



JULIANA DE CASSIA SILVA PRADO

**Nanopartículas de Prata: Biossíntese, Investigação das Atividades
Antibacteriana, Antifúngica e Citotoxicidade**

LIMEIRA

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS APLICADAS

Juliana de Cassia Silva Prado

**Nanopartículas de Prata: Biossíntese, Investigação das Atividades
Antibacteriana, Antifúngica e Citotoxicidade**

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Aplicadas da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP para obtenção do título de Mestre em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo. Área de Concentração: Metabolismo e Biologia Molecular

Orientadora: Profa. Dra. Patricia da Silva Melo

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL
DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA
JULIANA DE CASSIA SILVA PRADO, E ORIENTADA PELA
PROFA. DRA. PATRICIA DA SILVA MELO

LIMEIRA

2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Aplicadas
Sueli Ferreira Júlio de Oliveira - CRB 8/2380

Si38n Silva, Juliana de Cassia, 1984-
Nanopartículas de prata : biossíntese, investigação das atividades antibacteriana, antifúngica e citotoxicidade / Juliana de Cassia Silva Prado. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Patricia da Silva Melo.
Coorientador: Priscyla Daniely Marcato.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Aplicadas.

1. Nanopartículas de prata biogênicas. 2. Atividade antimicrobiana. 3. Citotoxicidade. 4. Glutathione. 5. Concentração inibitória mínima. I. Melo, Patricia da Silva. II. Marcato, Priscyla Daniely. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Aplicadas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Silver nanoparticles: biosynthesis, investigation of antibacterial and antifungal activity and cytotoxicity

Palavras-chave em inglês:

Biogenic silver nanoparticles

Antimicrobial activity

Cytotoxicity

Glutathione

Minimal inhibitory concentration

Área de concentração: Metabolismo e Biologia Molecular

Titulação: Mestra em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo

Banca examinadora:

Patricia da Silva Melo [Orientador]

Ana Beatriz Albino de Almeida

Marcelo Bispo de Jesus

Data de defesa: 30-01-2014

Programa de Pós-Graduação: Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo

Campinas, 30 de janeiro de 2014

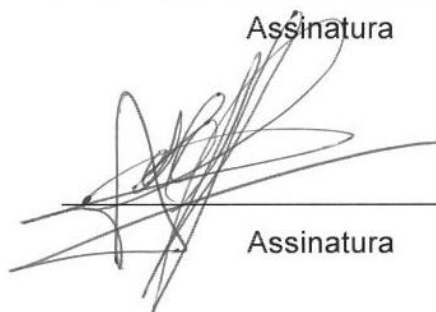
Banca examinadora

Profa. Dra. Patrícia da Silva Melo



Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Bispo de Jesus



Assinatura

Profa. Dra. Rosana Francisco Siqueira dos Santos

Assinatura

Profa. Dra. Ana Beatriz Albino de Almeida



Assinatura

Profa. Dra. Cintia Maria Cereda

Assinatura

RESUMO

Com o objetivo de entender melhor a toxicidade das nanopartículas de prata biogênicas, estas foram preparadas utilizando a rota biotecnológica e extracelular com o fungo *Fusarium oxysporum*. As nanopartículas de prata biogênicas foram caracterizadas por microscopia eletrônica de transmissão (TEM) e absorbância na região do UV/Visível. O tamanho das nanopartículas foi determinado pela técnica de análise de rastreamento de nanopartículas (NTA) utilizando o equipamento NanoSight, e por espectroscopia de correlação de fótons utilizando o equipamento ZetaSizer. O potencial zeta das partículas também foi avaliado no ZetaSizer. A atividade antimicrobiana, a citotoxicidade e os mecanismos de ação das nanopartículas de prata biogênicas em células V79 também foram investigados. A produção de nanopartículas de prata foi evidenciada pela presença da banda de absorção de plasma ($\lambda = 450$ nm) e por TEM sendo observadas partículas esféricas com o tamanho de 15-22 nm. A atividade antibacteriana e antifúngica das nanopartículas de prata foi avaliada contra *Staphylococcus aureus* (MIC $1,47 \mu\text{g mL}^{-1}$), *Salmonella typhimurium* (MIC $0,36 \mu\text{g mL}^{-1}$), *Escherichia coli* (MIC $0,73 \mu\text{g mL}^{-1}$), *Aspergillus niger* (MIC $5,90 \mu\text{g mL}^{-1}$) e *Trichophyllum rubrum* (MIC $2,95 \mu\text{g mL}^{-1}$). Além disso, a atividade bactericida das nanopartículas de prata foi diminuída na presença de glutatona reduzida, indicando que a eficácia antimicrobiana está provavelmente relacionada com a indução de estresse oxidativo. As nanopartículas de prata exibiram citotoxicidade dose dependente em células V79. Na concentração de $8,49 \mu\text{g mL}^{-1}$ as nanopartículas de prata promoveram 51% de morte celular avaliada pela redução do MTT e 37 % em ensaios de DNA. A presença de glutatona ($307,3 \mu\text{g mL}^{-1}$) aumentou em 17 % a viabilidade celular, atingindo 66% de células viáveis no ensaio MTT e em 25 % no ensaio de DNA, atingindo 88% de células viáveis. Estes resultados podem indicar que os efeitos citotóxicos induzidos pelo tratamento de nanopartículas de prata biogênicas podem estar relacionadas com o estresse oxidativo. Este efeito pode ser muito importante na terapia de câncer e de antibióticos, e também para tratamento de doenças neurodegenerativas entre outras.

Palavras-chave: nanopartículas de prata biogênicas, atividade antimicrobiana, citotoxicidade, glutatona, concentração inibitória mínima, MIC.

ABSTRACT

Aiming to understand better the toxicity of biogenic silver nanoparticles, these were prepared using biotechnological extracellular route and fungus *Fusarium oxysporum*. biogenic silver nanoparticles were then characterized by transmission electron microscopy and UV/Vis. Their size and zeta potential were determined using the nanoparticle tracking analysis software by Nanosight, photon correlation spectroscopy and zeta potential techniques. The antimicrobial activity, cytotoxicity and *in vitro* mechanism of biogenic silver nanoparticles action in V79 cells were also investigated. The biogenic silver nanoparticles production was evidenced by the presence of the plasmon absorption band ($\lambda = 450$ nm) and spherical particles with the size of 15-22 nm were obtained. The biogenic silver nanoparticles antimicrobial and antifungal activity against *Staphylococcus aureus* (MIC $1.47 \mu\text{g mL}^{-1}$), *Salmonella typhimurium* (MIC $0.36 \mu\text{g mL}^{-1}$), *Escherichia coli* (MIC $0.73 \mu\text{g mL}^{-1}$), *Aspergillus niger* (MIC $5.90 \mu\text{g mL}^{-1}$) and *Trichophyllum rubrum* (MIC $2.95 \mu\text{g mL}^{-1}$) were measured. Furthermore, the bactericidal activity of AgNP_{bio} decreased in the presence of reduced glutathione (GSH) indicating that antimicrobial effectiveness is probably related to oxidative stress induction. The biogenic silver nanoparticles exhibited cytotoxicity in some extent regarding V79 cells. At the concentration of $8.49 \mu\text{g mL}^{-1}$ biogenic silver nanoparticles provoked 51% cell death in the MTT and 37% in DNA assays. The presence of glutathione (GSH, 307.3 ng mL^{-1}) increased 17% cell viability on MTT and 25% on DNA assays. Obtained results may point out that the cytotoxic effects induced by biogenic silver nanoparticles treatment could be related to the oxidative stress. This effect can be very important in the cancer and antibiotic therapy and also for neurodegenerative and many other diseases treatments.

Keywords: biogenic silver nanoparticles, antimicrobial activity, cytotoxicity, glutathione, minimal inhibitory concentration, MIC.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

INTRODUÇÃO	21
1. Histórico da Prata como Agente Antimicrobiano	21
2. Nanotecnologia e as Nanopartículas de Prata	22
3. Métodos de Síntese de Nanopartículas de Prata	25
3.1. Método Químico de Síntese de Nanopartículas de Prata	25
3.2. Método Biológico de Síntese de Nanopartículas de Prata	26
4. Características Gerais dos Microrganismos Utilizados	27
4.1. <i>Aspergillus niger</i>	30
4.2. <i>Trichophyton rubrum</i>	32
4.3. <i>Staphylococcus aureus</i>	35
4.4. <i>Escherichia coli</i>	36
4.5. <i>Salmonella typhimurium</i>	37
5. Avaliação da Citotoxicidade	38
5.1. Células V79	39
OBJETIVOS	40
CAPÍTULO 1 – Artigo	41
Introduction	44
Matherial and Methods	45
Results and Discussion	49
Conclusions	54
References	56

RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	69
CONCLUSÃO.....	76
REFERÊNCIAS.....	77

Ofereço este Trabalho

Às pessoas mais importantes da minha vida...
...a toda a minha família, que foram o meu pilar por todo este tempo e principalmente
por terem me ensinado o que aprendi de mais importante em minha vida.

Sou muito grata a todos vocês: Minha mãe Ana, Meu pai Marcos,
Meus avós, irmã e tias Priscila e Fátima.

Aos amigos que tive o prazer de conhecer durante o mestrado
e que me ajudaram muito na realização deste projeto.

Muito obrigada!

Dedico este trabalho

Ao César Corat Ribeiro Prado

Por ter me ensinado a amar minha profissão pelo seu exemplo e ensinamentos,
por todo o amor, ajuda e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais por terem feito o impossível para que eu tivesse uma boa educação.

Ao meu marido que não poupou esforços para me ajudar em todas as fases do meu projeto.

À Daniela Ballottin pela amizade, pelas contribuições e por ter me ajudado tanto na realização deste trabalho.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Patricia da Silva Melo pelo incentivo ao mestrado, pela orientação e por ter despertado em mim a vontade em seguir a área acadêmica com as aulas-surpresa.

À Prof^a Dr^a Priscyla Marcato pela amizade, exemplo, cuidado, respeito, orientação, por ter me recebido tão bem em seu laboratório e por toda ajuda dada.

Aos funcionários e alunos do departamento de Físico-química do IQ-Unicamp por terem me recebido tão bem.

Ao grupo de pesquisa em Nanotecnologia.

À Universidade Estadual de Campinas, em especial a Faculdade de Ciências Aplicadas de Limeira.

A Deus, que me deu a vida e que me fortaleceu por todo o tempo.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ag: Prata

Ag⁺: Íon de Prata

Ag⁰: Prata metal

AgNO₃: Nitrato de Prata

AgNP: Nanopartículas de Prata

AgNP_{bio}: Nanopartículas de Prata Biogênicas

ATCC: *American Type Culture Collection*

BHI: Brain and Heart Infusion

BP: Baird Parker Agar

CFU: *Colony Forming Unit*

CIM: Concentração Inibitória Mínima

CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

DHN: Dihydroxynaphthalene

DL₅₀: Dose Letal 50%

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Deoxyribonucleic Acid

DOPA: Dihydroxyphenylalanine

ECN: Estafilococo Coagulase Negativa

ESALQ: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

GSH: Glutathione

GSSG: Glutathione Oxidada

HE: Hematoxilina-Eosina

HEPA: High Efficiency Particulate Air

HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana

IAL: *Instituto Adolfo Lutz*

IC₅₀: Half Maximal Inhibitory Concentration

IFN- γ : Interferon gama
 IL-10: Interleucina 10
 IL-6: Interleucina 6
 INT: Sal de Iodonitrotetrazolium
ITAL: Instituto de Tecnologia de Alimentos
 KCl: Cloreto de Potássio
 LST: Caldo Lauril Sulfato Triptose
MEA: Ágar Extrato de Malte
MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura
MH: Mueller-Hinton
 MIC: Minimum Inhibitory Concentration
 MTT: Methylthiazolotetrazolium
 NADP: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
 NADPH: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (Reduced)
 nm: nanômetro
 NO₂: Óxido Nítrico
 NO₃: Nitrato
 NTA: Nanoparticle Tracking Analysis
PBS: Saline Phosphate Buffer
 PCR: Polymerase chain reaction
PCS: Photon Correlation Spectroscopy
 pH: potencial hidrogeniônico
 PVP: polivinilpirrolidona
 ROS: Espécies Reativas de Oxigênio
 RPMI 1640: Medium Roswell Park Memorial Institute – 1640
SEM: Scanning Electron Microscope
TEM: Transmission electron microscopy
 TGF- β 1: Transforming growth factor beta 1
 UFC: Unidades Formadoras de Colônia
 USP: Universidade de São Paulo

UV: Ultra-Violeta

V79: Linhagem Celular de Fibroblastos de Hamster Chinês

XLD: Desoxicolato-lisina-xilose Agar

λ : lambda (comprimento de onda)

INTRODUÇÃO

1. Histórico da Prata como Agente Antimicrobiano

Desde o século XIX, a aplicação do nitrato de prata (AgNO_3) como fármaco vem sendo pesquisada. Em estudos de caso com a aplicação de solução aquosa de nitrato de prata para tratamento de pacientes com erisipela, distúrbios visuais e úlceras, foi relatada uma melhora significativa (Sem autor, 1847; Bedingfield, 1849; Solomon, 1851).

Em 1906, pesquisadores realizaram estudos experimentais a fim de comprovar a eficiência bactericida do nitrato de prata, da prata propriamente dita e de fármacos contendo o metal frente às bactérias *Streptococcus pyogenes* e *Staphylococcus aureus*, verificando-se uma excelente atividade farmacológica sobre esses microrganismos (Marshall e Macleod-Neave, 1906; Derby, 1906).

Com a eficácia do nitrato de prata como agente antimicrobiano comprovada em estudos anteriores, Marshall e Killoh (1915) testaram a prata coloidal e o nitrato de prata frente à cultura de bactérias, como *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* e *Bacillus anthracis*. A prata coloidal é uma substância a base de prata (Ag) composta de partículas extremamente pequenas, porém maiores que a maioria das moléculas normalmente variando de 0,01 a 0,001 microns de diâmetro. Neste estudo a prata coloidal foi mais eficaz do que o nitrato de prata, demonstrando um efeito bactericida e anti-séptico.

Gibbard (1933) realizou um estudo utilizando a prata coloidal para o tratamento da água, submetendo culturas de *E. coli* e *Salmonella typhimurium* ao tratamento, sendo que após duas horas, a ação bactericida da prata, frente aos microrganismos testados, foi comprovada.

Uma revolução vem acontecendo na ciência e tecnologia desde o entendimento de que os materiais em escala nanométrica podem apresentar novos comportamentos e propriedades diferentes daquelas que geralmente apresentam em escala macroscópica. Em nanoescala surgem novos fenômenos que não aparecem na macroescala. As mudanças mais importantes de comportamento são causadas não apenas pela ordem de magnitude da redução do tamanho, mas por novos fenômenos intrínsecos, observados ou que se tornam predominantes em nanoescala, e que não são necessariamente previsíveis em escalas maiores. Esta alteração de comportamento está relacionada com as forças naturais fundamentais, tais como a gravidade, atrito, eletrostática, entre outros que mudam de importância quando a escala é reduzida (Fishbine, 2002; Nicolau et al., 2000; Rieth, 2003; Galembeck, 2003).

2. Nanotecnologia e as Nanopartículas de Prata

Nanopartículas inorgânicas têm sido empregadas com grande eficácia em várias áreas das ciências biológicas, biomédicas e farmacêuticas. Devido a eficácia como substância antimicrobiana as nanopartículas de prata têm sido utilizadas na indústria têxtil, cosmética e farmacêutica, dentre outras (Gibbins e Warner, 2005; Nederberg et al., 2011).

Sabe-se que maioria dos agentes antimicrobianos utilizados comercialmente, incluindo a prata, são biocidas para grande parte dos microorganismos relevantes à área médica incluindo bactérias, fungos e leveduras. A forma de atuação destes agentes consiste em danificar a parede celular ou alterar a permeabilidade da membrana celular, desnaturar proteínas e inibir a atividade enzimática ou a síntese de lipídios, os quais são mecanismos essenciais para a sobrevivência celular (Jovietic et al., 2010; Nederberg et al., 2011). No caso de íons e nanopartículas de prata há diversas propostas na literatura sendo a mais citada a reação destas estruturas com proteínas dos microorganismos devido a forte interação da prata com os grupos

sulfidrilas (SH) das proteínas levando a inativação das mesmas (Zheng e Huang, 2004).

Atualmente vários métodos químicos e biológicos têm sido empregados em preparações de nanopartículas de prata, mas a grande dificuldade é o controle do tamanho das partículas, problema que é minimizado quando as nanopartículas são obtidas pelo método biológico (Durán et al., 2011; Mussarrat et al., 2010). Vários organismos e microrganismos são conhecidos por produzirem materiais inorgânicos extra ou intracelularmente (Durán et al., 2011). Um exemplo é o fungo *Fusarium oxysporum* (Figura 1) que quando exposto a uma solução de ouro ou prata, reduz rapidamente estes dois metais, produzindo nanopartículas altamente estáveis de dimensões entre 2 e 50 nm (Durán et al., 2005).

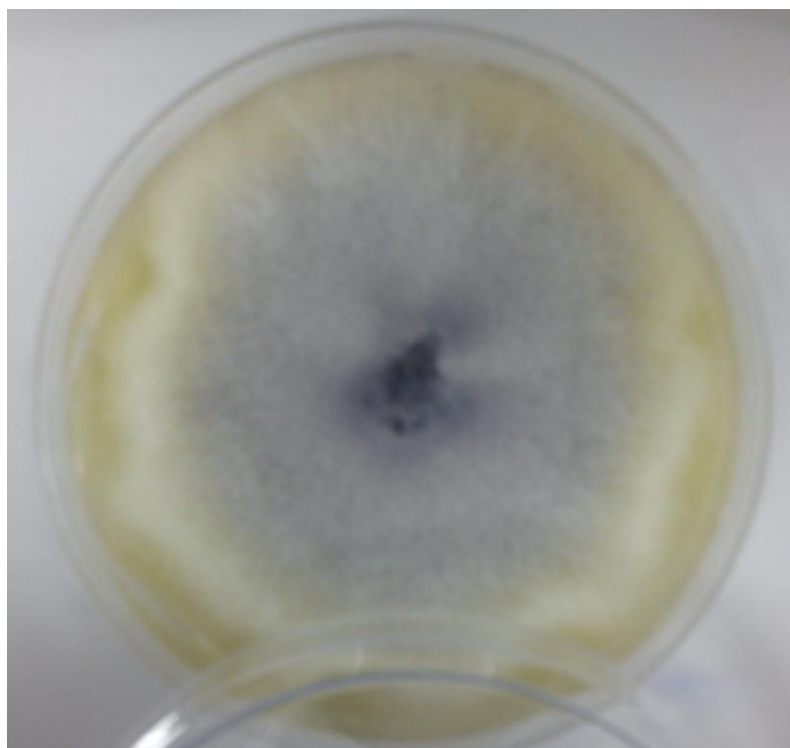


Figura 1: Característica da colônia de *Fusarium oxysporum* (551) cultivada em meio Ágar Sabouraud (Silva JC, 2013).

Dentre as diversas aplicações das nanopartículas de prata, estas têm sido impregnadas em tecidos como algodão, náilon, poliéster entre outros para a obtenção de materiais antimicrobianos (Durán et al., 2007, Xing et al., 2011; Chen e Chiang, 2011). Durán e colaboradores (2007) estudaram a impregnação de nanopartículas de prata produzidas pelo método biológico em tecidos de algodão. Os autores observaram que os tecidos impregnados com as nanopartículas apresentaram atividade antibacteriana frente à bactéria *S. aureus*, reduzindo o número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) em 99,9%.

