Síntese verde de nanopartículas de prata intermediada por fungo anamórfico e eficácia antibacteriana e antifúngica

Green synthesis of silver nanoparticles mediated by anamorphic fungi and antibacterial and antifungal efficacy

Dib Mady Diniz Gomes^I | Nelson Durán^{II} | Amedea Barozzi Seabra^{II} | Larissa de Paiva Silva^I |
Fabiano Brito Prado^I | Taciana de Amorim Silva^I | Maria Francisca Simas Teixeira^I

^IUniversidade Federal do Amazonas. Manaus, Amazonas, Brasil

^{II}Universidade Federal do ABC. Santo André, São Paulo, Brasil

Resumo: O objetivo deste estudo foi investigar o efeito do pH, da temperatura e da concentração de nitrato de prata (AgNO_3) na síntese de nanopartículas de prata (AgNPs) por *Aspergillus flavo-furcatis* e avaliar o respectivo potencial antimicrobiano. Um experimento fatorial 2^3 foi realizado para avaliar o efeito das condições físico-químicas na síntese de AgNPs. A caracterização das AgNPs foi realizada em espectroscopia UV-Vis e ICP-MS. A atividade antimicrobiana foi avaliada por difusão em ágar por poço e microdiluição em caldo. O pH e a concentração de AgNO_3 tiveram efeitos significativos na síntese de AgNPs nas condições experimentais. As AgNPs sintetizadas em pH 9,0 e concentração de AgNO_3 de 1,5 mM apresentaram maior eficácia contra *Staphylococcus aureus* (3,17 $\mu\text{g/mL}$), *Escherichia coli* (6,35 $\mu\text{g/mL}$) e *Candida albicans* (0,79 $\mu\text{g/mL}$). Os dados mostraram que a síntese de AgNPs por *A. flavo-furcatis* é influenciada pelo pH e pela concentração de AgNO_3 , indicando que as AgNPs sintetizadas possuem atividade antimicrobiana contra *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans*.

Palavras-chave: Amazônia. *Aspergillus*. Atividade antimicrobiana. Micossíntese.

Abstract: The aim of the present study was to investigate the effect of pH, temperature and silver nitrate (AgNO_3) concentration on the synthesis of silver nanoparticles (AgNPs) by *Aspergillus flavo-furcatis* and to evaluate its antimicrobial activity. A full factorial experiment 2^3 was carried out in order to assess the effect of physicochemical conditions on AgNP synthesis. The characterization of AgNPs was done through UV-Vis and ICP-MS spectroscopy. The antimicrobial activity was assessed by agar well diffusion and broth microdilution. pH and AgNO_3 concentration had significant effects on the AgNP synthesis under experimental conditions. AgNPs synthesized at pH 9,0 and 1,5 mM AgNO_3 showed increased efficacy against *Staphylococcus aureus* (3,17 $\mu\text{g/mL}$), *Escherichia coli* (6,35 $\mu\text{g/mL}$) and *Candida albicans* (0,79 $\mu\text{g/mL}$). These data support that AgNP synthesis by *A. flavo-furcatis* is influenced by pH and by AgNO_3 concentration, suggesting that AgNPs have antimicrobial activity against *S. aureus*, *E. coli* and *C. albicans*.

Keywords: Amazon. *Aspergillus*. Antimicrobial activity. Mycosynthesis.

GOMES, D. M. D., N. DURÁN, A. B. SEABRA, L. P. SILVA, F. B. PRADO, T. A. SILVA & M. F. S. TEIXEIRA, 2020. Síntese verde de nanopartículas de prata intermediada por fungo anamórfico e eficácia antibacteriana e antifúngica. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Naturais** 15(2): 433-443. DOI: <http://doi.org/10.46357/bcnaturais.v15i2.332>.

Autor para correspondência: Dib Mady Diniz Gomes. Universidade Federal do Amazonas. Instituto de Ciências Biológicas. General Rodrigo Otávio Jordão Ramos, 6200 – Coroado I. Manaus, AM, Brasil. CEP 69080-900 (dibmady@gmail.com).

Recebido em 29/02/2019

Aprovado em 19/06/2019

Responsabilidade editorial: Fernando da Silva Carvalho-Filho

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a síntese ou a nanotecnologia verde, que associa procedimentos biológicos com físicos e químicos, tem sido explorada para obtenção de novos materiais antimicrobianos, como as nanopartículas de prata (AgNPs). Entre as rotas empregadas para síntese verde de AgNPs estão o uso de biomoléculas oriundas de plantas e microrganismos (Roy *et al.*, 2013; Syafiuddin *et al.*, 2017). Essa nanotecnologia de segunda geração está voltada para o desenvolvimento de processos limpos que utilizam produtos não tóxicos e ambientalmente benignos, condições que reduzem os possíveis riscos ao meio ambiente e à saúde humana (Malmann *et al.*, 2015; Abdelghany *et al.*, 2018).

