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp. e cepas de leveduras (11,14).

A forma e tamanho das NP's biossintetizadas, fatores importantes para aplicações biomédicas, dependem diretamente das espécies biológicas envolvidas, entretanto, o tamanho e a taxa de formação podem ser manipulados pelo controle de parâmetros como: pH, temperatura, concentração, agitação e tempo de exposição ao metal (10,14).

2.1.3 Caracterização das AgNP's

Uma etapa muito importante é a caracterização das NP's formadas, visto que é necessário elucidar suas características quanto à estrutura, interações interpartículas e funcionalidade.

2.1.3.1 Espectroscopia UV-Visível

Nanopartículas de prata exibem forte absorção de ondas eletromagnéticas na faixa visível devido à ressonância plasmônica de superfície localizada (LSPR). LSPR é quando a frequência da luz visível incidida sobre a partícula é igual a frequência da onda gerada pela oscilação coletiva dos elétrons, após a irradiação dessa luz visível (36). O espectro de absorção óptica das nanopartículas metálicas é sensível a vários fatores, como tamanho, forma, interação partícula-partícula com o meio e índice de refração local (37). A cor da prata coloidal é atribuída ao LSPR específico, portanto, a monitorização da cinética da reação é realizada pela espectroscopia UV-Visível (36).

2.1.3.2 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) é uma técnica importante e frequentemente utilizada na a caracterização de nanomateriais, para obter medidas quantitativas de partículas, distribuição de tamanhos e morfologia (10).

2.1.3.3 Espalhamento de luz dinâmico (DLS)

O espalhamento de luz dinâmico (DLS) é capaz de determinar o tamanho da nanopartícula, considerando o núcleo metálico da NP e a nuvem de elétrons que a cerca, além de definir o potencial zeta que permite avaliar a estabilidade das NP's (26, 38).

Meléndrez et al. (39) relatam que o aumento da quantidade de nanopartículas em suspensão, reduz a distância entre as partículas. Isso permite que as forças atraentes prevaleçam sobre as forças repulsivas, que são responsáveis pela estabilidade coloidal. Estas forças atrativas diminuem o potencial zeta e a mobilidade eletroforética, permitindo assim a interação entre as NP's e consequente formação de agregados. Sendo assim, a estabilidade coloidal das AgNP's pode ser confirmada pela medição do potencial zeta para estimar a carga na superfície das NP's. Em geral, NP's com potencial zeta maior que +25 mV ou menor que -25 mV possuem repulsão eletrostática suficiente para permanecerem estáveis em solução (33).

2.1.3.4 Espectroscopia de infravermelhos transformada de Fourier (FTIR)

Espectroscopia de infravermelhos transformada de Fourier (FTIR) pode determinar a qualidade ou a consistência de uma amostra além de determinar a quantitativamente os componentes presentes na amostra. Esta técnica detecta a vibração das ligações químicas orgânicas presentes na superfície das nanopartículas, portanto, é utilizada para obter informações sobre os grupos funcionais com os quais as nanopartículas são estabilizadas (37).

2.1.3.5 Espalhamento Raman

O espalhamento Raman e o FTIR são técnicas complementares. Geralmente no (FTIR), as bandas de vibração NH₂ e N- H são fundamentais para elucidar o tipo de amina presente, enquanto que no espectro Raman as bandas vibratórias são muito úteis nos estudos conformacionais, para a determinação da estrutura secundária de moléculas biológicas (40).

2.1.4 Aplicações das NP's metálicas, biossintetizada a partir de fungos

AgNP's de fungo possuem significativas propriedades antibacterianas contra microrganismos patogênicos. Ninganagouda *et al.* (41) demonstraram que AgNP's produzidas por *Aspergillus niger* possuem propriedades antibacterianas que atuam

sobre as bactérias patogênicas por ancoragem à superfície da célula, onde perfuram a membrana celular, causando derrame dos componentes intracelulares e consequente morte do agente infeccioso. Simultaneamente, as AgNP's podem estimular a produção de ROS (espécies reativas de oxigênio), causando assim diferentes reações de oxidação em proteínas específicas da membrana ou no DNA, provocando dano celular (42).

Ainda que AgNP's sejam menos tóxicas para humanos e animais do que fungicidas sintéticos, o efeito antifúngico de AgNP's tem recebido menor atenção na comunidade científica, com apenas alguns artigos publicados (14). Fátima *et al.* (26) relatam uma atividade antifúngica moderada de AgNP's de *Bipolaris tetramera* contra *Aspergillus niger* e *Trichoderma* sp., por meio de lise celular, provocada pela formação de compostos insolúveis por inativação dos grupos sulfidríla na parede celular fúngica e perturbação de enzimas ligadas à membrana e aos lipídeos.

O primeiro estudo com o objetivo de explorar a atividade anti-helmíntica das NP's metálicas, derivadas de fungos fitopatogênicos, foi Kar *et al.* (37). Os autores utilizaram NP's de ouro biossintetizada a partir de *Nigrospora oryzae*, em cestóides (tênia), e verificaram mudanças na arquitetura tegumentar, causando mudanças de permeabilidade no tegumento do verme. Além disso, as NP's de ouro afetaram o funcionamento fisiológico normal do cestóide, causando paralisia e subsequente morte.

2.2 Fungos nematófagos

Fungos nematófagos são microfungos, que habitam o solo, capazes de capturar, matar e digerir nematóides. Eles usam estruturas especiais do micélio, chamadas de armadilhas, para capturar o parasito ou pontas de hifas para atacar ovos ou cistos dos nematoides. Em seguida eles iniciam a penetração na cutícula do nematóide, invasão e digestão. De acordo com Park *et al.* (43), existem cerca de 160 espécies de fungos nematófagos, inimigos naturais de nematóides.

Os fungos nematófagos são divididos em três grupos principais: fungos nematófagos que capturam nematóides de vida livre utilizando estruturas morfológicas especializadas (ou seja, armadilhas); fungos endoparasitas que

infectam nematóides utilizando esporos adesivos; e fungos de ovo e de cisto que infectam estes estágios parasitários com suas pontas de hifas (43).

A captura do verme é um meio de sustentação para os fungos e é importante para o equilíbrio ecológico no ambiente. Muitos dos nematóides visados por estes fungos são parasitas e podem infectar culturas ou pecuárias, causando um elevado impacto econômico. As opções disponíveis para a proteção contra estes organismos incluem antibióticos ou pesticidas, os quais têm efeitos secundários negativos; portanto, aproveitar as habilidades de um predador natural de nematóides pode fornecer um meio alternativo para combater este problema (44).

Duddingtonia flagrans é um fungo nematófago, considerado uma espécie promissora para o controle biológico de parasitos gastrintestinais; uma vez que produz estruturas fúngicas, conídios e clamidosporos, que garantem a propagação e sobrevivência destes organismos em condições ambientais; além de eficiente crescimento em condições de laboratório e, principalmente, capacidade predatória (15). No extrato bruto de *D. flagrans* é possível observar enzimas extracelulares produzidas pelo próprio fungo, como proteases e quitinases, capazes de hidrolisar a cutícula do nematoide; a penetração do fungo é, portanto facilitada, provocando assim a morte do parasito (15, 18).

