

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**Avaliação da atividade nematicida de nanopartículas de fungos
nematófagos no controle *in vitro* de larvas infectantes de
nematóides**

ANNA CLAUDIA MOMBRINI SILVA BARBOSA

VILA VELHA
ABRIL / 2018

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**Avaliação da atividade nematocida de nanopartículas de fungos
nematófagos no controle *in vitro* de larvas infectantes de
nematóides**

Dissertação apresentada à
Universidade Vila Velha, como pré-
requisito do Programa de Pós-graduação
em Ciência Animal, para a obtenção do
grau de Mestra em Ciência Animal.

ANNA CLAUDIA MOMBRINI SILVA BARBOSA

VILA VELHA
ABRIL/ 2018

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

B238a Barbosa, Anna Claudia Mombrini Silva
 Avaliação da atividade nematicida de nanopartículas de fungos
 nematófagos no controle in vitro de larvas infectantes de nematóides
 / Anna Claudia Mombrini Silva Barbosa – 2018.
 40 f.: il.

 Orientador: Fabio Ribeiro Braga.
 Dissertação (mestrado em Ciência Animal) - Universidade
 Vila Velha, 2018.
 Inclui bibliografias.

 1. Medicina veterinária. 2. Fungos nematófagos. 3. Pragas –
 Controle biológico. I. Braga, Fabio Ribeiro. II. Universidade Vila
 Velha. III. Título.

CDD 636.89

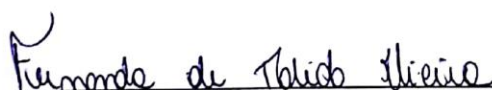
ANNA CLAUDIA MOMBRINI SILVA BARBOSA

**Avaliação da atividade nematicida de nanopartículas de fungos
nematófagos no controle *in vitro* de larvas infectantes de
nematóides**

Dissertação apresentada à Universidade
Vila Velha, como pré-requisito do
Programa de Pós-graduação em Ciência
Animal, para a obtenção do grau de
Mestra em Ciência Animal.

Aprovada em 10 de abril de 2018.

Banca Examinadora:



Fernanda de Toledo Vieira (UVV)



Dominik Lenz (UVV)



Fabio Riberio Braga (UVV)

Orientador

Dedico este trabalho aos meus pais, ao meu esposo e às minhas filhas que sempre me incentivaram e acreditaram em mim.

AGRADECIMENTO

Agradeço primeiramente a Deus por ter me concedido essa oportunidade!

Aos meus pais, Cesar e Jussara, que sempre me deram suporte e incentivo.

Ao meu querido e amado esposo Jorge Lucas pela paciência, amor e apoio em todas as etapas de nossas vidas.

Às minhas lindas filhas Lisa e Lucy – elas são minhas maiores motivações.

À minha querida amiga, irmã, comadre e dinda Elisângela que sempre esteve ao meu lado.

A toda minha família e amigos pelo carinho e preocupação.

Ao meu orientador, professor Dr. Fabio Ribeiro Braga, por seu apoio e por ter acreditado em mim desde o início, além de sua dedicação, competência, atenção e sugestões, fatores fundamentais para realização deste trabalho.

À querida amiga e Msc. Laryssa Pinheiro, que foi fundamental para a realização deste trabalho e foi o meu anjo nessa caminhada.

Ao professor Dr. Marcio Fronza pela ajuda nos testes para a realização deste trabalho, bem como a todos do seu laboratório.

À Msc. Clarisse e ao Luciano do Laboratório de Microbiologia que por tantas vezes me auxiliaram para usar os equipamentos e sempre me incentivaram!

A todos do LabPeixe que permitiram que eu usasse os equipamentos necessários!

Aos meus amigos, Caio Senna, Frederico Fróes, Anderson Aguiar, Carolina Ferraz e Jeane Saraiva por sempre estarem ao meu lado me ajudando e incentivando.

Em especial, ao meu amigo Fabio Senna que sempre estava disposto a me ajudar, nunca medindo esforços. Desde 2009 quando ingressei na graduação sempre estava no laboratório para auxiliar a todos com muito amor e carinho!

À Prof. Msc. Emy Hiura, por toda ajuda e troca de experiências.

A todos meus amigos do Mestrado, passamos juntos por muitas coisas!

À minha IC Bruna por todo tempo que esteve ao meu lado me auxiliando.

À querida professora Dra. Tayse Domingues, que nos ajudou tanto na “conquista” das larvas!

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal e da Graduação em Medicina Veterinária que contribuíram para minha formação.

Aos funcionários da UVV por todo cuidado.

À Universidade Vila Velha (UVV) e Universidade Federal do Espírito Santos (UFES) pela oportunidade e confiança.

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES), por ter me concedido a oportunidade de realizar o Mestrado e a pesquisa.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1. Introdução.....	1
2. Revisão De Literatura	4
2.1. O <i>Ancylostoma</i> spp	4
2.2 Nanopartículas (NP's)	5
2.3. Fungos nematófagos	6
2.4 Ensaio de citotoxicidade	8
3. Objetivos	9
3.1 Objetivo geral	9
3.2 Objetivos específicos	9
4. Material e Métodos	10
4.1 Biossíntese da nanopartícula	10
4.1.1. Obtenção do filtrado fúngico.....	10
4.1.2. Análise do filtrado fúngico – Teor de proteínas	11
4.1.3. Biossíntese das AgNP's a partir do filtrado fúngico	11
4.2. Caracterização das AgNP's	11
4.2.1. Espectroscopia de Absorbância Ultravioleta-Visível (UV-Vis)	11
4.2.2 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	12
4.2.3 Infravermelho de Fourier (FTIR)	12
4.2.4 Difração de Raio – X (XRD)	12

4.3 Secagem das AgNP's biossintetizadas.....	12
4.4. Otimização da secagem e solubilização das AgNP biossintetizadas	13
4.4.1 Secagem - Análise do tempo e rotação	13
4.4.2 Solubilização - Análise da Ressonância Plasmônica de superfície das AgNP	13
4.5. Ensaio experimental	14
4.5.1. Ensaio de citotoxicidade	14
4.5.2. Obtenção das L ₃ de Ancylostoma caninum	15
4.5.3 Preparo da solução de conídios e clamidósporos de D. flagrans	15
4.5.4. Análise da atividade nematicida das AgNP's biossintetizadas sobre as larvas de Ancylostoma spp.	16
4.5.5 Análise ultraestrutural das larvas de Ancylostoma spp.	17
5. Resultados e Discussão	19
6. Conclusão	29
7 REFERÊNCIAS	30

RESUMO

BARBOSA, ANNA CLAUDIA MOMBRINI SILVA, M.Sc, Universidade Vila Velha – ES, abril de 2018. **Avaliação da atividade nematicida de nanopartículas de fungos nematófagos no controle *in vitro* de larvas infectantes de nematóides.** Orientador: Fábio Ribeiro Braga.

A biossíntese de nanopartículas a partir de fungos nematófagos vem sendo estudada mundialmente e é uma área promissora da nanobiotecnologia. Neste estudo, realizamos a biossíntese de nanopartículas de prata (AgNP's) utilizando o fungo nematófago *Duddingtonia flagrans*. Foi estudado o melhor método para liofilização e ressuspensão das nanopartículas, sendo a melhor forma para liofilizá-las na rotação 12.000 rpm por 20 minutos e o melhor meio para ressuspensão foi em água ultrapura. O ensaio do MTT revelou que o IC₅₀ da AgNP biossintetizada foi de 43,4 µg/mL. Foram obtidas imagens por MET das AgNP's mostrando sua forma esférica, tamanho e monodispersão. O método de Bradford e técnicas espectroscópicas (UV-Vis, FTIR, DRX) foram utilizadas para indicar quais moléculas estão envolvidas na formação das nanopartículas, como a quitinase, explicando a ação penetrante das AgNPs biossintetizadas nos nematoides. Foi realizado o teste de atividade nematicida das AgNPs comparando-as com outras substâncias. As AgNPs obtiveram eficácia em sua ação nematicida, sendo as únicas capazes de penetrar a cutícula das larvas causando alterações tegumentares levando o parasita à morte. Dessa forma, as nanopartículas biossintetizadas são promissoras para aplicações terapêuticas de verminoses em animais e humanos.

Palavras chaves: nanopartículas de prata, AgNO₃, nematoide, controle biológico.

ABSTRACT

BARBOSA, ANNA CLAUDIA MOMBRINI SILVA, M.Sc, Universidade Vila Velha – ES, abril de 2018. **Evaluation of nematicidal activity of nematophagous fungi nanoparticles in the in vitro control of nematode infecting larvae.**

Orientador: Fábio Ribeiro Braga.

Nanoparticle biosynthesis from nematophagous fungi has been studied worldwide and is a promising area for nanobiotechnology. In this study, we performed silver nanoparticle biosynthesis (AgNP's) using the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans*. The best method for lyophilization and resuspension of the nanoparticles was the best way to freeze dry them at 12,000 rpm for 20 minutes and the best medium for resuspension was in ultrapure water. The MTT assay revealed that the biosynthesized AgNP IC_{50} was 43.4 $\mu\text{g/mL}$. MET images of the AgNPs were obtained showing their spherical shape, size and monodispersion. The Bradford method and spectroscopic techniques (UV-Vis, FTIR, DRX) were used to indicate which molecules are involved in the formation of nanoparticles, such as chitinase, explaining the penetrating action of biosynthesized AgNPs in the nematodes. The nematicidal activity test of the AgNPs was performed comparing them with other substances. The AgNPs obtained efficacy in their nematicidal action, being the only ones able to penetrate the cuticle of the larvae causing tegumentary changes leading the parasite to death. Thus, biosynthesized nanoparticles are promising for therapeutic applications of verminoses in animals and humans.

Key words: silver nanoparticles, AgNO_3 , nematoid, biologic control.

1. INTRODUÇÃO

Mais de um quarto da população mundial está suscetível à infecção causada por helmintos através do contato com o solo contaminado (JOURDAN et al., 2018). De acordo com Katagiri et al. (2007), o destaque dos principais causadores de helmintoses se deve as infecções causadas por *Toxocara canis* (larva migrans visceral), *Ancylostoma* spp (larva migrans cutânea), *Echinococcus granulosus* (cisto hidático), *Trichuris vulpis* e *Dipylidium caninum*. Contudo, os gêneros *Ancylostoma* e o *Toxocara* são os geohelmintos intestinais mais ubíquos e prevalentes (ROBERTSON & THOMPSON, 2002).

Segundo Santarém et al. (2004), estima-se que mais de 1 bilhão de pessoas no mundo são infectadas por geohelmintos por meio do solo, sugerindo-se, portanto, que a contaminação ambiental é um importante fator de risco em relação ao aspecto sanitário e riscos para a população humana. Nesse sentido, pode-se aferir que as áreas públicas, como os parques e praças, são os principais locais de contaminação destes geohelmintos principalmente em crianças com idade pré-escolar. Jourdan et al. (2018), também relatam que mesmo as medicações de tratamento sendo doadas de forma totalmente gratuita em países endêmicos, metade das crianças em risco não receberam a medicação em 2016.

De acordo com Kohansal et al. (2017) os parasitos gastrintestinais de animais de companhia, incluindo os cães, são de grande preocupação para com a saúde pública, devido ao risco potencial de transmissão de espécies zoonóticas para humanos tanto em áreas rurais quanto urbanas. A transmissão de parasitas para humanos ocorre principalmente através do contato com as fezes de animais infectados. Portanto, deve-se entender o ciclo evolutivo destes parasitos (ovos e ou larvas) que são expelidos nas fezes e evoluem para o hospedeiro seguinte, em algumas situações os humanos.

Dessa forma, e com o exposto até aqui, há a necessidade de pesquisas que envolvam o conhecimento da epidemiologia parasitária e sua atuação em um controle efetivo. Sendo assim, no Brasil, os trabalhos realizados com fungos nematófagos no controle de geohelmintos têm merecido a atenção (Braga et al., 2007; Frassy et al., 2010). Esses estudos denotam não somente uma descrição da atividade de fungos ditos “nematóforos” na destruição de formas parasitárias

de nematoides de cães e gatos, mas também “apontam para um horizonte” promissor na utilização de uma ferramenta colaborativa com o controle químico, já existente, porém com insucessos comprovados.

Recentemente uma abordagem não-tóxica, “*eco-friendly*” para a biossíntese de nanomateriais e nanoestruturas tem sido estudada (Silva et al. 2017). A nanotecnologia verde utiliza micro-organismos, como: bactérias, leveduras e fungos nematófagos, para a síntese de nanopartículas de metais. Estes microorganismos apresentam características importantes para a síntese destas partículas; são capazes de agregar material inorgânico dentro ou fora da célula, além de produzirem bio-extratos, que atuam como agente redutor de material inorgânico e agente de proteção na síntese das nanopartículas de ouro, prata, platina, selênio, sílica e zircônio (MOAZENI et al., 2012; CHOWDHURY et al., 2014; KULKARNI & MUDDAPUR, 2014; ALGHUTHAYMI et al., 2015).