Outra aplicação importante das nanopartículas de prata é a associação destas com outras substâncias, tais como, por exemplo, gentamicina e amoxicilina (Rai et al., 2009). Esta associação pode direcionar estes fármacos para alvos específicos, além de potencializar o seu efeito diminuindo a resistência de microorganismos (Gimenez et al., 2005). Além disso, estas partículas têm sido utilizadas no tratamento de lesões como queimaduras. Tian et al. (2007) estudaram os benefícios que as nanopartículas de prata proporcionam quando aplicadas em lesões. Neste trabalho foi verificado que o processo de cicatrização é acelerado, apresentando pouca fibrose e crescimento normal de pêlos, sendo, portanto, esteticamente viável. Além disso, no estudo do efeito da prata em citocinas (IL-6, IL-10, TGF- β 1, IFN- γ) através de análises de PCR em tempo real (RT-PCR) foi observado que as partículas além de seu poder antimicrobiano, também modulam a produção de citocinas inflamatórias, auxiliando eficientemente no processo de cicatrização (Tian et al., 2007). Eles verificaram que a prata coloidal foi mais eficiente e menos tóxica do que íons de prata no tratamento de feridas, promovendo um aumento da re-epitelização quando comparada com antibióticos. Desta forma as nanopartículas de prata têm grande potencial no tratamento de feridas, porém este pode ser melhorado pela sua associação com óxido nítrico. Estudos na literatura mostraram a eficiência do no tratamento de feridas.

Conforme citado anteriormente, as nanopartículas de prata podem ser produzidas por diferentes métodos que podem ser classificados em dois grupos principais: biológico e químico (Durán et al., 2011).

3. Métodos de Síntese de Nanopartículas de Prata

3.1. Método Químico de Síntese de Nanopartículas de Prata

No método químico de síntese de nanopartículas de prata, utilizam-se agentes redutores para promover a redução dos íons de prata (Ag^+) para prata metálica (Ag^0) e a adição de surfactantes para estabilizar as nanopartículas. A não adição de surfactantes (estabilizantes) pode ocasionar alterações, em termos de diâmetro e distribuição das partículas. Uma limitação deste método é a produção de partículas com larga faixa de diâmetro, além de ser mais complexo e trabalhoso e apresentar contaminação ambiental devido aos resíduos de solventes utilizados na preparação (Chen et al., 2003).

Exemplos de agentes redutores que podem ser utilizados são o borohidreto de sódio ou hidrazina, álcool e o citrato de sódio. Entretanto, alguns destes agentes redutores necessitam também da ação do calor para que a reação ocorra e podem ser tóxicos como, por exemplo, o borohidreto de sódio ou hidrazina (Pillai e Kamat, 2003; Kim et al., 2007).

Diferente da síntese biológica na qual não é necessária a adição de surfactantes (pelo fato das proteínas presentes na estrutura do próprio microrganismo agir como estabilizante da nanopartícula sintetizada), no método de produção química de nanopartículas é comumente adicionado agentes estabilizantes como o PVP (poly-vinyl-pyrrolidone) (Sun e Xia, 2002).

3.2. Método Biológico de Síntese de Nanopartículas de Prata

As nanopartículas biológicas são produzidas através do uso de organismos: fungos filamentosos como *Fusarium oxysporum* e leveduras, bactérias como *Bacillus megaterium*, *B. subtilis*, *Morganella* spp., *Catharanthus roseus*, e até mesmo plantas, como extrato de folhas de *Manilkara zapota*, não sendo tóxico e ambientalmente aceitável (“química verde”) (Kamaraj et al., 2012; Mourato et al., 2011; Saravanan et al., 2011; Parikh et al., 2011; Kannan et al., 2011). É possível a preparação de partículas com uma faixa estreita de diâmetro, já estabilizadas por proteínas do próprio organismo, desta forma não havendo a necessidade da adição de agentes surfactantes que, como visto anteriormente, pode ocasionar alterações, em termos de diâmetro e distribuição das partículas, além do fato da reação ocorrer à temperatura ambiente (Mohanpuria et al., 2008). A biossíntese de nanopartículas de prata usando organismos eucarióticos tais como fungos, pode ser obtida intracelularmente (Sastry et al., 2003) como também extracelularmente (Durán et al., 2011; Balaji et al., 2009).

A produção intracelular de nanopartículas de prata ocorre em fungos como o *Verticillium* sp., sendo que os íons de prata são reduzidos à prata metal, as quais são acumuladas na biomassa do microorganismo. Um possível mecanismo para a presença de partículas em sua biomassa fúngica, pode ser a redução extracelular de íons Ag^+ na solução seguida de sua precipitação na célula. O tamanho das nanopartículas formadas é controlado por parâmetros como pH, temperatura, concentração do substrato e tempo de exposição ao substrato. Já na produção extracelular das nanopartículas de prata, uma quantidade de biomassa do fungo é mantida por 3 dias em água e, em seguida, filtrada sendo que a redução dos íons de prata é feita no filtrado sem a presença do fungo. A vantagem deste método em relação ao intracelular é o fato de não ser necessário a separação dos micélios do fungo das nanopartículas produzidas (Mohanpuria et al., 2008).

O mecanismo de produção das nanopartículas de prata pelos métodos biológicos utilizando-se microrganismos não está totalmente elucidado, porém já foi demonstrado na literatura que este mecanismo ocorre devido à presença de uma enzima redutase e de uma quinona extracelular (Figura 2). Os microrganismos que não possuem estas estruturas não conseguem realizar a redução dos íons prata (Durán et al., 2005).

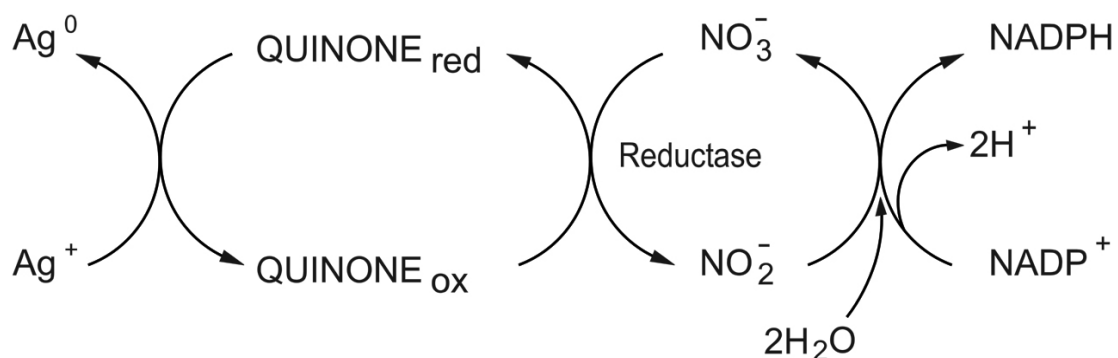


Figura 2: Diagrama da produção de nanopartículas de prata por fungos (Durán et al., 2010)

4. Características Gerais dos Fungos Filamentosos

Os fungos filamentosos são organismos eucarióticos, não-fotossintéticos e possuem parede celular, exceto raras exceções. Obtêm seu alimento por absorção, são multicelulares e enquanto alguns são macroscópicos, outros são microscópicos. Os fungos formam esporos que são dispersos por correntes de ar. São divididos em *fungos perfeitos* e *fungos imperfeitos*, sendo os denominados *perfeitos* aqueles que possuem todos os estágios sexuais conhecidos e *imperfeitos* os que não possuem. O Reino Fungi é dividido em três principais grupos: os fungos limosos, os fungos inferiores flagelados e os fungos terrestres. As espécies de fungos terrestres são as espécies mais conhecidas entre os fungos e incluem leveduras, bolores e cogumelos. Há quatro principais classes de fungos terrestres: *Zygomycetes*, *Ascomycetes*, *Basidiomycetes* e *Deuteromycetes* (Pelczar et al., 1996).

Os zigomicetos são formados por hifas cenocíticas com exceção das estruturas reprodutivas e do resto das hifas filamentosas. Produzem um esporo sexuado com parede celular espessa denominado *zigósporo*. A reprodução assexuada tipicamente

ocorre por meio de esporangiósporos que se desenvolvem no interior dos esporângios que se rompem quando maduros. Os ascomicetos são denominados fungos superiores por possuírem estrutura mais complexa do que os demais fungos. Podem apresentar formas leveduriformes, miceliais, e fungos dimórficos. As espécies de ascomicetos que possuem micélio os mesmos são septados e suas células podem ter um ou mais núcleos. Distinguem-se pela produção de esporos sexuais denominados *ascóporos* contidos em *ascos*. Os esporos assexuais (conídios) do micélio dos ascomicetos são produzidos nas extremidades das hifas e apresentam-se geralmente em cadeias. Os basidiomicetos possuem cerca de 25.000 espécies e podem ser distinguidos dos outros fungos por possuírem *basídio*, que é uma estrutura reprodutiva microscópica em forma de clava onde ocorre a cariogamia e a meiose (Pelczar et al., 1996).

4.1. *Aspergillus niger*

Existem cerca de 600 espécies de fungos do gênero *Aspergillus* isolados de lugares distintos como do solo, de detritos vegetais, do ar atmosférico, de diferentes alimentos e de lesões humanas e de animais (Lacaz et al., 2002).

A incidência de *Aspergillus niger* em ambientes hospitalares é conhecida há um tempo e devido ao seu caráter oportunista costuma acometer indivíduos imunodeprimidos, desta forma uma série de estudos vem sendo realizados com o intuito de prevenir a disseminação de esporos de *Aspergillus* spp. nesses ambientes.

Sistemas de filtração de ar têm sido monitorados com o intuito de garantir que contaminantes existentes no ambiente externo a hospitais não sejam disseminados para o interior do hospital. Cornet et al. (1999) avaliaram a eficácia de fluxos laminares HEPA (High Efficiency Particulate Air) que retém partículas tais como microrganismos provenientes do ar, e demonstraram a utilidade da vigilância ambiental em facilitar a proteção dos pacientes em risco de aspergilose pulmonar invasiva.

Anaissie e Costa (2001) demonstraram que *A. niger* pode ser disseminado mesmo em ambientes hospitalares que possuem sistema de filtração de ar por uma fonte de água contaminada, desta forma podendo-se adquirir infecções por vias aéreas a partir de esporos em aerossol.

Entretanto, estudos mostram que *A. niger* não são disseminados exclusivamente pelo ar em ambientes hospitalares. Loudon e Burnie (1995) realizaram um estudo em um hospital e observaram um conjunto de três casos de aspergilose cutânea devido a *A. niger* que foi isolado a partir de infecções de pele invasivas, sendo associada com a aplicação de adesivo contaminado, fitas ou placas de braço em pacientes neutropênicos, e também espécies de *Aspergillus* foram isolados a partir de fontes de alimentos.

Um estudo com plantas ornamentais que muitas vezes estão presentes em quartos de indivíduos hospitalizados mostrou que estas espécies de plantas podem veicular esporos de *Aspergillus niger* e *Aspergillus fumigatus*, recomendando que sejam proibidos nesses ambientes (Staib, 1980).

Aspergillus spp. são fungos oportunistas, podendo colonizar cavidades do corpo como no caso do aspergiloma intracavitário, infecções em geral, processos alérgicos e intoxicações por micotoxinas. A aspergilose pulmonar foi uma das primeiras micoses viscerais descritas na literatura, e as principais espécies são o *Aspergillus flavus* Link 1809, *Aspergillus fumigatus* Fresenius 1863, *Aspergillus glaucus* Link 1809, *Aspergillus nidulans* Winter 1884, *Aspergillus niger* Van Tieghem 1867 e *Aspergillus terreus* Thom 1918 (Lacaz et al., 2002).

A Aspergilose raramente ocorre em indivíduos com alta imunidade e causa com certa frequência infecções pulmonares, nos ouvidos, no sistema nervoso central, nos olhos e outros órgãos em indivíduos imunodeprimidos. Apresenta-se em material clínico com hifas septadas, ramificadas dicotomicamente, irradiando de um ponto (Trabulsi e Alterthum, 2004).

A doença pode variar de acordo com a extensão das lesões, o tempo de evolução clínica, o tipo de órgãos afetados e o grau de resistência do hospedeiro. (Lacaz et al., 2002).

Formas de *Aspergillus* spp. podem ser visualizadas diretamente de material clínico como secreções, principalmente em escarros, apresentando hifas septadas e hialinas, conidióforos, vesículas, fiálides e conídios como observado na Figura 3 (McGinnis, 1980).

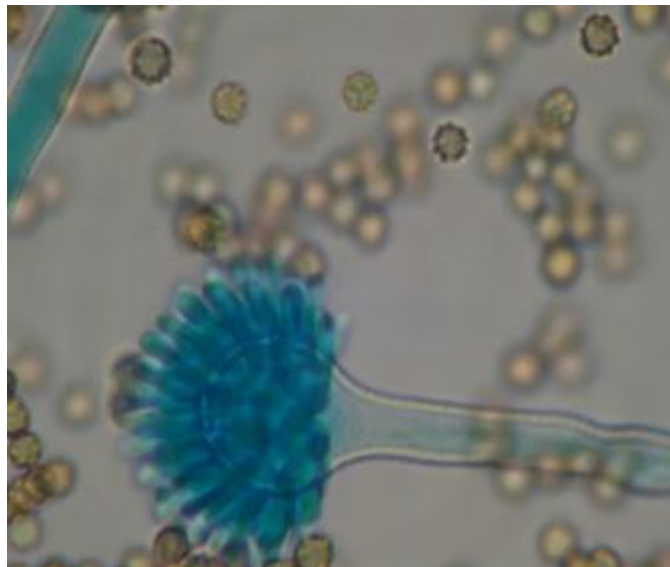


Figura 3: Lâmina de *Aspergillus niger* corada com lactofenol azul algodão em microscópio de luz em aumento de 1000x (Zago e Perez-Balbuena, 2013).

Em cortes histológicos corados com hematoxilina-eosina (HE), pode-se observar em exames microscópicos hifas septadas basofílicas, muitas vezes com ramificações dicotômicas em ângulos de 45° (Figura 4).

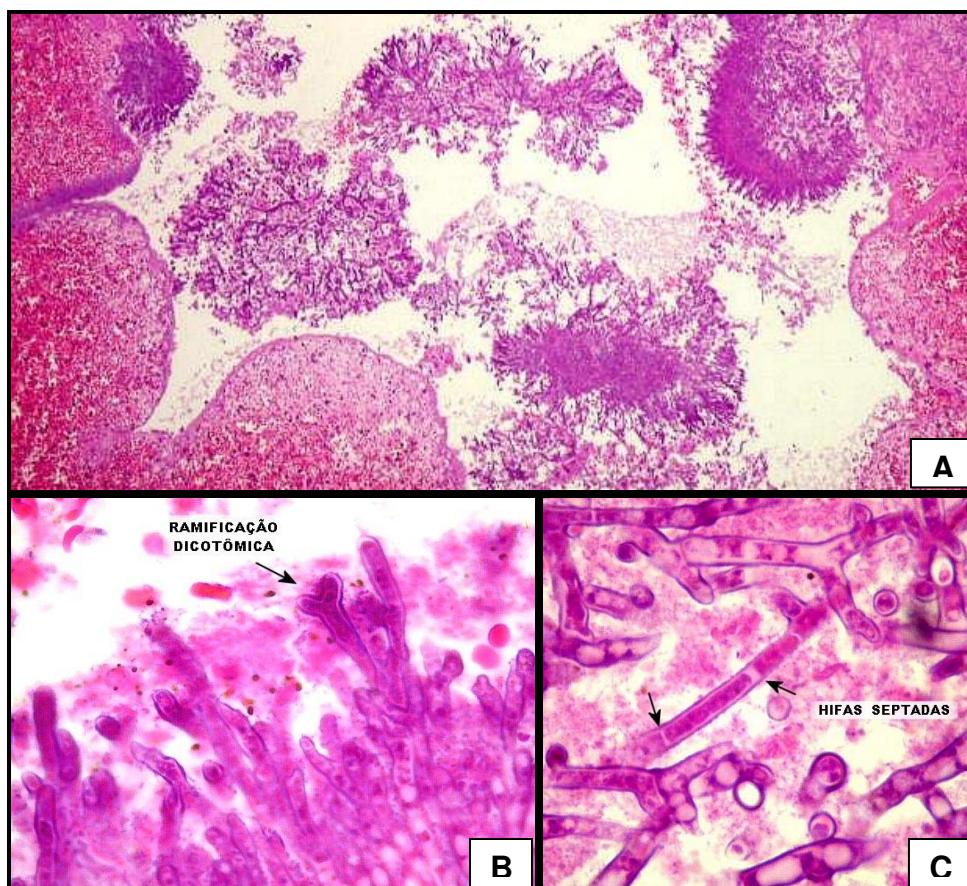


Figura 4: Características histopatológicas de Aspergilose Sistêmica Pulmonar (HE, PAS). Aspecto geral (A), Hifas septadas (C), Ramificação dicotômica (B). Fonte: <http://anatpat.unicamp.br/biinflaspergilose2b.html> acessado em 18/02/2013.

Culturas de *A. niger* caracterizam-se por crescer com velocidade média de 7 a 10 dias e em meio Ágar Sabouraud apresentam micélios lanosos, inicialmente brancos ou amarelos, tornando-se pretos com o tempo (Figura 5), sendo o reverso do branco ao amarelo. O micélio é septado e os conidióforos não são ramificados e possuem uma célula-pé na base que sustentam uma grande vesícula na ponta. Essa vesícula, por sua vez, sustenta fiálides vasiformes curtas em fileira única ou dupla, que produzem cadeias de fialoconídios. (Kern e Blevins, 1999; Minami, 2003).

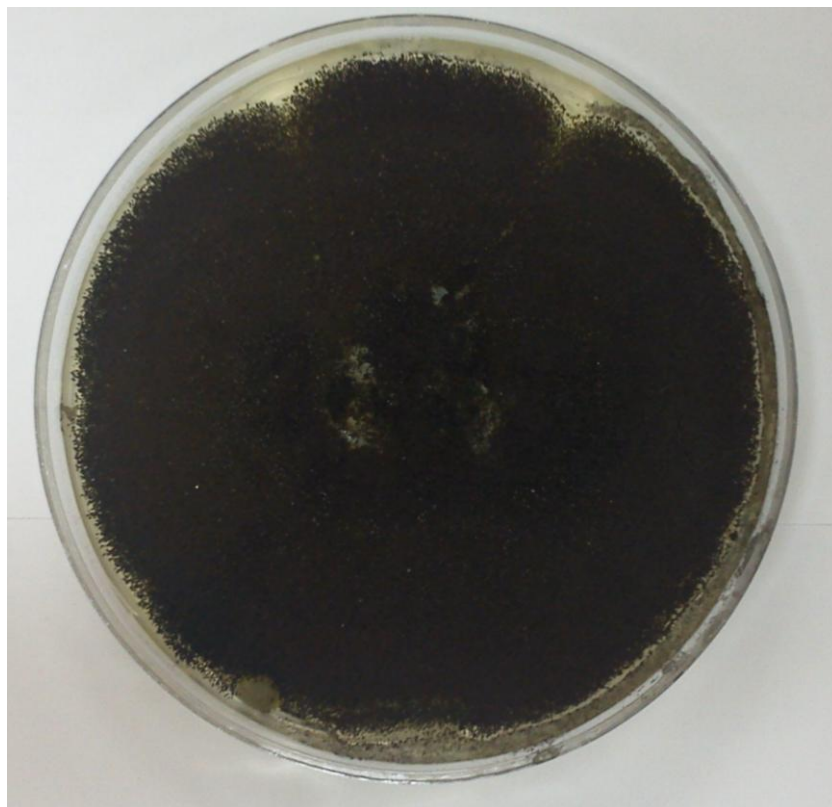


Figura 5: Característica da colônia de *Aspergillus niger* cultivada em Ágar Sabouraud (Silva JC, 2013).

O tratamento da aspergilose depende da forma clínica (alérgica, aspergiloma, crônica necrotizante ou invasivas) sendo tratadas com Prednisona, anfotericina B ou até mesmo através de cirurgias. Frequentemente reações adversas a anfotericina B podem ocorrer como calafrios e febre, náuseas e vômitos, efeitos nefrotóxicos e alterações de ritmo cardíaco e mielotoxicidade (Lacaz et al., 2002).