O controle biológico de parasitos gastrointestinais por fungos nematófagos é uma opção viável. Contudo, neste estudo, uma nova abordagem de aplicação desses organismos será avaliada, envolvendo o desenvolvimento de um método biológico para a síntese de AgNP's utilizando o fungo *D. flagrans*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Obtenção do filtrado fúngico

Foi utilizado um isolado de *D. flagrans* (AC001), oriundo de solo brasileiro, do município de Viçosa na zona da mata de Minas Gerais, (latitude 20°45'20"S, longitude 42°52'40" W, a 649m do nível do mar). O fungo foi mantido em tubos de ensaio a 4°C contendo ágar ágar 2% (A.A 2%), protegido da luz por 10 dias.

Para preparar a biomassa para os estudos de biossíntese, micélios fúngicos foram obtidos através da transferência de discos de cultura (cerca de 5mm de diâmetro) dos isolados fúngicos mantidos em ágar ágar 2% (A.A 2%) para frascos erlenmeyers (250mL) contendo 200mL de meio líquido pobre em nutrientes (LNM), composto de: peptona bacteriológica, 2g/L; extrato de levedura, 3 g/L; fosfato bibásico de potássio, 0,1 g/L; sulfato de magnésio hexahidratado, 0,05 g/L; ácido láctico 85%, 100µL; pH=9.

Os frascos foram incubados em um agitador orbital (120 rpm) a 25°C. A biomassa formada foi retirada após 10 dias de crescimento com o auxílio de uma peneira inox previamente autoclavada, seguido de lavagem extensiva com água ultrapura para remover qualquer componente de meio da biomassa.

Duas condições reacionais foram testadas, a primeira contendo apenas 100mL de água ultrapura e 10 g (peso úmido) da biomassa (Filtrado 1) e a segunda enriquecida com 0,1g de cascas de carrapato, fonte natural de quitina, (Filtrado 2), ilustrado na Figura 2. Os frascos foram novamente incubados em um agitador orbital nas mesmas condições anteriormente citadas, durante 15 dias. Após a incubação, o filtrado celular foi obtido utilizando membranas 0,22µm.

3.2. Análise do filtrado fúngico – Teor de proteínas

Os dois filtrados fúngicos foram analisados quanto ao seu teor de proteínas totais (PT), por meio do método de Bradford, em triplicata.

O método de Bradford é um método colorimétrico para quantificação de proteínas, baseado no deslocamento da absorvância do corante Coomassie Brilliant Blue G-250.

Coomassie Brilliant Blue G-250 existe em duas formas de cores diferentes, vermelho e azul. A forma vermelha é convertida na forma azul após ligação do corante à proteína. Esta ligação provoca uma alteração na absorção máxima do corante de 465 para 595 nm. A intensidade de absorção em 595nm é relacionado com a quantidade de proteínas presentes na amostra (45).

Para a curva padrão utilizou-se Albumina sérica bovina (BSA) (98%, Sigma, Brasil) e as leituras foram realizadas no espectrofotômetro UV-Vis (Espectrofotômetro Spectramax 190) a 595 nm (Figura 1).

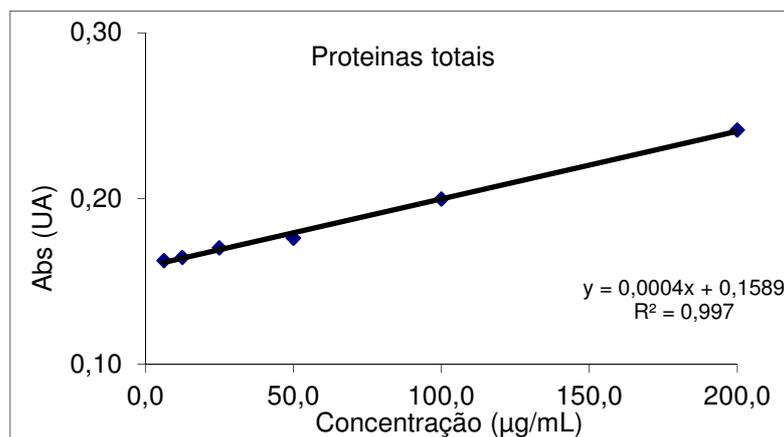


Figura 1. Gráfico da curva padrão realizada com Albumina sérica bovina (BSA) (98%, Sigma, Brasil).

3.3. Biossíntese das AgNP's a partir do filtrado fúngico

A fim de determinar a condição necessária para a formação das nanopartículas, os filtrados fúngicos 1 e 2, foram adicionados a 100 ml de solução de AgNO_3 1mM, em diferentes temperaturas (30 e 60 °C) e em diferentes pH (5 e 10), e mantidos em um agitador orbital a 120 rpm no escuro. A formação de nanopartículas de prata foi visualizada preliminarmente pela alteração na cor da solução, que foi ainda confirmada confirmada por espectroscopia UV-Vis.

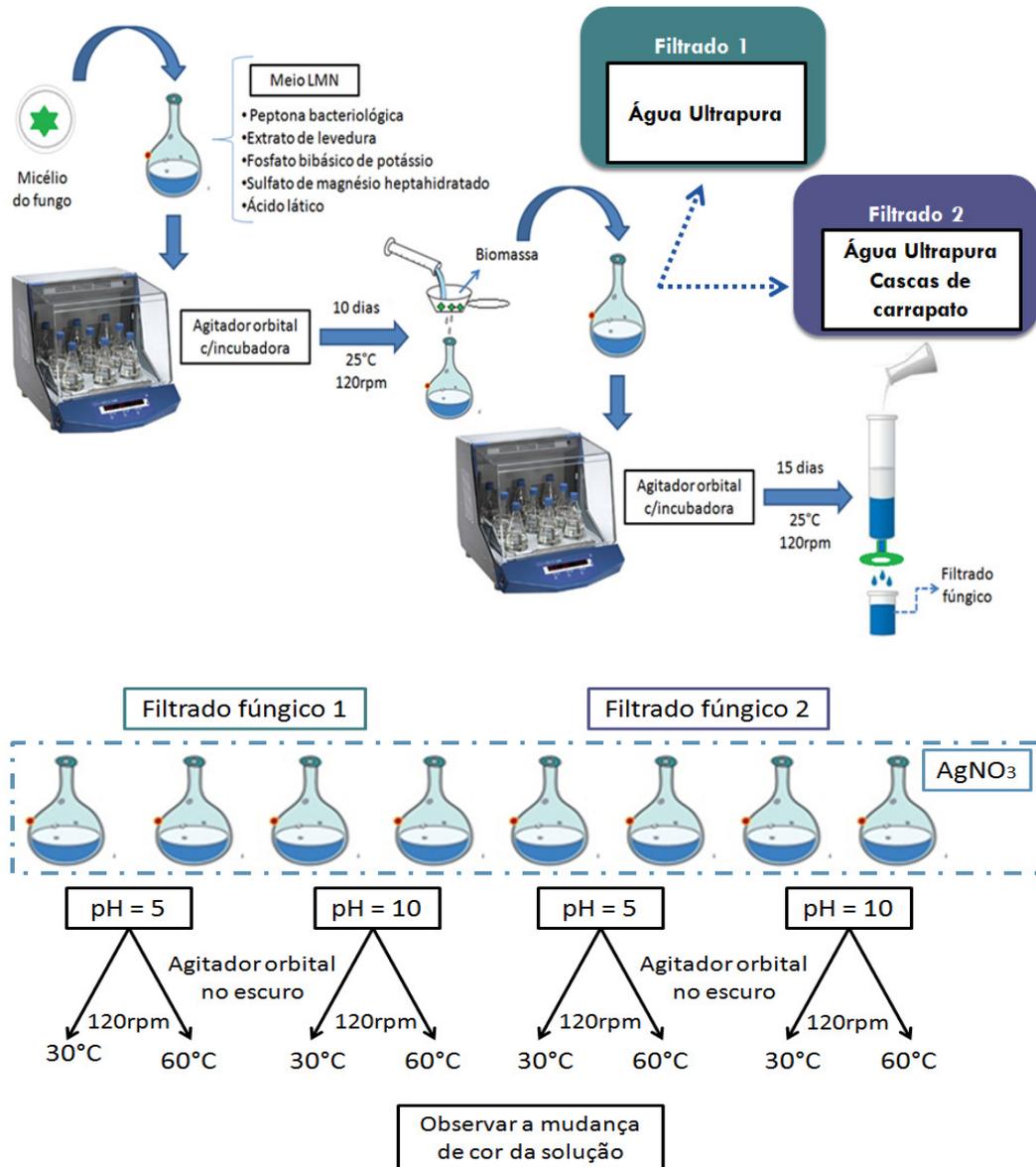


Figura 2. Processo de obtenção dos filtrados e biossíntese das AgNP's.