De volta ao problema dos parasitos gastrintestinais de animais domésticos, de acordo com Braga et al. (2013) devido ao uso indevido de antiparasitários, há ocorrência de resistência desses medicamentos. Nesse sentido, o controle biológico realizado com fungos nematófagos, visando uma ação direcionada no ambiente tem disso uma premissa interessante (Fachinni et al 2017; Aguiar et al., 2017). Desatacando-se principalmente a redução das fases pré-parasitárias de nematoides gastrintestinais, tanto em condições laboratoriais quanto a campo, este grupo de fungos é o mais estudado (SOARES et al., 2013, SILVA et al., 2017).

No grupo dos fungos predadores, *Duddingtonia flagrans* é considerada a espécie mais promissora para o controle biológico de parasitos gastrintestinais. Algumas características importantes desse fungo são: produz estruturas fúngicas, conídios e clamidosporos que garantem a propagação e sobrevivência em condições ambientais; possui eficiente crescimento em condições de laboratório e, excelente capacidade predatória (HIURA et al., 2015). Além disso, no extrato bruto de *D. flagrans* é possível observar enzimas extracelulares produzidas, como proteases e quitinase, que são capazes de hidrolisar a cutícula do nematoide provocando assim a morte do parasito (BRAGA et al., 2013; BRAGA et al., 2015). Estudos como os de Braga et al. (2013), Buzatti et al. (2015) e Hiura et al. (2015) comprovam que o controle biológico de parasitos gastrointestinais pelo fungo *D. flagrans* é uma opção viável.

Recentemente Silva et al. (2017) publicou a ideia que nanopartículas de prata originadas de uma espécie específica de fungo nematófago, o *D. flagrans*, poderia ser utilizada futuramente no controle de larvas infectantes de nematoides. Segundo esses autores, a síntese biológica a partir da produção desse fungo é um processo barato, ecologicamente correto e de alto rendimento. Também é possível realizar uma síntese extracelular, o que torna o este processo mais fácil, uma vez que nenhum procedimento extra é necessário para separar as partículas das células vivas. Por outro lado, contextualizando o significado de nanopartículas, pode-se mencionar que as mesmas são atualmente uma área de intensa investigação científica, com uma síntese de custo eficaz, não tóxica e ambientalmente inofensivo.

Contudo, esse é o primeiro trabalho da atuação in vitro de nanopartículas do fungo *D. flagrans* sobre L₃ de *Ancylostoma caninum*, visando no futuro obter uma metodologia para a aplicação biotecnológica dessas estruturas no controle de geohelmintos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O *Ancylostoma* spp

Apesar de serem os animais domésticos considerados como “melhores amigos do homem”, os cães podem ser reservatórios de alguns agentes infecciosos, como parasitas intestinais, bactérias, fungos e vírus, trazendo risco para a saúde humana ao ser uma fonte potencial de contaminação. Nesse sentido, os cães e os gatos são hospedeiros primários de variados parasitos, podendo afetar a sua saúde e o seu bem-estar. Esses parasitos podem ser específicos de uma espécie ou podem parasitar outros hospedeiros, incluindo os humanos e ressalta-se aqui a que a maioria destes parasitos é geohelmintos, ou seja, com desenvolvimento no ambiente externo. Dentre esses, destaca-se o geohelminto *Ancylostoma* spp., potencialmente zoonótico (DANTAS-TORRES & OTRANTO, 2014).

No gênero *Ancylostoma*, as espécies *A. caninum* e o *A. braziliense* possuem maior prevalência e risco de contaminação direta do solo pelas fezes de animais infectados com larvas infectantes-L₃ (MELLO et al., 2014). Miranda et al. (2015) registraram a contaminação do solo por larvas de *Ancylostoma* sp., em áreas de recreação das escolas estudadas. No Rio Grande do Sul, Prestes et al. (2015) relata que das amostras analisadas, 41% eram positivas e que em todas as praças avaliadas foram encontradas associações de mais de um gênero de parasitos, sendo a mais frequente *Toxocara* spp./superfamília Strongyloidea (possíveis ancilostomídeos). Seus resultados comprovaram a contaminação do solo das dez praças públicas avaliadas, especialmente por geohelmintos. Também foi relado no estado do Espírito Santo, por Maciel et al. (2016) que dentre os parasitos encontrados na cidade de São Mateus, o de maior frequência foi o *Ancylostoma* spp (77,6%).

Nos humanos, o *Ancylostoma* spp. é o responsável pela inflamação cutânea ou Larva Migrans Cutânea (LMC), infecção esta vista principalmente em “viajantes” que retornaram das praias em áreas tropicais e que por ventura estejam contaminadas por larvas deste nematóide (FIGUEREDO et al., 2005; (AHID, SUASSUNA & FILGUEIRA, 2009; ELSTON & ABEL, 2011; JOURDAN et al., 2018). A incidência de LMC é maior durante a estação chuvosa (HEUKELBACH et al., 2008). Em um estudo realizado na Argentina, em Mar del Plata, foi relatado alta prevalência de parasitos intestinais de cães ao longo do ano, com variações sazonais de acordo

com gênero e espécie do parasito. Foi constatado que ancilostomídeos (*Ancylostoma* spp.) tiveram maior prevalência no verão e outono (ANDRESIUK , SARDELLA , DENEGRÍ, 2007).

Os *A. caninum* adultos vivem no intestino de cães e gatos. Seus ovos são eliminados nas fezes e eclodem na superfície do solo em um dia e evoluem para larvas infectantes de terceiro estágio (L₃) em uma semana. Quando protegidas da luz solar e estando em ambiente quente e úmido, elas podem manter o local contaminado por vários meses. As larvas do *A. caninum* respondem à vibração do solo e por meio de seus movimentos semelhantes aos de cobra, tem sua temperatura elevada. Esse movimento característico facilita as larvas a encontrarem seu hospedeiro, e após encontrarem elas se rastejam pela pele a procura de um local adequado para penetração (HAAS et al., 2005).

No hospedeiro animal, as larvas do *A. caninum* penetram o sistema linfático e venoso causando ancilostomose. Porém nos seres humanos eles não conseguem penetrar além da pele, sendo incapazes de se desenvolverem e completar seu ciclo, sendo denominados, portanto, hospedeiros acidentais (GILLES, 2004).

Para controlar a ocorrência de larva migrans cutânea a nível comunitário, é necessário que haja tratamento anti-helmíntico regular de cães e gatos, porém em locais com poucos recursos isso raramente é viável. Os animais devem ser banidos das praias e parques infantis (HELKELBACH & FELDMEIER, 2008), mas devido à quantidade de cães errantes torna-se muito difícil o controle destes.

2.2 Nanopartículas (NP's)

A nanotecnologia é o entendimento e controle da matéria em nanoescala (1-100nm) (SHIPWAY et al., 2000). É um campo em rápido desenvolvimento devido à sua ampla gama de aplicações em ciência, nanociência e biotecnologia (CHITRA & ANNADURAI, 2014). Esta área tem por premissa conceitual tornar os processos de produção mais baratos, menos danosos ao meio ambiente e com menor consumo de energia, mesmo nas indústrias tradicionais, oferecendo produtos mais funcionais e com maior valor agregado.

Nas últimas décadas, nanopartículas metálicas com propriedades óticas e elétricas únicas têm sido amplamente investigadas. As nanopartículas de prata (AgNPs) estão entre as nanopartículas metálicas mais estudadas devido às suas

exclusivas propriedades físico-química, ótica, mecânica e magnética (ZANG et al., 2018). As propriedades intrínsecas das AgNPs são determinadas principalmente por seu tamanho, forma, composição, cristalinidade e estrutura (sólido ou poroso) (SUN et al., 2002).

Diversos estudos têm investigado os mais variados métodos de síntese química, física e biológica com o objetivo de estabelecer uma técnica que possibilite a regulação morfológica das nanopartículas de prata. Dentre os métodos disponíveis para a síntese de AgNP's, o método de "Síntese verde" ou "Biosíntese", é o mais vantajoso, pois é rentável, ecologicamente correto, reproduzível e eficiente em termos energéticos (READDY et al., 2015).

Na busca por uma biosíntese com parâmetros controlado e eficiente, sistemas biológicos como microrganismos (bactérias, fungos, algas, cianobactérias) e plantas estão sendo utilizados (YADAV et al., 2015).

Entre os sistemas citados, destacam-se os fungos, uma vez que apresentam maior facilidade no cultivo e na síntese das nanopartículas, pois o manejo da biomassa fungica é simples. O micélio fúngico pode suportar alta pressão de fluxo, agitação e outras condições no biorreator em comparação com os outros microrganismos e plantas (ALGHUTHAYMI et al., 2015).

A viabilidade econômica é outra vantagem que se destaca na utilização de fungos na síntese de NP's, visto que a síntese em larga escala é possível utilizando uma pequena quantidade de biomassa (CHOWDHURY et al., 2014; GHAREIB et al., 2016). Fungos filamentosos produzem uma grande quantidade de enzimas extracelulares e compostos orgânicos, necessárias para a síntese de nanopartículas (MOAZENI et al., 2012; BASAVARAJA et al., 2008).

De acordo com BASAVARAJA et al. (2008) e KHAN et al. (2017), as nanopartículas sintetizadas fora da célula fúngica são desprovidas de componentes celulares e, portanto, podem ser usadas diretamente para diferentes aplicações biológicas como: antibacteriano, antifúngico, antiparasitário, antiviral, antidermatofítica, anti-inflamatório, antitumoral, hepatoprotetor, citotóxico e imunomodulador.

2.3. Fungos nematófagos

Fungos nematófagos são microfungos habitantes do solo, capazes de capturar, matar e digerir nematoides. Suas estruturas especiais do micélio, chamadas de

armadilhas, são utilizadas para capturar o parasito ou pontas de hifas para atacar ovos ou cistos dos nematoides. Em seguida eles penetram a cutícula do nematóide, seguido pela invasão e digestão. Esses fungos são naturais do ambiente e atuam nas fases pré-parasitárias contidas no ambiente externo (BRAGA et al., 2009, 2010).

De acordo com Park et al. (2012), existem cerca de 160 espécies de fungos nematófagos, inimigos naturais de nematoides. Os fungos nematófagos são divididos em três grupos principais: fungos nematófagos que utilizam suas estruturas morfológicas especializadas (armadilhas) para capturar nematoides de vida livre; fungos endoparasitas que utilizam esporos adesivos para infectar nematoides; e fungos de ovo e de cisto que com suas pontas de hifas infectam estes estágios parasitários.

Os fungos predadores produzem órgãos de captura em cultura pura, mas o processo de diferenciação das hifas em armadilhas ocorrerá dentro de 24 horas após a interação do fungo com o nematóide, e quanto maior a motilidade das larvas maior será a produção de armadilhas pelo fungo, visto que o estímulo será maior em solo com microbiota rica (Nansen et al., 1986; Braga et al., 2010a).

O primeiro grupo, dos predadores, é o grupo mais estudado e, por conseguinte, o mais utilizado no controle biológico de nematoides parasitos gastrintestinais de domésticos, reduzindo de forma efetiva a sua população tanto em condições laboratoriais quanto em condições a campo (SILVA et al., 2017). Nesse sentido a espécie *Duddingtonia flagrans*, isolado AC001 tem o mais “elencado” nas pesquisas de controle biológico, por possuir atividade predatória bem definida.

De acordo com Braga et al. (2014), estes fungos possuem a vantagem de apresentar maior potencial de industrialização e são velhos conhecidos dos pesquisadores brasileiros. Produzem até seis tipos de estruturas especializadas: hifas adesivas não diferenciadas; ramificações de hifas que sofrem anastomose, formando redes adesivas tridimensionais; ramificações adesivas, onde em algumas vezes podem se unir formando redes adesivas simples bidimensionais; nódulos adesivos; anéis constritores; e anéis não constritores (BRAGA & ARAÚJO, 2014; VILELA et al., 2016; SILVEIRA et al., 2017).

Silva et al. (2017), Silveira et al. (2017), Fernandes et al., 2017, mencionam que o fungo nematófago *D. flagrans* é o mais promissor dos controladores biológicos existentes no ambiente. Contudo, as recentes pesquisas demonstraram que esta espécie de fungo nematófago produz uma nanopartícula com “grandes” potenciais

biológicos, e dentre esses a sua possível utilização sobre L₃ de nematoides parasitos gastrintestinais.

A premissa da instalação da resistência parasitária tem sido uma constante preocupação no Brasil e no mundo. Mota et al. (2003) mencionam que o desenvolvimento rápido da resistência anti-helmíntica é uma limitação no controle efetivo das recidivas das infecções helmínticas nos animais e nesse sentido, a busca por alternativas seguras e viáveis é importante (Araújo et al., 1998; Braga et al., 2007). Nesse sentido, a utilização do manejo químico realizado com o uso de medicamentos antihelmínticos e conjuntamente com fungos nematófagos tem sido uma estratégia interessante de controle e com resultados satisfatórios (VIEIRA et al., 2016). Contudo, muito ainda deve ser estudado, como por exemplo, saber o completo mecanismo de predação destes organismos e a produção de seus “produtos”, como enzimas e ou nanopartículas e quais suas aplicações e propriedades (Soares et al., 2017).