Dados da literatura têm revelado a forte atividade de AgNPs contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo cepas multirresistentes. Além disso, também são consideradas como potenciais agentes antifúngicos biocompatíveis e econômicos. O efeito antimicrobiano de AgNPs e seus nanomateriais está em evidência, essencialmente devido à crescente resistência microbiana aos antibióticos, além da eficácia na profilaxia da colonização bacteriana de próteses e cateteres (Panáček *et al.*, 2009; Roy *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2017; Silva-Vinhote *et al.*, 2017).

Entre os microrganismos e outros recursos biológicos disponíveis, os fungos são mais adequados para síntese de AgNPs, visto que apresentam fácil manuseio e sintetizam grande quantidade de biocompostos, como proteínas que contribuem para alta produtividade e estabilidade das nanopartículas. Além disso, se comparados às plantas e a outros microrganismos, a biomassa resiste a ambientes severos. Consequentemente, são alternativas eficazes à síntese química, ganhando considerável popularidade para a síntese verde de AgNPs (Keat *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2017).

Diferentes fungos são citados na síntese de nanopartículas, como *Aspergillus niger* Tiegh 1867 (Chengzheng *et al.*, 2018), *Cladosporium sphaerospermum* Penzig 1882 (Abdel-Hafez *et al.*, 2016), *Fusarium oxysporum* Schlechtendal 1824 (Husseiny *et al.*, 2015), *Penicillium*

nalvogiense Laxa 1932 (Maliszewska *et al.*, 2014) e *Trichoderma harzianum* Rifai 1969 (Ahluwalia *et al.*, 2014).

Com base na ação das AgNPs e na eficiência dos fungos, esta pesquisa teve como objetivo investigar a influência de fatores físico-químicos na síntese de nanopartículas de prata, utilizando *Aspergillus flavo-furcatis* Batista & H. Maia 1955, uma linhagem do ecossistema amazônico, e a respectiva atividade antimicrobiana desses nanomateriais.

MATERIAL E MÉTODOS

MICRORGANISMO

Neste estudo, a espécie selecionada foi *Aspergillus flavo-furcatis* DPUA 1540, cedida pela Coleção de Culturas do Departamento de Parasitologia (DPUA), da Universidade Federal do Amazonas (UFAM). Para obtenção de subcultivo da cultura preservada em óleo mineral, foram retirados fragmentos da colônia, os quais foram transferidos para caldo glicosado 2% (p/v), em tubos de ensaio. Os cultivos foram mantidos a 25 °C. Após sete dias desses cultivos, foram transferidos fragmentos para ágar Czapek-Dox + extrato de levedura 0,5% (p/v) (CYA) em tubos de ensaio.

AUTENTICAÇÃO DA ESPÉCIE COM BASE NAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

Para autenticação, com base nas características morfológicas, *A. flavo-furcatis* foi cultivado em ágar Czapek-Dox (CZ), ágar Extrato de Malte (MEA) e ágar CYA (Raper & Fennel, 1977; Klich & Pitt, 1988), sendo mantido a 25 °C por sete dias.

PRODUÇÃO DA BIOMASSA

Cinco discos miceliais de um cultivo de *A. flavo-furcatis* mantido em CYA a 28 °C por sete dias foram inoculados para 250 mL de meio MGYD [extrato de malte 0,3 % (p/v), glicose 1% (p/v), extrato de levedura 0,3% (p/v) e peptona 0,5 % (p/v)], pH 7,0, em frascos de Erlenmeyer de 500 mL. A fermentação foi conduzida a 28 °C, a 180 rpm, por 96 horas. A biomassa recuperada foi lavada três vezes com água ultrapura, esterilizada (Milli-Q®) e pesada.

Aproximadamente 25 g da biomassa foram adicionados em frascos Erlenmeyer de 500 mL, contendo 250 mL de água deionizada ultrapura esterilizada, mantido a 25 °C, 180 rpm, por 72 h. O extrato aquoso foi recuperado por filtração em papel de filtro Whatman n° 01 e membrana nitrocelulósica com 0,22 µm (Silva *et al.*, 2017).

OTIMIZAÇÃO DA BIOSÍNTESE DE AGNPS

Um delineamento experimental do tipo fatorial completo 2³ com três pontos centrais foi elaborado no *software* estatístico Minitab®, versão 17.0, para avaliar o efeito do pH, da temperatura e da concentração de nitrato de prata (AgNO₃) na síntese de nanopartículas de prata por *A. flavo-furcatis* (Tabela 1). Para a síntese de AgNPs, foram transferidos 50 mL do extrato aquoso para frascos Erlenmeyer de 125 mL. Em seguida, foi adicionada solução de AgNO₃ 1 M, até atingir as concentrações de 0,5, 1,0 e 1,5 mM. O pH foi aferido para 5,0, 7,0 e 9,0 com NaOH ou HCl 1 M. Os ensaios foram mantidos a 180 rpm, por 96 horas, em ausência de luz, em diferentes temperaturas (Tabela 1) (Durán *et al.*, 2007; Manimozhi & Anitha, 2014).