3.4. Caracterização das AgNP's

A confirmação da formação das AgNP's após a alteração de cor da solução e a determinação da ressonância de plasmônica de superfície localizada (LSPR) das AgNP's foi realizada pelo espectrofotômetro UV-Vis (Espectrofotômetro Spectramax 190) a 1 nm de resolução e varredura de 200 a 600nm. A morfologia das nanopartículas foi confirmada a partir de imagens obtidas pela Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). As AgNP's foram colocada sobre uma grade de cobre revestida com Formvar (Ted Pella Inc., EUA), e examinadas por MET

utilizando um microscópio da JEOL (JEOL, Inc., EUA), modelo JEM1400 operado a 120KV com filamento de hexaboreto de lantânio (LAB6).

O potencial zeta e a distribuição de tamanho das partículas e foram determinados utilizando o espalhamento dinâmico de luz (DLS) combinada com a interação de movimento browniano aleatório e o movimento de campo elétrico das suspensões de partículas (NPA152 Zetatrac, Microtrac Instruments, York, EUA).

O formato esférico das AgNP's foi determinada com base na razão de aspecto (Diâmetro maior / Diâmetro menor) utilizando os valores de diâmetros obtidos pelo software ImageJ 1.51i (n = 500 NP's). Para a análise da diferença de esfericidade das AgNP's sintetizadas em diferentes condições reacionais, foi aplicado a análise da variância ANOVA (BioEstat 5.3).

Após a síntese das AgNP's, as amostras foram centrifugadas a 15.000 rpm durante 30 min e o pellet formado foi utilizado para a análise de infravermelho acoplada a transformada de Fourier (FTIR). O FTIR foi realizado no modo ATR (FT-MIR FTLA 2000 Bomem) para investigar quais compostos orgânicos poderiam estar associados às AgNP's. As AgNPs foram caracterizadas por espalhamento Raman (Espectrômetro Raman Confocal ALPHA 300R) na região de 500-3000 cm^{-1} a uma comprimento de onda de 532 nm.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os microrganismos possuem um grande potencial para a produção de AgNP's para diversas aplicações. Este estudo demonstrou que é possível a biossíntese de AgNP's a partir de compostos secretados pelo fungo nematófago *D. flagrans*. Wang et al. (20) descreveram a possibilidade da formação natural de NP's a partir do fungo nematófago *Arthrobotrys oligospora* com "vistas" a aplicabilidade terapêutica como imunomodulador, entretanto, não foi descrita a presença de possíveis agentes redutores presentes no fungo ou em seu filtrado, capazes de reduzir metais, e conseqüentemente formar NP's metálicas. Neste trabalho, pela primeira vez, relatamos uma maneira biológica simples para a síntese de AgNP's extracelular utilizando um filtrado livre de células do fungo *D. flagrans*.

A quantidade de proteínas totais presente no filtrado fúngico, de acordo com os resultados obtidos pelo método de Bradford, foi influenciada pelo o tipo de meio no qual a biomassa foi mantida, uma vez que a concentração de proteínas totais do Filtrado 2 (PT= 0,62 mg/mL), foi cerca de 77% maior do que no Filtrado 1 (PT= 0,35 mg/mL), como pode se observado na Figura 3 A. Isso ocorre pois o fungo *D. flagrans* pode ser estimulado a produzir enzimas hidrolíticas como protease, pectinase, fosflipase e quitinase, conforme os constituintes do meio (18, 46, 47). Neste estudo, o meio foi enriquecido com uma fonte natural de quitina (casca do carrapato), com o objetivo de aumentar a produção de quitinase. Braga *et al.* (48), relataram que a quitinase produzida pelo fungo *D. flagrans* possui peso de 34kDa e atividade máxima em pH 8-10 a 60°C.

A cor da prata coloidal é atribuída ao LSPR (ressonância plasmônica de superfície localizada) específico, portanto a formação de nanopartículas foi estabelecida pela espectroscopia UV-Vis. Os resultados da Figura 3B e 3C, apontam que a condição necessária para esta síntese de AgNP's é pH 10 a 60°C, uma vez que apresentou um pico entre 380-450nm no UV-vis, faixa de comprimento de onda característico da LSPR de AgNP's (41). A princípio a formação das nanopartículas foi observada devido a alteração da cor da solução, que passou a ser marrom amarelada, 24h após a adição da solução de AgNO₃ ao filtrado fúngico. Dentre os dois filtrados utilizados na síntese, o que apresentou melhor espectro das NP's, foi o filtrado da biomassa mantida em meio eriquecido com quitina (Figura 3, C).