2.4 Ensaio de citotoxicidade

O teste do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) é um teste utilizado para avaliar viabilidade celular.

Este método baseia-se na redução metabólica do brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2- il)-2,5- difeniltetrazólio] (MTT) no interior da mitocôndria celular pela enzima succinato desidrogenase (NADPH), formando um composto de coloração violácea denominado de formazan. A produção de formazan reflete o estado funcional da cadeia respiratória celular, sendo proporcional ao número de células vivas (RACUSEN et al., 1999).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade nematicida de nanopartículas de prata biossintetizadas a partir do fungo *Duddingtonia flagrans*, em larvas infectantes de *Ancylostoma caninum*.

3.2 Objetivos específicos

- Analisar o melhor tempo e rotação (rpm) para a secagem das AgNPs biossintetizadas a partir do fungo *D. flagrans*.
- Verificar a solubilidade das AgNP biossintetizadas secas frente aos solventes PBS , DMSO e água ultrapura.
- Analisar a toxicidade das nanopartículas de prata biossintetizadas em células não cancerígenas de fibroblastos L929 (L929 cell line, ATCC®-CCL1™) (Cell Line Service, Rio de Janeiro, Brazil).
- Verificar a atividade nematicida *in vitro* das nanopartículas obtidas sobre L₃ de *Ancylostoma* spp.
- Comparar a atividade nematicida das nanopartículas obtidas com a atividade do fungo isolado, *D. flagrans*.
- Comparar a atividade nematicida das nanopartículas obtidas com a atividade de anti-helmínticos rotineiramente utilizados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. *Biossíntese da nanopartícula*

4.1.1. *Obtenção do filtrado fúngico*

Foi utilizado um isolado do fungo nematófago *D. flagrans* (AC001) para a produção de uma solução. Esse isolado é oriundo do solo brasileiro na localidade de Viçosa, na zona da mata mineira, MG. O fungo foi mantido em placas de 5mm à 4°C contendo Corn-Meal-Ágar 2% (CMA2%) no escuro durante 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 (*Low Nutrient Medium* - LMN), 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, 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. Foi adicionado 100mL de água ultrapura e 10 g (peso úmido) da biomassa e enriquecido com 0,1g de cascas de carrapato, fonte natural de quitina, ilustrado na Figura 1.

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 filtros com membranas 0,22µm.

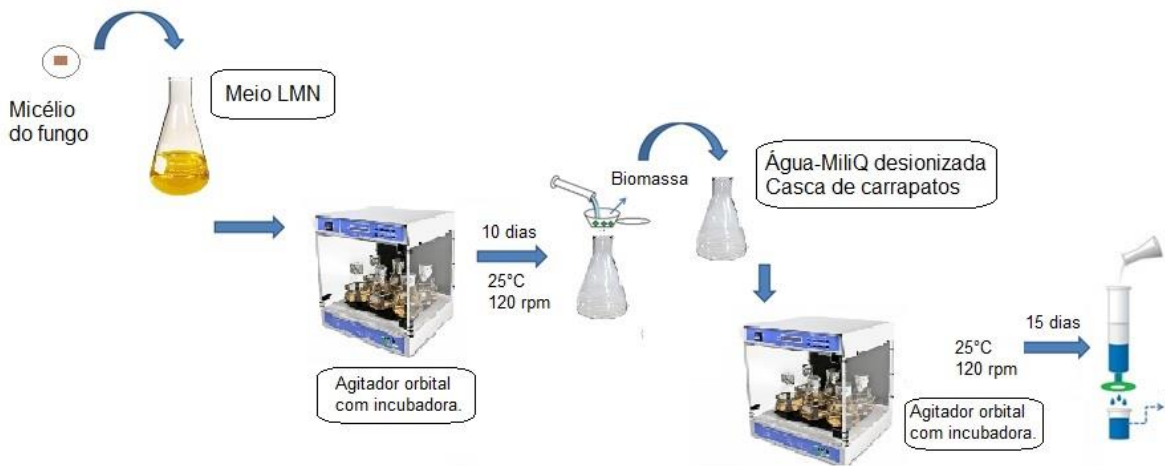


Figura 1. Processo de obtenção do Filtrado (enriquecido com cascas de carrapato-fonte natural de quitina).

4.1.2. Análise do filtrado fúngico – Teor de proteínas

O filtrado fúngico foi analisado quanto ao seu teor de proteínas totais (PT), por meio do método de Bradford. Utilizou-se Albumina sérica bovina (BSA) (98%, Sigma, Brasil) para a curva padrão e as leituras foram realizadas no espectrofotômetro UV-Vis (Espectrofotômetro Spectramax 190) a 595 nm.

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

O filtrado fúngico, foi adicionado a 100 ml de solução de AgNO_3 1mM na concentração de 1:50 e mantido em um agitador a 120 rpm, 60°C no escuro. A formação de nanopartículas de prata foi visualizada primeiramente pela alteração na cor da solução, que foi ainda confirmada por absorção óptica (UV-Vis).

4.2. Caracterização das AgNP's

4.2.1. Espectroscopia de Absorbância Ultravioleta-Visível (UV-Vis)

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.

4.2.2 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A morfologia das nanopartículas foi confirmada por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). As AgNP's foram colocadas 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).

4.2.3 Infravermelho de Fourier (FTIR)

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 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.

4.2.4 Difração de Raio – X (XRD)

As estruturas cristalinas das AgNP's biossintetizadas, foram determinadas usando difração de raios X (XRD). As amostras AgNP foram preparadas por revestimento reverso das AgNPs peletizadas em uma lâmina de vidro e varrimento na região 2θ de 30° a 80° a $0,01^\circ$ por minuto com uma constante de tempo de 2 segundos usando um D8 Advance (Bruker-axs, Billerica, MA, EUA) difratômetro de raios-X.

4.3 Secagem das AgNP's biossintetizadas

Em microtubos de 1,5mL, são adicionados 1mL da solução de AgNP. Em seguida, estes microtubos contendo a solução, são expostos à rotação em uma centrífuga de microtubos. Após a centrifugação o sobrenadante é retirado e o pellet formado é colocado em uma Placa de Petri e acondicionado em uma estufa a 60°C , por 12 horas. Posteriormente, o material é retirado da placa com o auxílio de uma lâmina de vidro.

4.4. Otimização da secagem e solubilização das AgNP biossintetizadas

4.4.1 Secagem - Análise do tempo e rotação

Adicionou-se 1mL da solução de AgNP em 15 microtubos .Em seguida, estes microtubos foram divididos em 5 grupos, contendo cada um deles 3 microtubos. Cada grupo foi submetido a diferentes velocidades de rotação (6.000 rpm, 8.000 rpm, 10.000 rpm, 12.000 rpm e 14.000 rpm). Para cada rotação aplicou-se três tempos distintos de rotação (5, 10 e 20 minutos), Figura 2. Após a centrifugação, o sobrenadante foi analisado, por meio de leitura da absorbância no UV-visível, realizada pelo espectrofotômetro UV-Vis (Espectrofotômetro Spectramax 190) a 1 nm de resolução e varredura de 200 a 600nm, para verificar a quantidade de AgNP dispersa no sobrenadante.



Figura 2: Análise do melhor tempo e rotação para a secagem das AgNP's biossintetizadas.

4.4.2 Solubilização - Análise da Ressonância Plasmônica de superfície das AgNP.

Os pellets formados na etapa anterior, após cada tempo e rotação diferente, foram solubilizados nos solventes: Água ultrapura (pH=6,0), Tampão fosfato-salino (Phosphate Buffered Saline – PBS; pH= 7,2) e Dimetilsulfóxido (DMSO; pH=8,0). Após a solubilização, foi realizada a leitura da absorbâncias das soluções em UV-visível pelo espectrofotômetro UV-Vis (Espectrofotômetro Spectramax 190) a 1 nm de resolução e varredura de 200 a 600nm, para verificar a possível alteração da morfologia das AgNPs após sua solubilização, via análise da alteração da

Ressonância Plasmônica de superfície das AgNP's. A análise foi realizada em triplicata, conforme a Figura 3.

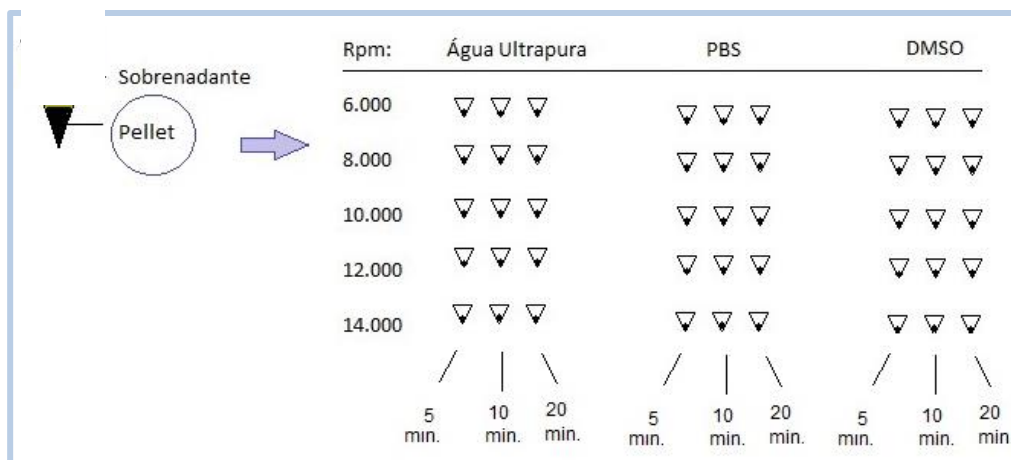


Figura 3. Análise da Ressonância Plasmônica de superfície das AgNP quando solubilizadas em diferentes solventes.

4.5. Ensaio experimental

4.5.1. Ensaio de citotoxicidade

A atividade citotóxica das AgNP's biossintetizadas a partir do fungo *D. flgrans*, das AgNP's sintetizadas quimicamente a partir da redução por Borohidreto de Sódio (BHI), do filtrado fúngico e do quimioterápico Doxorrubicina, foi avaliada em linhagem de células não cancerígenas de fibroblastos L929 (L929 cell line, ATCC®-CCL1™) (Cell Line Service, Rio de Janeiro, Brazil) pelo ensaio colorimétrico do MTT segundo Mosmann (1983).

Para os experimentos do MTT foi utilizada uma suspensão de 7×10^4 células/ml. As células foram cultivadas em placas de 96 poços, e após 24 horas de cultivo, foram expostas a diferentes concentrações das amostras diluídas no próprio meio de cultura. A seguir as placas foram incubadas por exatamente 24 horas a 37° C em atmosfera de 5% de CO₂. Doxorrubicina foi utilizada como controle positivo. Após incubação, o conteúdo de cada poço foi removido, e 100 µL de MTT (5 mg/mL) foram adicionados, seguido de incubação por 2 horas para metabolização mitocondrial pelas células vivas do MTT. A seguir, o excesso de MTT foi removido e os cristais de formazana dissolvidos com 100 µL de DMSO (Dimetilsulfóxido). A leitura da absorbância (595 nm) das placas foi feita em leitor de microplacas

(SpectraMax 190 Microplate Reader, Molecular Devices, Califórnia, USA). A viabilidade celular foi determinada por comparação dos valores de absorbância obtidos para as células tratadas com células não tratadas e o resultado expresso em IC50 em µg/mL (concentração necessária para causar a morte de 50% das células) com o auxílio de regressão linear.

4.5.2. Obtenção das L₃ de *Ancylostoma caninum*

As larvas infectantes de terceiro estágio (L₃) de *A. caninum* foram obtidas a partir de fezes frescas de cães infectados. Foi realizada a contagem de ovos por grama de fezes (OPG) de acordo com Gordon e Withlock (1939), com a finalidade de encontrar amostras positivas. Posteriormente foi realizada a coprocultura de vermiculita mantida durante 10 dias a 26 °C em uma incubadora. Após este período, as larvas ativas foram colhidas da cultura pelo Método de *Baermann-Moraes*. As L₃ foram identificadas e quantificadas segundo os critérios descritos por Bevilaqua et al. (1993), em microscópio óptico, objetiva de 10X. A leitura do Baermann demonstrou que as L₃ visualizadas eram de *A. caninum* e estavam na concentração de 13 L₃/µL.

4.5.3 Preparo da solução de conídios e clamidósporos de *D. flagrans*

Assim como no estudo de Silva et al. (2017), foi usado um isolado do fungo nematófago *D. flagrans* (AC001). Este fungo veio do Laboratório de Parasitologia do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais Gerais, Viçosa, onde foi mantido a 4 ° C protegido de luz em tubos de ensaio contendo 2% de farinha de milho. Em seguida, este isolado foi cultivado em Placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo meio Ágar a 2% durante 7 dias. Para induzir a formação de micélios, fragmentos de Ágar com aproximadamente 5 mm de diâmetro contendo micélios fúngicos e esporos foram transferidos para frascos Erlenmeyer de 250 ml contendo 150 ml de meio líquido GPY (glucose, peptona e levedura), pH 6,5, com agitação a 120 rpm, no escuro, a 26°C durante 10 dias.