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA

ESPECTROSCOPIA UV-VIS

Alíquotas de 1 mL dos ensaios foram diluídas em água deionizada (proporção 1:5, v/v) e analisadas em espectrofotômetro de duplo feixe (*Agilent Technologies*® *Cary 60*) na faixa de 200 a 800 nm, com resolução de 1 nm. Os ensaios que apresentaram picos de absorvância entre 400 a 530 nm foram considerados positivos para síntese de AgNPs (Abbasi *et al.*, 2016).

QUANTIFICAÇÃO DE PRATA TOTAL POR ICP-MS

A prata total foi quantificada em espectrofotômetro de massa por plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) (*Agilent Technologies*® 7900, Hachioji, Japan), utilizando 1 mL das amostras positivas para AgNPs, previamente digeridas a

Tabela 1. Níveis das variáveis utilizadas no experimento fatorial completo 2³ para avaliar a influência do pH, da temperatura e da concentração de AgNO₃ na síntese de nanopartículas por *Aspergillus flavo-furcatis* DPUA 1540.

Nível	pH	Temperatura (°C)	Concentração de AgNO ₃ (mM)
-1	5,0	25	0,5
0	7,0	30	1,0
+1	9,0	35	1,5

90 °C por quatro horas, em ácido nítrico 98 % (v/v) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) (Rolim *et al.*, 2019).

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

DIFUSÃO EM ÁGAR POR POÇO

A atividade antimicrobiana das nanopartículas de prata sintetizadas foi determinada pelo método de difusão em ágar por poço contra *Candida albicans* DPUA 1706, *Escherichia coli* CBAM 001 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Inóculos de culturas bacterianas (10⁸ UFC/mL) e de levedura (10⁶ UFC/mL) foram adicionados na superfície de ágar Mueller-Hinton (MHA) e Sabouraud (SAB), respectivamente. Em cada placa, foram transferidos 100 µL da solução de AgNPs sintetizadas para poços de 8 mm, feitos na superfície do ágar. Como controle positivo, foram utilizadas soluções de estreptomicina e itraconazol (50 µg/mL) para bactérias e leveduras, respectivamente. Os experimentos foram realizados em triplicata e mantidos a 37 °C por 24 h, sendo, então, verificada a formação de halos de inibição, expressos em milímetros (Silva *et al.*, 2017).

MICRODILUIÇÃO EM CALDO

As AgNPs com atividade antimicrobiana significativa em meio sólido foram selecionadas para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM), pelo método de microdiluição em caldo. Em microplacas de 96 poços, as bactérias (5 × 10⁵ UFC/mL) e a levedura (2 × 10³ UFC/mL) foram expostas às nanopartículas diluídas [(1:2 até 1:1024, v/v)]. Como controle positivo, foram utilizadas

soluções de itraconazol e estreptomicina ($200 \mu\text{g/mL}$). Para o crescimento das bactérias e da levedura, as placas foram mantidas a 37°C , durante 24 h e 36 h, respectivamente. Após esse período, foram adicionados $10 \mu\text{L}$ de resazurina ($200 \mu\text{g/mL}$) em cada poço, mantidos a 37°C por duas horas para evidenciar o crescimento dos microrganismos. A alteração de cor do revelador para rosa ou azul indica o crescimento e a inibição do microrganismo, respectivamente. A CIM foi definida como a menor concentração em $\mu\text{g/mL}$ do agente onde foi observada a inibição do microrganismo. Os ensaios foram realizados em triplicata (Prado *et al.*, 2017).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados através da análise de variância (ANOVA) ao nível de 95% de significância. A análise estatística e os gráficos foram realizados utilizando-se os programas computacionais Minitab, versão 17.0, e Origin, versão 8.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

AUTENTICAÇÃO DA ESPÉCIE COM BASE NAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

Aspergillus flavo-furcatis DPUA 1540 apresentou as características morfológicas típicas do gênero e da espécie (Figura 1) sem alterações fisiológicas após preservação por dez anos em óleo mineral, característica que sugere se tratar de uma linhagem viável para ensaios biotecnológicos (Raper & Fennel, 1977).

OTIMIZAÇÃO DA SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA

A biossíntese de AgNPs por *A. flavo-furcatis* foi indicada pela mudança de coloração do extrato aquoso de incolor para tons de marrom e cinza (Figura 2), após adição de AgNO_3 . A Tabela 2 mostra os resultados dos 11 ensaios, entre os quais somente três foram positivos para mudança de coloração, característica que revela a redução total dos

Figura 1. Autenticação das características morfológicas de *Aspergillus flavo-furcatis* DPUA 1540: A) características macroscópicas de cultivos ágar CZ, MEA e CYA mantidos a 28°C após sete dias; B) célula-pé; C) estrutura de reprodução assexuada (conidióforo com vesícula globosa e conídios). Créditos da imagem: D. M. D. Gomes (2019).

Figura 2. Mudança de coloração observada nos ensaios positivos para síntese biogênica de nanopartículas de prata por *Aspergillus flavo-furcatis* DPUA 1540. Créditos da imagem: D. M. D. Gomes (2019).