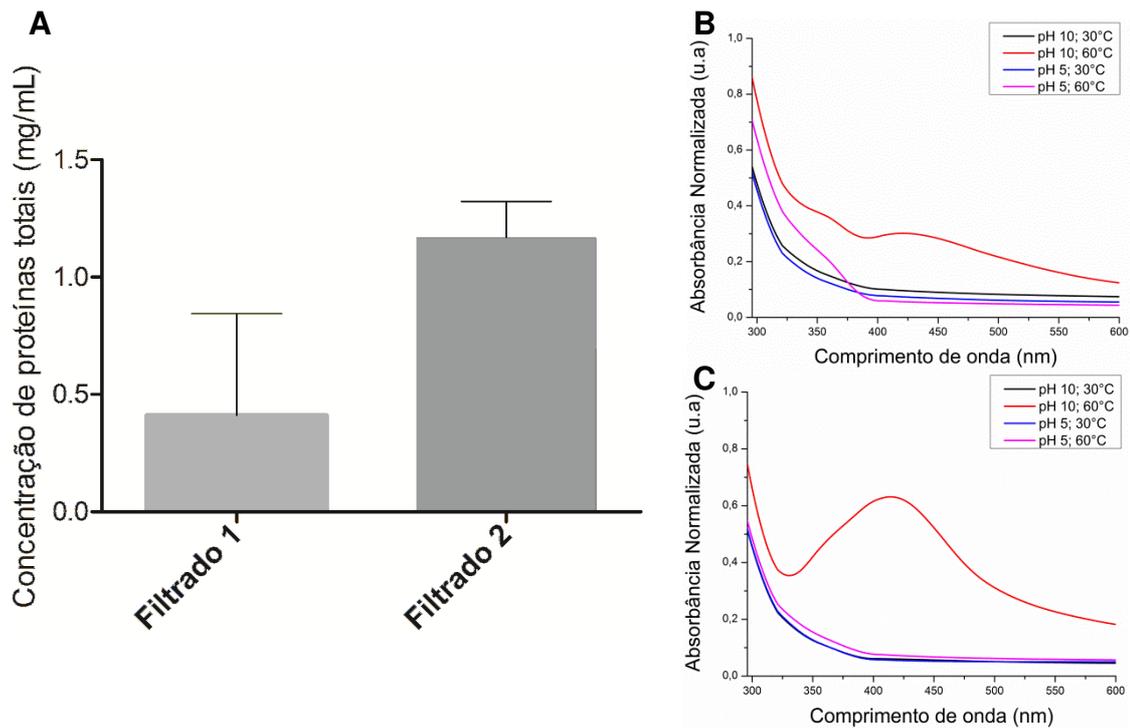


Figura 3. **A)** Concentração de proteínas totais presente no filtrado fúngico obtido a partir da biomassa mantida em água ultrapura sem quitina (Filtrado 1) e água ultrapura enriquecida com quitina (Filtrado 2). **B e C)** Absorção óptica (UV-Vis) da solução 1:100, após 24h, com variação de pH e temperatura nos Filtrados 1 e 2, (respectivamente).

A fim de determinar a melhor condição para a síntese das NP's, foi estudado três misturas reacionais, 1:100, 1:50 e 1:25 (filtrado fúngico : sol. AgNO_3 1mM). Estas soluções foram monitoradas nos intervalos de tempo 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20 e 30 dias, utilizando espectroscopia UV-Visível. As AgNP's sintetizadas mostraram a média do pico máximo de absorbância em 414, 406 e 413 nm para as soluções 1:100, 1:50 e 1:25, respectivamente, e o rendimento foi analisado durante 30 dias (Figura 4, A-C) . A intensidade do pico no UV-Visível é diretamente proporcional ao rendimento da síntese das NP's, sendo assim, na Figura 4 D foi possível observar que o melhor rendimento das soluções 1:100 é em 20 dias, 1:50 em 1 dia e 1:25 em 30 dias. A amostra 1:50, foi a que apresentou menor regularidade dos picos durante os 30 dias analisados, sugerindo assim uma variação quanto ao rendimento da reação (Figura 4, B).

Os valores de potencial zeta médio obtido para as amostras 1:100, 1:50 e 1:25 foram -49,205mV, -28,655mV e -61,935mV, respectivamente (Figura 4, E). Estes valores indicam uma boa estabilidade dos colóides; sendo a solução 1:25 a

mais estável, uma vez que apresentou o maior valor negativo do potencial zeta. Esta estabilidade pode estar atribuída à presença de proteínas fúngicas que funcionalizaram as NP's.

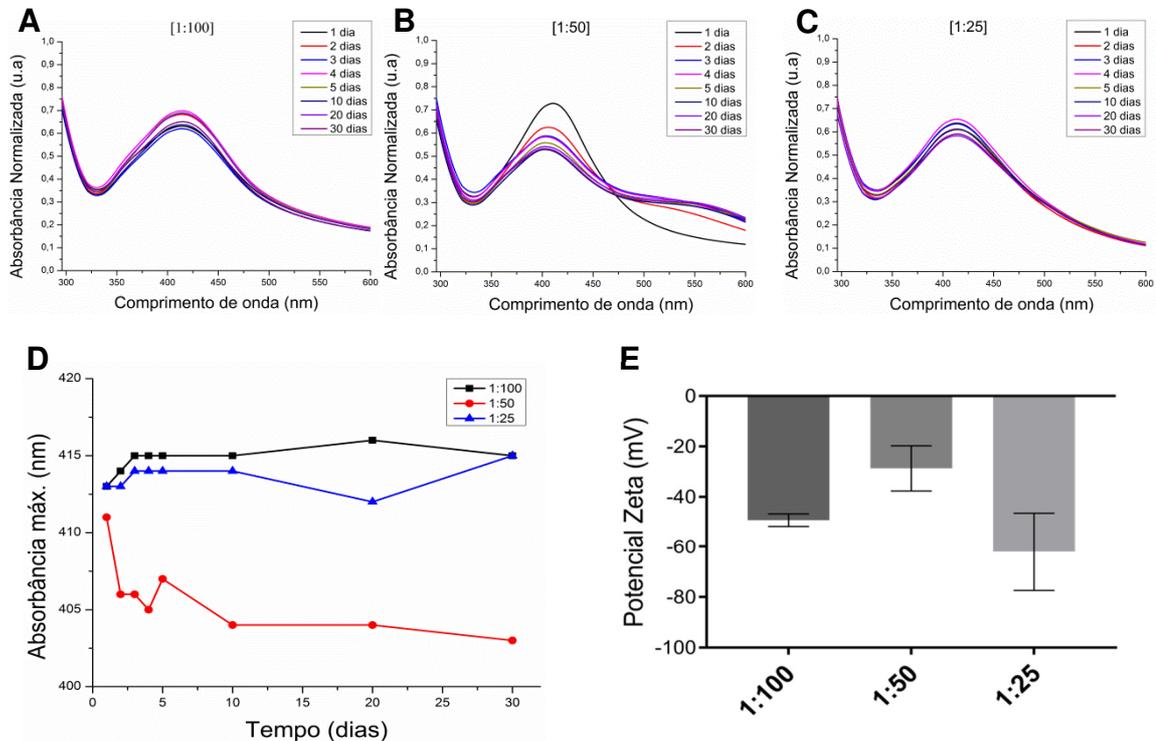


Figura 4. Espectro UV-Visível em função do tempo de reação da solução aquosa de AgNO_3 1mM com o filtrado da biomassa fúngica, solução 1:100 (A); 1:50 (B) e 1:25 (C). D) Média da absorbância máxima das soluções. E) Pontencial zeta das AgNP's biosintetizadas em diferentes concentrações do filtrado fúngico.

O espalhamento de luz dinâmico (DLS) é capaz de determinar o tamanho da NP, considerando o núcleo metálico da NP e a nuvem de elétrons que a cerca, além de definir o potencial zeta (26,38). De acordo com o DLS, o tamanho das AgNP's 1:100 biosintetizadas encontram-se entre 36-486nm, as AgNP's 1:50 entre 30-409nm e as AgNP's 1:25 entre 12-409nm (Figura 5). A solução 1:25 foi que apresentou maior monodispersão.