Após esse período, o material fúngico cultivado foi removido com o auxílio de uma alça de platina estéril. Resíduos do meio de cultura foram removidos com o auxílio de papel filtro qualitativo, e usando a metodologia descrita por Walker e Connick (1983) e modificado por Lackey et al. (1993). A massa do micélio foi pesada para produzir pellets matriz de sódio de alginato na proporção de 5,7 g de cada dos

fungos. Os pelets contendo material fúngico de *D. flagrans* (AC001) foram inoculadas em placas de Petri (9 cm de diâmetro) contendo 2% de Ágar Dextrose de Batata (2% PDA). Estas placas foram incubadas em BOD a 25 ° C por 10 dias.

Após os 10 dias de incubação, a superfície das placas contendo o fungo já crescido foi lavada com 10 ml de água destilada. Usando uma lâmina de vidro foi realizada raspagem no ágar, tomando cuidado para não remover o inóculo inicial da placa. Então, a solução foi invertida em um becker estéril e homogeneizado (Araújo et al. 1993). Quando todos os pelets foram dissolvidos, foi removida uma alíquota de 10µl da solução e feita a contagem dos clamidósporos em uma câmara de Neubauer.

4.5.4. Análise da atividade nematicida das AgNP's biosintetizadas sobre as larvas de *Ancylostoma* spp.

Inicialmente em 27 microtubos foram adicionados 50 µL de solução das larvas L₃ de *Ancylostoma caninum* (13 L₃/µL). Em seguida estes microtubos contendo a solução de larvas L₃ foram divididos em 9 grupos:

Grupo I (Controle Negativo): Solução de larvas L₃ + 1 mL de água ultrapura;

Grupo II (Controle Positivo): Solução de larvas L₃ + 1 mL de Levamisol 22,3%;

Grupo III(Controle Positivo): Solução de larvas L₃ + 1 mL de Ivermectina 1%;

Grupo IV: Solução de larvas L₃ + 1 mL de solução de AgNO₃ (1mM);

Grupo V: Solução de larvas L₃ + 1 mL de solução de conídios e clamidósporos de *D. Flagrans* na concentração de 126 conídios/ 10 µL;

Grupo VI: Solução de larvas L₃ + 1 mL de AgNP's sintetizadas quimicamente a partir da redução por Borohidreto de Sódio (BHI);

Grupo VII: Solução de larvas L₃ + 1 mL da solução de AgNP biosintetizada na concentração de 43,40 µg/mL;

Grupo VIII: Solução de larvas L₃ + 1 mL da solução de AgNP biosintetizada na concentração de 21,70 µg/mL;

Grupo IX: Solução de larvas L₃ + 1 mL da solução de AgNP biosintetizada na concentração de 10,85 µg/mL.

Os microtubos foram colocados em um agitador de bancada permanecendo no escuro, durante 24 horas a 28°C .

Após esse período, as amostras foram colocadas em microplacas de 12 poços, sob uma placa de aquecimento à 37°C por 2 minutos. Uma alíquota de 280 µL de

cada grupo foi retirada para a contagem das larvas vivas em microscópio óptico, objetiva 10X. Os testes foram realizados em triplicata, conforme Figura 4.

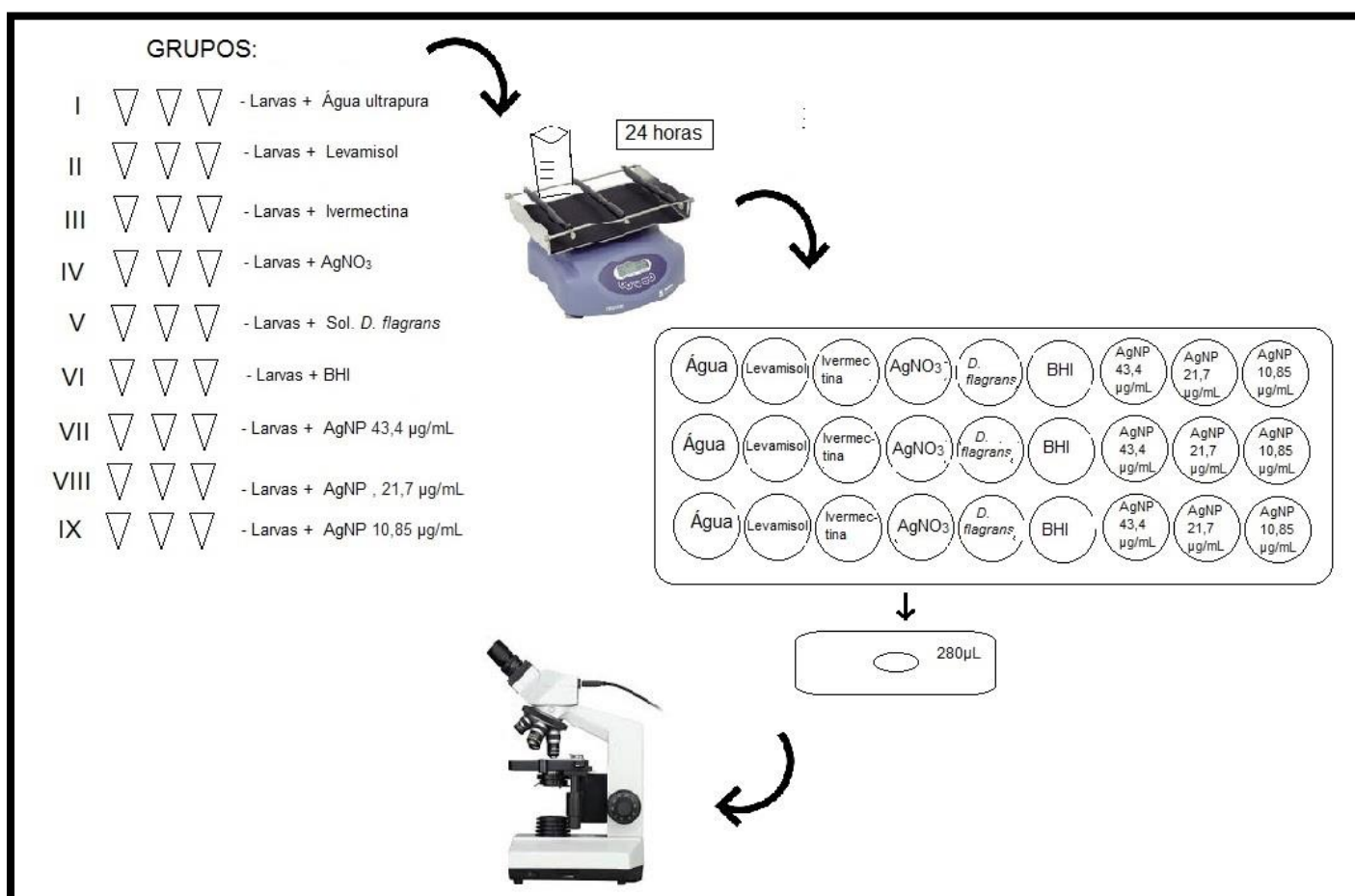


Figura 4. Análise da atividade nematicida das diferentes substâncias analisadas (água ultrapura; Levamisol, Ivermectina, solução de AgNO₃ (1mM), solução de conídios e clamidósporos de *D. Flagrans*, solução de AgNP's sintetizadas quimicamente a partir da redução por Borohidreto de Sódio (BHI), solução de AgNP biossintetizada nas concentrações 43,4 µg/mL, 21,7 µg/mL e 10,85 µg/mL) sobre as larvas L₃ de *Ancylostoma caninum*.

4.5.5 Análise ultraestrutural das larvas de *Ancylostoma spp.*

A análise ultraestrutural das larvas L₃ de *Ancylostoma spp.* foi realizada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). As larvas tratadas e controle foram lavadas em PBS e fixadas em Tampão cacodilato 0,1M por 24 h. Em seguida, foram lavadas novamente em PBS e pós-fixadas com uma solução de Tetróxido de ósmio,

OsO₄, 1% em Tampão cacodilato 0,1M adicionado de Ferrocianeto de potássio 1,25%. Os espécimes foram então lavados com Tampão Cacodilato 0,1 mol/L e Água ultrapura. Posteriormente as amostras foram desidratadas com graus crescentes de etanol (30, 50, 70, 90 e 100%) e secas por ponto crítico utilizando dióxido de carbono líquido como fluido de transição durante 15 min e seco ao ar a 25°C. O material seco foi colocado em um stub de acordo com a orientação requerida e pulverizado com ouro no metalizador, Deton Vacuum DESK V. Os espécimes revestidos de ouro foram observados utilizando Microscópio Eletrônico de Varredura (JEOL) (modelo nº. JSM – 6610LV) com tensão de aceleração de elétrons variando entre 10 e 20 quilovolts (kV).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

. A quantidade de proteínas totais presente no filtrado, de acordo com os resultados obtidos pelo método de Bradford, foi 0,80 mg/mL. Para que houvesse maior concentração de proteínas, o meio foi enriquecido com uma fonte natural de quitina (casca de carrapato), com o objetivo de aumentar a produção de quitinase, segundo o método usado por Silva et al., 2017.

A formação das nanopartículas pôde ser observada no início devido a alteração da cor da solução, que passou a ser marrom amarelada, 24h após a adição da solução de AgNO_3 ao filtrado fúngico. Basavaraja et al., (2008) afirmam que AgNP's apresentam forte absorção de ondas eletromagnéticas na faixa visível devido à ressonância plasmônica de superfície localizada (LSPR). Este fenômeno ocorre devido a oscilações coletivas dos elétrons de condução de NP's por irradiação com luz visível, portanto a formação de nanopartículas foi estabelecida pela espectroscopia UV-Vis. As AgNPs apresentam um pico característico entre 380 e 450nm. Na Figura 5 pode-se observar o pico da amostra em 408 nm.

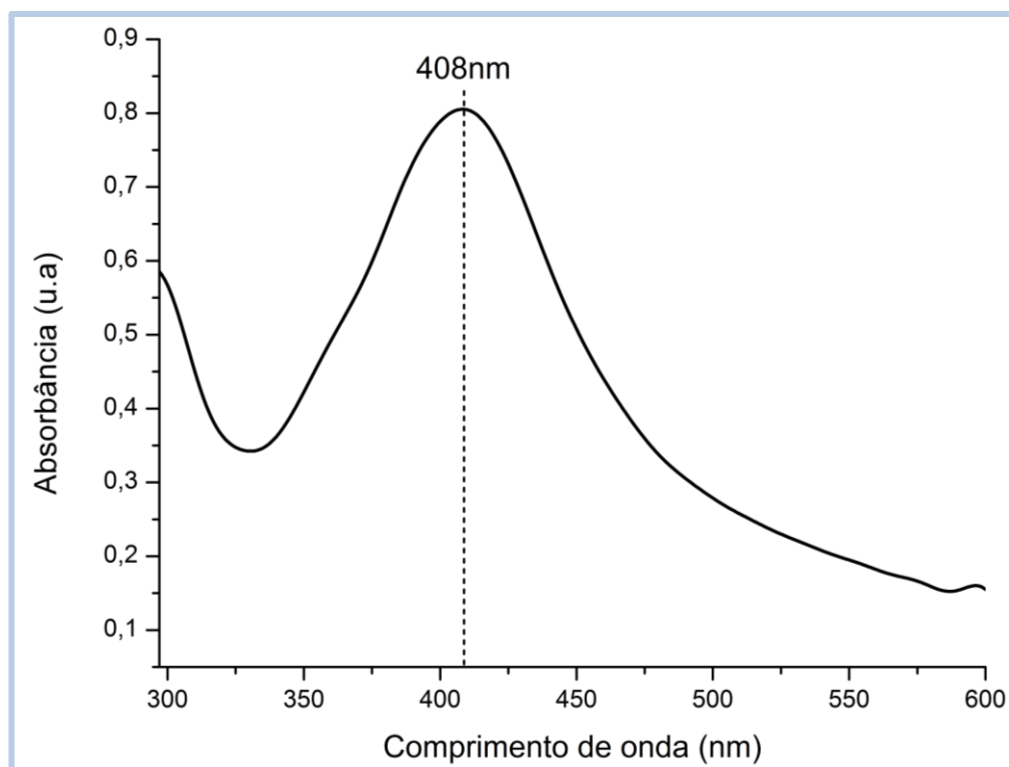


Figura 5: Absorvância das AgNPs biosintetizadas estabelecida pela espectroscopia UV-Vis.

A partir dos resultados do MET foi possível observar a forma esférica, o tamanho e monodispersão das NP's, conforme a Figura 6. Pelas imagens de MET, utilizando o programa ImageJ 1.51i, foi possível calcular a área e o diâmetro médio das NP's, 42,60 nm² e 6,94 nm respectivamente.