íons de prata a nanopartículas e a consequente formação de uma banda de ressonância de plasmon de superfície (RPS), resultante da interação dos elétrons da superfície da nanopartícula com a luz incidente (Wei *et al.*, 2015; Biswas & Mulaba-Bafubandi, 2016). Registros na literatura também demonstraram que a solução de AgNPs obtidas por intermédio de *Aspergillus* apresentam coloração variando de marrom-escuro a cinza (Phanjom & Ahmed, 2015; Wilson *et al.*, 2016).

Tabela 2. Influência do pH, da temperatura e da concentração de AgNO₃ na síntese de AgNPs intermediada por *A. flavo-furcatis*. Legendas: + = positivo; - = negativo.

Ensaio	pH	Temperatura (°C)	Concentração de AgNO ₃ (mM)	Mudança de coloração
1	5,0	25	0,5	-
2	9,0	25	0,5	-
3	5,0	35	0,5	-
4	9,0	35	0,5	+
5	5,0	25	1,5	-
6	9,0	25	1,5	+
7	5,0	35	1,5	-
8	9,0	35	1,5	+
Ponto central	7,0	30	1,0	-
Ponto central	7,0	30	1,0	-
Ponto central	7,0	30	1,0	-

Na análise por espectroscopia UV-Vis, foram observados picos de absorvância referentes à banda de RPS das AgNPs, na faixa típica para nanopartículas de prata (400 a 530 nm) (Abbasi *et al.*, 2016). Estes dados confirmam a síntese de AgNPs nos mesmos ensaios onde foi observada a mudança de coloração (ensaios 4, 6 e 8), cujos picos de absorvância foram

de 455, 505 e 520 nm (Figura 3). Resultados semelhantes foram citados por Biswas & Mulaba-Bafubiandi (2016), em estudo realizado com *Aspergillus wentii* Wehmer 1896 que produziu AgNPs com picos máximos de absorvância a 455 nm. Contudo, registros na literatura mostram que a síntese de AgNPs intermediada por espécies de *Aspergillus*

Figura 3. Absorção UV-Vis dos ensaios realizados para verificar o efeito do pH, da temperatura e da concentração de AgNO₃ na síntese de nanopartículas de prata intermediada por *Aspergillus flavo-furcatis* DPUA 1540. Créditos da imagem: D. M. D. Gomes (2019).

comumente apresentam absorvância máxima entre 410 a 446 nm (Wilson *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2017; Solanki *et al.*, 2017; Nanda *et al.*, 2018). Na investigação de Mlalila *et al.* (2016), foi observado que AgNPs de maior tamanho apresentam um deslocamento da banda de RPS para comprimentos de onda acima de 500 nm, indicando que as AgNPs sintetizadas por *A. flavo-furcatis* apresentam maior tamanho quando comparadas a outras espécies de *Aspergillus*.

O gráfico de Pareto (Figura 4A) mostra as variáveis avaliadas e as respectivas interações que influenciaram na síntese de AgNPs intermediada por *A. flavo-furcatis*. Somente o pH e a concentração de AgNO_3 apresentaram efeitos significativos, assim como as interações destas variáveis com a temperatura ($p < 0,05$). O gráfico de contorno mostra as condições ótimas para síntese de nanopartículas de prata por *A. flavo-furcatis* (Figura 4B).

Figura 4. Análise de variância (ANOVA) do efeito do pH, da temperatura e da concentração de AgNO_3 sobre a síntese de nanopartículas de prata por *Aspergillus flavo-furcatis* DPUA 1540: A) gráfico de Pareto identificando os fatores e as interações significativos na síntese de AgNPs; B) gráfico de contorno mostrando as melhores condições de pH e a concentração de AgNO_3 ($p < 0,05$). Créditos da imagem: D. M. D. Gomes (2019).

Nas condições experimentais, a síntese máxima de AgNPs foi verificada em pH 9,0. Esses dados corroboram citações da literatura que mostram que o pH ótimo de síntese de AgNPs por outras espécies de *Aspergillus* está entre 9,0 e 10,0 (Manimozhi & Anitha, 2014; Roy & Das, 2014; Salem & Abdelkhalek, 2015; Al-Hamadani & Kareem, 2017). Em pH alcalino, há maior concentração de íons hidroxila (OH⁻) que agem como doadores de elétrons para enzima responsável pela síntese, agilizando o processo de redução de Ag⁺ a Ag⁰ (Phanjom & Ahmed, 2017). Entretanto, em faixas de pH acima de 10,0, ocorre a desnaturação das proteínas envolvidas no processo de redução da prata e consequente perda de atividade, resultando na formação de agregados e na sedimentação da prata (Edison & Sethuraman, 2012).

Além do pH, outra variável de influência significativa foi a concentração de AgNO₃, cuja condição ótima foi de 1,5 mM. Esses dados estão condizentes com registros na literatura para *Aspergillus*, onde a síntese de AgNPs é proporcional à concentração de AgNO₃, com faixa ótima entre 1,5 a 2,0 mM (El-Sayed & Ali, 2018; Omran *et al.*, 2018). Contudo,

em altas concentrações (acima de 2 mM), ocorre o esgotamento de sítios ativos das enzimas envolvidas, promovendo redução na taxa e na eficiência da síntese de AgNPs (Balakumaran *et al.*, 2016; Khan *et al.*, 2016).