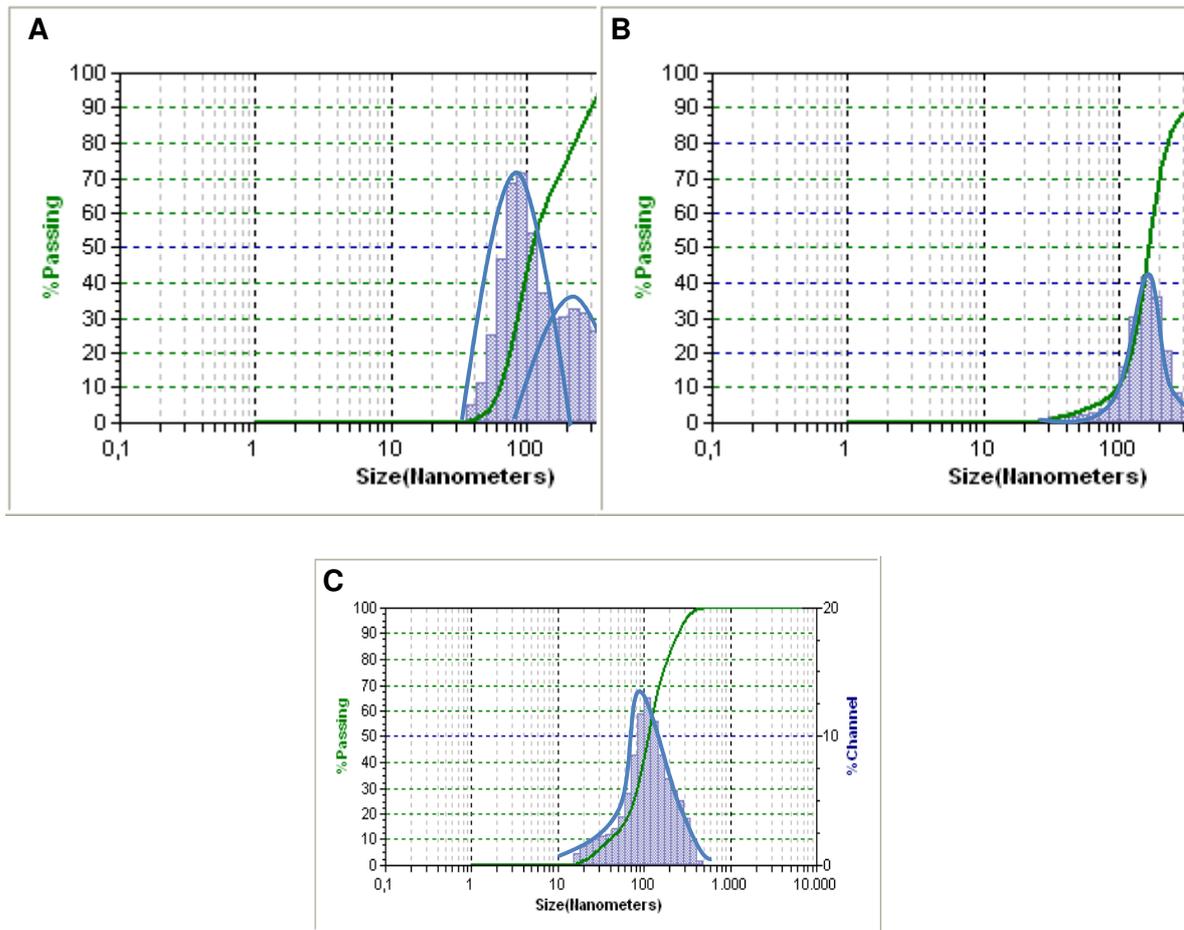


Figura 5. Distribuição de tamanho de partícula de AgNPs 1:100 (A), 1:50 (B) e 1:25 (C).

Utilizando as imagens obtidas pelo MET (Figura 6) no programa ImageJ 1.51i, foi possível realizar o cálculo do diâmetro das NP's (n=500) e assim avaliar o tamanho, a monodispersão e a forma esférica das AgNP's.

As AgNP's sintetizadas na condição 1:100 revelaram menor tamanho e partículas dispersas (média do diâmetro = $10,29 \pm 7,18$) (Figura 6, B-D), já as NP's da amostra 1:50 são maiores e mais aglomeradas (média do diâmetro = $12,17 \pm 5,94$) (Figura 6, E-G). As AgNP's mais dispersas foram as sintetizadas na condição 1:25 (média do diâmetro = $11,69 \pm 8,49$) (Figura 6, H-J).

As NP's da solução 1:50 por estarem mais aglomeradas, indicaram menor estabilidade, o que confere com os resultados do potencial zeta (Figura 4 E).

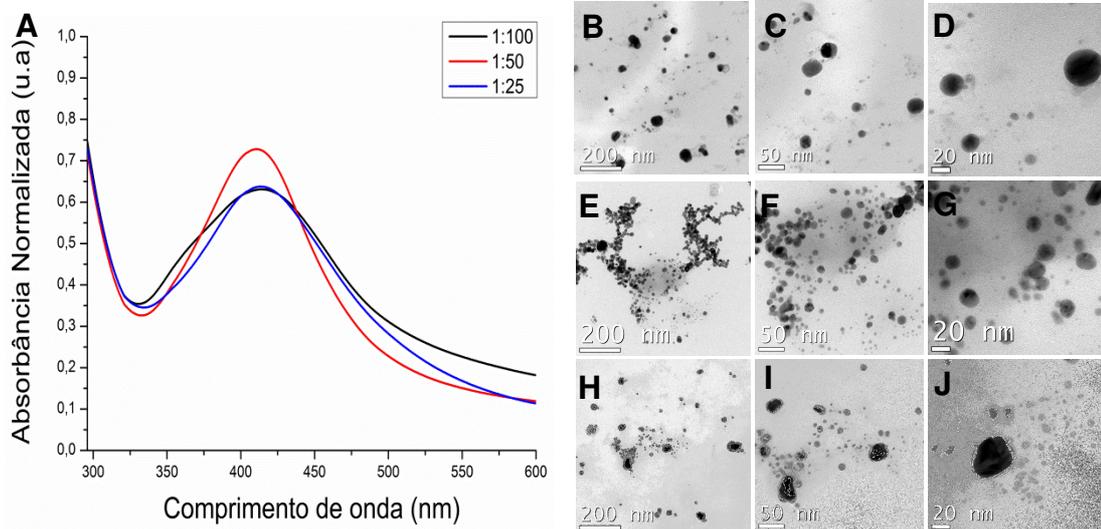


Figura 6. **A)** Absorbâncias das AgNP's após 24h e suas imagens por MET (**B, C e D)** 1:100, (**E, F e G)** 1:50 e (**H, I e J)** 1:25.

No histograma construído a partir dos valores de diâmetro das NP's, foi possível concluir que as NP's da solução 1:25 possuem maior variação de tamanho e as da solução 1:50 menor variação de tamanho, portanto, maior monodispersividade (Figura 7, A), o que confirma os resultados obtidos pelo DLS (Figura 5, B). As AgNP's não são totalmente esféricas, sendo necessário o cálculo da razão de aspecto (RA), realizado através da razão entre o diâmetro maior (DM) e do diâmetro menor (Dm) de cada NP metálica (n=500). A partir da RA das AgNP's foi possível observar que as partículas produzidas são partículas esféricas e que não há diferença estatística quanto a esfericidade das AgNP's produzidas pelas soluções 1:100, 1:50 e 1:25 (ANOVA, $p > 0,005$) (Figura 7,B).

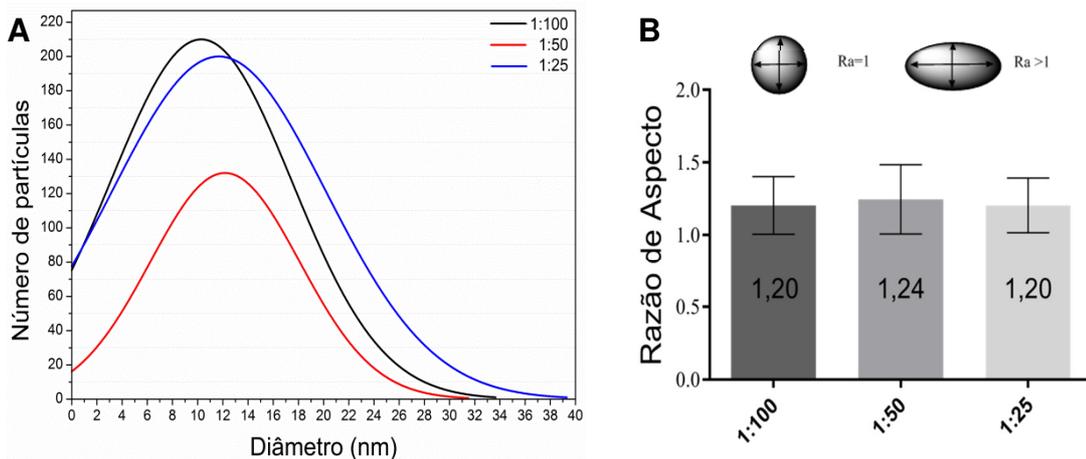


Figura 7. Histograma do diâmetro **(A)** e razão de aspecto **(B)** das AgNP's. Cálculos realizados a partir das imagens das obtidas pelo MET.