4.1.1. *Trichophyton rubrum*

Dermatofitoses são moléstias causadas por fungos denominados dermatófitos. Na nomenclatura popular são conhecidas como tineas (do latim *tinea*) e se localizam na epiderme, apresentando, em geral, aspecto descamativo e pruriginoso. Clinicamente as lesões de pele se caracterizam por eritema com descamação, prurido, bordos elevados e contorno geográfico. Os pêlos podem ser

cortados devido à ação dos dermatófitos, formando zonas de tonsura ou ser destruídos nos folículos produzindo alopecia. As unhas são atacadas, apresentando lesões secas que geralmente crescem da extremidade para a base, ocasionando, muitas vezes, a queda das mesmas. As dermatofitoses podem ser transmitidas de pessoa a pessoa, de animais ou do solo para os seres humanos. A distribuição geográfica é universal e os principais dermatófitos em nosso meio são os gêneros *Trichophyton* sp., *Microsporum* sp. e *Epidemophyton* sp.. Os dermatófitos podem ser encontrados fora do pêlo (parasitismo ectotrix) e dentro do pêlo (parasitismo endotrix). O *Trichophyton* sp. causa parasitismo do tipo endotrix, formando hifas ou cadeias artrosporadas por dentro do pêlo, provocando a sua ruptura. Possuem crescimento rápido e vistos ao microscópio óptico, os dermatófitos possuem características que distinguem os gêneros, como o caso do *Trichophyton* sp. que possui esporos mais variados e nem sempre encontráveis, mas geralmente são alongados, com lados paralelos em forma de bastão, septados e paredes finas, conforme pode ser destacado na Figura 6 (Minami, 2003).



Figura 6: Lâmina de *T. rubrum* corada com lactofenol azul algodão evidenciando um único macrogonídio com nove núcleos em forma de bastão (Albano, 2013).

O fungo *Trichophyton rubrum* é uma espécie antropofílica, responsável por cerca de 70% das dermatofitoses em humanos (Figura 7) (Leng et al., 2008).

A *Tinea pedis* (tinha dos pés), também chamada de pé de atleta, a *Tinea manuum* (Tinha das mãos) e as *dermatofítides* são manifestações de *Trichophyton rubrum* freqüentes em todo o mundo, sendo alta a incidência dessas dermatoses em marinheiros, soldados e estudantes. Fatores que contribuem para o desenvolvimento da doença são a sudorese, a umidade, as caminhadas prolongadas, os calçados anti-higiênicos e o descuido com a higiene da pele e os casos são mais comuns no verão (Lacaz et al., 2002).



Figura 7: Dermatofitose extensa em paciente com doença de Cushing (A) e onicomicose branca superficial em paciente com doença de Cushing (B), retirado de Peixoto et al. (2010).

O crescimento de *T. rubrum* é lento, sendo as colônias de textura cotonosa ou aveludada e coloração branca. O reverso da colônia tem cor avermelhada, o que originou o nome da espécie (*rubrum*), entretanto existem variedades isentas de pigmentação (Figura 8) (Larone, 1996).

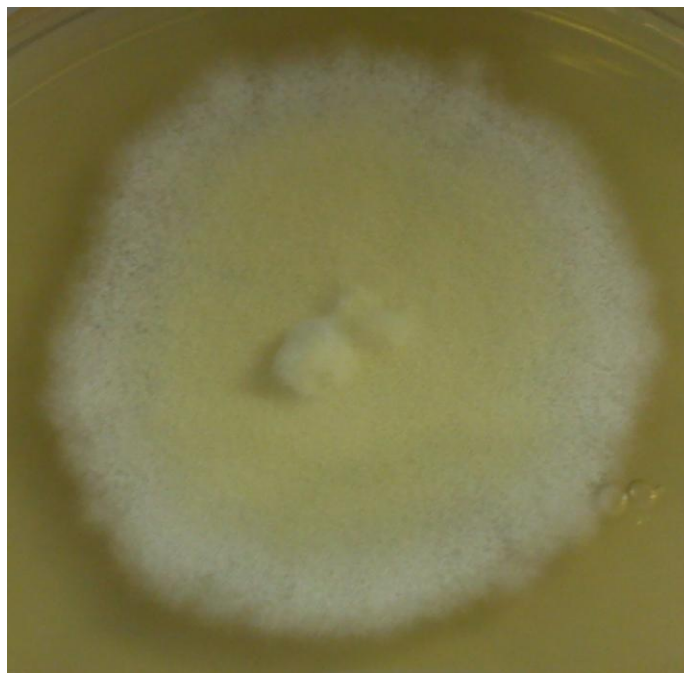


Figura 8: Característica da colônia de *Trichophyton rubrum* cultivada em Ágar Sabouraud (Silva JC, 2013).

4.2. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus são cocos gram-positivos, se dividem em mais de um plano formando aglomerados de células que lembram cachos de uvas (Figura 9 C). No gênero *Staphylococcus*, a espécie *Staphylococcus aureus*, coagulase-positiva é frequentemente membro da microbiota normal do corpo humano, no entanto é uma das bactérias patogênicas mais importantes, atuando em uma ampla gama de infecções (Trabulsi e Alterthun, 2004). A espécie é produtora de uma série de outras enzimas e toxinas, sendo a coagulase positiva a mais conhecida e, freqüentemente implicada na etiologia de uma série de infecções e intoxicações no homem e nos animais, enquanto que os estafilococos coagulase-negativa (ECN) têm sido considerados saprófitas ou raramente patogênicos. Atualmente, são reconhecidos como microrganismos essencialmente oportunistas, que se prevalece de inúmeras situações orgânicas para produzir graves infecções, como observado na Figura 9 B (Reynolds, 2009).

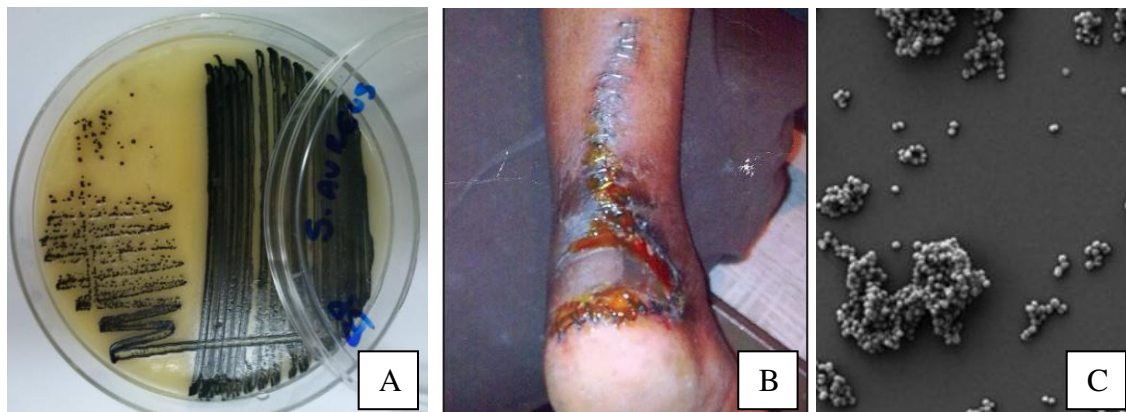


Figura 9: A) Característica da colônia de *Staphylococcus aureus* cultivada em Ágar Baird-Parker (Silva JC, 2013). B) Caso clínico de septicemia superficial adquirida em pós-operatório por *Staphylococcus aureus* (Radzilani, 2010). C) Microscopia Eletrônica de Varredura (Varrone et al., 2011).

4.3. *Escherichia coli*

O grupo Coliformes Termotolerantes possui pelo menos três gêneros *Escherichia*, *Enterobacter* e *Klebsiella*, dos quais os últimos incluem cepas de origem não fecal. Portanto, a enumeração direta de *E. coli* é muito mais significativa, por sua alta incidência dentro do grupo termotolerante (Figura 10). A *E. coli* é o melhor indicador de contaminação fecal conhecido até o momento (Alves et al., 2002). É uma bactéria Gram negativa, em forma de bastonete, anaeróbica facultativa e em humanos provoca quadros de diarreia sanguinolenta. A ingestão de água ou alimentos contaminados por *E. coli* leva a gastroenterite de severidade variada, incluindo sintomas como febre, meningite e septicemia. Há o aparecimento de cepas resistentes aos antibióticos usuais, portanto o estudo de novas substâncias com ação antibiótica é recomendado (Njoroge e Sperandio, 2009).

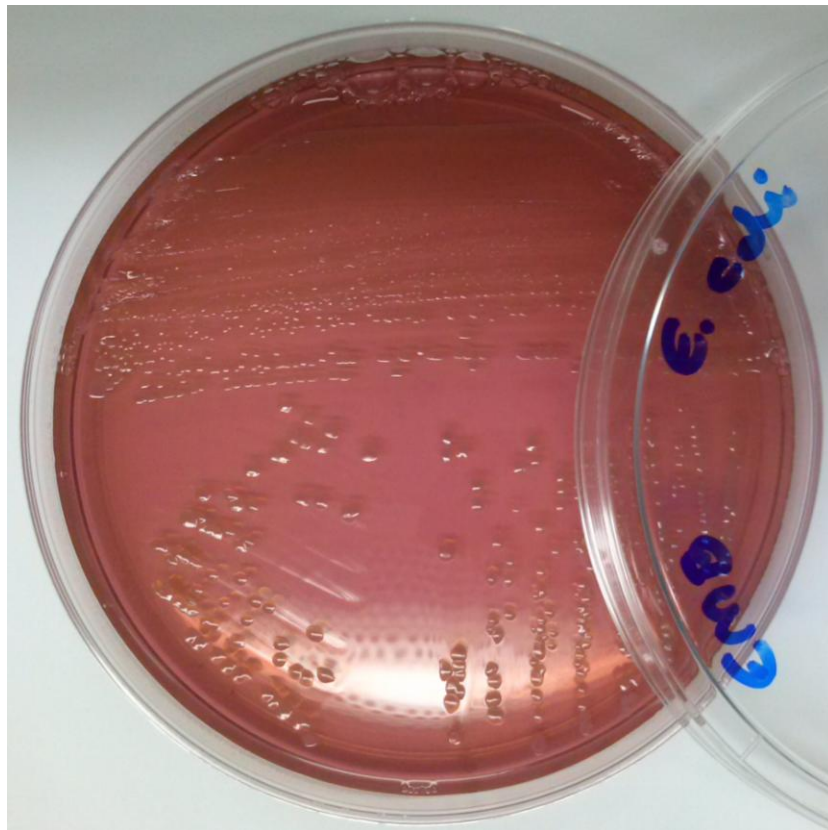


Figura 10: Característica da colônia de *Escherichia coli* cultivada em meio EMB Ágar (Silva JC, 2013).

4.4. *Salmonella typhimurium*

Salmonella é um gênero da Família Enterobacteriaceae, apresenta forma de bastonete Gram-negativo não esporulados, anaeróbios facultativos e oxidase negativos (Figura 11). A espécie *S. typhimurium* é o principal agente causador de doenças de origem alimentar, provocando gastroenterites, manifestando-se como uma infecção aguda na mucosa intestinal, caracterizando por infiltração e transmigração epitelial de neutrófilos, exsudação de líquido seroso e diarreia (Pelczar et al., 1996; Trabulsi e Alterthun, 2004).

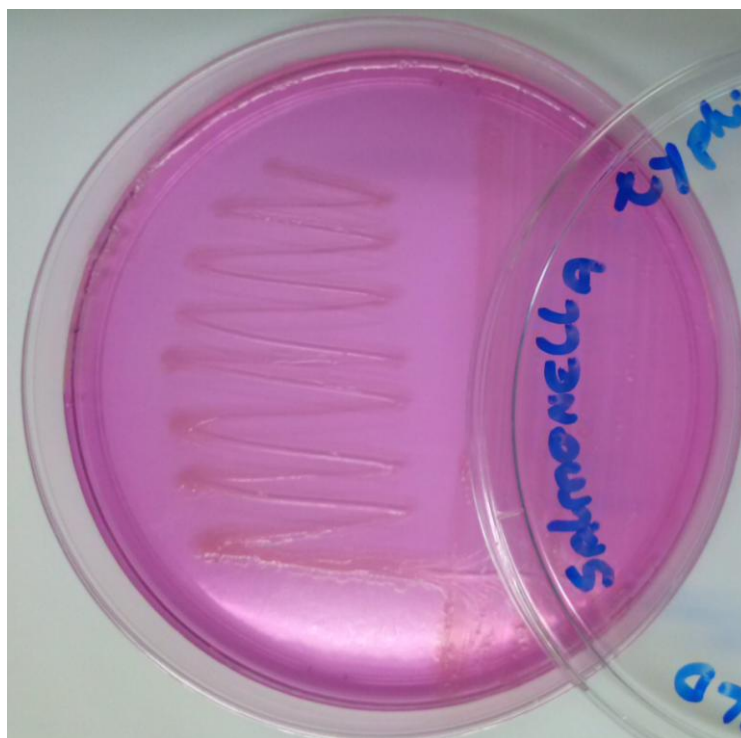


Figura 11: Característica da colônia de *Salmonella typhimurium* cultivada em meio XLD Ágar (Silva JC, 2013).

5. Avaliação da Citotoxicidade

Os testes de citotoxicidade *in vitro* são úteis para a definição da citotoxicidade basal, assim como para o estabelecimento do intervalo de concentração no qual o agente tóxico atua. Detalhes importantes sobre os parâmetros citotóxicos envolvidos – como genotoxicidade, indução de mutações ou morte celular programada – são determinados neste tipo de teste. Com o estabelecimento da dose onde 50% das células são afetadas (IC_{50}), é possível comparar quantitativamente a resposta de um mesmo composto em diferentes sistemas ou de vários compostos em um único sistema (Melo et al., 2003; Monteiro-Riviere et al., 2009).

Os alvos (“endpoints”) celulares dos testes de citotoxicidade são baseados, principalmente, na perda da permeabilidade seletiva celular, na redução da função

mitocondrial e nas mudanças na morfologia e na replicação celular (Tavares et al., 2007).

5.1. Células V79

O uso de cultura de células é de grande valia na investigação das características toxicológicas no que tange aos estudos farmacológicos e ambientais, propiciando uma ferramenta fundamental na avaliação dos parâmetros biológicos e/ou terapêuticos *versus* os efeitos toxicológicos (Rosenkranz et al., 1992; Melo et al., 2004; Combes et al., 2008).

Das várias linhagens celulares, destacam-se as células V79, provenientes de fibroblastos de pulmão de Hamster Chinês – um tipo celular amplamente empregado na avaliação da citotoxicidade e mutagenicidade (Katzner et al., 2002; Pfuhler e Wolf, 2002; Cavalcanti et al., 2008) por possuir elevada velocidade de proliferação e eficiência de clonagem, cariótipo estável e manutenção de suas propriedades iniciais após criopreservação.

Em decorrência dessas propriedades, as células V79 têm sido utilizadas para avaliar a toxicidade de novas formulações cosméticas, matérias primas, pesticidas, fármacos e resíduos tóxicos em geral (Melo et al., 2000; Gimenez et al., 2005; Melo et al., 2006). Os resultados determinados nesta linhagem celular asseguram a avaliação da toxicidade do composto sem metabolização pela via do sistema citocromo P450. Embora existam algumas limitações na determinação da toxicidade em células V79, a avaliação dos resultados destes testes é muito reprodutível (Freshney, 1994; Camargo et al., 2009), sendo possível estabelecer relações entre a citotoxicidade e a toxicidade aguda oral em animais experimentais, podendo-se determinar os valores de dose letal 50 (DL₅₀) através desta via (Halle e Spielmann, 1992).

OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi produzir nanopartículas de prata através do método biológico utilizando o fungo *Fusarium oxysporum*, caracterizá-las e avaliar seu efeito citotóxico em cultura de células V79 e sua atividade antimicrobiana frente a diferentes bactérias e fungos, assim como avaliar a sua ação na produção de espécies reativas de oxigênio.

Capítulo 1 – Artigo submetido a *Journal of Biomedical Nanotechnology*

***In vitro* evaluation of the antimicrobial activity and cytotoxicity of biogenic silver nanoparticles**

Silva, J. C.^{1*}, Marcato, P. D.^{2,3}, Ferreira, I. R.^{1,4}, Durán, N.^{3,5},
Ballottin, D.³, Tasic, L.³, Melo, P. S.^{1,4}

¹Faculdade de Ciências Aplicadas, UNICAMP, Limeira, SP, Brazil.

²NanoBioLab, School of Pharmaceutical Science of Ribeirao Preto, USP, Ribeirao Preto, SP,
Brazil

³Laboratório de Química Biológica, Instituto de Química, UNICAMP, Campinas, SP, Brazil.

⁴METROCAMP, Campinas, SP, Brazil.

⁵Center of Natural and Human Sciences, UFABC, Santo Andre, SP, Brazil.

Abstract

Aiming to understand better the toxicity of biogenic silver nanoparticles (AgNP_{bio}), these were prepared using biotechnological extracellular route and fungus *Fusarium oxysporum*. AgNP_{bio} were then characterized by transmission electron microscopy (TEM) and UV/Vis. Their size and zeta potential were determined using the nanoparticle tracking analysis software (NTAS) by Nanosight, photon correlation spectroscopy (PCS) and zeta potential techniques. The antimicrobial activity, cytotoxicity and *in vitro* mechanism of AgNP_{bio} action in V79 cells were also investigated. AgNP_{bio} production was evidenced by the presence of the plasmon absorption band ($\lambda = 450$ nm) and spherical particles with the size of 15-22 nm were obtained. The AgNP_{bio} antimicrobial and antifungal activity against *Staphylococcus aureus* (MIC 1.47 $\mu\text{g mL}^{-1}$), *Salmonella typhimurium* (MIC 0.36 $\mu\text{g mL}^{-1}$), *Escherichia coli* (MIC 0.73 $\mu\text{g mL}^{-1}$), *Aspergillus niger* (MIC 5.90 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and *Trichophytum rubrum* (MIC 2.95 $\mu\text{g mL}^{-1}$) were measured. Furthermore, the bactericidal activity of AgNP_{bio} decreased in the presence of reduced glutathione (GSH) indicating that antimicrobial effectiveness is probably related to oxidative stress induction. AgNP_{bio} exhibited cytotoxicity in some extent regarding V79 cells. At the concentration of 8.49 $\mu\text{g mL}^{-1}$ AgNP_{bio} provoked 51% cell death in the MTT and 37% in DNA assays. The presence of glutathione (GSH, 307.3 ng mL⁻¹) increased 17% cell viability on MTT and 25% on DNA assays. Obtained results may point out that the cytotoxic effects induced by biogenic silver nanoparticles treatment could be related to the oxidative stress. This effect can be very important in the cancer and antibiotic therapy and also for neurodegenerative and many other diseases treatments.

Keywords: biogenic silver nanoparticles (AgNP_{bio}), antimicrobial activity, cytotoxicity, glutathione, minimal inhibitory concentration (MIC).