A Tabela 3 mostra a quantidade total de prata (Ag⁰) nos ensaios positivos para síntese de AgNPs, quando examinados por ICP-MS. Todas as amostras apresentaram prata na sua composição, confirmando a redução da prata iônica (Ag⁺), oriundas do nitrato de prata, em AgNPs (Ag⁰) pelos biocompostos de *A. flavo-furcatis*. Os dados referentes à quantidade total de prata foram essenciais na determinação da concentração inibitória mínima (CIM).

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

As nanopartículas de prata obtidas por intermédio de *Aspergillus flavo-furcatis* apresentaram atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar por poço contra *Candida albicans*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, com halos de inibição variando de 12,0 a 19,8 mm (Tabela 4). Esses resultados estão em concordância com registros na literatura. No estudo

Tabela 3. Concentração total de prata nas soluções coloidais de AgNPs obtidas em diferentes condições de síntese intermediada por *A. flavo-furcatis*.

Amostra	pH	Temperatura (°C)	Concentração de AgNO ₃ (mM)	Concentração total de prata (g.mL ⁻¹)
Ensaio 4	9,0	35	0,5	55,1051 ± 0,004
Ensaio 6	9,0	25	1,5	118,8430 ± 0,003
Ensaio 8	9,0	35	1,5	101,5378 ± 0,002

Tabela 4. Diâmetro médio (mm) dos halos de inibição microbiana por ação das nanopartículas de prata obtidas por intermédio de *A. flavo-furcatis* DPUA 1540. Ensaio 4: pH 9,0, [AgNO₃] de 0,5 mM, 35 °C; ensaio 6: pH 9,0, [AgNO₃] de 1,5 mM, 25 °C; ensaio 8: pH 9,0, [AgNO₃] de 1,5 mM, 35 °C.

Microrganismo	Diâmetro do halo de inibição (mm) Média ± desvio-padrão		
	Ensaio 4	Ensaio 6	Ensaio 8
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	19,8 ± 0,37	18,8 ± 0,69	18,5 ± 0,76
<i>Escherichia coli</i> CBAM 001	13,0 ± 0,58	12,7 ± 0,74	12,0 ± 0,81
<i>Candida albicans</i> DPUA 1706	19,0 ± 0,82	18,0 ± 1,15	18,5 ± 1,25

de Hassan *et al.* (2015), foi demonstrado que as AgNPs sintetizadas por *Aspergillus flavus* Link 1809 inibiram o crescimento de *C. albicans*, *E. coli* e *S. aureus*. Além disso, a investigação de Rani *et al.* (2017) também evidenciou que as AgNPs de *Aspergillus terreus* Thom 1918 inibiram *E. coli* e *S. aureus*.

A concentração inibitória mínima (CIM) é definida como a menor concentração do agente antimicrobiano que inibe o crescimento do microrganismo em condições padronizadas (Prado *et al.*, 2017). Os dados referentes à CIM das soluções coloidais de AgNPs se encontram na Tabela 5. A solução coloidal de AgNPs obtida nas condições do ensaio 8 (pH 9,0, concentração de AgNO_3 de 1,5 mM e 35 °C) apresentou a menor CIM para *C. albicans*, *E. coli* e *S. aureus*, com valores de 0,79, 6,35 e 3,17 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Os resultados da atividade antimicrobiana das AgNPs de *A. flavo-furcatis* estão em concordância com os dados de Balakumaran *et al.* (2016). Estes autores observaram que as AgNPs de *A. terreus* foram mais eficientes no controle de *S. aureus* e *C. albicans* (CIM de 3,125 $\mu\text{g/mL}$) do que para *E. coli* (CIM de 12,5 $\mu\text{g/mL}$). A atividade antimicrobiana de AgNPs é amplamente relatada e atribuída à interação desses nanomateriais com compostos da membrana de microrganismos, culminando em mudanças na permeabilidade e consequente lise celular (Radzig *et al.*, 2013; Agnihotri *et al.*, 2014; Rai *et al.*, 2014; Durán *et al.*, 2016). Contudo, esse mecanismo de ação é influenciado pela composição da membrana celular dos microrganismos (Panáček *et al.*,

2009; Ottoni *et al.*, 2017), propriedade que esclarece a ação diferenciada das AgNPs avaliadas neste estudo.

Em outra investigação feita por Phanjom & Ahmed (2017) avaliando também AgNPs de *Aspergillus oryzae* (Ahlburg) Cohn 1884 sintetizadas em diferentes condições físico-químicas, foram observados efeitos antimicrobianos distintos, dados similares aos obtidos neste estudo com *A. flavo-furcatis*. As condições de síntese afetam diretamente a morfologia das nanopartículas e, conseqüentemente, a atividade antimicrobiana foi outro relato citado por esses autores.