Para a melhor compreensão das NP's biosintetizadas, técnicas como FTIR e Raman foram utilizadas para caracterizar as moléculas que possam estar adsorvidas na superfície destas AgNP's.

De acordo com Stuart (49), os espectros FTIR de proteínas exibem bandas de absorção associadas ao seu grupo amida característico. As bandas do grupo amida das proteínas são semelhantes às bandas de absorção exibidas pelas amidas secundárias (amida A, amida B e amida I-VII). Todas as amidas mostram uma banda de absorção de carbonila, mais conhecida como banda de amida I, que ocorre entre $1680-1640\text{cm}^{-1}$. Sua posição depende do grau de ligação hidrogênio e do estado físico do composto. O número de ligações N-H em uma amida é igual ao número de bandas de deformação N-H observado no espectro, sendo assim, amidas secundárias apresentam apenas uma banda de deformação axial entre 1560 e 1530cm^{-1} , chamada de banda de amida II (49,50).

O FTIR das AgNP's (Figura 8) mostrou a presença de duas bandas: 1640 e 1540cm^{-1} , identificadas como amida I e amida II, respectivamente, e surgem devido a vibrações de deformação axial C=O e vibrações de deformação angular de N-H nas ligações amida das proteínas. Também foi possível observar a presença de banda de deformação axial O-H de ácido carboxílico em 2665cm^{-1} (49) e bandas de estiramento em 730cm^{-1} ($\text{CH}_2\text{-S-S}$, possivelmente referente a ligações cruzadas de dissulfeto entre o aminoácido cisteína) (40), 1000cm^{-1} (C-O) (51), 1811cm^{-1} (C=O de anidrido) (49), 2100cm^{-1} ($\text{C}\equiv\text{O}$) (51), 2326cm^{-1} (NH_2^+) (40) e 2665 , 3600 e 3751cm^{-1} (O-H) (33, 52).

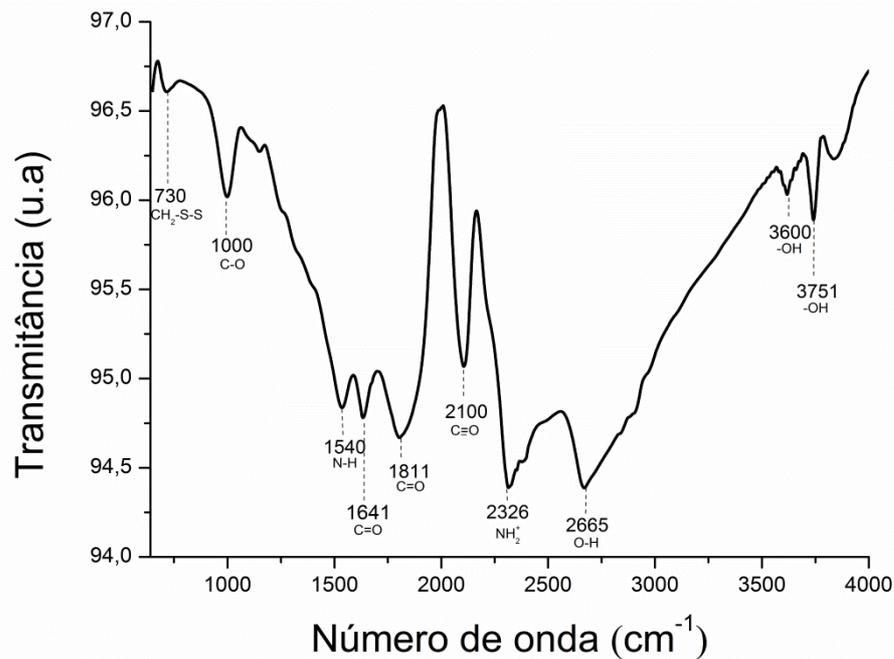


Figura 8. Espectro FTIR das AgNP's biosintetizadas.

Basavaraja et al. (36) confirmaram com estudo de espectrometria no infravermelho, que o grupo carbonila presente em resíduos de aminoácidos e peptídeos de proteínas possuem maior capacidade de ligar metal, de modo que as proteínas podem formar um revestimento que cubra as nanopartículas de metal para evitar a aglomeração das partículas e estabiliza-las no meio. Essa evidência sugere que as moléculas biológicas poderiam possivelmente desempenhar a função para a formação e estabilização das nanopartículas de prata em meio aquoso.

Geralmente no FTIR, as bandas de vibração NH₂ e N-H são fundamentais para elucidar o tipo de amina presente, enquanto que no espectro Raman as bandas vibratórias são muito úteis nos estudos conformacionais, para a determinação da estrutura secundária de moléculas biológicas (40). Portanto, a partir dos resultados obtidos pelo Raman (Figura 9), foi possível verificar que a molécula -C(=O)-NHR que está adsorvida na superfície metálica da NP possui uma conformação *cis*, devido ao pico em 1440 cm⁻¹. Tanto na amostra de AgNP's, quanto no filtrado, foi possível observar a presença da banda 1600 cm⁻¹, Stuart (49) relata que vibrações do anel benzênico em 1600 e 1602 cm⁻¹, podem indicar a presença de aminoácidos essenciais com cadeias laterais aromáticas, como: fenilalanina e tirosina, respectivamente. Yamagami et al. (53) relatou a presença de aminoácidos como

aspartato, alanina, cisteína, fenilalanina, tirosina, arginina, entre outros, na composição da quitinase.

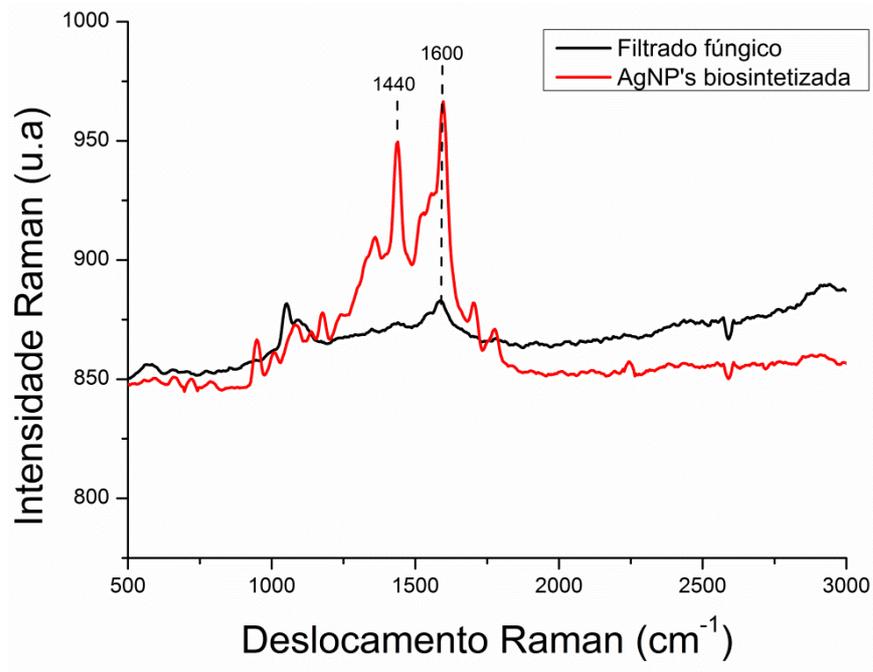


Figura 9. Espectro do Raman das AgNP's biosintetizadas.