1. INTRODUCTION

For some time, silver nanoparticles (AgNPs) are being used in several medical devices, clothing and refrigerators as very effective and potent antibacterials.¹ Ionic silver (Ag^+) and silver nanoparticles have received renewed concern as interesting antifungal and antibacterial agents in wound dressing and can be applied in medicine for reduction of infections enabling introduction of a new generation of bactericides. Colloidal silver, as an antimicrobial agent, has been used since ancient civilizations such as Greek, Roman and Egyptian (cited in Zhou²). The antibacterial effects of silver probably occur by weakening DNA replication and by inactivating enzymes and proteins containing thiol (-SH) groups. Several *in vitro* assays have demonstrated that increased reactive oxygen species generation is a first factor of toxicity in nanoparticle treated cells.³⁻⁷ Usually, cell exposures to metallic nanoparticles lead to lipid peroxidation, DNA injury, caspase activation triggering micronuclei formation, chromatin condensation and cell death by apoptosis. Results of Ahmad *et al.*⁸ indicated that AgNPs induce heat shock stress, oxidative stress, DNA damage and apoptosis. All of these processes are activated as a cascade of events culminating with enhanced damage to the building blocks of the cells, leading to cell death by apoptosis or necrosis. The pharmacological spectrum of AgNPs is broader than that of common antibiotics. Membranes incorporated with AgNPs were found to have antimicrobial activities toward several bacteria, including *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas* spp.^{9, 10} AgNPs are effective against fungi and pathogenic *Candida* species.^{11, 12} There are many techniques to synthesize AgNPs including chemical or biological routes. Among chemical ways, stand out the chemical reduction, photochemical and electrochemical processes.^{13, 14} AgNPs can be synthesized using bacteria, fungi or yeast, as already reported.^{15, 16} The use of microorganisms for the silver nanoparticles synthesis (clusters of silver atoms with a diameter between 1 and 100 nm) is known for at least ten years. Among the wide range of existing species, *Fusarium oxysporum* stands for rapidly reducing the silver when exposed to a solution containing this metal ion, producing highly stable nanoparticles.¹⁷⁻²⁰

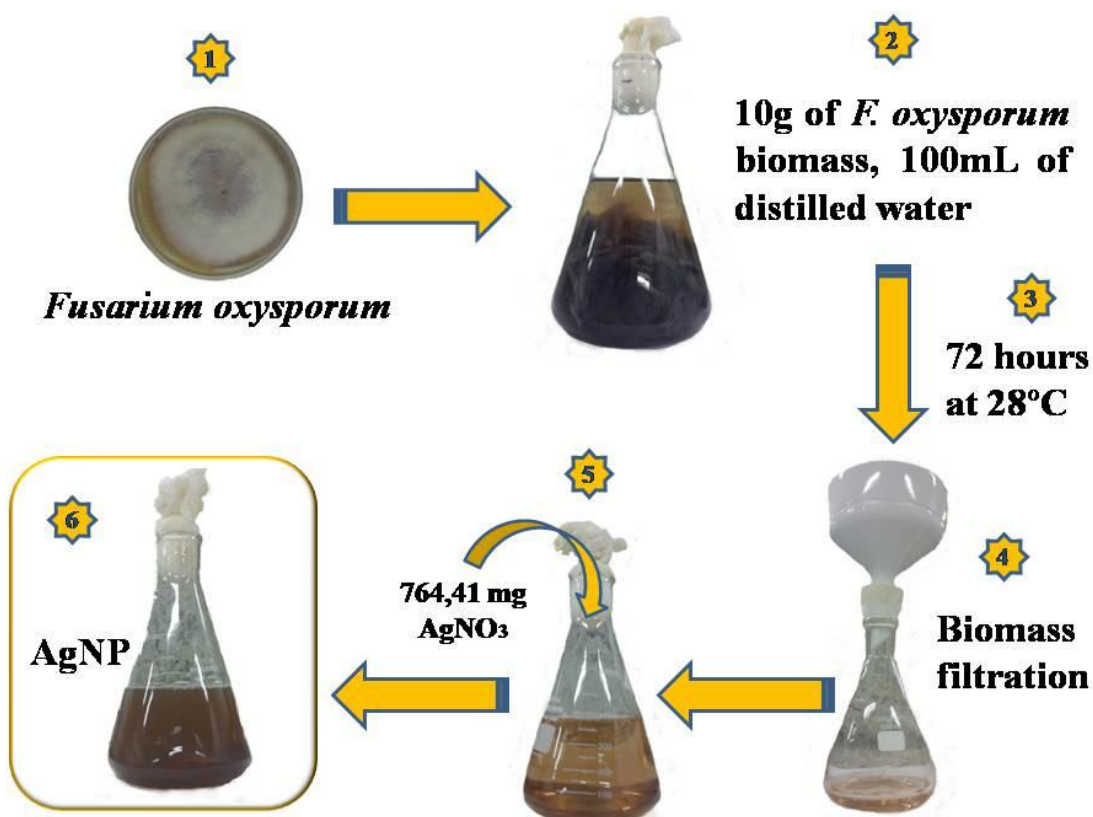
In present work, we report green synthesis of silver nanoparticles (AgNP_{bio}) using *Fusarium oxysporum* with the aim to investigate antimicrobial and toxicity activities of these particles. The antibacterial and antifungal activities of AgNP_{bio} were tested against *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Aspergillus niger* and

Trichophytum rubrum. The cytotoxicity of AgNP_{bio}, with and without glutathione (GSH) in V79 fibroblasts cells culture was also investigated.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Biogenic Silver nanoparticles production

Fusarium oxysporum strain (551) from ESALQ-USP Genetic and Molecular Biology Laboratory (Piracicaba, Brazil) was used. The fungal inoculum was prepared in 2% malt extract and 0.5% yeast extract at 28 °C in Petri dishes and incubated at 28 °C for 7 days. Afterwards, the biomass was suspended in sterile water (0.1 g of biomass/ mL of water) and kept for 72 h at 28 °C. Then, the biomass was removed by filtration and the fungal filtrate was obtained. AgNO₃ (10⁻² mol L⁻¹) was added into the fungal filtrate and the system was kept for several hours at 28 °C. Periodically, aliquots of the reaction solution were removed and the absorption was measured in a UV-Vis spectrophotometer (Agilent 8453 - diode array) at 450 nm.



2.2. Transmission Electron Microscopy (TEM)

Biogenic silver nanoparticles were characterized using Transmission Electron Microscopy (TEM). Bright field images were obtained using a Carl Zeiss (Libra) transmission electron microscope (120 KeV). One drop of the particle dispersion diluted in water was deposited on carbon-coated parlodion film supported in 300 mesh copper grids (Ted Pella).

2.3. Particle size and Zeta Potential measurements

The average particle size (Z-average) and size distribution were measured by photon correlation spectroscopy (PCS) (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments Corp) at 25 °C. The zeta potential was measured in capillary cells with path lengths of 10 mm, using a Zetasizer Nano ZS. Measurements were performed with silver nanoparticle dispersions diluted with KCl solution (10^{-3} mol L⁻¹).

2.4. Nanosight analysis

The size and AgNP_{bio} particle concentration were analyzed by Nanoparticle Tracking Analysis (NTA). The sample was diluted with water and the measured using NanoSight LM10.

2.5. Antibacterial and antifungal assay

The antimicrobial activity was carried out by the microdilution assay against *S. aureus* (ATCC 9144), *E. coli* (ATCC 11229), *S. typhimurium* (ATCC 14028) *A. niger* (ATCC 16404) and *T. rubrum* (ATCC 28188).^{21,22} In a plate with 96 vials, different concentrations of AgNP_{bio} (0 – 100 µg mL⁻¹) were added. The dispersion of AgNP_{bio} was diluted with the Mueller Hinton broth for assays with the bacteria or with RPMI-1640 broth for assays with the filamentous fungi. In each vial was added a suspension of bacteria 5×10^5 CFU/mL or 5×10^4 CFU/mL in the case of filamentous fungi. Then, the plates were incubated at 35 °C for 16-20 h for bacteria and 46-50 h for fungi. Afterwards, the bacterial and fungal growth has been evaluated. Each AgNP_{bio} concentration was tested in 3 different experiments (n =12). In order to verify if AgNP_{bio} present bactericidal or bacteriostatic effects, after incubation, aliquots of each vial were transferred to Petri dishes containing Mueller Hinton Agar for bacteria and Malt Extract Agar for filamentous fungi. Afterwards, the Petri dishes were incubated at 35 °C for 16-20 h for bacteria and 46-50 h for fungi. In reading the results, fungicidal or bactericidal effects were evidenced when the

microorganisms did not grow into the vial nor on Petri dish. However, when microorganisms did not grow in the vial but did grow on Petri dish, bacteriostatic or fungistatic effects were considered. In order to verify the antimicrobial mechanism of action of the AgNP_{bio} the antibacterial and antifungic assays were carried out, using the same protocol and same microorganism in the culture medium as already described in the presence of glutathione (GSH, 24.6 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

2.6. Analysis of bacteria morphology by SEM

Scanning electron microscopy was performed to observe eventual morphological alterations of the microorganisms after treatment with AgNP_{bio}. For this, culture suspension was filtered with Millipore filter (LCR hydrophilic PTFE) with 0.45 μm pore size and 13 mm in diameter using a syringe, to retain the microorganisms on the membrane. Afterwards, fixation was performed using a solution of glutathione (2.5%) and the excess was removed with saline phosphate buffer (PBS, pH 7.2). The post-fixation was performed with a solution of osmium tetroxide (1%) and the excess was removed using water (Milli-Q). The membrane filter was removed and submitted to a dewatering process using ethanol (30, 50, 70, 90% and absolute). A process of substitution of absolute ethanol present in membrama by liquid CO₂ was conducted by Critical Point Drying. The samples were coated with 10 nm of gold/palladium under vacuum by sputtering using a BAL-TEC's apparatus and characterized by SEM at a voltage of 20 kV (Jeol - JSM-6360LV).

2.7. Cytotoxicity assays

The cytotoxicity of AgNP_{bio} was assessed in a permanent lung fibroblast cell line (V79) culture²³ that are commonly used cells for cytotoxicity studies. V79 fibroblasts were grown as monolayers in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 IU of penicillin/mL and 100 $\mu\text{g/mL}$ of streptomycin in a humidified incubator with 5% CO₂ in air at 37 °C. The cells were plated at a density of 3 x10⁴ cells/mL in 96-well plates. Forty-eight hours after cell seeding, semiconfluent cultures were exposed to AgNP_{bio} at different concentrations (0 – 8.49 $\mu\text{g mL}^{-1}$). The cells were exposed during 24 h to the test

medium with or without the AgNP_{bio} (control) and in the presence or absence of glutathione (GSH, 307.3 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Each concentration was tested in six replicates in three independent experiments. At the end of the incubation, the MTT reduction assay and deoxyribonucleic acid (DNA) content were carried out to evaluate the cell viability.

2.8. Endpoints evaluated

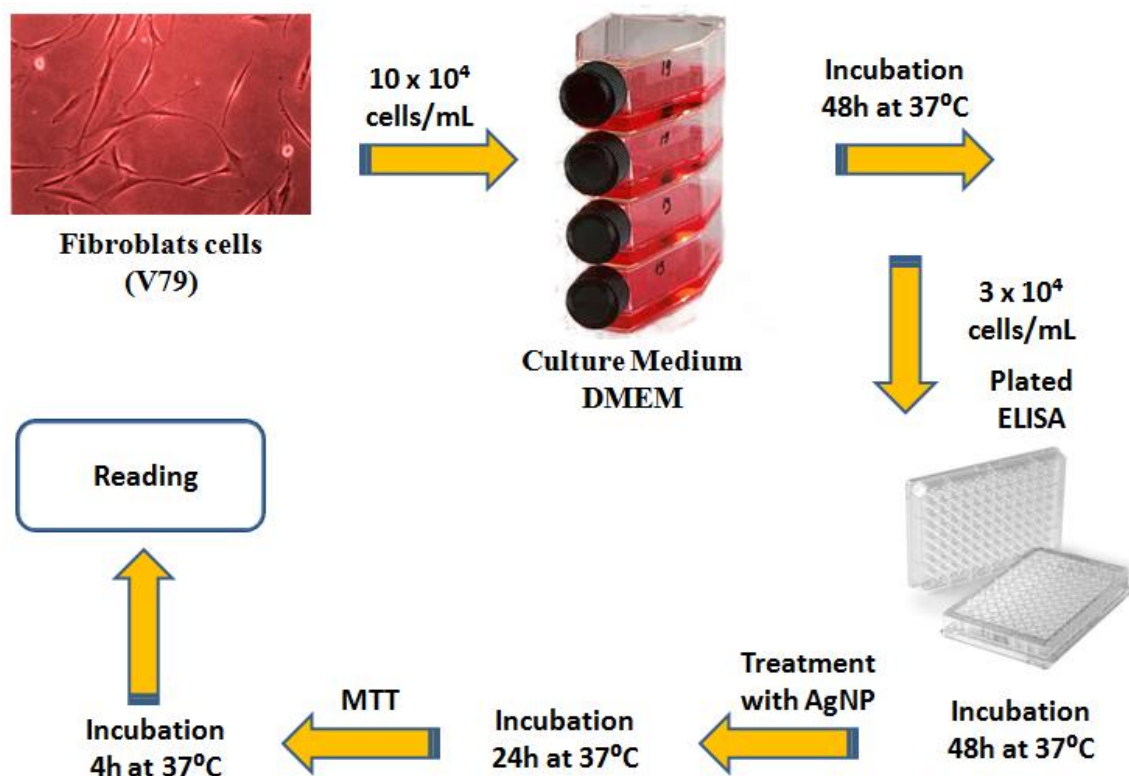
The cytotoxicity of the AgNP_{bio} was evaluated using two different endpoints: MTT reduction and DNA content in according to the methods described below.

A. Methylthiazolotetrazolium (MTT) reduction

The MTT reduction assay was performed as described by Denizot and Lang.²⁴ Briefly, cells were washed once with PBS before adding 0.1 mL of serum-free medium containing 0.05% of MTT salt to each well. After incubation for 5 h, the culture medium was removed and 0.1 mL of ethanol was added to each well to solubilize the formazan formed. The plates were shaken gently for 10 min and the absorbance was measured at 570 nm (VersaMax, Tunable Microplate Reader, Molecular Devices, Co., Sunnyvale, CA, USA).

B. Deoxyribonucleic Acid (DNA) Content

The assay for the estimation of DNA content present in the cell culture was performed as described.²⁵ After the MTT assay, the culture medium was removed from solution that contained the MTT dye and the AgNP_{bio} solution. The cells were washed with PBS - Ca²⁺ (PBS Ca²⁺ in mmol dm⁻³: 136.9 NaCl; 2.8 KCl; 7.99 NaHPO₄; 1.47 KH₂PO₄; 1.24 CaCl₂, 0.5 MgCl₂) fixed with aqueous trichloroacetic acid (TCA, 5%), washed 2 times with ethanol (all solutions used were cold, 4 °C) and air dried. For cell lysis, NaOH 0.5 mol L⁻¹ (0.1mL/well) was added and system was kept for 1 h at 37 °C and then, the solution absorbance was read using spectrophotometer at 260nm.



3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 AgNP_{bio} characterization

The color of the *Fusarium oxysporum* fungal filtrate changed from the pale yellow to brownish upon 28 h of addition of Ag⁺ ions indicating the initial formation of AgNP_{bio} (**Fig 1**). Synthesis of the AgNP_{bio} was confirmed by UV-visible spectroscopy as a plasmon absorption band, with the maximum at 410 nm to 425 nm significantly increased in intensity over time (**Fig 2A**). Spherical particles with the size of 22 nm were observed by TEM as shown (**Fig 2B**). The average sizes of AgNP_{bio} measured by PCS and Nanosight were approximately 95 nm exhibiting the polydispersity index of 0.3 indicative for polydispers sample, also seen in TEM. The particles concentration, measured by Nanosight, was 13 x 10¹¹ particles/mL. Differences in the sizes of the AgNP_{bio} that were measured in independent experiments are the consequences of the differences between hydrodynamic radii that include the protein capping around the particles as already

described in the literature.^{12, 13} The zeta potential of AgNP_{bio} was negative with values of -37.2 ± 5.8 mV and are indicative for good particles' stability. The physical stability (size and zeta potential) of nanoparticles was measured over 120 days, in intervals of 30 days (**Fig 3**). All parameters did not change significantly in 120 days showing an excellent stability of the AgNP_{bio}.

3.2. Antibacterial assay

Antimicrobial assays were performed varying concentrations of AgNP_{bio} (from 13×10^{11} to 2.5×10^9 particles/mL) against *E. coli*, *S. typhimurium* and *S. aureus* treated with reduced form of glutathion (GSH) and without any GSH (**Table 1**).

The minimum inhibitory concentration (MIC) values obtained for the AgNP_{bio} against *E. coli* are very low ($0.73 \mu\text{g mL}^{-1}$ or 1.0×10^{10} particles/mL) indicating an excellent activity against this Gram-negative bacterium. Similar results were reported in the works (**Table 2**).^{26, 27} For the other Gram-negative bacteria tested, *Salmonella typhimurium*, the MIC values were $0.36 \mu\text{g mL}^{-1}$ and 5.0×10^9 particles/mL, considered very low compared to the literature. Some authors in the literature^{28, 29} found MIC values of 3.12 to $3.00 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectively, although Jain *et al.* (2009)²⁸ used the photoassisted reduction method for the synthesis of silver nanoparticles and Lkhagvajav *et al.* (2011)²⁹ the sol-gel method.

Interestingly, the MIC values against Gram-positive bacteria seems to be almost twice as high than values obtained for the Gram-negative bacteria. The MIC of *Staphylococcus aureus*, a Gram-positive bacterium was $1.47 \mu\text{g mL}^{-1}$ (2.0×10^{10} particles/mL). Similar MIC values were reported previously by literature^{26, 27} with silver nanoparticles synthesized by fungi (**Table 2**).

Therefore, our results showed better efficacy against Gram-negative bacteria (*E. coli* and *S. typhimurium*) than Gram-positive (*S. aureus*). These data could be explained when we compare Gram-positive and Gram-negative bacteria differences in the microbial wall structures. In this regard, Gram-negative microorganisms have two cellular membranes and a very porous outer membrane that facilitates the AgNP_{bio} way to the periplasmatic space encountering one thin polysaccharides bacterial wall and the inner membrane. Differently, Gram-positive bacteria have very thick polysaccharide bacterial wall that do not permit AgNP_{bio} easy access to the membrane. We can assume that AgNP_{bio} need more time to penetrate this thick barrier and, therefore, more

particles are necessary to inhibit such bacteria. Our data are comparable to the published data on different MIC against Gram-negative and positive bacteria, but this is the first time that these results are discussed in this manner, proposing a mechanism of entrance and approaching of AgNPs to the bacterial membranes.

When one works with potent bacterial inhibitors such as AgNP_{bio} are, it is also important to verify if the inhibitory growth is a bactericidal or bacteriostatic especially due to emergence of the bacterial resistance and multiresistance to antibiotics that represent very serious public health worldwide problem. The development of bacterial biofilms on materials used in hospitals and medicine can lead to antibiotics resistance, which is the ability to survive in the presence of bacteriostatic factors, not necessarily expressing a genetic resistance. Besides HIV infections, tuberculosis and influenza, the antibioresistance is considered along with the other mentioned diseases a global concern.³⁰ Reduced antimicrobial susceptibility is associated with the biofilm phenotype, improving the need for the development of more effective antibiotics. In this context, nanometals are considered promising agents compared to the traditional antibiotics since they act at different stages of the vital viral and bacterial metabolism, making consecutive mutations necessary for the development of chemotherapy resistance.³¹

The MIC value obtained for the fungus *Tricophyton rubrum* was 2.95 µg mL⁻¹ (4.1 x 10¹⁰ particles/mL). This value is lower than that found in the literature. Noorbakhsh (2011)³² verified that silver nanoparticles produced by *Klebsiella pneumoniae* showed MIC against *T. rubrum* of 10 µg mL⁻¹, although the size of nanoparticles used is unknown. For fungus *Aspergillus niger*, the value of MIC is 5.9 µg mL⁻¹ (8.1 x 10¹⁰ particles/mL). The literature data about MIC values using AgNP against *A. niger* are scarce. Different data reported may be due to the differences in the synthesis process of silver nanoparticles, when herein biological process using *Fusarium oxysporum* was used, and most of the published data refer to chemical AgNPs. According to Pal *et al.* (2007)³¹, the size and shape of nanoparticles also may be related to the action of silver nanoparticles, but further research should be conducted to elucidate the mechanism of action of AgNPs. However, the low values verified with AgNP_{bio} produced in this work indicate interesting particles with a high antifungal activity against *T. rubrum*, that are the most important dermatophytes in nail infection (onicomycosis);^{1, 33} and *A. niger* may cause pneumonia in immunocompromised persons and also mycoses.^{34, 35} Furthermore, the MIC value of AgNP_{bio} against *T. rubrum* was lower than MIC value against *A. niger*. This difference can be related with

fungi membranes, more specifically with characteristics of protection of the complex chitin-melanin present in the cell wall.³⁶

The principal types of melanin produced by fungi are dihydroxyphenylalanine (DOPA)-melanin and dihydroxynaphthalene (DHN)-melanin, which are the virulence factors important to quench free radicals.³⁷ It is known that the *Trichophyton* species are able to synthesize melanin-like compounds *in vitro* only under specific conditions.^{38, 39} However, this is major component of the outermost wall layer of *Aspergillus* species. In fungi, α -1,3-glucan, which appears to protect young, non-melanized hyphae from the action of hydrolytic enzymes, presumably because of the α -glucan's ability to hinder them from reaching their substrates. Old hyphae use the α -1,3-glucan layer as a source of carbon, and they become deprived of this protective shield. Melanin, then, substitutes the α -glucan in this role by complexing with chitin and becoming a macromolecule extremely resistant to degradation.