CONCLUSÕES

Aspergillus flavo-furcatis DPUA 1540 é um viável e eficiente intermediador na síntese verde extracelular de nanopartículas de prata, processo que foi significativamente influenciado pelo pH do extrato micelial e pela concentração de nitrato de prata, assim como pela interação destes parâmetros com a temperatura. Além disso, foi evidenciada a ação antimicrobiana das nanopartículas de prata frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*, com CMI obtidas nas condições ótimas de síntese em escala laboratorial.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBiotec) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), pelo apoio técnico, científico e financeiro.

Tabela 5. Valores de concentração inibitória mínima das AgNPs sintetizadas por extrato micelial aquoso de *A. flavo-furcatis* DPUA 1540 sobre diferentes microrganismos-teste.

Microrganismo	Concentração mínima inibitória ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)		
	Ensaio 4	Ensaio 6	Ensaio 8
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	6,89	3,71	3,17
<i>Escherichia coli</i> CBAM 001	13,78	7,43	6,35
<i>Candida albicans</i> DPUA 1706	1,72	0,93	0,79

REFERÊNCIAS

- ABBASI, E., M. MILANI, S. F. AVAL, M. KOUHI, A. AKBARZADEH, H. T. NASRABADI, P. NIKASA, S. W. JOO, Y. HANIFEHPOUR, K. NEJATI-KOSHKI & M. SAMIEL, 2016. Silver nanoparticles: synthesis methods, bio-applications and properties. **Critical Reviews in Microbiology** 42(2): 173-180. DOI: <https://doi.org/10.3109/1040841X.2014.912200>
- ABDELGHANY, T. M., A. M. H. AL-RAHJI, M. A. AL-ABBOUD, M. M. ALAWLAQI, A. G. MAGDAH, E. A. M. HELMY & A. S. MABROUK, 2018. Recent advances in green synthesis of silver nanoparticles and their applications: about future directions, a review. **BioNanoScience** 8(1): 5-16. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12668-017-0413-3>
- ABDEL-HAFEZ, S. I. I., N. A. NAFADY, I. R. ABDEL-RAHIM, A. M. SHALTOUT & M. A. MOHAMED, 2016. Biogenesis and optimization of silver nanoparticles by the endophytic fungus *Cladosporium sphaerospermum*. **International Journal of Nanomaterials and Chemistry** 2(1): 11-19. DOI: <http://doi.org/10.18576/ijnc/020103>
- AGNIHOTRI, S., S. MUKHERJI & S. MUKHERJI, 2014. Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5–100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. **Royal Society of Chemistry Advances** 4(1): 3974-3983. DOI: <https://doi.org/10.1039/c3ra44507k>
- AHLUWALIA, V., J. KUMAR, R. SISODIA, N. A. SHAKIL & S. WALIA, 2014. Green synthesis of silver nanoparticles by *Trichoderma harzianum* and their bio-efficacy evaluation against *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae*. **Industrial Crops and Products** 55(1): 202-206. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.01.026>
- AL-HAMADANI, A. H. U. & A. A. KAREEM, 2017. Optimization of silver nanoparticle biosynthesis process using cell-free filtrate of *Aspergillus niger*. **Al-Qadisiyah Medical Journal** 13(23): 132. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1158-6>
- BALAKUMARAN, M. D., R. RAMACHADRAN, P. BALASHANMUGAM, D. J. MUKESHKUMAR & P. T. KALAICHELVAN, 2016. Mycosynthesis of silver and gold nanoparticles: optimization, characterization and antimicrobial activity against human pathogens. **Microbiological Research** 182(1): 8-20. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.09.009>
- BISWAS, S. & A. F. MULABA-BAFUBIANDI, 2016. Optimization of process variables for the biosynthesis of silver nanoparticles by *Aspergillus wentii* using statistical experimental design. **Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology** 7(4): 045005. DOI: <https://doi.org/10.1088/2043-6262/7/4/045005>
- CHENGZHENG, W., W. JIAZHI, C. SHUANGJIANG, M. K. SWAMY, U. R. SINNIHA, S. MOHD & A. UMAR, 2018. Biogenic synthesis, and characterization and evaluation of silver nanoparticles from *Aspergillus niger* JX556221 against human colon cancer cell line HT-29. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology** 18(5): 3673-3681. DOI: <https://doi.org/10.1166/jnn.2018.15364>
- DURÁN, N., P. D. MARCATO, G. I. H. DE SOUZA, O. L. ALVES & E. ESPOLITO, 2007. Antibacterial effect of silver nanoparticles produced by fungal process on textile fabrics and their effluent treatment. **Journal of Biomedical Nanotechnology** 3(2): 203-208. DOI: <https://doi.org/10.1166/jbn.2007.022>
- DURÁN, N., M. DURÁN, M. B. JESUS, A. B. SEABRA, W. J. FÁVARO & G. NAKAZATO, 2016. Silver nanoparticles: a new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine** 12(3): 789-799. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.11.016>
- EDISON, T. J. I. & M. G. SETHURAMAN, 2012. Instant green synthesis of silver nanoparticles using *Terminalia chebula* fruit extract and evaluation of their catalytic activity on reduction of methylene blue. **Process Biochemistry** 47(9): 1351-1357. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.04.025>
- EL-SAYED, A. S. A. & D. ALI, 2018. Biosynthesis and comparative bactericidal activity of silver nanoparticles synthesized by *Aspergillus flavus* and *Penicillium crustosum* against the multidrug-resistant bacteria. **Journal of Microbiology and Biotechnology** 28(1).
- HASSAN, M. H. A., A. M. MOHARRAM, M. A. ISMAIL & A. M. SHOREIT, 2015. Biogenic silver nanoparticles of resistant *Aspergillus flavus* AUMC 9834 against some pathogenic microorganisms and its synergistic effect with the antifungal fluconazole. **Journal of Basic and Applied Mycology** 6(1): 1-7.
- HUSSEINY, S. M., T. A. SALAH & H. A. ANTER, 2015. Biosynthesis of size controlled silver nanoparticles by *Fusarium oxysporum*, their antibacterial and antitumor activities. **Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences** 4(3): 225-231. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bjbas.2015.07.004>
- KEAT, C. L., A. AZIZ, A. M. EID & N. A. ELMARZUGI, 2015. Biosynthesis of nanoparticles and silver nanoparticles. **Bioresources and Bioprocessing** 2(1): 47-58. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40643-015-0076-2>
- KHAN, N. T., N. JAMEEL & S. U. A. REHMAN, 2016. Optimizing physioculture conditions for the synthesis of silver nanoparticles from *Aspergillus niger*. **Journal of Nanomedicine and Nanotechnology** 7(5): 1000402. DOI: <https://doi.org/10.4172/2157-7439.1000402>
- KLICH, M. A. & J. I. PITT, 1988. **A laboratory guide to the common Aspergillus species and their teleomorphs**: 1-115. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Division of Food Processing, Australia.
- MALISZEWSKA, I., A. JURASZEK & K. BIELSKA, 2014. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using Ascomycota fungi *Penicillium nalgiovense* AJ12. **Journal of Cluster Science** 25(4): 989-1004. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10876-013-0683-z>