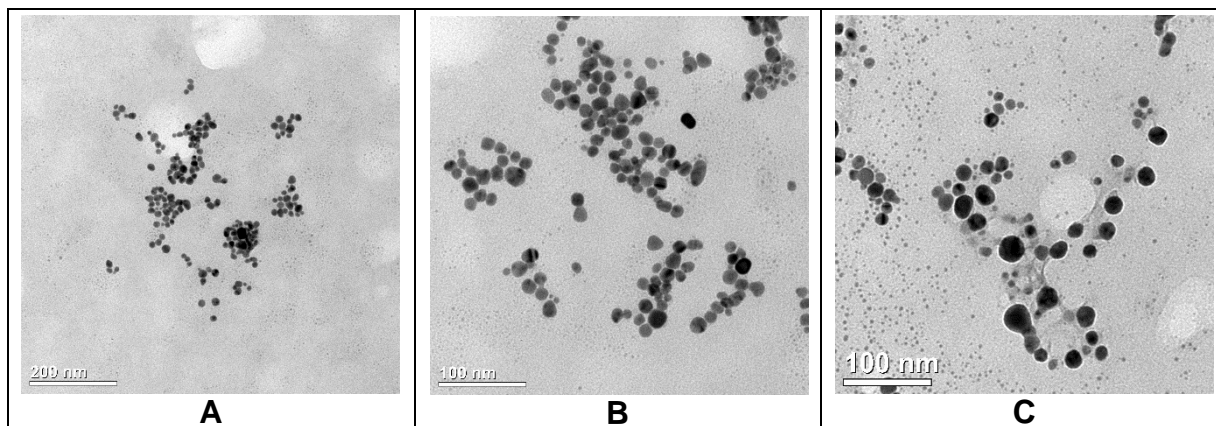


Figura 6: Imagens obtidas por MET em diferentes níveis de magnificação(A-100K, B-200K e C-300K), sendo possível observar a forma esférica, tamanho e monodispersão das AgNP's- biossintetizadas.

Para caracterização de moléculas que possam estar adsorvidas na superfície das nanopartículas biossintetizadas, foi utilizada a Espectroscopia de infravermelho transformada de Fourier (FTIR) (ȚUCUREANU et al., 2016).

Ao analisar as amostras das AgNP's biossintetizadas a partir do fungo *D. flgrans* no FTIR, Silva et al. (2017) relata a presença de duas bandas específicas de proteínas, 1640 e 1540 cm⁻¹, identificadas como amida I e amida II, respectivamente; além da banda em 2665 cm⁻¹ – característico da deformação axial O-H de ácido carboxílico e bandas de estiramento em 730 cm⁻¹ (CH₂-S-S, possivelmente referente a ligações cruzadas de dissulfeto entre o aminoácido cisteína), 1000 cm⁻¹ (C-O), 1811 cm⁻¹ (C=O de anidrido), 2100 cm⁻¹ (C≡O), 2326 cm⁻¹ (NH₂⁺) e 2665, 3600 e 3751 cm⁻¹ (O-H).

As bandas indentificados como amida I e amida II ocorrem devido a vibrações de deformação axial C=O e vibrações de deformação angular de N-H nas ligações amida das proteínas (STUART, 2004; SILVERSTEIN et al., 2007).

O FTIR das AgNPs biossintetizadas neste trabalho (Figura 7) e do filtrado utilizado para a síntese, apresentaram de forma semelhante ao estudo de Silva et al. (2017) bandas em 1640 e 1540 cm^{-1} referentes aos grupos de Amida I e Amida II; e bandas de estiramento 996 cm^{-1} (C-O).

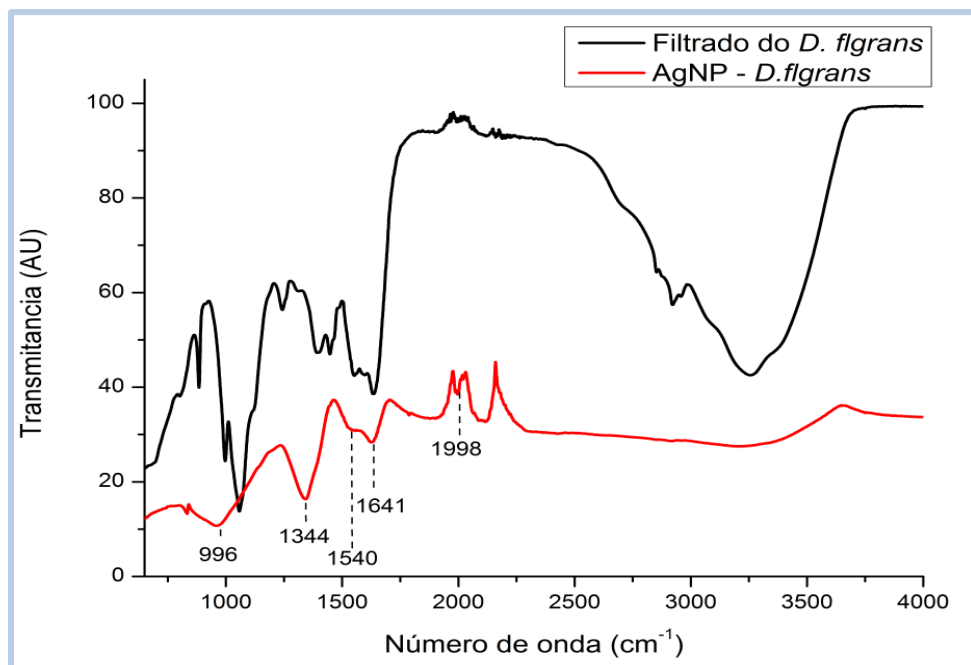


Figura7: Espectro FTIR das AgNP's biossintetizadas apresentando bandas em 1640 e 1540 cm^{-1} referentes aos grupos de Amida I e Amida II; e bandas de estiramento 996 cm^{-1} (C-O).

O padrão obtido na difração de raios X (XRD) pelas AgNP's biossintetizadas, mostrou quatro picos intensos no espectro de 2θ de 30° a 80° . O XRD ratifica a redução da Ag^+ (Prata protonada) para Ag^0 (Prata reduzida) realizada pelo filtrado fungico do *D. flgrans*.

Os dados obtidos foram então combinados com a base de dados do Joint Committee on Powder Diffraction Standards (JCPDS file No 04-0783), e observou-se que as AgNP's biossintetizadas exibiram picos de prata a $2\theta = 39^\circ$, $43,45^\circ$, $64,5^\circ$ e $77,39^\circ$, que referem-se às facetas (111), (200), (220) e (311) da prata, respectivamente (Figura 8). De acordo com Rathod et al. (2012), estes valores estão de acordo com os valores relatados para nanocristais de prata cúbicos de face centrada (fcc).

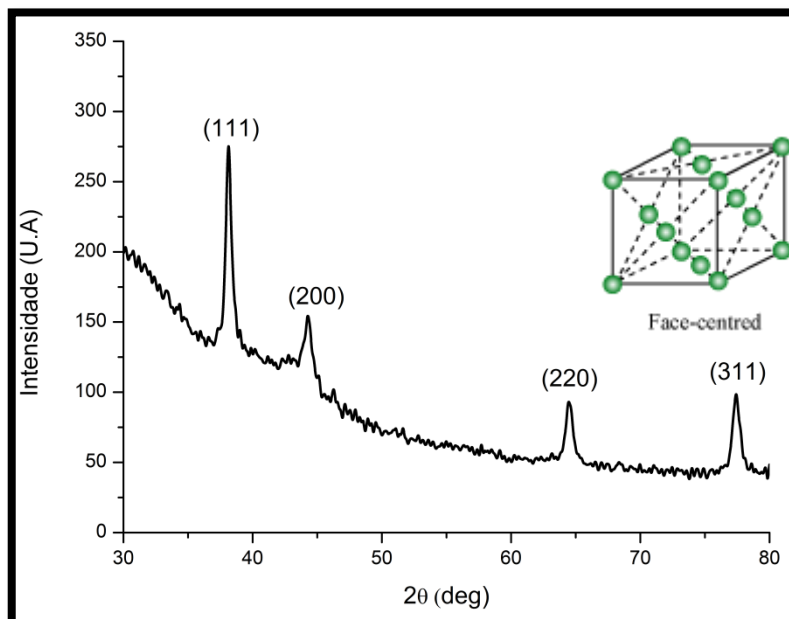


Figura 8: Análise da estrutura cristalina por DRX apresentando picos de prata a $2\theta = 39^\circ$, $43,45^\circ$, $64,5^\circ$ e $77,39^\circ$, que referem-se às facetas (111), (200), (220) e (311) da prata, respectivamente.

Visando a otimização da secagem das AgNP's biossintetizadas, foi analisado o sobrenadante da solução de AgNP's após a centrifugação em diferentes tempos e velocidade de rotação. Dessa forma, foi observado que a melhor condição rotacional foi de 12.000 rpm/20 min. Esta análise é comprovada pela concentração de AgNP's dispersas no sobrenadante, que pode ser mensurada pela intensidade do pico na leitura do UV-Visível, Figura 9.

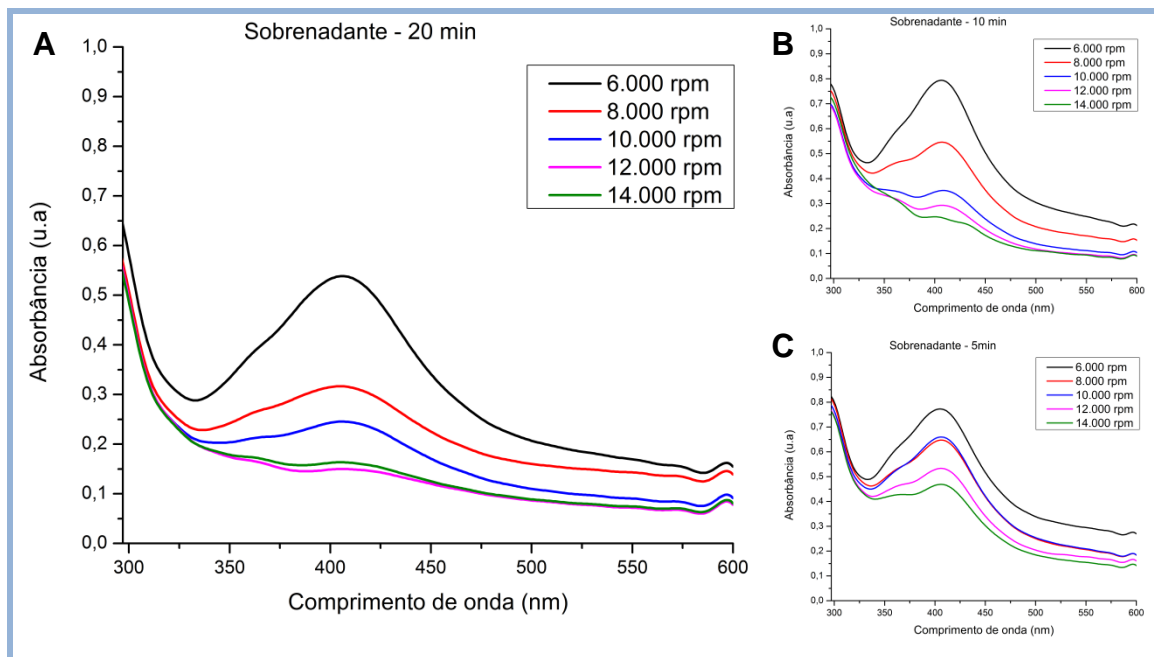


Figura 9: Otimização da secagem das AgNP's. Análise do Tempo (min.) x Velocidade de rotação (rpm), a partir de leituras UV-Vis do sobrenadante após 20 minutos de rotação (A); 10 minutos de rotação (B) e 5 minutos de rotação(C).

A solubilidade e a estabilidade das AgNP's foi testada em Água ultrapura, PBS e DMSO. No teste realizado foi possível observar que as AgNP's – *D. flagrans* solubilizadas em Água ultrapura apresentaram um pico com deslocamento de -13nm, entretanto, este manteve-se na região 380-450nm do UV-Vis. Já nas leituras das AgNP's – *D. flagrans* solubilizadas em PBS, não apresentaram pico, e nas AgNP's – *D. flagrans* solubilizadas em DMSO, embora tenham apresentado um leve pico, este não foi expressivo. Isto indica que somente em Água ultrapura as AgNP's não perderam suas propriedades físico-químicas ao serem ressuspensas.

Além disso, foi possível observar que o tempo e a velocidade de rotação aplicadas durante o processo de secagem das AgNP's podem interferir diretamente na estabilidade das AgNP's quando novamente diluídas em um solvente. Supostamente a condição de rotação 14.000 rpm/ 20min seria a melhor via de secagem das AgNP's, pois haveria uma maior quantidade de pellet formado e por consequência mais AgNP's disponíveis. Entretanto, ao analisarmos os gráficos da Figura 7, observamos que o pico desta rotação apresenta baixa intensidade e uma

largura maior quando comparada a condição 12.000 rpm/20min. Portanto, a condição de rotação 14.000 rpm/ 20min não foi a condição de secagem que obteve melhor rendimento nem a melhor estabilidade, mas sim a condição 12.000 rpm/20min.