3.3. Antimicrobial Mechanism of AgNP_{bio}

The addition of reduced glutathione (GSH) together with the AgNP_{bio} showed a protective effect for all microorganisms tested, especially for *S. typhimurium* increasing MIC from 0.36 $\mu\text{g mL}^{-1}$ to 2.95 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (**Table 1**).

On bactericidal effect, *S. aureus* showed highest resistance among bacteria tested herein even when with AgNP_{bio} glutathione was used GSH (**Fig. 4**). According to the literature, it is known that *S. aureus* is highly resistant to antibiotics in general.^{40, 41} On the bactericidal effect of AgNP_{bio} values for *E. coli* were higher when GSH was used, demonstrating that low concentrations of AgNP_{bio} are sufficient to provoke *E. coli* cells death (13×10^{11} to 8.1×10^{10} and 13×10^{11} to 4.1×10^{10} particle/mL respectively) (**Fig. 4**). The bacteriostatic effect of silver nanoparticles observed point that *S. aureus* showed a broad concentration range with a bacteriostatic effect, *i.e.*, confirming growth inhibition but without cells death.

3.4. Bacterial morphology alteration evaluation

In order to evaluate the influence of AgNP_{bio} on microorganisms morphology, Scanning Electron Microscopy (SEM) images of *E. coli* before and after treatment with particles, in MIC

concentration, was carried out (**Fig. 5**). It is possible to notice that *E. coli* rods morphology before the AgNP_{bio} treatment. When *E. coli* was exposed to AgNP_{bio}, in the minimum inhibitory concentration (MIC), damage on the morphology of some cells was observed as shown (**Fig 5 B and C, arrows**). However, it can be observed that some cells still have normal morphology even when AgNP_{bio} present. This result confirms the data obtained in bactericidal and bacteriostatic assays, where it was verified that AgNP_{bio} exhibit bacteriostatic action against *E. coli*.

3.5. Cytotoxicity assay

Using the MTT assay on V79 cells, the inhibitory concentration (IC₅₀) of AgNP_{bio} was found to be 3.4 µg mL⁻¹ (4.7 x 10¹⁰ particles/mL, **Fig 6a**) and it remained stable until the highest concentration tested (8.5 µg mL⁻¹ or 1.2 x 10¹¹ particles/mL). The same concentration of AgNP_{bio} were tested with the addition of glutathione (GSH, **Fig 6b**), and even higher AgNP_{bio} concentrations tested were not sufficient to reach the IC₅₀, indicating a protective effect of the glutathione (GSH). The DNA assay showed that even the highest concentrations of AgNP_{bio} tested were sufficient to cause DNA damage in more than 60% of V79 cells (**Fig 6a**), and with the addition of the GSH, the DNA damage was almost none (**Fig 6b**).

According to these results, GSH was found to be very effective in decreasing the cytotoxicity of the AgNP_{bio}, indicating that AgNP_{bio} toxicity may be related to oxidative stress. Glutathione (GSH) is a tripeptide containing sulphydryl group (-SH) with important anti-oxidant chemical action, which is responsible for the maintenance of redox homeostasis in the cells.⁴² GSH action is to capture free radicals, forming oxidated glutathione (GSSG), therefore it is possible that the beneficial action of GSH is related to the attenuation of the toxic effects of reactive oxidative species (ROS).⁴³

Mukherjee *et al.*⁴⁴ compared the *in vitro* cytotoxicity of silver nanoparticles into two mammalian cell lines: HeLa and HaCaT. In their study, it was verified that silver nanoparticles induce higher levels of oxidative stress, glutathione depletion and damage of the cell membrane triggering the cell death by apoptosis. Although the authors used nanoparticles purchased from Sigma -Aldrich, the average size of the nanoparticles was 27 nm, similar to that presented in this article.

The results of the MTT assays can also be seen in a similar way. Due to the generation of

ROS induced by the presence of silver nanoparticles, an oxidative stress is created when AgNP_{bio} enter the cell, therefore, damaging mitochondria and consequently causing cytotoxicity and cell death. Similar results were reported by Carlson *et al.* (2008)⁴² using silver nanoparticles produced by a unknown method, which has observed that nanoparticles with the sizes from 15 nm to 30 nm exhibit high cytotoxicity, which decrease when AgNPs of 55 nm size were used. This could be related to the direct interaction between the silver nanoparticles of a small size and the glutathione (GSH), which found a large surface available to react with, thus decreasing the levels of this GSH in the cell, and increasing the generation of ROS, supporting the hypothesis that cells are submitted to oxidative stress, provoking in the observed cytotoxicity.⁴²

In addition to size, the toxicity of silver nanoparticles also depends on the morphology, zeta potential and on the surface properties of these particles, while synthetic methods also can have an effect (Table 2).^{3,7} Some further investigations need to be conducted to understand better the complex action mechanism of silver nanoparticles and the relation with important AgNPs physical-chemistry properties.

4. CONCLUSIONS

Biogenic silver nanoparticles synthesized by green method using *Fusarium oxysporum* showed spherical shape, small size, low polydispersity index, and stability during 120 days. These nanoparticles exhibited high antimicrobial activity, which was significantly decreased with the addition of reduced glutathione (GSH), confirming the probable mechanism of AgNP_{bio} action through induction of the oxidative stress. It is more likely that this glutathione effect is extracellular and protective against membrane peroxidation, since any tripeptide uptake is less probable. Furthermore, biogenic silver particles exhibited high antifungal activity against important dermatophytes (*T. rubrum* and *A. niger*). Differences in the antimicrobial activities were observed and are, probably, related with microorganism membrane composition. The highest antimicrobial activity of biogenic nanosilver was against Gram-negative bacteria and the fungus *Trichophyton rubrum*. The cytotoxicity assays indicated that action mechanism of AgNP_{bio} is due to the oxidative stress because evident reduction in the mitochondrial and DNA damage was observed when glutathione (GSH) was added into the culture medium. In V79 cells, the encountered IC₅₀ values in MTT assays were increased indicating, again, a possible

antimicrobial and cytotoxicity mechanisms of the biogenic silver nanoparticles through oxidative stress. Furthermore, in a low concentration (below $0.42 \mu\text{g mL}^{-1}$) these particles do not exhibit cytotoxicity effect against V79 cells and can be used safely. Although we still need to investigate the glutathione effects on AgNP_{bio} cytotoxicity, we can assume that a formulation of the biogenic silver nanoparticles can be used safely even in higher amounts.

Aknowledgements: CNPq (Rede de Nanotoxicologia)

References

1. P. D. Marcato, M. Durán, S. Huber, M. Rai, P. S. Melo, O. L. Alves, N. Durán Biogenic silver nanoparticles and its antifungal activity as a new topical transungual drug delivery, *J. Nano Res.* 20, 99-107 **(2012)**
2. Y. Zhou, Y. Kong, S. Kundu, J. D. Cirillo, H. Liang Antibacterial activities of gold and silver nanoparticles against *Escherichia coli* and *Bacillus Calmette-Guérin*. *J. Nanobiotechnol.* 10,19 **(2012)**
3. N. Durán,; P. D. Marcato, R. Conti, O. L. Alves, F. T. M. Costa, M. Brocchi, . Potential use of silver nanoparticles on pathogenic bacteria, their toxicity and possible mechanisms of action, *J. Braz. Chem. Soc.* 21,949-959 **(2010)**
4. N. Durán, , A. B. Seabra, , R. De Lima, In *Nanotoxicology: Materials, methodologies, and assessments*, Edited N. Durán, S.S. Guterres, O.L. Alves, Springer, London **(2014)** PP. 245-263.
5. R. De Lima, A. B. Seabra, and N. Durán, Silver nanoparticles: a brief review of cytotoxicity and genotoxicity of chemically and biogenically synthesized nanoparticles. *J. Appl. Toxicol.* 32, 867-879 **(2012)**
6. I. Gupta, N. Durán, and M. Rai, in *Nano-Antimicrobials: progress and prospects*, Edited M. Rai and N. Cioffi, Springer, Germany, **(2012)**, pp. 525-548
7. R. Lima, , L. O. Feitosa, , D. Ballottin, , P. D. Marcato, , L. Tasic, , N. Durán, Cytotoxicity and genotoxicity of biogenic silver nanoparticles. *J. Phys. Conf. Ser.* 429, 012020 **(2013)**
8. N. Ahmad, S. Sharma, V. N. Singh, S. F Shamsi, A. Fatma, B. R. Mehta, Biosynthesis of silver nanoparticles from *Desmodium triflorum*: a novel approach towards weed utilization. *Biotechnol. Res. Int.* Article ID 454090, 8 pages **(2011)**
9. M. M. D. Paula, C. V. Franco, M. U. Baldin, R. S. A. Larissa, B. C. Tatiana, G. D. Savi, L. F. Bellato, W. A. Fiori, L. Silva Synthesis, characterization and antibacterial activity studies of poy-(styrene-acrylic acid) with silver nanoparticles. *Mater Sci Eng C* 29, 647-650 **(2009)**

10. B. U. Lee , S. H. Yun , J. H. Ji , G. N. Bae, . Inactivation of *S. epidermidis*, *B. subtilis*, and *E. coli* bacteria bioaerosols deposited on a filter utilizing airborne silver nanoparticles. J. Microbiol Biotechnol. 18,176-182 **(2008)**
11. A. Panacek , M. Kolár , R. Vecerová , R. Pucek , J. Soukupová , V. Krystof , P. Hamal , R. Zboril , L. Kvitek Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp. Biomaterials 30, 6333-6340 **(2009)**
12. A. G. Rodrigues,; L. Y. Ping, P. D. Marcato, O. L. Alves,M. C. P. Silva,; R. C. Ruiz,; I. S. Meli,; L. Tasic,; A. O.Souza, Biogenic antimicrobial silver nanoparticles produced by fungi. Appl. Microbiol. Biotechnol. 97, 775–782 **(2013)**
13. K. Shameli, M. B. Ahmad, M. Zargar, W. M. Yunus, A. Rustaiyan, N. A. Ibrahim, Synthesis of silver nanoparticles in montmorillonite and their antibacterial behavior. Int. J. Nanomedicine 6, 581-590 **(2011)**
14. M. L. Rodríguez-Sánchez, M. J. Rodríguez, M. C. Blanco, J. Rivas, M. A. López-Quintela, . Kinetics and mechanism of the formation of Ag nanoparticles by electrochemical techniques: a plasmon and cluster time-resolved spectroscopic study, J. Phys. Chem. B. 109, 1183-1191 **(2005)**
15. K. B. Narayanan ,N. Sakthivel, Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes. Adv Colloid Interface Sci. 156,1-13 **(2010)**
16. N. Durán, P. D. Marcato, M. Durán, A. Yadav, A. Gade, M. Rai, Mechanistic aspects in the biogenic synthesis of extracellular metal nanoparticles by peptides, bacteria, fungi, and plants. Appl. Microbiol. Biotechnol., 90,1609–1624 **(2011)**
17. M. Sastry, A. Ahmad, M. I. Khan,; R. Kumar, Biosynthesis of metal nanoparticles using fungi and Actinomycete. Curr. Sci. 85, 162-170 **(2003)**
18. N. Durán, P. D. Marcato, O. L. Alves, G. I. H. Souza, E. Esposito, Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains, J.Nanobiotechnol. 3 ,1-7 **(2005)**
19. N. Durán, P. D. Marcato, O. L. Alves, G. H. Souza, E. Esposito,. Antibacterial effect of silver nanoparticles produced by fungal process on textile fabrics and their effluent treatment. J. Biomed. Nanotechnol., 3, 203-208 **(2007)**

20. A. P. Gade, P. Bonde, A. P. Ingle, P. D. Marcato, N. Duran, M. Rai, Mycosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium acuminatum* and its activity against some human pathogenic bacteria. *Curr Nanosci.* 4, 141-144 (2008)
21. CLSI/NCCLS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard - Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 (ISBN 1-56238-486-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, (2003)
22. CLSI/NCCLS. Método de referência para testes de diluição em caldo para determinação da sensibilidade a terapia antifúngica de fungos filamentosos; Norma Aprovada. NCCLS document M38-A (ISBN 1-56238-470-8). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, (2002)
23. D. H. A. Corrêa, P. S. Melo, C. A. A. Carvalho, M. B. M. Azevedo, N. Duran, M. Haun, Dehydrocrotonin and its β -cyclodextrin complex: cytotoxicity in V79 fibroblasts and rat cultured hepatocytes, *Eur. J.Pharmacol.* 510, 17-24 (2005)
24. F. Denizot, R. Lang ,Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods*89, 271-7 (1986)
25. M. R. Cingi, I. De Angelis, E. Fortunati, D. Reggiani, V. Bianchi, R. Tiozzo, F. Zucco, Choice and standardization of test protocols in cytotoxicology: A multicentre approach,*Toxicol in Vitro* 5, 119-125 (1991)
26. J. S. Kim, E. Kuk, K. N. Yu, J. H. Kim, S. J. Park, H. J. Lee, S. H. Kim, Y. K. Park, Y. H. Park, C. Y. Hwang, Y. K. Kim, Y. S. Lee, D. H. Jeong, M. H. Cho, Antimicrobial effects of silver nanoparticles, *Nanomed.* 3, 95– 101 (2007)
28. J. Jain, S. Arora, J. M. Rajwade, P. Omay, S. Khandelwal, K. M. Paknikar, Silver nanoparticles in therapeutics: development of an antimicrobial gel formulation for topical use, *Mol. Pharmaceut.* 6, 1388–1401 (2009)
29. N. Lkhagvajav, I. Yaşa, E. Çelik, M. Koizhaiganova, Ö. Sari, Antimicrobial activity of colloidal silver nanoparticles prepared by sol-gel method, *Dig. J. Nanomat. and Bios.* (6(1): 149-154 (2011)

30. C. S Ciobanu, S. L. Iconaru, M. C. Chifiriuc, A. Costescu, P. Le Coustumer, D. Predoi, Synthesis and antimicrobial activity of silver-doped hydroxyapatite nanoparticles, *BioMed Res. Int.* ID 916218, 10. **(2013)**
31. S. Pal, Y. K. Tak, J. M. Song Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the Gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73,1712-1720, **(2007)**
32. F. Noorbakhsh, Antifungal effects of silver nanoparticle alone and with combination of antifungal drug on dermatophyte pathogen *Trichophyton rubrum*. *IPCBEE* 5, 364-367 **(2011)**
33. P. D. Marcato, G. Nakasato, M. Brocchi, P. S. Melo, S. C. Huber,; I. R. Ferreira, O. A. Alves,; N. Durán, Biogenic silver nanoparticles: antibacterial and cytotoxicity applied to textile fabrics, *J. Nano Res.* 20,69-76 **(2012)**
34. E. Schuster, N. Dunn-Coleman, J. C. Frisvad, P. W. M. van Dijck. On the safety of *Aspergillus niger* – a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59, 426–435 **(2002)**
35. World Health Organization. Prevention of hospital-acquired infections: A practical guide. 2nd edition. Department of Communicable Disease, Surveillance and Response. WHO/CDS/CSR/EPH, 2002.12.
36. G. San-Blas The cell wall of fungal human pathogens: Its possible role in host-parasite relationships. *Mycopathologia* 79, 159 184 **(1982)**
37. K. Langfelder, M. Streibel, B. Jahn, G. Haase, A. A. Brakhage, Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. *Fungal Genet. Biol.* . 38, 143–158 **(2003)**
38. R. A. Zussman, I. Lyon, E. E. Vicher, Melanoid pigment production in a strain of *Trichophyton rubrum*. *J. Bact.* 80, 708–713 **(1960)**
39. S. Youngchim, S. Pornsuwan, J. D. Nosanchuk, W. Dankai, N. Vanittanakom Melanogenesis in dermatophyte species in vitro and during infection. *Microbiol.*, 157, 2348–2356 **(2011)**
40. H. F. Chambers, F. R. De Leo, Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era, *Nature Rev. Microbiol.* 7, 629-641 **(2009)**

41. M. Z. David, R. S. Daum, Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. Clin. Microbiol. Rev. 23,616-687 **(2010)**
42. C. Carlson, S. M. Hussain, A. M. Schrand, L. K. Braydich-Stolle, K. L. Hess, R. L. Jones, J. J. Schlager. Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species, J. Phys. Chem. B. 112, 13608-13619 **(2008)**
43. S. C. Corticeiro, A. I. L. Gusmão, E. M. A. P. Figueira, A importância da glutatona no estado oxidativo de *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* sob exposição ao Cd. Tecnologia enzimática e microbiana. 40, 132-137 (2006)
44. S. G. Mukherjee, N. O'Claonadh, A. Casey, G. Chambers. Comparative in vitro cytotoxicity study of silver nanoparticle on two mammalian cell lines, Toxicol. In Vitro. 26, 238-251 **(2012)**
45. C. N. Lok, C. M. Ho, R. Chen, Q. Y. He, W. Y. Yu, H. Sun, P. K. H. Tam, J. F. Chiu, C. M. Che Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities, J. Biol. Inorg. Chem. 12, 527–534 **(2007)**
46. C. N. Lok, C. M. Ho, R. Chen, Q. Y. He, W. Y. Yu, H. Sun, P. K. H. Tam, J. F. Chiu, C. M. Che, Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles, J. Proteome Res., 5, 916-924 **(2006)**
47. E. Parameswari, C. Udayasoorian, S. P. Sebastian, R. M. Jayabalakrishnan, The bactericidal potential of silver nanoparticles, Int. Res. J. Biotechnol. 1, 44-49 **(2010)**
48. J. P. Ruparelia, A. K. Chatterjee, S. P. Duttagupta, S. Mukherji Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles, Acta Biomater. 4, 707–716 **(2008)**
49. S. H. Kim, H. S. Lee, D. S. Ryu, S. J. Choi, D. S. Lee, Antibacterial activity of silver-nanoparticles against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, Korean J. Microbiol. Biotechnol. 39,77–85 **(2011)**
50. P. D. Marcato, N. Durán in: Metal Nanoparticles in Microbiology, Edited M Rai and N Durán, Springer verlag, Germany, **(2011)** pp. 249-267.
51. P. V. Quelemes, F. B. Araruna, B. E. F. de Faria, S. A. S. Kuckelhaus, D. A. da Silva, R. Z. Mendonça, C. Eiras, M. J. S. Soares, J. R. S. A. Leite, Development and

antibacterial activity of cashew gum-based silver nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.*, 14, 4969-4981 **(2013)**

52. M. A. Ansari, H. M. Khan, A. A. Khan, A. Malik, A. Sultan, M. Shahid, F. Shujatullah, A. Azam, Evaluation of antibacterial activity of silver nanoparticles against MSSA and MRSA on isolates from skin infections, *Biol. Med.*, 3, 141-146 **(2011)**

Table 1. Minimum inhibitory concentration values obtained for biogenic silver nanoparticles treatments with and without the addition of glutathione (GSH) against the selected microorganisms

Microorganism	MIC AgNP _{bio}		MIC AgNP _{bio} + GSH	
	Particle/mL	µg/mL	Particle/mL	µg/mL
<i>A. niger</i> (ATCC 16404)	8.1×10^{10}	5.90	3.2×10^{11}	23.61
<i>T. rubrum</i> (ATCC 28188)	4.1×10^{10}	2.95	8.1×10^{10}	5.90
<i>E. coli</i> (ATCC 11229)	1.0×10^{10}	0.73	4.1×10^{10}	2.95
<i>S. aureus</i> (ATCC 9144)	2.0×10^{10}	1.47	8.1×10^{10}	5.90
<i>S. typhimurium</i> (ATCC 14028)	5.0×10^9	0.36	4.1×10^{10}	2.95

Table 2. A brief review of published results using silver nanoparticles against microorganisms with minimum inhibitory concentration (MIC), method of synthesis and size of the nanoparticles.