Os resultados obtidos pelo FTIR e Raman corroboram com a hipótese de que a molécula responsável para a redução e estabilidade da nanopartícula de prata, seria a quitinase, uma vez que, foi confirmada a presença de aminoácidos que pertencem à sequência de aminoácidos desta proteína na superfície das AgNP's e por fim, a redução da prata só foi possível em condições ideais para atividade desta enzima, tendo o melhor rendimento na síntese que utilizou o filtrado da biomassa enriquecida com quitina.

5. CONCLUSÃO

- Neste trabalho relatamos um processo biológico simples para a biosíntese extracelular de AgNP's utilizando o fungo nematófago *D. flagrans*.
- Dentre as diferentes concentrações do filtrados testados, observamos que a condição que apresentou maior número AgNP's com dimensões reduzidas e estáveis, foi a solução 1:100.
- As AgNP's da solução 1:25 apesar de serem as mais estáveis, apresentam maior variação de tamanho.
- Técnicas espectroscópicas (UV-Vis, FTIR, Raman) e testes para quantificação de proteínas (método de Bradford) indicaram que proteínas presentes no filtrado fúngico, possivelmente a quitinase, desempenham um papel importante na formação e estabilização de AgNP's através do revestimento destas NP's.
- AgNP's podem apresentar propriedades antibacterianas, antifúngicas, antivirais e anti-câncer; sendo portanto uma estratégia promissora para o aplicações terapêuticas, o que potencializa novos delineamentos experimentais utilizando o fungo *D. flagrans* (AC001) na biossíntese dessas NP's.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Franci G, Falanga A, Galdiero S, Palomba L, Rai M, Morelli G, Galdiero M. Silver nanoparticles as potential antibacterial agents. *Molecules* 2015; **20**:8856-8874.
2. Mallmann EJJ, Cunha FA, Castro BNMF, Maciel AM, Menezes EA, Fachine PBA. Antifungal activity of silver nanoparticles obtained by green synthesis. *Rev I Med Trop* 2015; **57**:165-167.
3. Elbeshehy EKF, Elazzazy AM, Aggelis George. Silver nanoparticles synthesis mediated by new isolates of *Bacillus* spp., nanoparticle characterization and their activity against Bean Yellow Mosaic Virus and human pathogens. *Front Cell Infect Microbiol* 2015; **6**:453-466.
4. Abamor ES, Allahverdiyev AM. A nanotechnology based new approach for chemotherapy of Cutaneous Leishmaniasis: TIO₂@AG nanoparticles - *Nigella sativa* oil combinations. *Exp Parasitol* 2016; **166**:150-163.
5. Allahverdiyev AM, Abamor ES, Bagirova M, Baydar SY, Ates SC, Kaya F, Kaya C, Rafailovich M. Investigation of antileishmanial activities of Tio₂@Ag nanoparticles on biological properties of *L. tropica* and *L. infantum* parasites, in vitro. *Exp Parasitol* 2013; **135**:55-63.
6. Lewinski N, Colvin V, Drezek R. Cytotoxicity of nanoparticles. *Small* 2008; **4**:26-49.
7. Wang B, Feng WY, Wang TC, Jia G, Wang M, Shi JW, Zhang F, Zhao YL, Chai ZF. Acute toxicity of nano- and micro-scale zinc powder in healthy adult mice. *Toxicol Lett* 2006; **161**:115-123.
8. Zhu MT, Feng WY, Wang B, Wang TC, Gu YQ, Wang M, Wang Y, Ouyang H, Zhao YL, Chai ZF. Comparative study of pulmonary responses to nano- and submicron-sized ferric oxide in rats. *Toxicology* 2008; **247**:102-111.

9. Singh P, Kim YJ, Singh H, Wang C, Hwang KH, Farh Mel-A, et al. Biosynthesis, characterization, and antimicrobial applications of silver nanoparticles. *Int J Nanomedicine* 2015; **10**:2567-2577.
10. Zhang XF, Liu ZG, Shen W, Gurunathan S. Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. *Int J Mol Sci* 2016; **17**:1534-1568.
11. Moazeni M, Rashidi N, Shahverdi AR, Noorbakhsh F, Rezaie S. Extracellular Production of Silver Nanoparticles by Using Three Common Species of Dermatophytes: *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* and *Microsporum canis*. *Iran Biomed J* 2012; **16**:52-58.
12. Chowdhury S, Basu A, Kundu S. Green synthesis of protein capped silver nanoparticles from phytopathogenic fungus *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid with antimicrobial properties against multidrug-resistant bacteria. *Nanoscale Res Lett* 2014; **9**(1):365-376.
13. Kulkarni N, Muddapur U. Biosynthesis of Metal Nanoparticles: A Review. *J Nanotechnol* 2014; 2014: 1-8.
14. Alghuthaymi MA, Almoammar H, Rai M, Said-Galiev E, Abd-Elsalam KA. Myconanoparticles: synthesis and their role in phytopathogens management. *Biotechnol. Biotechnol Equip* 2015; **29**: 221-236.
15. Braga FR, Araújo JV. Nematophagous fungi for biological control of gastrointestinal nematodes in domestic animals. *Appl Microbiol Biot* 2014; **98**:71-82.
16. Hiura E, Lopes ADC, Paz JS, Gava MG, Flecher MC, Colares M, et al. Fungi predatory activity on embryonated *Toxocara canis* eggs inoculated in domestic chickens (*Gallus gallus domesticus*) and destruction of second stage larvae. *Parasitol Res* 2015; **114**:3301-3308.
17. Braga FR, De Freitas Soares FE, Araujo JM, Da Fonseca LA, Hiura E, Gava MG, et al. Statistical experimental design to assess the influence of enzymes of nematophagous fungi versus helminths. *Res Vet Sci* 2014; **97**:527-532.