De acordo com Meléndrez et al (2008), a estabilidade de uma nanopartícula, depende da relação entre forças atraentes e forças repulsivas. O aumento da quantidade de nanopartículas em suspensão ou uma energia excitatória em excesso cedida ao sistema podem reduzir a distância entre as partículas, interferindo assim na estabilidade das NP's, uma vez que as forças atraentes prevaleceriam sobre as forças repulsivas, levando a formação de agregados. Quando as AgNP's se agregam, tornam-se coloides e a ressonância plasmonica de superfície é alterada, não havendo mais pico no UV-Vis na região 380-450nm (Figura 10).

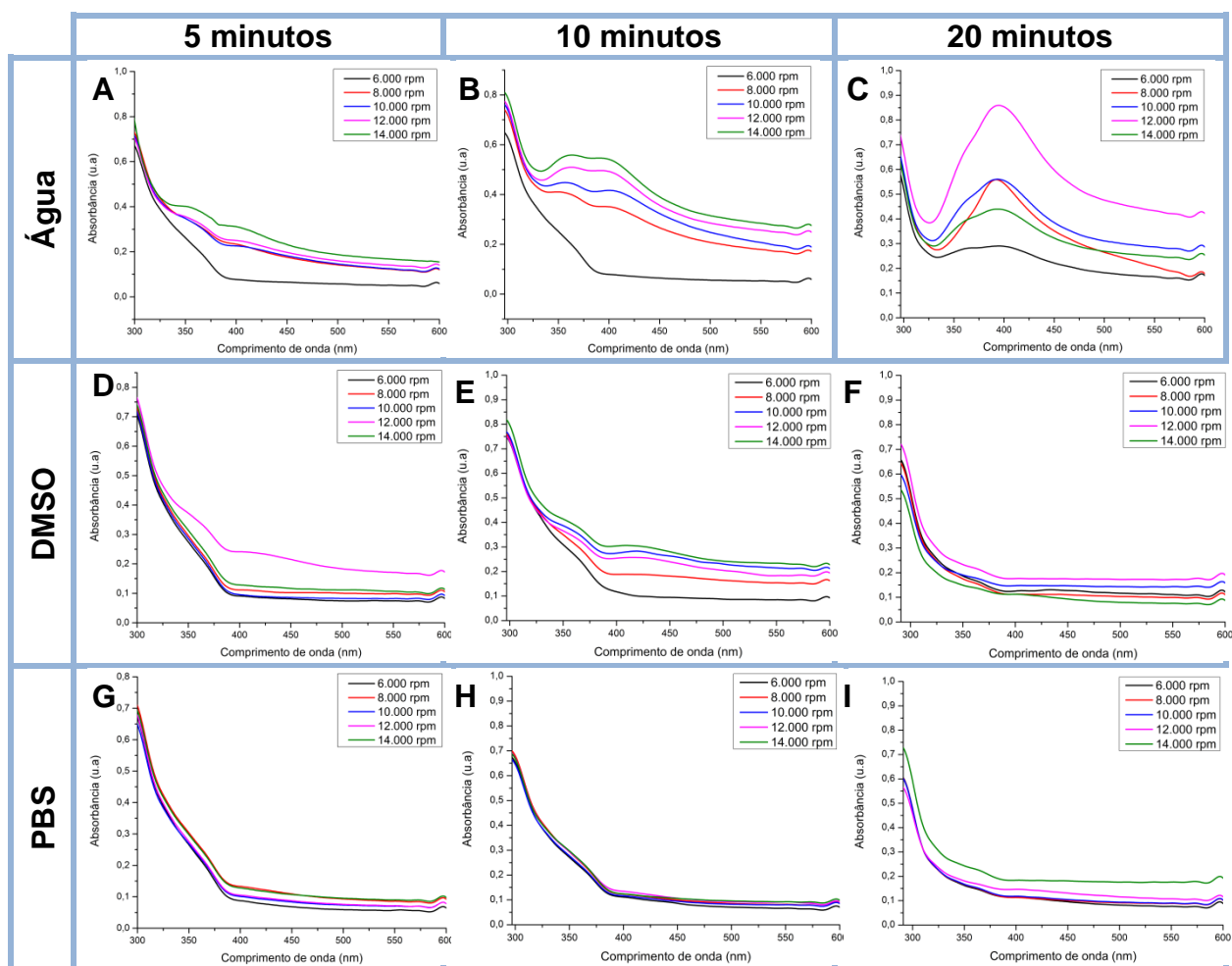


Figura 10: Análise da Ressonância Plasmônica de superfície das AgNP quando solubilizadas em diferentes solventes. A-C: Água ultrapura; D-F: DMSO e G-I: PBS.

Quanto ao ensaio de toxicidade das AgNPs em células não cancerígenas (Fibroblastos L929), o MTT revelou os seguintes IC_{50} : Doxorubicina 64.2 ± 5.2 ; Filtrado fungíco 444.1 ± 12.3 ; AgNP – Síntese química 228.2 ± 6.7 e AgNP - *D.flagrans* $43,4 \mu\text{g/mL} \pm 6.8$; como mostra a Figura 11. Este resultado indica a dose tóxica para as células saudáveis. A partir do resultado do MTT foi possível determinar a concentração máxima de AgNP - *D.flagrans* a ser utilizada nos testes.

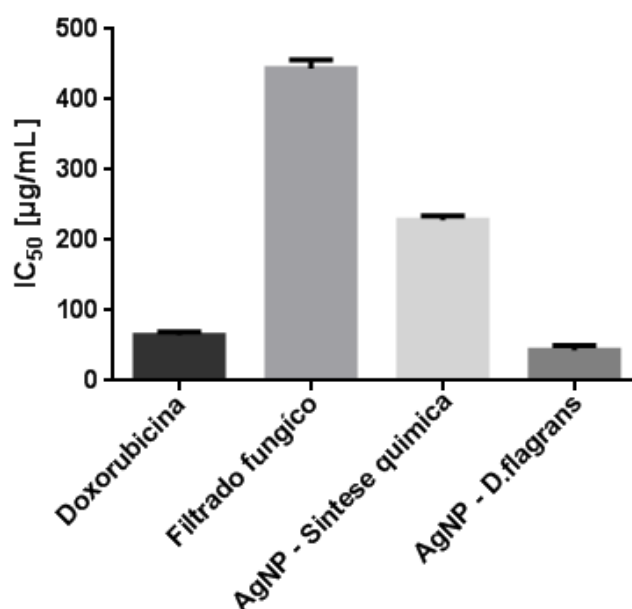


Figura 11: Toxicidade das AgNP em células não cancerígenas (Fibroblastos L929)

Os testes para verificar a atividade nematicida das AgNP's biossintetizadas em larvas de *Ancylostoma* spp. revelou que as AgNPs em todas as concentrações testadas manifestaram efeito nematicida, sendo mais eficiente que o antiparasitário Levamisol, a solução do fungo nematófago *D. flagrans*, a AgNP sintetizada quimicamente e a água ultrapura. Os resultados estão apresentados na Figura 12.

Grupo	Agentes	Larvas Vivas (%)
I	Água Ultrapura	12
II	Levamisol 5%	3
III	Ivermectina 1%	0
IV	Solução AgNO ₃	0
V	Solução <i>D. flagrans</i>	9,4
VI	AgNP – Síntese química	45
VII	AgNP – <i>D. flagrans</i> 43,4 µg/ml	0
VIII	AgNP – <i>D. flagrans</i> 21,7 µg/ml	0
IX	AgNP – <i>D. flagrans</i> 10,85 µg/ml	0

Figura 12: Contagem do número de Larvas vivas após 24h de tratamento, para avaliar o efeito nematicida dos agentes testados.

A partir dos dados obtidos, é possível observar que as AgNPs– Síntese química não ocasionou a morte de 100% das L₃ como as AgNP – *D. flagrans* causaram. Portanto, a causa da morte das larvas não foi apenas devido a prata reduzida, visto que ambas as soluções de NP's são de prata. Provavelmente a eficácia da solução das as AgNP – *D. flagrans* deve-se a presença de proteínas do *D. flagrans* adsorvidas em sua superfície que facilita a penetração da nanopartícula no nematoide. Silva et al. (2017) sugere que a proteína presente na superfície da AgNP biosintetizada pelo filtrado fungico do *D. flagrans* é a quitinase.

Análises quanto ao efeito das AgNP's na cutícula do nematoide foram realizadas, a partir de imagens obtidas pela Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Na Figura 8 é possível observar que quando as larvas são expostas aos antiparasitários Ivermectina e Levamisol, não há alterações visuais em sua cutícula; uma vez que estes medicamentos agem nos receptores GABAérgicos e provocam uma paralisia espástica nos nematoides, determinando uma contração muscular

estável, respectivamente, o que facilita a eliminação do parasito, e portanto não agem na cutícula do parasita (WALKER et al., 1992; KÖHLER, 2001).

A resistência antiparasitária pode ser explicada pela teoria da evolução na qual havia na população original de parasitos alguns indivíduos com capacidade genética de sobreviver ao tratamento. Como o fármaco antiparasitário elimina todos os indivíduos sensíveis, a próxima geração consistirá da progênie daqueles poucos parasitos que sobreviveram ao tratamento e muitos destes terão herdado a capacidade de sobreviver à exposição anti-helmíntica (ECHEVARRIA, 1996). Estudos in vitro testando levamisol em nematóides mostraram que a resistência aos imidotiazóis ocorre devido à alteração farmacológica dos receptores de acetilcolina (SANGSTER, 1999). Esse fato explica porque o Levamisol não foi tão eficaz como as AgNPs sobre as larvas.

Ao analisarmos as imagens das larvas tratadas com solução de AgNP e AgNP-Síntese química, também não foi observado alterações morfológicas na cutícula dos nematoides. Entretanto, as L₃ tratadas com AgNP – *D. flagrans* apresentam extensas alterações morfológicas na cutícula. Estes resultados corroboram com a hipótese da eficiência da solução das AgNP – *D. flagrans* ser devido a presença de quitinases produzidas pelo *D. flagrans* adsorvidas em sua superfície, o que facilita a penetração da nanopartícula no nematoide levando o parasita a morte. As diferenças da superfície das larvas frente aos diferentes tratamentos testados podem ser vistas na Figura 13.

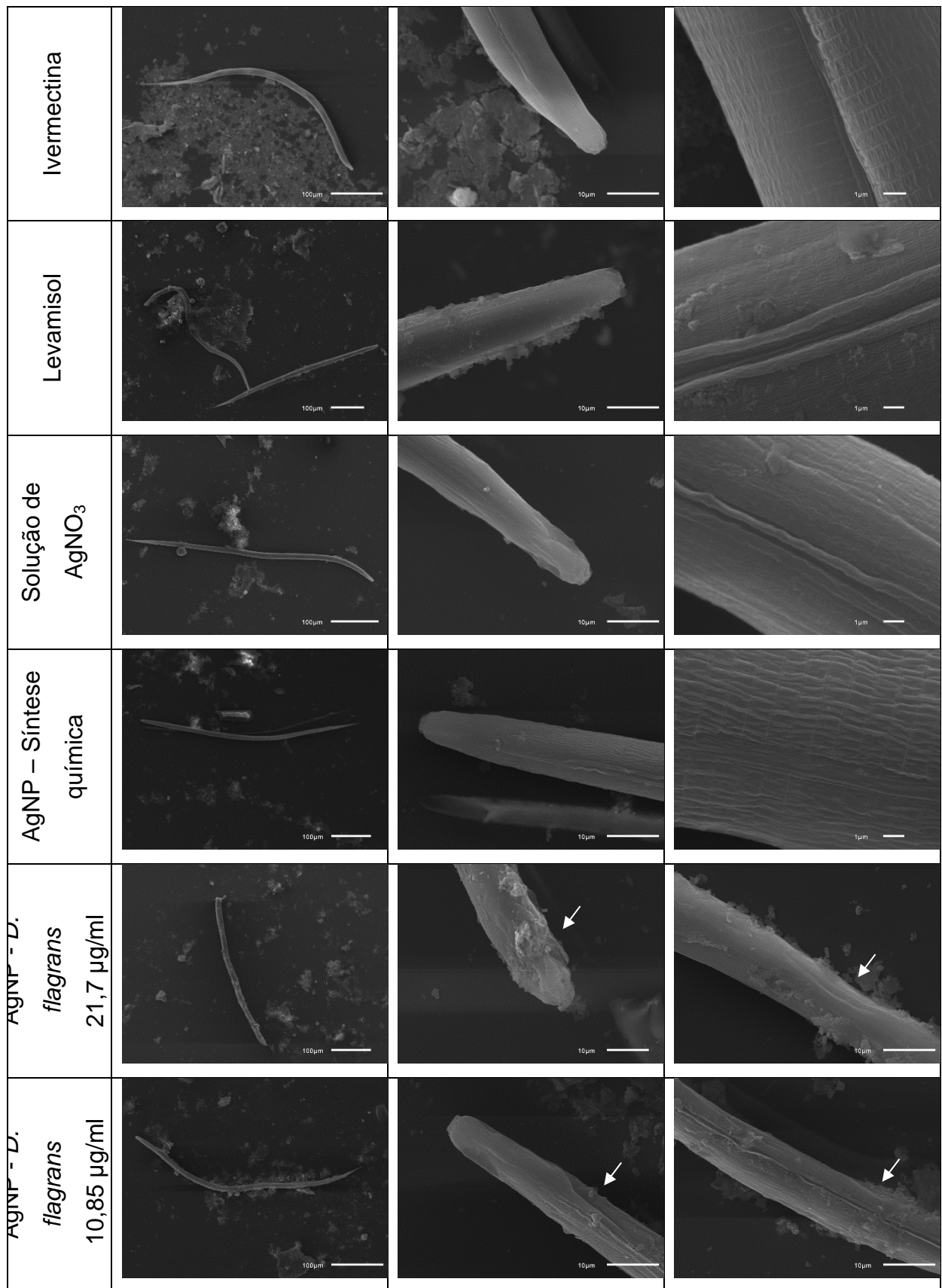


Figura 13: Microscopia Eletrônica de Varredura L₃ de *Ancylostoma caninum* tratadas com: Ivermectina; Levamisol; Solução de AgNO₃; AgNP – Síntese química; AgNP - *D. flagrans* 21,7 µg/ml e AgNP - *D. flagrans* 10,85 µg/ml.