Microorganism	MIC (µg/mL)	Origin of AgNP	Size range of AgNP (nm)	Authors
<i>E. coli</i> (clinically isolated)	0.313	Biological	Not described	Thirumurugan <i>et al.</i> , 2009 ²⁷
<i>E. coli</i> (ATCC 43886)	0.56	Chemical	13,4	Kim <i>et al.</i> , 2007 ²⁶
<i>E. coli</i> (ATCC 117)	1.56	Chemical	7-20	Jain <i>et al.</i> , 2009 ²⁸
<i>E. coli</i> (K12 strain, MG1655)	1.8	Chemical	44-80	Lok <i>et al.</i> , 2007 ⁴⁵
<i>E. coli</i> (K12 strain, MG1655)	2.9	Chemical	9,3	Lok <i>et al.</i> , 2006 ⁴⁶
<i>E. coli</i> (ATCC 12228)	3	Chemical	20-45	Lkhagvajav <i>et al.</i> , 2011 ²⁹
<i>E. coli</i> (MTCC 433)	10	Chemical	53-91	Parameswari <i>et al.</i> , 2010 ⁴⁷
<i>E. coli</i> (MTCC 443)	40	Chemical	3,32	Ruparelia <i>et al.</i> , 2008 ⁴⁸
<i>E. coli</i> (clinically isolated)	100	Chemical	Not described	Kim <i>et al.</i> , 2011 ⁴⁹
<i>E. coli</i> (MTCC 1302)	120	Chemical	3,32	Ruparelia <i>et al.</i> , 2008 ⁴⁸
<i>E. coli</i> (MTCC 1687)	140	Chemical	3,32	Ruparelia <i>et al.</i> , 2008 ⁴⁸
<i>E. coli</i> (ATCC 739)	180	Chemical	3,32	Ruparelia <i>et al.</i> , 2008 ⁴⁸
<i>E. coli</i> (ATCC 25923)	1,8	Biological	20-40	Marcato and Durán, 2011 ⁵⁰
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	6.75	Biological	3-6	Quelemes <i>et al.</i> , 2013 ⁵¹
<i>E. coli</i> silver resistant (J53, pMG101)	770.9	Chemical	44-80	Lok <i>et al.</i> , 2007 ⁴⁵
<i>S. aureus</i> (clinically isolated)	0.625	Biological	Not described	Thirumurugan <i>et al.</i> , 2009 ²⁷
<i>S. aureus</i> (ATCC 19636)	1,12	Chemical	13,4	Kim <i>et al.</i> , 2007 ²⁶
<i>S. aureus</i> (ATCC 6538-P)	4	Chemical	20-45	Lkhagvajav <i>et al.</i> , 2011 ²⁹
<i>S. aureus</i> (ATCC 19636)	5.6	Chemical	13,4	Kim <i>et al.</i> , 2007 ²⁶
<i>S. aureus</i> (ATCC 6538)	6.25	Chemical	7-20	Jain <i>et al.</i> , 2009 ²⁸
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	12.5	Chemical	5-10	Ansari <i>et al.</i> , 2011 ⁵²
<i>S. aureus</i> (clinically isolated)	100	Chemical	Not described	Kim <i>et al.</i> , 2011 ⁴⁹
<i>S. aureus</i> (NCIM 2079)	120	Chemical	3,32	Ruparelia <i>et al.</i> , 2008 ⁴⁸
<i>S. aureus</i> (NCIM 5021)	120	Chemical	3,32	Ruparelia <i>et al.</i> , 2008 ⁴⁸
<i>S. aureus</i> (NCIM 5022)	120	Chemical	3,32	Ruparelia <i>et al.</i> , 2008 ⁴⁸
<i>S. aureus</i> (ATCC 05923)	1.9	Biological	20-40	Marcato and Durán, 2011 ⁵⁰
<i>S. aureus</i> (ATCC 29213)	13.5	Biological	3-6	Quelemes <i>et al.</i> , 2013 ⁵¹
<i>S. typhimurium</i> (CCM 5445)	3	Chemical	20-45	Lkhagvajav <i>et al.</i> , 2011 ²⁹
<i>S. typhimurium</i> (ATCC 23564)	3.12	Chemical	7-20	Jain <i>et al.</i> , 2009 ²⁸
<i>T. rubrum</i> (not described)	10	Biological	Not described	Noorbakhsh, 2011 ³²

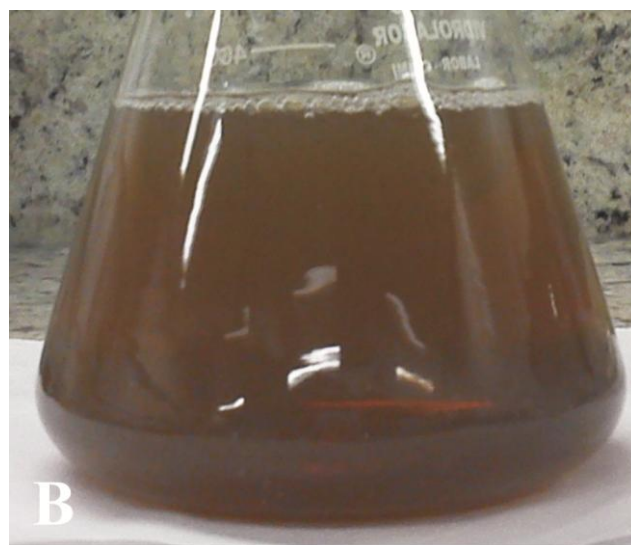


Figure 1: Beakers containing: a) Fungal filtrate before silver ion addition, b) Fungal filtrate after 28 h upon silver ion addition.

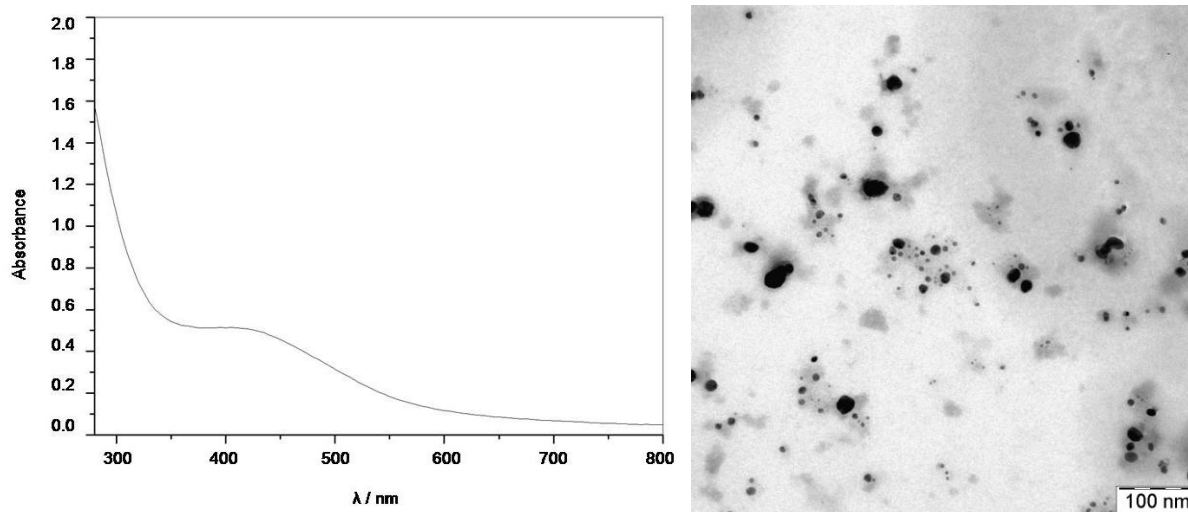


Figure 2A: UV-Vis spectra during the reaction of biogenic synthesis of silver nanoparticles in an aqueous AgNO_3 (10^{-2} M) solution. **Figure 2B:** Transmission electron microscopy (TEM) of silver nanoparticles synthesized by biological method using *Fusarium oxysporum*.

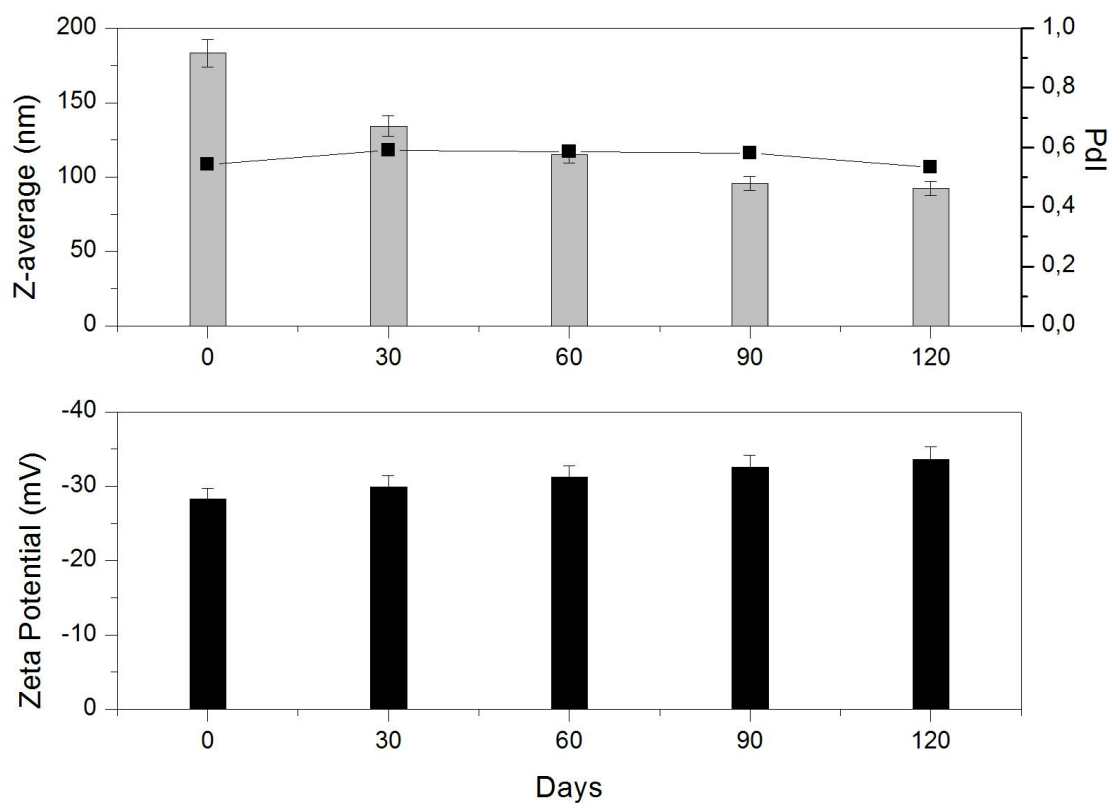


Figure 3. Physical stability of AgNP_{bio} stored at room temperature and under light protection immediately after preparation (0 day) and over 120 days. Bars indicate mean diameter (above) and zeta potential (below). Lines indicate size distribution (PdI).

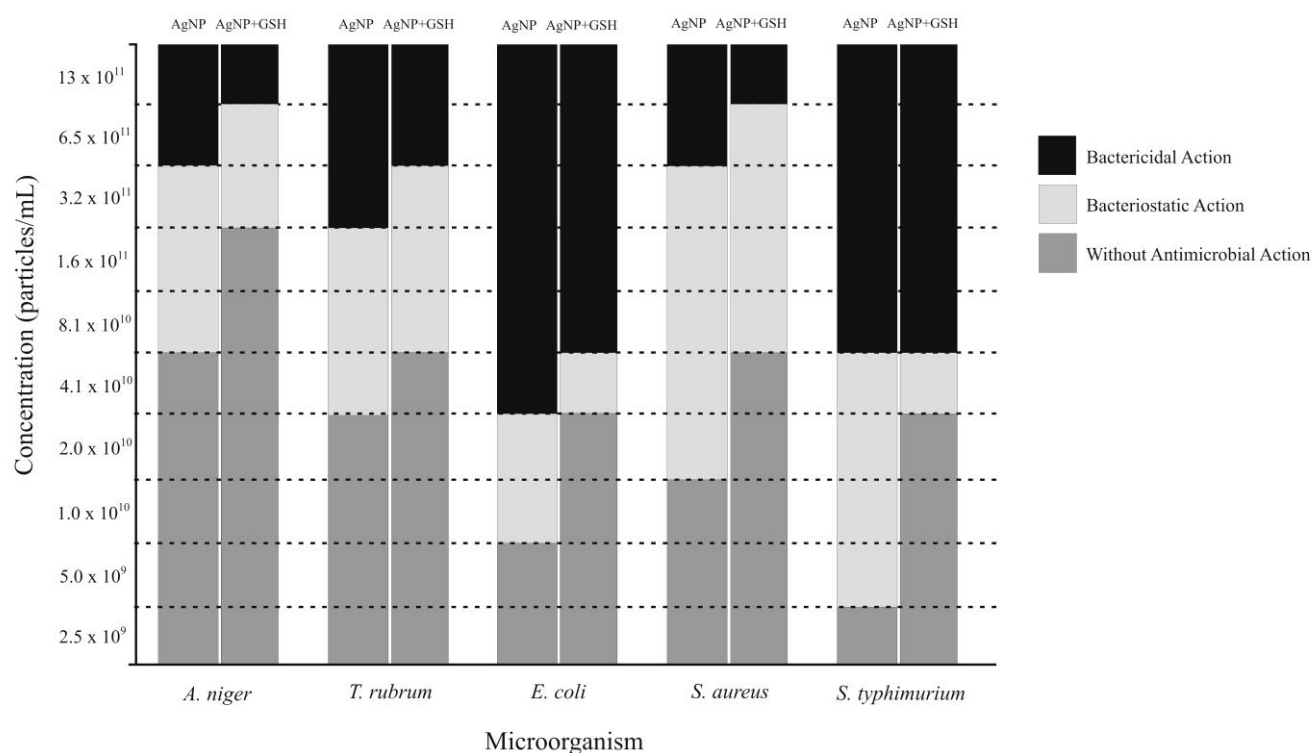


Figure 4. Effect on inhibition and death of microorganisms when treated with biogenic silver nanoparticles in absence and presence of glutathione (GSH). All values are expressed in particles/mL.

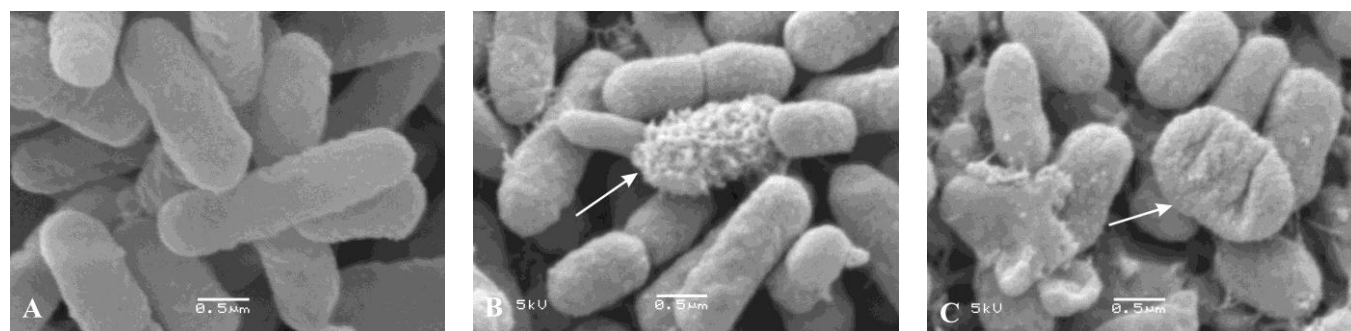


Figure 5: Scanning electron micrographs of *Escherichia coli* cells in two investigated cases: (A) Without treatment with biogenic silver nanoparticles, showing typical rod-shape; and (B) and (C) When treated with the biogenic silver nanoparticles at the minimum inhibitory concentration (MIC), showing a rod-shape with deformities as pointed with the arrows.

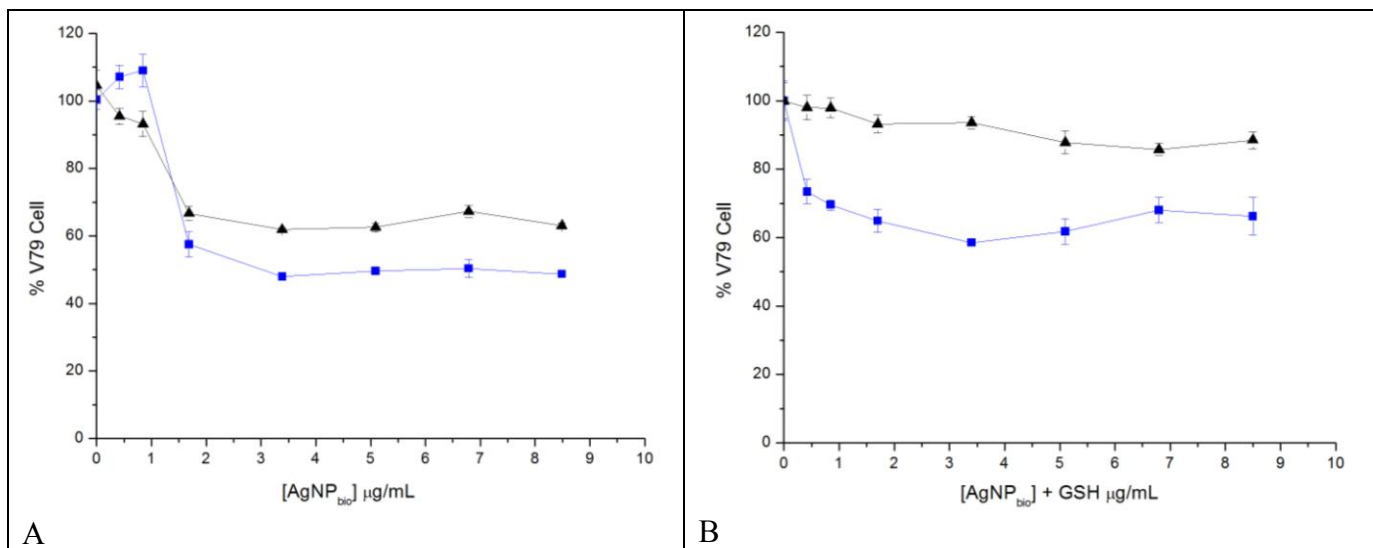


Figure 6: Viability of V79 cells using the MTT (■) and DNA (▲) assays *versus* silver nanoparticles concentration (μg/mL): (a) without glutathione and b) with glutathione.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A síntese das nanopartículas foi confirmada por espectroscopia de UV - visível através do surgimento da banda de absorção de plasma em torno de 410 nm a 425 nm, a qual aumentou significativamente em intensidade ao longo do tempo indicando a formação das nanopartículas de prata.

A morfologia das nanopartículas foi caracterizado por TEM, sendo observado partículas esféricas com um tamanho médio de 22 nm. O diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas de prata sintetizadas também foi analisado por PCS e NTA, sendo observado um valor médio de 95 nm e um índice de polidispersão de 0,3. O valor do diâmetro hidrodinâmico (DH) foi maior que o avaliado por TEM pois o DH refere-se ao diâmetro da partícula e a capa de estabilização da mesma, que no caso das nanopartículas de prata biogênica, se refere a capa protéica que estabiliza as nanopartículas de prata como já demonstrado na literatura (Rodrigues et al., 2013; Shameli et al., 2011, Duran et al., 2007). A concentração de partículas, medida por NanoSight, foi de 13×10^{11} partículas/mL.

O potencial zeta das nanopartículas foi negativo com valores de $-37,2 \pm 5,8$ mV, o qual pode indicar uma alta estabilidade das dispersões. A estabilidade física (tamanho e potencial zeta) das partículas foi medida durante 120 dias, em intervalos de 30 dias e foi verificado que todos os parâmetros não mudaram significativamente durante este período, demonstrando uma excelente estabilidade destas nanopartículas.

Os ensaios antimicrobianos foram realizados em várias concentrações de AgNP_{bio} (a partir de 13×10^{11} a $2,5 \times 10^9$ partículas/mL) contra *E. coli*, *S. aureus*, *S. typhimurium*, *T. rubrum* e *A. niger*, sendo que estes testes foram realizados com ou sem adição de GSH. A concentração inibitória mínima (MIC) obtida em *E. coli* tratada com AgNP_{bio} foi em uma concentração baixa ($0,73 \mu\text{g mL}^{-1}$ ou de $1,0 \times 10^{10}$ partículas/mL),

indicando uma excelente atividade contra esta bactéria Gram-negativa . Resultados semelhantes foram relatados por Thirumurugan et al. (2009) e Kim et al. (2007).