- MALMANN, E. J. J., F. A. CUNHA, B. N. M. F. CASTRO, A. M. MACIEL, E. A. MENEZES & P. B. A. FECHINE, 2015. Antifungal activity of silver nanoparticles obtained by green synthesis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** 57(2): 165-167. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652015000200011>
- MANIMOZHI, R. & R. ANITHA, 2014. Mycosynthesis of silver nanoparticles using aqueous extract of *Aspergillus flavus* mycelium and its characterization. **International Journal of Pharmaceutics and Drug Analysis** 2(9): 734-739.
- MLALILA, N. G., H. S. SWAI, A. HILONGA & D. M. KADAM, 2016. Antimicrobial dependence of silver nanoparticles on surface plasmon resonance bands against *Escherichia coli*. **Nanotechnology Science and Application** 10: 1-9. DOI: <http://dx.doi.org/10.2147/NSA.S123681>
- NANDA, A., B. K. NAYAK & M. KRISHNAMOORTHY, 2018. Antimicrobial properties of biogenic silver nanoparticles synthesized from phyloplane fungus, *Aspergillus tamarii*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology** 16(1): 225-228. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.08.002>
- OMRAN, B. A., H. N. NASSAR, N. A. FATTHALLAH, A. HAMDY, E. H. EL-SHATOORY & N. S. EL-GHENDY, 2018. Characterization and antimicrobial activity of silver nanoparticles mycosynthesized by *Aspergillus brasiliensis*. **Journal of Applied Microbiology** 125(2): 370-382. DOI: <https://doi.org/10.1111/jam.13776>
- OTTONI, C. A., M. F. SIMÕES, S. FERNANDES, J. G. SANTOS, E. S. SILVA, R. F. B. SOUZA & A. E. MAIORANO, 2017. Screening of filamentous fungi for antimicrobial silver nanoparticles synthesis. **AMB Express** 7(1): 31. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0332-2>
- PANÁČEK, A., M. KOLÁR, R. VEČEROVA, R. PRUCEK, J. SOUKUPOVÁ, V. KRYŠTOF, P. HAMAL, R. ZBORIL & L. KVÍTEK, 2009. Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp. **Biomaterials** 30(31): 6333-6340.
- PHANJOM, P. & G. AHMED, 2015. Biosynthesis of silver nanoparticles by *Aspergillus oryzae* (MTCC No. 1846) and its characterizations. **Nanoscience and Nanotechnology** 5(1): 14-21.
- PHANJOM, P. & G. AHMED, 2017. Effect of different physicochemical conditions on the synthesis of silver nanoparticles using fungal cell filtrate of *Aspergillus oryzae* (MTCC No. 1846) and their antibacterial effect. **Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology** 8(1): 045016. DOI: <https://doi.org/10.1088/2043-6254/aa92bc>
- PRADO, F. B., W. C. ROCHA, S. R. MARTIM, M. M. ALECRIM, L. P. SILVA, L. S. C. SILVA, T. A. SILVA & M. F. S. TEIXEIRA, 2017. Produção de compostos bioativos por *Aspergillus* mantidos sob duas condições de preservação. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Naturais** 12(1): 37-47.
- RADZIG, M. A., V. A. NADTOCHENKO, O. A. KOKSHAROVA, J. KIVI, V. A. LIPASOVA & I. A. KHMEL, 2013. Antibacterial effects of silver nanoparticles on Gram-negative bacteria: influence on the growth and biofilms formation, mechanisms of action. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** 102(1): 300-306. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.07.039>
- RAI, M., K. KON, A. INGLE, N. DURÁN, S. GALDIERO & M. GALDIERO, 2014. Broad-spectrum bioactivities of silver nanoparticles: the emerging trends and future prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology** 98(5): 1951-1961. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5473-x>
- RANI, R., D. SHARMA, M. CHATURVEDI & J. P. YADAV, 2017. Green synthesis, characterization and antibacterial activity of silver nanoparticles of endophytic fungi *Aspergillus terreus*. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology** 8(4): 1000457. DOI: <https://doi.org/10.4172/2157-7439.1000457>
- RAPER, K. B. & D. I. FENNEL, 1977. **The genus *Aspergillus***: 1-686. Robert E. Krieger Co., Huntington.
- ROLIM, W. R., M. T. PELEGRINO, B. A. LIMA, L. S. FERRAZ, F. N. COSTA, J. S. BERNARDES, T. RODRIGUES, M. BROCCCHI & A. B. SEABRA, 2019. Green tea extract mediated biogenic synthesis of silver nanoparticles: characterization, cytotoxicity evaluation and antibacterial activity. **Applied Surface Science** 463(1): 66-74. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2018.08.203>
- ROY, S., T. MUKHERJEE, S. CHAKRABORTY & T. K. DAS, 2013. Biosynthesis, characterisation & antifungal activity of silver nanoparticles synthesized by the fungus *Aspergillus foetidus* MTCC8876. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures** 8(1): 197-205.
- ROY, S. & K. T. DAS, 2014. Biosynthesis of silver nanoparticles by *Aspergillus foetidus*: optimization of physicochemical parameters. **Nanoscience and Nanotechnology Letters** 6(3): 181-189. DOI: <https://doi.org/10.1166/nnl.2014.1749>
- SALEM, M. & E. ABDELKHALEK, 2015. A comparative nano biotechnological study: pH dependent biosynthesized silver nanoparticles by *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* and *Streptomyces fradiae*. **International Journal of Science and Research** 5(12): 2112-2119.
- SILVA, T. A., P. F. ANDRADE, K. SEGALA, L. S. C. SILVA, L. P. SILVA, S. V. G. NISTA, L. H. I. MEI, N. DURÁN & M. F. S. TEIXEIRA, 2017. Silver nanoparticles biosynthesis and impregnation in cellulose acetate membrane for anti-yeast therapy. **African Journal of Biotechnology** 16(27): 1490-1500. DOI: <https://doi.org/10.5897/AJB2017.16024>
- SILVA-VINHOTE, N. M., N. DURÁN, T. A. SILVA, P. V. QUELEMES, A. R. ARAÚJO, A. C. M. MORAES, A. L. S. CÂMARA, J. P. F. LONGO, R. B. AZEVEDO, D. A. SILVA, J. R. S. A. LEITE & M. F. S. TEIXEIRA, 2017. Extracellular biogenic synthesis of silver nanoparticles by actinomycetes from amazonic biome and its antimicrobial efficiency. **African Journal of Biotechnology** 16(43): 2072-2082. DOI: <https://doi.org/10.5897/AJB2017.16148>