6.CONCLUSÃO

Neste presente trabalho foi estabelecida a melhor forma de secagem e melhor solvente para as nanopartículas de prata biossintetizadas pelo filtrado fungico do *D. flagrans*. Na qual a melhor condição para secagem das AgNP's – *D. flagrans* foi a 12.000 rpm durante 20 minutos e o melhor solvente para a solubilizar as AgNPs foi a água.

A partir das imagens obtidas por MET, foi possível caracterizar a forma, tamanho e dispersão das AgNP's.

A partir do teste de MTT, obteve-se o valor de $IC_{50} = 43,4 \mu\text{g/mL} \pm 6.8$ para as AgNP's - *D. flagrans* em linhagem de células sadias (fibroblastos L929).

As AgNPs - *D.flagrans* foram muito eficazes em sua atividade nematicida, tendo resultados mais satisfatórios que a síntese química, a solução de *D. flagrans* e o Levamisol.

As imagens realizadas pelo MEV das larvas L3 de *Ancylostoma* spp. tratadas, permitiu observar alterações tegumentares nas larvas causadas pela ação das AgNP's – *D. flagrans* sob a cutícula do parasito.

A partir dos resultados obtidos quanto a ação das AgNPs - *D.flagrans* em larvas L3 de *Ancylostoma* spp. e sua toxicidade, podemos afirmar que estas nanopartículas possuem futuro promissor no tratamento de helmintíases em animais e humanos. Mais estudos devem ser realizados, visando a rota metabólica que pode ser percorrida tanto no hospedeiro, como no parasita pelas nanopartículas.

REFERÊNCIAS:

- 1- AGUIAR, A. R. ; FERRAZ, C. M. ; HIURA, E. ; GOMES, L. ; RIBEIRO, V. ; LOPES, C. G.; DEL, A. ; LACERDA NETO, T. P. ; Araújo, J. V. ; BRAGA, F.R. Gastrointestinal nematode larvae in dairy cattle bred on *Panicum maximum* cv. Mombasa Cynodon, Brachiaria mutica and Brachiaria decumbens pastures. JOURNAL OF ANIMAL AND PLANT SCIENCES, v. 31, p. 5074-5078, 2017.
- 2- AHID, S.M.M.; SUASSUNA, A.C.D.; FILGUEIRA, K.D. Fauna Parasitológica em Animais Domésticos e Exóticos no município de Mossoró-RN, BIOCÊNCIAS, Porto Alegre, v. 17, n. 1, p. 44-47, dez. 2009;
- 3- ALGHUTHAYMI, M.A.; ALMOAMMAR, H.; RAI, M.; SAID-GALIEV, E.; ABD-ELSALAM, K. A.: Myconanoparticles: synthesis and their role in phytopathogens management. Biotechnol. *Biotechnol Equip* 2015; 29: 221-236.
- 4- ALGHUTHAYMI, M.A.; ALMOAMMAR, H.; RAI, M.; SAID-GALIEV, E.; ABD-ELSALAM, K. A.: Myconanoparticles: synthesis and their role in phytopathogens management. Biotechnol *Biotechnol Equip*. 2015;29(2):221–236.
- 5- ANDRESIUK, V., SARDELLA, N ., DENEGRÍ, G.: Seasonal fluctuations in prevalence of dog intestinal parasites in public squares of Mar del Plata city, Argentina and its risk for humans. *Rev Argent Microbiol* 2007, 39:221–224.
- 6- ARAÚJO, J.V.; SANTOS, M.A.; FERRAZ, S.; MAIA, A.S.: Antagonistic effect of predacious Arthrobotrys fungi on infective Haemonchus placei larvae. *J Helminthol* 67:136–138, 1993.
- 7- BASAVARAJA, S.; BALAJIA, S.D.; ARUNKUMAR, L.; RAJASAB A.H.; VENKATARAMANA, A.: Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium semitectum*. *Mater. Res. Bull.*, 43(5):1164–1170., 2008.
- 8- BEVILAQUA, C. M. L.; RODRIGUES, M. L.; CONCORDET, D. Identification of infective larvae of some common nematode strongylids of horses. *Revue Médecine*

- Véterinaire, v. 144, n. 12, p. 989-995, 1993.
- 9- BRAGA, F. R.; ARAÚJO, J. V.; CAMPOS, A. K.; CARVALHO, R. O.; SILVA, A. R.; TAVELA, A. O.; MACIEL, A. S.: Observação in vitro da ação dos isolados fúngicos *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* e *Verticillium chlamydosporium* sobre ovos de *Ascaris lumbricoides* (Lineu, 1758). Rev. Soc. Bras. Med. Trop., Uberaba , v. 40, n. 3, p. 356-358, jun. 2007 .
- 10- BRAGA, F.R; ARAÚJO, J.V ; ARAUJO, J. M ; SILVA, A.R ; CARVALHO, R.O ; CAMPOS, A.K . AVALIAÇÃO IN VITRO DO FUNGO PREDADOR DE NEMATÓIDES *Duddingtonia flagrans* SOBRE LARVAS INFECTANTES DE CIATOSTOMÍNEOS DE EQÜINOS. (NEMATODA: CYATHOSTOMINAE). Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, v. 18, p. 83-85, 2009.
- 11- BRAGA, F.R; SILVA, A.R. ; ARAUJO, J. M ; CARVALHO, R. O. ; ARAÚJO, J. V. ; FRASSY, L.N . Atividade predatória dos fungos nematófagos *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* e *Artrobotrys robusta* sobre larvas infectantes de *Strongyloides stercoralis*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical (Impresso), v. 43, p. 588-590, 2010.
- 12- BRAGA, F.R., de ARAÚJO, J.V., Nematophagous fungi for biological control of gastrointestinal nematodes in domestic animals; Appl Microbiol Biotechnol, Jan;98(1):71-82, 2014.
- 13- BRAGA, F.R; ARAUJO, J.M.; E SILVA, A.R.; ARAÚJO, J.V.; CARVALHO, R.O.; SOARES, F.E.F.; QUEIROZ, J. H.; GÊNIER, H.L.A. Ovicidal action of a crude enzymatic extract of fungus *Pochonia chlamydosporia* against *Ancylostoma* sp eggs. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v.44, n.1, p.116-118, 2011.
- 14- BRAGA, F.R.; ARAÚJO, J.V. DE; SOARES, F.E.DE F.; ARAUJO, J.M.; FERREIRA, S.R.; TAVELA, A. DE O.; et al .Proteolytic action of the crude extract of *Duddingtonia flagrans* on cyathostomins (Nematoda: Cyathostominae) in coprocultures. Revista Brasileira Parasitologia Veterinária,v. 22, n. 1, p. 143-146,

2013.

15- BRAGA, F.R; ARAUJO, J. M. ; ARAÚJO, J. V. ; SOARES, F.E.F ; TAVELA, A.O ; Frassy, L.N ; LIMA, W.S ; MOZER, L.R . In vitro predatory activity of conidia of fungal isolates of the *Duddingtonia flagrans* on *Angiostrongylus vasorum* first-stage larvae. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical (Impresso)*, v. 46, p. 108-110, 2013.

16- BRAGA, F. R.; SOARES, F. E. F.; GIUBERTI, T. Z.; CARMEN GARCIAS LOPES, A. D.; LACERDA, T.; AYUPE, T. D. H.; QUEIROZ, P. V.; GOUVEIA, A. D. S.; PINHEIRO, L.; ARAÚJO, A. L.; QUEIROZ, J. H.; ARAÚJO, J. V.: Nematocidal activity of extracellular enzymes produced by the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* on cyathostomin infective larvae. *Veterinary Parasitology*, v. 15, p. 214-218, 2015.

17- BUZATTI, A.; DE PAULA S.C.; MACHADO, F.M.A.; YOSHITANI, U.Y.; SPRENGER, L.K.; DALLAGASSA, DOS S.C.; MOLENTO, M.B. *Duddingtonia flagrans* in the control of gastrointestinal nematodes of horses. *Experimental Parasitology*, 2015, doi:10.1016/j.exppara.2015.07.006.

18- CHITRA, K.; ANNADURAI, G.: Antibacterial Activity of pH-Dependent Biosynthesized Silver Nanoparticles against Clinical Pathogen. *Biomed Res Int* 2014; 2014:1-6.

19- CHOWDHURY S., BASU A., KUNDU S.: Green synthesis of protein capped silver nanoparticles from phytopathogenic fungus *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid with antimicrobial properties against multi-drug-resistant bacteria. *Nanoscale Res Lett*. 2014;9(1):365–376.

20- DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. : Dogs, cats, parasites, and humans in Brazil: opening the black box. *Parasites & Vectors* 2014 7:22;

- 21- DE SÁ, M. A. R., et al. Avaliação da contaminação ambiental e análise de fatores de risco envolvidos na transmissão de larva migrans cutânea em Aracaju-Sergipe. Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP, [S.l.], v. 12, n. 3, p. 57-57, mar. 2015. ISSN 2179-6645. Disponível em: <<http://revistas.bvs-vet.org.br/recmvz/article/view/24898>>. Acesso em: 21 aug. 2017;
- 22- ECHEVARRIA, F. A. M. Resistência anti-helmíntica. In: Controle de nematóides gastrintestinais em ruminantes. Terezinha Padilha (Editora), p.53-76, 1996.
- 23- ELSTON, D., ABEL, E.A.: Infestation. ACP Medicine. 2011;
- 24- FACCHINI, R.; VICTOR, J.; BRAGA, F. R.; CAMPOS, A. K.; DE CARVALHO, M. L.; ARAUJO, J. M.; AGUIAR, A. R.; FERRAZ, C. M.; FERREIRA DA SILVEIRA, W.; VALADÃO, M. C. ; DE OLIVEIRA, T ; GALVÃO DE FREITAS, S. ; ARAÚJO, J. V.: Duddingtonia flagrans formulated in rice bran in the control of Oesophagostomum spp. intestinal parasite of swine. Experimental Parasitology, v. 182, p. 0014-4894, 2017.
- 25- FERNANDES, FERNANDA MARA ; AGUIAR, ANDERSON ROCHA ; COSTA SILVA, LARYSSA PINHEIRO ; SENNA, THIAGO ; MELLO, INGRID NEY KRAMER DE ; OLIVEIRA, THAIS DE ; FREITAS, SAMUEL GALVÃO ; FERREIRA SILVEIRA, WENDEO ; BRAGA, FABIO RIBEIRO ; Araújo, Jackson Victor . Biological control on gastrointestinal nematodes in cattle with association of nematophagous fungi. BIOCONTROL SCIENCE AND TECHNOLOGY, v. 12, p. 1-9, 2017.
- 26- FIGUEREDO, S.P.; TADDEL, J.; MENEZES, J.; NOVO, N.F.; SILVA, E.S.; CRISTOVÃO, H.G. Estudo clínico-epidemiológico da toxocaríase em população infantil. Journal of Pediatric; 81; p.26-32.;2005.
- 27- FRASSY, L.N.; BRAGA; F.R., SILVA; A.R., ARAÚJO; J.V.; FERREIRA, S.R.; FREITAS, L.G.: Destrução de ovos de Toxocara canis pelo fungo nematófago *Pochonia chlamydosporia*. Rev Soc Bras Med Trop 2010; 43(1): 102-104. PMID:20305981. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822010000100024>

- 28- GHAREIB, M.; TAHON, M. A.; SAIF, M. M.; EL-SAYED ABDALLAH, W.: Rapid Extracellular Biosynthesis of Silver Nanoparticles by *Cunninghamella phaeospora* Culture Supernatant. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research : IJPR*. 2016;15(4):915-924.
- 29- GILLES HM. Soil-transmitted helminths (geohelminths). In: Cook GC, Zumla A, eds. *Manson's Tropical Diseases*, 21st edn. London: Saunders, 2004: 1527–60.
- 30- GORDON, H. M.; WHITLOCK, H. V. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. *Journal of the Council for Scientific Industrial Research*, v. 12, p. 50-52, 1939.
- 31- HAAS, W., HABERL, B., SYAFRUDDIN, IDRIS, I., KERSTEN, S.: Infective larvae of the human hookworms *Necator americanus* and *Ancylostoma duodenale* differ in their orientation behaviour when crawling on surfaces. *Parasitol Res* 2005; 95: 25–29.
- 32- HEUKELBACH, J., FELDMIEIER, H.: Epidemiological and clinical characteristics of hookworm-related cutaneous larva migrans. *Lancet Infect Dis* 2008; 8: 302–09.
- 33- HEUKELBACH, J., JACKSON, A., ARIZA, L., FELDMIEIER, H. : Prevalence and risk factors of hookworm-related cutaneous larva migrans in a rural community in Brazil. *Ann Trop Med Parasitol* 2008, 102:53–61;
- 34- HIURA, E.; LOPES, A.D.C.; PAZ, J.S.; GAVA, M.G.; FLECHER, M.C.; COLARES, M.; SOARES, F.E. DE F.; LACERDA, T.; DE ARAÚJO, J.V.; BRAGA, F.R. Fungi predatory activity on embryonated *Toxocara canis* eggs inoculated in domestic chickens (*Gallus gallus domesticus*) and destruction of second stage larvae. *Parasitology Research.*, v.114, n. 9, p. 3301-3308, 2015.
- 35- JOURDAN, P.M.; LAMBERTON, P.H.L; FENWICK, A.; ADDISS, D.G. Soil-transmitted helminth infections. *Lancet* 2018; 391: 252–65.