Para a outra bactéria Gram-negativa testada, o valor da MIC para *Salmonella typhimurium* foi de $0,36 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($5,0 \times 10^9$ partículas/mL), considerado um valor muito eficaz em comparação com dados da literatura. Jain et al. (2009) e Lkhagvajav et al. (2011) descreveram valores de MIC de 3,12 a $3,00 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, apesar de Jain et al. (2009) terem utilizado o método de redução fotoassistido para a síntese de nanopartículas de prata enquanto Lkhagvajav et al. (2011) utilizaram o método de sol-gel .

Os valores de MIC contra as bactérias Gram-positivas foram quase duas vezes superiores do que os valores obtidos para as bactérias Gram-negativas. O MIC para *Staphylococcus aureus*, uma bactéria Gram-positiva, foi de $1,47 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($2,0 \times 10^{10}$ partículas/mL). Os valores de MIC foram similares aos dados relatados anteriormente na literatura com as nanopartículas de prata sintetizados por fungos (Thirumurugan et al., 2009; Kim et al., 2007).

Desta forma, os resultados obtidos no presente estudo mostraram uma melhor eficácia contra as bactérias Gram-negativas (*E. coli* e *S. typhimurium*) do que na bactéria Gram-positiva (*Staphylococcus aureus*). Estes dados podem ser explicados quando comparamos a estrutura da parede microbiana de bactérias Gram-positivas com as Gram-negativas, visto que as Gram-negativas possuem duas membranas celulares e uma membrana exterior muito porosa que facilita a entrada das AgNP_{bio} no espaço periplasmático. Diferentemente, as bactérias Gram-positivas têm polissacarídeos compondo sua parede bacteriana, tornando-a muito espessa e não permitindo que as nanopartículas de prata tenham fácil acesso membrana adentro (Chambers e De Leo, 2009).

O valor de MIC obtido para o fungo *Tricophyton rubrum* foi $2,95 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($4,1 \times 10^{10}$ partículas/mL), sendo este valor inferior ao encontrado na literatura. Noorbakhsh

(2011) verificou que as nanopartículas de prata produzidas por *Klebsiella pneumoniae* apresentaram valores de MIC contra *T. rubrum* de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, entretanto neste estudo não foi indicado o tamanho das nanopartículas utilizadas o que dificulta a sua comparação com o presente estudo já que o diâmetro, a carga superficial, a morfologia, a capa de estabilização são parâmetros que afetam o efeito biológicos das nanopartículas. Para o fungo *Aspergillus niger*, o valor de MIC foi de $5,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($8,1 \times 10^{10}$ partículas/mL). Os dados da literatura sobre os valores de MIC utilizando AgNP contra *A. niger* são escassos.

De acordo com Pal et al. (2007), o tamanho e a forma de nanopartículas também podem estar relacionados com a ação de nanopartículas de prata, mas pesquisas adicionais devem ser realizadas para elucidar o mecanismo de ação destas partículas. No entanto, as baixas concentrações dos MIC das AgNP_{bio} principalmente frente aos fungos, indicam que estas partículas são interessantes contra *T. rubrum*, que são os dermatófitos mais importantes na infecção das unhas (onicomicoses) (Marcato et al., 2012). *A. niger* pode causar pneumonia em pessoas imunocomprometidas e também micoses (Schuster et al., 2002; World Health Organization, 2012). Além disso, o valor de MIC de AgNP_{bio} contra *T. rubrum* foi inferior ao valor de MIC contra *A. niger*. Esta diferença pode estar relacionada com as membranas dos fungos, mais especificamente com as características de protecção do complexo quitina-melanina presente na parede da célula (San-Blas, 1982). Os principais tipos de melanina produzida por fungos são a di-hidroxifenilalanina (DOPA) e di-hidroxinaftaleno-melanina (DHN)-melanina, que são fatores importantes para eliminar os radicais livres de virulência (Langfelder et al., 2003). Sabe-se que as espécies de *Trichophyton* são capazes de sintetizar os compostos do tipo melanina, *in vitro*, apenas sob condições específicas (Zussman et al., 1960; Youngchim et al., 2011), no entanto, é o principal componente da parede de espécies de *Aspergillus*.

A adição de glutathiona reduzida (GSH), juntamente com as nanopartículas de prata, mostrou um efeito protetor para todos os microrganismos testados neste trabalho, especialmente para *S. typhimurium*, aumentando o valor do MIC de $0,36 \mu\text{g mL}^{-1}$ para

2,95 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Provavelmente este aumento no valor do MIC foi devido a proteção do GSH sobre o estresse oxidativo.

Também é importante verificar se a concentração inibitória é bactericida ou bacteriostática, especialmente devido ao aparecimento de resistência bacteriana e multirresistência aos antibióticos que representam um sério problema de saúde pública a nível mundial. Com relação ao efeito bactericida, a *S. aureus* apresentou maior resistência entre as bactérias testadas neste trabalho, mesmo quando utilizado o GSH juntamente com as nanopartículas de prata. De acordo com a literatura, sabe-se que a *S. aureus* é altamente resistente aos antibióticos em geral (Chambers e DeLeo, 2009; David e Daum, 2010). Quanto ao efeito bactericida frente à *E. coli*, (com e sem a adição de GSH) foi observado que baixas concentrações de AgNP_{bio} são suficientes para provocar a morte celular (nas concentrações de $13 \times 10^{11} - 8,1 \times 10^{10}$ e $13 \times 10^{11} - 4,1 \times 10^{10}$ partículas/mL, respectivamente). O efeito bacteriostático das nanopartículas de prata observado aponta que *S. aureus* apresentou uma ampla faixa de concentração com efeito bacteriostático, ou seja, confirmando a inibição do crescimento, porém sem morte celular (Figura 12).

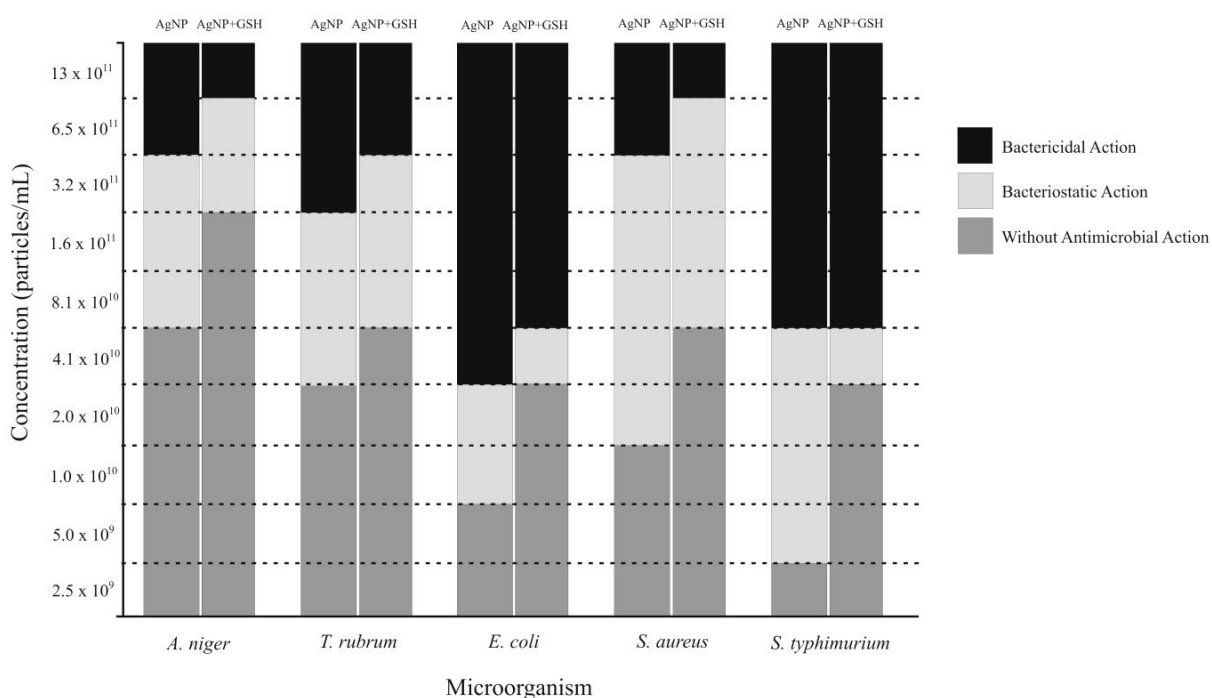


Figura 12. Efeito de inibição e morte de microrganismos tratados com nanopartículas de prata na presença e sem Glutathione reduzida (GSH). Valores expressos em partículas/mL

De modo a avaliar a influência de AgNP_{bio} na morfologia do microrganismo *E. coli*, foram obtidas imagens através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), antes e após o tratamento com as partículas, sendo possível observar danos sobre a morfologia de algumas células na concentração inibitória mínima, porém haviam células bacterianas adjacentes que ainda apresentavam morfologia normal (Figura 13). Este resultado confirma os dados obtidos nos ensaios bactericidas e bacteriostáticos, onde verificou-se que as nanopartículas de pratas produzidas apresentam ação bacteriostática contra *E. coli*.

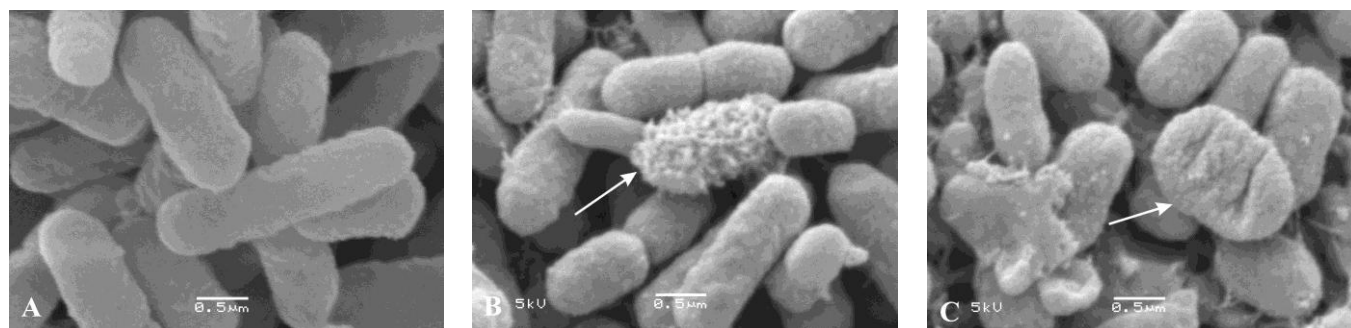


Figura 13. Micrografia Eletrônica de Varredura de *Escherichia coli*. A) Forma típica, sem o tratamento com nanopartículas de prata, apresentando forma típica e B) e C) *E. coli* na concentração inibitória mínima (MIC), evidenciando alterações morfológicas nas setas.

Usando o ensaio de redução do MTT nas células V79, a concentração de nanopartículas que inibe 50% da viabilidade celular (IC_{50}) foi observada em $3,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($4,7 \times 10^{10}$ partículas/mL, Figura 14a) e manteve-se estável até a concentração mais elevada testada ($8,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ou $1,2 \times 10^{11}$ partículas/mL). A mesma concentração de nanopartículas foi testada com a adição de glutathione (Figura 14b), e em concentrações superiores de AgNP_{bio} testadas não foram suficientes para alcançar o valor de IC_{50} , indicando um efeito protetor da Glutathione reduzida. O ensaio de DNA mostrou que nem

mesmo as mais altas concentrações de AgNP_{bio} testadas foram suficientes para provocar danos ao conteúdo de DNA em mais de 60 % das células V79 (Figura 14a), e com a adição de GSH, o dano ao conteúdo de DNA foi quase nulo (14b).

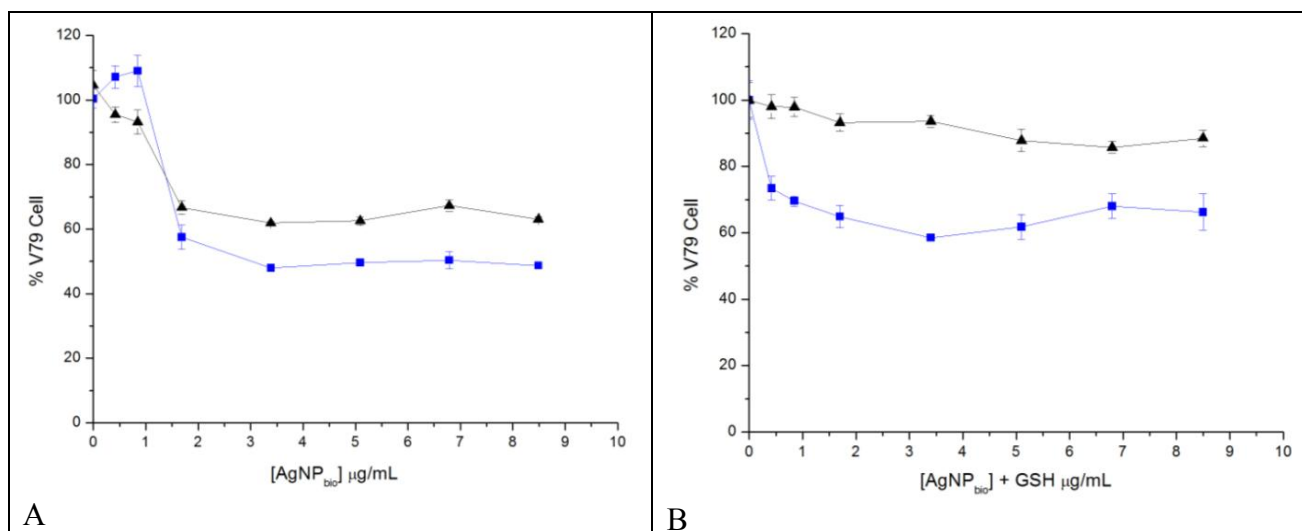


Figura 14. Viabilidade celular em células V79 utilizando o ensaio MTT (■) e DNA (▲), em relação à concentração de nanopartículas de prata (μg/mL). A) sem glutathiona reduzida (GSH) e B) Com a adição do GSH.

De acordo com estes resultados, a GSH apresentou-se eficaz na redução da citotoxicidade da AgNP_{bio} , indicando que a toxicidade oriunda das nanopartículas de prata pode estar relacionada com o estresse oxidativo. A glutathiona (GSH) é um tripeptídeo que contém um grupo sulfidrílico (-SH), com efeito anti-oxidante, o qual é um dos responsáveis pela manutenção da homeostase redox nas células (Carlson et al., 2008), uma vez que a captura de radicais livres por GSH forma glutathiona oxidada (GSSG), por isso, é possível que a ação benéfica da GSH esteja relacionada com a atenuação dos efeitos tóxicos das espécies reativas de oxigênio (ROS) (Corticeiro et al., 2006).

Com relação aos resultados de redução do MTT , também pode ser visto de uma forma semelhante. Devido à geração de ROS induzida pela presença de nanopartículas de prata, uma situação de estresse oxidativo é criada quando AgNP_{bio} entrar na célula, por isso, danificando a mitocôndria e, por conseguinte, causando citotoxicidade e a morte celular. Resultados semelhantes foram relatados por Carlson et al. (2008), utilizando nanopartículas de prata produzidos por um método desconhecido, o qual observaram que as nanopartículas com os tamanhos de 15 nm a 30 nm apresentavam uma elevada citotoxicidade, que diminuiu quando foram usadas nanopartículas de 55 nm de tamanho. Estes resultados podem estar relacionados com a interação direta entre as nanopartículas de prata, de um tamanho pequeno e a glutathione, que encontraram uma grande superfície disponível para reagir, diminuindo assim os níveis de GSH presente na célula e o aumento da geração de ROS, apoiando a hipótese de que as células são submetidas a um estresse oxidativo, resultando na citotoxicidade observada (Carlson et al., 2008). Entretanto, investigações adicionais devem ser realizadas para melhor compreender o mecanismo de ação do complexo de GSH com as nanopartículas de prata e sua relação com as importantes propriedades físico-químicas das nanopartículas de prata.

CONCLUSÃO

Nanopartículas de prata biogênicas sintetizadas pelo método biológico utilizando o fungo *Fusarium oxysporum* apresentaram forma esférica, tamanho nanométrico, baixo índice de polidispersão, e estabilidade durante 120 dias. Estas nanopartículas exibiram elevada atividade antimicrobiana, a qual foi significativamente reduzida com a adição de glutathione reduzida (GSH), podendo supor que o mecanismo de ação dessas nanopartículas é através da indução de estresse oxidativo. É mais provável que este efeito é devido a ação da glutathione extracelular e de proteção contra a peroxidação da membrana, uma vez que qualquer absorção de tripeptídeo é menos provável.

Além disso, as partículas de prata biogênicas exibiram elevada atividade antifúngica contra dermatófitos importantes (*T. rubrum* e *A. niger*). As diferenças entre as atividades antimicrobiana observadas estão provavelmente relacionadas com a composição da membrana do microorganismo. A maior atividade antimicrobiana das nanopartículas de prata produzidas neste trabalho foi contra bactérias Gram-negativas e o fungo *Trichophyton rubrum*. Os ensaios de citotoxicidade indicaram que o mecanismo de ação da AgNP_{bio} é devido a indução de uma situação de estresse oxidativo devido a redução evidente de dano ao conteúdo de DNA e da atividade enzimática mitocondrial quando a glutathione (GSH) foi adicionada ao meio de cultura durante os testes de citotoxicidade. Além disso, numa concentração baixa (inferior a 0,42 mg mL⁻¹), estas partículas não apresentam efeito citotóxico contra as células V79 e podem ser usadas com segurança. Embora ainda seja necessário investigar os efeitos da glutathione na toxicidade final das nanopartículas frente às células, é promissor o uso dessas nanopartículas com segurança sob a forma de fármacos contra os microrganismos testados.

5. REFERÊNCIAS

Ahmad N, Sharma S, Singh VN, Shamsi SF, Fatma A, Mehta BR (2011). "Biosynthesis of silver nanoparticles from *Desmodium triflorum*: a novel approach towards weed utilization". Biotechnol Res Int, Article ID 454090, 8 pages.

Alves NC, Odorizzi AC, Goulart FC (2002). "Análise Microbiológica de águas minerais e de água potável de abastecimento". Rev Saúde Pública de Marília, **36** (6).

Anaissie EJ, Costa SF. (2001) "Nosocomial aspergillosis is waterborne". Clin Infect Dis, **33**: 1546-1548.

Ansari MA, Khan HM, Khan AA, Malik A, Sultan A, Shahid M, et al. (2011). "Evaluation of antibacterial activity of silver nanoparticles against MSSA and MRSA on isolates from skin infections". Biol Med, **3**: 141-146.

Balaji DS, Basavaraja S, Deshpande R, Mahesh DB, Prabhakar BK, Venkataraman A. (2009). "Use of zeolite to refold a disulfide-bonded protein". Colloids Surf B Biointerfaces, **68**: 88-92.

Bedingfield J (1849) "Claim to Priority of the Application of Nitrate of Silver in Ulceration of the Larynx". Prov Med Surg J. **13** (17): 1.

Bisi-Johnson MA, Obi CL, Hattori T, Oshima Y, Kambizi L, Eloff JN, Vasaikar SD (2011). "Evaluation of the antibacterial and anticancer activities of some South African medicinal plants". BMC Complement Altern Med, **17**: 11-14.

Camargo SE, Camargo CH, Hiller KA, Rode SM, Schweikl H, Schmalz G (2009). "Cytotoxicity and genotoxicity of pulp capping materials in two cell lines". Int Endod J, **42**: 227-237.

Carlson C, Hussain SM, Schrand AM, Braydich-Stolle LK, Hess KL, Jones LR et al. (2008). "Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species". J Phys Chem B. **112**: 13608-13619.

Cavalcanti BC, Júnior HV, Seleguim MH, Berlinck RG, Cunha GM, Moraes MO, Pessoa C (2008). "Cytotoxic and genotoxic effects of tambjamine D, an alkaloid isolated from the nudibranch *Tambja eliora*, on Chinese hamster lung fibroblasts". Chem Biol Interact, **174**: 155-162.

Chambers HF, De Leo FR (2009). "Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era". Nature Rev Microbiol. **7**: 629-641.

Chen JP, Chiang Y (2010). "Bioactive Electrospun Silver Nanoparticles-Containing Polyurethane Nanofibers as Wound Dressings". J Nanosci Nanotechnol, **10**: 7560-7564.