SOLANKI, B. D., S. M. DODIA, H. R. RAMANI & D. V. PARMAR, 2017. Anti-bacterial and biogenic silver nanoparticles synthesized using fungus *Aspergillus niger*. **Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences** 6(6): 14-22.

SYAFI UDDIN, A., M. R. SALIM, A. B. H. KUEH, T. HADIBARATA & H. NUR, 2017. A review of silver nanoparticles: research trends, global consumption, synthesis, properties, and future challenges. **Journal of the Chinese Chemical Society** 64(7): 732-756. DOI: <https://doi.org/10.1002/jccs.201700067>

WEI, L., J. LU, A. PATEL, Z. S. CHEN & G. CHEN, 2015. Silver nanoparticles: synthesis, properties, and therapeutic applications. **Drug Discovery Today** 20(5): 595-601. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.11.014>

WILSON, A., S. PRABUKUMAR, G. SATHISHKUMAR & S. SIVARAMAKRISHNAN, 2016. *Aspergillus flavus* mediated silver nanoparticles synthesis and evaluation of its antimicrobial activity against different human pathogens. **International Journal of Applied Pharmaceutics** 8(4): 43-46.

ZHAO, X., L. ZHOU, M. S. R. RAJOKA, L. YAN, C. JIANG, D. SHAO, J. ZHU, J. SHI, Q. HUANG, H. YANG & M. JIN, 2017. Fungal silver nanoparticles: synthesis, application and challenges. **Critical Reviews on Biotechnology** 38(6): 817-835. DOI: <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1414141>