- 36- KATAGIRI, S.; OLIVEIRA-SEQUEIRA, T.C.G.: Zoonoses causadas por parasitas intestinais de cães e o problema do diagnóstico. *Arq. Inst. Biol., São Paulo*, v.74, n.2, p.175-184, abr./jun., 2007.
- 37- KHAN, A. U.; MALIK, N.; KHAN, M.; CHO, M. H.; KHAN, M. M.: Fungi-assisted silver nanoparticle synthesis and their applications. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2018 Jan;41(1):1-20. doi: 10.1007/s00449-017-1846-3. Epub 2017 Sep 30.
- 38- KOHANSAL, M.H.; FAZAELI, A.; NOURIAN, A.; HANILOO, A.; KAMALI, K.: Dogs' gastrointestinal parasites and their association with public health in Iran. *J Vet Res/61,189-195,2017.*
- 39- KÖHLER, P. The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. *International Journal for Parasitology*, v.31. p.336-345, 2001.
- 40- KULKARNI N., MUDDAPUR U.: Biosynthesis of metal nanoparticles: a review. *JNanotechnol.* 2014;2014:1–8.
- 41- LACKEY, B.A.; MULDOON, A.E.; JAFFE, B.A.: Alginate pellet formulation of *Hirsutella rossiliensis* for biological control of plant-parasitic nematodes. *Biol Control* 3:155–160,1993.
- 42- MACIEL, J.S.; ESTEVES, R.G.; SOUZA, M.A.A: Prevalência de helmintos em areias de praças públicas do município de São Mateus, Espírito Santo, Brasil. *Natureza on line* 14 (2): 015-022; 2016.
- 43- MANDARINO-PEREIRA, A., DE SOUZA, F.S., LOPES, C.W., PEREIRA, M.J: Prevalence of parasites in soil and dog feces according to diagnostic tests. *Vet Parasitol* 2010, 170:176– 181.

- 44- MELÉNDREZ, M.F.; CÁRDENAS, B.G.; ARBIOL, J.: Synthesis and characterization of gallium colloidal nanoparticles. *J Colloid Interface Sci.*, 346:279–287, 2010.
- 45- MELLO, I.N.; BRAGA, F.R.; MONTEIRO, T.S.; FREITAS, L.G.; ARAUJO, J.M.; SOARES, F.E.; ARAÚJO, J.V. Biological control of infective larvae of *Ancylostoma* spp. in beach sand. *Revista Iberoamericana Micologia*, v. 31, n. 2, p. 114-118, 2014;
- 46- MIRANDA, P. H. S.; BEZZERA, W. F.L.; CASTRO, T. M. B. Q. C.; GONÇALVES, L. S.: Contaminação do solo de áreas de recreação infantil de creches públicas por *ancylostoma* sp. e *toxocara* sp. em Teresina-PI. *R. Interd.* v. 8, n. 4, p. 93-98, out. nov. dez. 2015
- 47- MOAZENI M., RASHIDI N., SHAHVERDI A.R., NOORBAKHS F., REZAI 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(1):52–58.
- 48- MOSER, W.; COULIBALY, J.T.; ALI, S.M.; AME, S.M.; AMOUR, A.K.; YAPI, R.B.; ALBONICO, M.; PUCHKOV, M.; HUWYLER, J.; HATTENDORF, J.; KEISER, J. Efficacy and safety of tribendimidine, tribendimidine plus ivermectin, tribendimidine plus oxantel pamoate, and albendazole plus oxantel pamoate against hookworm and concomitant soil-transmitted helminth infections in Tanzania and Côte d'Ivoire: a randomised, controlled, single-blinded, non-inferiority trial. *Lancet Infect Dis* 2017; 17: 1162–71.
- 49- NAKKALA, J. R.; BHAGAT, E.; SUCHIANG, K.; SADRAS, S.R.: . Comparative Study of Antioxidant and Catalytic Activity of Silver and Gold Nanoparticles Synthesized from *Costus pictus* Leaf Extract. *Journal of Materials Science &*

Technology (2015), <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.imst.2015.07.002>.

- 50- NANSEN, P.; GRONVOLD, J.; HENRIKSEN, SV. AA.; WOLSTRUP, J.: Predacious Activity of the Nematode-destroying Fungus, *Arthrobotrys oligospora*, on Preparasitic Larvae of *Cooperia oncophora* and on Soil Nematodes. *Proc. Helminthol. Soc. Wash.* 53(2), 1986, pp. 237-243.
- 51- PARK, J.; KIM, S; CHOI, J.; YOON, M.; CHUNG, D.; KIM, H.J.: Biological Control by Nematophagous Fungi for Plant-parasitic Nematodes in Soils Korean. *J Soil Sci Fert.*, 45(1):74-78, 2012.
- 52- PRESTES, L. F.; JESKE, S.; SANTOS, C. V.; GALLO, M. C.; VILLELAM M.M. : Contaminação do solo por geohelminthos em áreas públicas de recreação em municípios do sul do Rio Grande do Sul (RS), Brasil. *Rev Patol Trop* Vol. 44 (2): 155-162. abr.-jun. 2015.
- 53- RACUSEN, L.C.; SOLEZ, K.; COLVIN, R.B; BONSI, S.M.; CASTRO, M.C.; CAVALLO, T.. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int.* 1999;55:713-23.
- 54- 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(1): 241-245.
- 55- REDDY, A.; CHAUHAN, R.; ABRAHAM, J.: Biosynthesis of silver and zinc oxide nanoparticles using *Pichia fermentans* JA2 and their antimicrobial property. *Appl Nanosci* (2015) 5:63–71.
- 56- ROBERTSON, I.D.; THOMPSON, R.C.: Enteric parasitic zoonoses of domesticated dogs and cats. *Microb Infect* 2002; 4:867-873.

- 57- SANGSTER, N.C.: Anthelmintic resistance: past, present and future. *International Journal for Parasitology* .**Volume** 29, Issue 1, January 1999, p. 115-124.
- 58- SANTARÉM, V.A.; GIUFFRIDA, R.; ASIN, G.A.: Larva migrans cutânea: ocorrência de casos humanos e identificação de larva de *Ancylostoma* spp em parque público do município de Taciba, São Paulo. *Rev Soc Bras Med Trop* 2004; 37:179-181.
- 59- SHIPWAY, A.N.; KATZ, E.; WILLNER, I.: Nanoparticle Arrays on Surfaces for Electronic, Optical, and Sensor Applications. *ChemPhysChem* 2000; 1:18–52.
- 60- SILVA, L.P.C.; OLIVEIRA , J. P. ; KEIJOK, W. J.; SILVA, A. R.; AGUIAR, A. R.; GUIMARÃES, M. C. C.; FERRAZ, C. M.; ARAÚJO, J.V.; TOBIAS, F.L.; BRAGA, F.R.: : Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the cell-free filtrate of nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans*. *Int J Nanomedicine*. 2017; 12: 6373–6381.
- 61- SILVA, L. P.C.; FERRAZ, C.M.; AGUIAR, A.R.; ARAÚJO, J.V.; RIBEIRO, S.R.; ROSSI, D.G.; MENDES, L. Q.; PEREIRA, F.E.L.; MOREIRA, N.I.B.; BRAGA, F.R.: Viability of *Strongyloides venezuelensis* eggs and larvae in vermiculite containing the fungus *Duddingtonia flagrans*. *Parasitol Res* DOI 10.1007/s00436-017-5502-2.
- 62- SILVEIRA, W. F ; OLIVEIRA, G. D. ; SILVA, L. A. ; CARVALHO, LORENDANE MILLENA DE ; BRAGA, F.R ; ZANUNCIO, J. C. ; Araújo, J. V. . Predation rate of nematophagous fungi after passing through the gastrointestinal tract of goats. *Small Ruminant Research*, v. 147, p. 101-105, 2017.
- 63- SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D. J.: Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, (2007).

- 64- SOARES, F.E.F. ; FREITAS, L.G. ; MORGAN, T. ; TAVARES, G. ; GENIÉR, H.L.A. ; MONTEIRO, T. S. A. ; GOUVEIA, A.S. ; SUFIATE, B. ; QUEIROZ, J.H ; BRAGA, F.R . Enhanced production of *Monacrosporium thaumasium* protease and destruction action on root-knot nematode *Meloidogyne javanica* eggs. Rhizosphere, v. 3, p. 13-15, 2017.
- 65- STUART, B.H. Infrared spectroscopy: fundamentals and applications. John Wiley & Sons, Chichester, p 49, 141, 2004.
- 66- SUN, Y.; XIA, Y.: Shape-controlled synthesis of gold and silver nanoparticles. Science. 2002 Dec 13;298(5601):2176-9.
- 67- TÁPARO, C.V., PERRI, S.H.V., SERRANO, A.C.M., ISHIZAKI, M. N., COSTA, T. P., AMARANTE, A.F.T., BRESCIANI, K. D. S.: Comparison between coproparasitological techniques for the diagnosis of helminth eggs or protozoa oocysts in dogs. Rev Bras Parasitol Vet 2006, 15:1–5.
- 68- ȚUCUREANU, V.; MATEI, A.; MARIUS A. A. : FTIR Spectroscopy for Carbon Family Study, Critical Reviews in Analytical Chemistry, (2016), 46:6, 502-520, DOI: [10.1080/10408347.2016.1157013](https://doi.org/10.1080/10408347.2016.1157013)
- 69- VIEIRA, J.N.; MAIA FILHO, F.S.; FERREIRA, G.F.; MENDES, J.F.; GONÇALVES, C.L.; VILLELA, M.M.; PEREIRA, D. I. B.; NASCENE, P. S.: Suscetibilidade *in vitro* de fungos nematófagos à antiparasitários: interações e implicações para o controle biológico. Braz. J. Biol. vol.77 no.3 São Carlos July/Sept. 2017.
- 70- VILELA, V. L. R ; FEITOSA, T. F. ; BRAGA, F. R. ; ARAÚJO, J. V. ; DOS SANTOS, A. ; DE MORAIS, D. F. ; DE OLIVEIRA SOUTO, D. V. ; ATHAYDE, A. C. R.: Coadministration of nematophagous fungi for biological control over gastrointestinal helminths in sheep in the semiarid region of northeastern Brazil. VETERINARY PARASITOLOGY, v. 221, p. 139-143, 2016.

- 71- WALKER, R.J.; CLOQUHOUM, L.; HOLDEN-DYE, L.: Pharmacological profiles of the GABA and acetylcholine receptors from the nematode, *Ascaris suum*. *Acta Biologica Hungarica*, 43 (1-4): 59-68, 1992.
- 72- WALKER, H. L.; CONNICK, W.J.; Sodium alginate for production and formulation of mycoherbicides. *Weed Sci Soc America* 31:333–338, 1983.
- 73- YADAV, A.; KON, K.; KRATOSOVA, G.; DURAN, N.; INGLE, A. P.; RA, I M.: Fungi as an efficient mycosystem for the synthesis of metal nanoparticles: progress and key aspects of research. *Biotechnol Lett.* 2015 Nov;37(11):2099-120. doi: 10.1007/s10529-015-1901-6. Epub 2015 Jul 12.
- 74- ZHANG, Z.; SHEN W.; XUE, J.; LIU, Y.; LIU, Y.; YAN, P.; LIU, J.; TANG, J.: Recent advances in synthetic methods and applications of silver nanostructures. *Nanoscale Res Lett.* 2018 Feb 18;13(1):54. doi: 10.1186/s11671-018-2450-4.