18. Braga FR, Soares FEF, Giuberti TZ, Lopes ACG, Lacerda T, Queiroz PV, et al. Nematocidal activity of extracellular enzymes produced by the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* on cyathostomin infective larvae. *Vet Parasitol* 2015; **212**:214–218.
19. De Mello IN, Braga FR, Monteiro TS, Freitas LG, Araujo JM, Soares FE, et al. Biological control of infective larvae of *Ancylostoma* spp. in beach sand. *Rev Iberoam Micol* 2014; **31**:114-118.
20. Wang Y, Sun L, Yi S, Huang Y, Lenaghan SC, Zhang M. Naturally Occurring Nanoparticles from *Arthrotrrys oligospora* as a Potential Immunostimulatory and Antitumor Agent. *Adv Funct Mater* 2013; **23**:2175–2184.
21. Hasan M, Kumar G. High-throughput drawing and testing of metallic glass nanostructures. *Nanoscale* 2017. doi: 10.1039/c7nr00126f.
22. Labowsky M, Lowenthal J, Fahmy TM. An in silico analysis of nanoparticle/cell diffusive transfer: application to nano-artificial antigen-presenting cell:T-cell interaction. *Nanomedicine* 2015; **11**:1019-1028.
23. Gonzalez-Melendi P, Fernandez-Pacheco R, Coronado MJ, Corredor E, Testillano PS, Risueno MC, Marquina C, Ibarra MR, Rubiales D, Perez-de-Luque A. Nanoparticles as smart treatment-delivery systems in plants; assessment of different techniques of microscopy for their visualization in plant tissues. *Ann Bot* 2008; **101**:187-195
24. Shipway AN, Katz E, Willner I. Nanoparticle Arrays on Surfaces for Electronic, Optical, and Sensor Applications. *ChemPhysChem* 2000; **1**:18–52.
25. Martínez JC, Chequer NA, González JL, Cordova T. Alternative Methodology for Gold Nanoparticles Diameter Characterization Using PCA Technique and UV-VIS Spectrophotometry. *Nanosc Nanotec* 2012; **2**: 184-189.
26. Fatima F, Bajpai P, Pathak N, Singh S, Priya S, Verma SR. Antimicrobial and immunomodulatory efficacy of extracellularly synthesized silver and gold nanoparticles by a novel phosphate solubilizing fungus *Bipolaris tetramera*. *BMC Microbiol* 2015; **15**:52-62.

27. Rathod V, Banu A, Ranganath E. Biosynthesis of highly stabilized silver nanoparticles by *Rhizopus stolonifer* and their Anti-fungal efficacy. *Int J Cur Biomed Phar Res* 2012; **2**: 241-245.
28. Kummara S, Patil MB, Uriah T. Synthesis, characterization, biocompatible and anticancer activity of green and chemically synthesized silver nanoparticles - A comparative study. *Biomed Pharmacother* 2016; **84**:10-21.
29. Raliya R, Tarafdar JC, Mahawar H, Kumar R, Gupta P, Mathur T, Kaul RK, Praveen-Kumar, Kalia A, Gautam R, Singh SK, Gehlot HS. ZnO nanoparticles induced exopolysaccharide production by *B. subtilis* strain JCT1 for arid soil applications. *Int J Biol Macromol* 2014; **65**:362-368.
30. Chitra K, Annadurai G. Antibacterial Activity of pH-Dependent Biosynthesized Silver Nanoparticles against Clinical Pathogen. *Biomed Res Int* 2014; **2014**:1-6.
31. AlSalhi MS, Devanesan S, Alfuraydi AA, Vishnubalaji R, Munusamy MA, et al. Green synthesis of silver nanoparticles using *Pimpinella anisum* seeds: antimicrobial activity and cytotoxicity on human neonatal skin stromal cells and colon cancer cells. *Int J Nanotechnol Nanomed* 2016; **11**:4439-4449.
32. Melo Jr. MA, Santos LSS, Gonçalves MC, Nogueira AF. Preparação de nanopartículas de prata e ouro: um método simples para a introdução da nanociência em laboratório de ensino. *Quím. Nova* 2012; **35**: 1872-1878.
33. Milaneze BA, Oliveira JP, Augusto I, Keijok WJ, Côrrea AS, Ferreira DM, et al. Facile Synthesis of Monodisperse Gold Nanocrystals Using *Viola oleifera*. *Nanoscale Res Lett* 2016; **11**:465-474.
34. Firdhouse MJ, Lalitha P. Biosynthesis of silver nanoparticles using the extract of *Alternanthera sessilis*-antiproliferative effect against prostate cancer cells. *Cancer Nanotechnol* 2013; **4**:137-143.
35. Alcor D, Gouzer G, Triller A. Single-particle tracking methods for the study of membrane receptors dynamics. *Eur J Neurosci* 2009; **30**:987-997.
36. Basavaraja S, Balajia SD, Arunkumar Lagashetty, Rajasab AH, Venkataramana A. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium semitectum*. *Mater Res Bull* 2008; **43**:1164–1170.

37. Kar PK, Murmu S, Saha S, Tandon V, Acharya K. Anthelmintic Efficacy of Gold Nanoparticles Derived from a Phytopathogenic Fungus, *Nigrospora oryzae*. *Plos one* 2014; **9**:1-9.
38. Elbeshehy EKF, Elazzazy AM, Aggelis George. Silver nanoparticles synthesis mediated by new isolates of *Bacillus* spp., nanoparticle characterization and their activity against Bean Yellow Mosaic Virus and human pathogens. *Front Cell Infect Microbiol* 2015; **6**:453-466.
39. Meléndrez MF, Cárdenasb G, Arbiol J. Synthesis and characterization of gallium colloidal nanoparticles. *J Colloid Interface Sci* 2010; **346**:279–287.
40. Lin Vien D, Colthup NB, Fateley WG, Graselli JG, editor. The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules. Academic Press, San Diego 1991.
41. Ninganagouda S, Rathod V, Jyoti H, Singh D, Prema K, Haq MU. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using *Aspergillus flavus* and their antimicrobial activity against gram negative mdr strains. *Int J Pharma Bio Sci* 2013; **4**:222 – 229.
42. Allahverdiyev AM, Abamor ES, Bagirova M, Baydar SY, Ates SC, Kaya F, Kaya C, Rafailovich M. Investigation of antileishmanial activities of Tio₂@Ag nanoparticles on biological properties of *L. tropica* and *L. infantum* parasites, in vitro. *Exp Parasitol* 2013; **135**:55-63.
43. Park J, Kim S, Choi J, Yoon M, Chung D, Kim HJ. Biological Control by Nematophagous Fungi for Plant-parasitic Nematodes in Soils Korean. *J Soil Sci Fert* 2012; **45**:74-78.
44. Sato BK. Attack of the Killer Fungus: A Hypothesis-Driven Lab Module . *J Microbiol Biol Educ* 2013; **14**:230-237.
45. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; **72**:248-254.
46. Meyer WJ, Wiebe MG. Enzyme production by the nematode-trapping fungus, *Duddingtonia flagrans*. *Biotechnol Lett* 2003; **25**:791–795.

47. Braga FR, Araújo JV De, Soares FE De F, Araujo JM, Ferreira SR, Tavela AO, et al. Proteolytic action of the crude extract of *Duddingtonia flagrans* on cyathostomins (Nematoda: Cyathostominae) in coprocultures. *Rev Bras Parasitol Vet* 2013; **22**:143-146.
48. Braga FR, Araújo JV, Soares FEF, Araujo JM, Tavela AO, Carvalho LM, et al. Interaction of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* on *Amblyomma cajannense* engorged females and enzymatic characterisation of its chitinase. *Biocontrol Sci Technol* 2013; **23**:584-594.
49. Stuart BH editor. Infrared spectroscopy: fundamentals and applications. John Wiley & Sons, Chichester 2004.
50. Silverstein RM, Webster FX, Kiemle DJ editor. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC 2007.
51. Lopes WA, Fascio M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. *Quím. Nova* 2004; **27**:670-673.
52. Pal R, Panigrahi S, Bhattacharyya D, Chakraborti AS. Characterization of citrate capped gold nanoparticle-quercetin complex: Experimental and quantum chemical approach. *Journal of Molecular Structure* 2013; **1046**:153-163.
53. Yamagami T, Tanigawa M, Masatsune I, Funatsu G. Complete amino acid sequence of chitinase-a from leaves of pokeweed. *Biosci Biotechnol Biochem* 1998; **62**:825-828.