Cingi MR, Angelis I, Fortunati E, Reggiani D, Bianchi V, Tiozzo R et al. (1991). "Choice and standardization of test protocols in cytotoxicology: A multicentre approach". Toxicol in Vitro **5**: 119-125.

Ciobanu CS, Iconaru SL, Chifiriuc MC, Costescu A, Coustumer P, Predoi D (2013). "Synthesis and antimicrobial activity of silver-doped hydroxyapatite nanoparticles". BioMed Res Int, ID 916218, 10 páginas.

CLSI/NCCLS. Método de referência para testes de diluição em caldo para determinação da sensibilidade a terapia antifúngica de fungos filamentosos; Norma

Aprovada. NCCLS document M38-A (ISBN 1-56238-470-8). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA. 2002.

Coelho LM, Aquino-Ferreira R, Maffei CML, Martinez-Rossi NM (2008) “*In vitro* antifungal drug susceptibilities of dermatophytes microconidia and arthroconidia” J Antimicrob Chem, 62 (4): 758-761.

Combes R, Grindon C, Cronin MT, Roberts DW, Garrod JF (2008). “Integrated Decision-tree Testing Strategies for Acute Systemic Toxicity and Toxicokinetics with Respect to the Requirements of the EU REACH Legislation”. Altern Lab Anim, 36: 91-109.

Cornet M, Levy V, Fleury L, Lortholary J, Barquins S, Coureul, MH et al. (1999). “Efficacy of prevention by high-efficiency particulate air filtration or laminar airflow against *Aspergillus* airborne contamination during hospital renovation”. Infection Control and Hospital Epidemiology, 20(7): 508–513.

Corrêa DHA, Melo PS, Carvalho CAA, Azevedo MBM, Durán N, Haun M (2005). “Dehydrocrotonin and its β -cyclodextrin complex: cytotoxicity in V79 fibroblasts and rat cultured hepatocytes”. Eur JPharmacol, 510: 17-24.

Corticeiro SC, Gusmão AIL, Figueira EMAP (2006). “A importância da glutatona no estado oxidativo de *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* sob exposição ao Cd”. Tecnologia enzimática e microbiana, 40: 132-137.

David MZ, Daum RS (2010). “Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic”. Clin Microbiol Rev 23: 616-687.

Denizot F, Lang R (1986). "Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability". J Immunol Methods, **89**: 271-277."

Derby GS (1906). "An experimental study on the bactericidal power of various silver preparations". Trans Am Ophthalmol Soc **11** (1): 21-27.

Durán N, Justo GZ, Melo PS, Ferreira CV, Cordi L, Martins D, Silva, MS (2007). Biotechnol Applied Biochem **48**:127-133.

Durán N, Marcato PD, Alves OL, Souza GIH Esposito E (2005) "Mechanistic aspect of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains". Journal of Nanobiotechnology, 3:8.

Durán N, Marcato PD, Yadav A, Gade A, Rai M (2011). "Mechanistic aspects in the biogenic synthesis of extracellular metal nanoparticles by peptides, bacteria, fungi, and plants". Appl Microbiol Biotechnol, **90**:1609–1624.

Durán N, Seabra AB, Lima R. Nanotoxicology: Materials, methodologies, and assessments, Editado N. Durán, S.S. Guterres, O.L. Alves, Springer, London (2014) pp. 245-263.

Fishbine G (2002). The investor guide to nanotechnology and micromachines. John Wiley and Sons. Inc. New York.

Freshney RI (1994). Culture of animal cells: a mannual of basic technique. Wiley Liss. Ed. John Wiley and Sons. 1994. p. 287-303.

Gade AP, Bonde P, Ingle AP, Marcato PD, Durán N, Rai M (2008). "Mycosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium acuminatum* and its activity against some human pathogenic bacteria". Curr Nanosci, **4**: 141-144.

Galembeck F (2003). "Polímeros e nanotecnologia. Polímeros: Ciência e Tecnologia". **13** (1).

Gibbard J (1933). "The Treatment of Water by Certain Forms of Silver". Am J Public Health Nations Health **23** (9):910-916.

Gibbins B, Warner L (2005). Medical Device and Diagnostic Industry Magazine. Agosto,112.

Gimenez IF, Anazetti MC, Melo OS, Haun M, Azevedo MMM, Durán N, Alves OL (2005). "Cytotoxicity on V79 and HL60 Cell Lines by Thiolated- β -Cyclodextrin-Au/Violacein Nanoparticles" J. Biomedical Nanotechnol. **1**:1-7.

Gupta I, Durán N, Rai M. Nano-Antimicrobials: progress and prospects, Editado M. Rai e N. Cioffi, Springer, Germany, (2012), pp. 525-548.

Halle W e Spielmann H (1992) "*In vitro* screening methods for assessing acute toxicity". Alt Lab Anim. **20**: 40-49.

Jain J, Arora S, Rajwade JM, Omray P, Khandelwal S, Paknikar KM (2009). "Silver nanoparticles in therapeutics: development of an antimicrobial gel formulation for topical use". Mol Pharmaceut, **6**: 1388–1401.

Jovietic S, Zhu Y, Marcone GL, Marinelli F, Tramper J (2010). " β -Lactam and glycopeptide antibiotics: first and last line of defense?" Trends Biotechcnol **28**:596-604.

Kamaraj C, Rajakumar G, Rahuman AA, Velayutham K, Bagavan A, Zahir AA, Elango G (2011). "Feeding deterrent activity of synthesized silver nanoparticles using *Manilkara zapota* leaf extract against the house fly, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae)". Parasitol Res **111** (6):2439-2448.

Kannan N, Mukunthan KS, Balaji S (2011). "A comparative study of morphology, reactivity and stability of synthesized silver nanoparticles using *Bacillus subtilis* and *Catharanthus roseus* (L.) G. Don." Colloids Surf B Biointerfaces. **86** (2):378-83.

Katzer A, Marquardt H, Westendorf J, Wening JV, Von Foerster G (2002). "Polyetheretherketone cytotoxicity and mutagenicity *in vitro*". Biomaterials, **23**: 1749-1759.

Kern ME, Blevins KS. Micologia Médica: texto e Atlas. São Paulo. Ed. Premier, 2^a Ed., 1999.

Kim JS, Kuk E, Yu KN, Kim JH, Park SJ, Lee HJ et al. (2007). "Antimicrobial effects of silver nanoparticles". Nanomed, **3**: 95-101.

Kim JS, Kuk E, Yu KN, Kim JH, Park SJ, Lee HJ, Kim SH, Park YK, Park YH, Hwang CY, Kim YK, Lee YS, Jeong DH, Cho MH (2007). "Antimicrobial effects of silver nanoparticles". Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine. **3** (1):95-101.

Kim SH, Lee HS, Ryu DS, Choi SJ, Lee DS (2011). "Antibacterial activity of silver-nanoparticles against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*". Korean J Microbiol Biotechnol **39**: 77–85.

Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vaccari EM, Melo NT. Tratado de micologia médica. São Paulo. Ed. Sarvier, 2002. 9 ed.

Langfelder K, Streibel M, Jahn B, Haase G, Brakhage AA (2003). "Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi". Fungal Genet Biol, **38**: 143-158.

Larone DH (1996). "Culture and identification of dermatophytes" Clinical Microbiol Newsletter, **18**:33-38.

Lee BU, Yun SH, Ji JH, Bae GN (2008). "Inactivation of *S. epidermidis*, *B. subtilis*, and *E. coli* bacteria bioaerosols deposited on a filter utilizing airborne silver nanoparticles". J. Microbiol Biotechnol, **18**: 176-182.

Leng W, Liu T, Li R, Yang J, Wei C, Zhang W, Jin Q (2008). "Proteomic profile of dormant *Trichophyton rubrum* conidia" BMC Genomics, **9**:303. .

Lima R, Seabra AB, Durán N (2012). "Silver nanoparticles: a brief review of cytotoxicity and genotoxicity of chemically and biogenically synthesized nanoparticles". J Appl Toxicol, **32**: 867-879.

Lima R, Feitosa LO, Ballottin D, Marcato PD, Tasic L, Durán N (2013). "Cytotoxicity and genotoxicity of biogenic silver nanoparticles". J Phys Conf Ser, **429**: 12-20.

Lkhagvajav N, Yaşa I, Çelik E, Koizhaiganova M, Sari Ö (2011). "Antimicrobial activity of colloidal silver nanoparticles prepared by sol-gel method". Dig J Nanomat and Bios., **6**(1): 149-154.

Lok CN, Ho CM, Chen R, He QY, Yu WY, Sun H et al. (2006). "Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles". J Proteome Res, **5**: 916-924.

Lok CN, Ho CM, Chen R, He QY, Yu WY, Sun H et al. (2007). "Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities". J Biol Inorg Chem **12**: 527–534.

Loudon KW e Burnie JP (1995). "Comparison of three typing methods for clinical and environmental isolates of *Aspergillus fumigatus*" J Clin Microbiol., **33**(12): 3362–3363.

Marcato PD, Durán M, Huber S, Rai M, Melo PS, Alves OL, Durán N. (2012). "Biogenic silver nanoparticles and its antifungal activity as a new topical transungual drug delivery". J Nano Res, **20**: 99-107.

Marcato PD, Durán N. Metal Nanoparticles in Microbiology. Editado M. Rai e N. Durán, Springer verlag, Germany, pp. 249-267. 2011

Marcato PD, Nakasato G, Brocchi M, Melo PS, Huber SC et al. (2012). "Biogenic silver nanoparticles: antibacterial and cytotoxicity applied to textile fabrics". JNano Res **20**: 69-76.

Marshall CR, Macleod-Neave EF (1906). "The Bactericidal action of Compounds of Silver". Br Med J, **2** :359-363.

Marshall CR, Killoh GB (1915). "The Bactericidal Action of Collosols of Silver and Mercury". Br Med J **1** (2820):102-104.

McGinnis MR. Laboratory handbook on medical mycology. New York. Academic Press, 1^a Ed. pp. 475-480, 1980.

Melo PS, Cavalcante HHM, Barbosa-Filho JM, Diniz MFFM, Medeiros IA, Haun M (2003). "Warifteine and milonine, alkaloids isolated from *cissampelos sympodialis* eichl: cytotoxicity on rat hepatocyte culture and in v79 cells". Toxicol Letters **142**: 143-151.

Melo PS, Fabrin Neto JB, Moraes SG, Assalin MR, Durán N, Haun M (2006) "Comparative toxicity of effluents processed by different treatments in V79 fibroblasts and the Algae *Selenastrum capricornutum*". Chemosphere, **62**: 1207-1213.

Melo PS, Justo GZ, Durán N, Haun M (2004) "Natural killer cell activity and anti-tumour effects of dehydrocrotonin and its synthetic derivatives". Eur J Pharmacol, **487**: 47-54.

Melo PS, Maria SS, Vidal BC, Haun M, Durán N (2000). "Violacein Cytotoxicity and Induction of Apoptosis in V79 Cells" In vitro Cell Dev Biol Animal, **36**: 539-543.

Minami OS Micologia: Métodos Laboratoriais de Diagnóstico da Micoses. Barueri. Editora Manole. 2003. 1º ed.

Mohanpuria P, Rana KN e Yadav SK (2008). "Biosynthesis of nanoparticles: Technological concepts and future applications". Journal of Nanoparticle Research, **10**: 507- 517.

Monteiro-Riviere NA, Inman AO, Zhang LW (2009). "Limitations and relative utility of screening assays to assess engineered nanoparticle toxicity in a human cell line". Toxicol Appl Pharmacol, **234**: 222-235.

Mourato A, Gadanho M, Lino AR, Tenreiro R (2011). "Biosynthesis of crystalline silver and gold nanoparticles by extremophilic yeasts". Bioinorg Chem Appl **2011**: ID 546074.

Mukherjee SG, O'Claonadh N, Casey A, Chambers G (2012). "Comparative in vitro cytotoxicity study of silver nanoparticle on two mammalian cell lines". Toxicol In Vitro, **26**: 238-251.

Mussarrat J, Dwivedi S, Singh BR, Al-Khedhairi AA, Azam A, Naqvi A (2010). "Production of antimicrobial silver nanoparticles in water extracts of the fungus *Amylomyces rouxii* strain KSU-09". Bioresour Technol, **101** (22):8772-8776.

Narayanan KB, Sakthivel N (2010). "Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes". Adv Colloid Interface Sci, **156**: 1-13.

NCCLS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. Approved Standard. Sixth Edition. NCCLS document M7-A6. Wayne, Pennsylvania 19087-1898, 2003.

Nederberg F, Zhang Y, Tan JP, Su K, Wang H, Yang C, Gao S, Guo ZD, Fukushima K, Li L, Hedrici JL, Yang YY (2011). "Biodegradable nanostructures with selective lysis of microbial membranes" Natural Chem **3**: 409-414.

Nicolau DE, Phillimore J, Cross R, Nicolau DV (2000). "Nanotechnology at the crossroads: The hard or the soft way?" Microeletronic Journal. **31**:611-616.

Njoroge J, Sperandio V (2009). "Jamming bacterial communication: New approaches for the treatment of infectious diseases". EMBO Mol Biomed, **1**:201-210.

Noorbakhsh F (2011). "Antifungal effects of silver nanoparticle alone and with combination of antifungal drug on dermatophyte pathogen *Trichophyton rubrum*". IPCBEE, **5**: 364-367.

Pal S, Tak YK, Song JM (2007). "Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the Gram-negative bacterium *Escherichia coli*". Appl Environ Microbiol **73**: 1712-1720.

Panacek A, Kolár M, Vecerová R, Pucek R, Soukupová J, Krystof V et al. (2009). "Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp." Biomaterials **30**: 6333-6340.

Parameswari E, Udayasoorian C, Sebastian SP, Jayabalakrishnan RM (2010). "The bactericidal potential of silver nanoparticles". Int Res JBiotechnol **1**: 44-49.

Parikh RY, Ramanathan R, Coloe PJ, Bhargava SK, Patole MS, Shouche YS, Bansal V (2011). "Genus-wide physicochemical evidence of extracellular crystalline silver nanoparticles biosynthesis by *Morganella* spp." PLoS One. **6**(6) :e21401.

Paula MMD, Franco CV, Baldin MU, Larissa RSA, Tatiana BC, Savi GD, Bellato LF, Fiori WA, Silva L (2009). "Synthesis, characterization and antibacterial activity studies of poy-(styrene-acrylic acid) with silver nanoparticles". Mater Sci Eng C, **29**: 647-650.

Peixoto I, Maquine G, Francesconi VA, Francesconi F (2010). "Dermatophytosis caused by *Tricophyton rubrum* as an oportunistic infection in patients with Cushing disease". An Bras Dermatol **85** (6):888-890.

Pelczar MJJ, Chan ECS, Krieg NR. Microbiologia: Conceitos e Aplicações. Volume 1. São Paulo, Ed. Makron, 2ª. Ed. 1996.

Pillai ZS e Kamat PV (2004). "What Factors Control the Size and Shape of Silver Nanoparticles in the Citrate Ion Reduction Method?" J Phys Chem B, **108**:945-951.

Quelemes PV, Araruna FB, Faria BEF, Kuckelhaus SAS, da Silva DA, Mendonça RZ et al (2013). "Development and antibacterial activity of cashew gum-based silver nanoparticles". Int J Mol Sci, **14**: 4969-4981.

Rai M, Yadav A, Gade A (2009). "Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials.". Biotechnol Adv, **27**: 76-83.

Reynolds R (2009). "Antimicrobial resistance in the UK and Ireland" J Antimicrob Chemother, **64** (1):19-23.

Rieth M (2003). Nano-engineering in science and technology: An introduction to the world of nano-design. Series on the Foundations of Natural Science and Technology. V. 6. World Scientific, New Jersey.

Rodrigues AG, Ping LY, Marcato PD, Alves OL, Silva MCP,; Ruiz RC et al. (2013). "Biogenic antimicrobial silver nanoparticles produced by fungi". Appl Microbiol Biotechnol, **97**: 775–782.

Rodríguez-Sánchez ML, Rodríguez MJ, Blanco MC, Rivas J, López-Quintela MA (2005). "Kinetics and mechanism of the formation of Ag nanoparticles by electrochemical techniques: a plasmon and cluster time-resolved spectroscopic study", J Phys Chem B., **109**: 1183-1191.

Rosenkranz HS, Matthews EJ, Klopmand G (1992). "Relationship between cellular toxicity, the maximum tolerated dose, lipophilicity and electrophilicity" Altern Lab. Anim., **20**: 549-562.

Ruparelia JP, Chatterjee AK, Duttagupta SP, Mukherji S (2008). "Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles". Acta Biomater **4**: 707-716.

San-Blas G (1982) "The cell wall of fungal human pathogens: Its possible role in host-parasite relationships". Mycopathologia, **79**: 159 184.

Saravanan M, Vemu AK, Barik SK (2011). "Rapid biosynthesis of silver nanoparticles from *Bacillus megaterizum* (NCIM 2326) and their antibacterial activity on multi drug resistant clinical pathogens". Colloids Surf B Biointerfaces. **88** (1):325-31.

Sastry, M.; Ahmad, A.; Islam, N.I.; Kumar, R. (2003). "Extracellular biosynthesis of monodisperse gold nanoparticles by a novel extremophilic actinomycete, *Thermomonospora* sp. Langmuir". Current Sci, **85**:162-170.

Schuster E, Dunn-Coleman N, Frisvad JC, van Dijck PWM (2002). "On the safety of *Aspergillus niger* – a review". Appl Microbiol Biotechnol, **59**: 426-435.

Sem autor (1847). "Nitrate of silver in erysipelas" Prov Med Surg J, **11** (19):532.

Shameli MB, Ahmad M, Zargar W, Yunus M, Rustaiyan A, Ibrahim NA (2011) "Synthesis of silver nanoparticles in montmorillonite and their antibacterial behavior". Int J Nanomedicine **6**: 581-590.

Solomon JV (1851). "Observations on Nitrate of Silver Stains of the Conjunctiva. Case of Absolute Blackness". Prov Med Surg J **15** (22): 594.

Staib F, Mishra SK, Rajendran C et al. (1980). "A notable *Aspergillus* from a mortal aspergilloma of the lung. New aspects of the epidemiology, serodiagnosis and taxonomy of *Aspergillus fumigatus*". Zentralbl Bakteriol: **A**, **247**: 530-536

Sun Y, Xia Y (2002). "Nanoparticles Shape-Controlled Synthesis of Gold and Silver". Science **298** (5601):2176-2179.

Tavares JF, Silva MVB, Queiroga KF, Diniz MFF, Barbosa Filho JM, Haun M, Melo PS, Silva MS (2007) "Xylodiol, a New Atisane Diterpenoid from *Xylopia Langsdorffiana* St.-Hil. & Tul. (Annonaceae)" Zeitschrift fur Naturforschung, **62**: 742-744.

Tian J, Wong KK, Ho CM, Lok CN, Yu WY, Chiu JF, Tam PK (2007). "Topical delivery of silver nanoparticles promotes wound healing." Chem Med, **2**:129-136.

Trabulsi LR e Alterthum F. Microbiologia. São Paulo, Ed. Atheneu, 4^a. Ed. 2004.

Varrone JJ, Li D, Daiss JL, Schwarz (2011). "Anti-glucosaminidase monoclonal antibodies as a passive immunization for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) orthopedic infections". IBMS BoneKEy, **8**: 187–194

World Health Organization. Prevention of hospital-acquired infections: A practical guide. 2nd edition. Department of Communicable Disease, Surveillance and Response. WHO/CDS/CSR/EPH, 2002.

Xing ZC, Chae WP, Huh MH, Park LS, Park SY, Kwark G, Yoon KB, Kang IK (2011). "In vitro anti-bacterial and cytotoxic properties of silver containing poli (L-lactide-co-glycolide) nanofibrous scaffolds". J Nanosci Nanotechnol, **11**:61-65.

Youngchim S, Pornsuwan S, Nosanchuk JD, Dankai W, Vanittanakom N (2011). "Melanogenesis in dermatophyte species in vitro and during infection". Microbiol, **157**: 2348–2356.

Zago VV e Perez-Balbuena. Laboratory in the Diagnosis of Bacterial and Fungal Keratitis, Chapter 4. Intech. Disponível em <http://www.intechopen.com/download/get/type/pdfs/id/44009> acessado em 13/12/2013.

Zheng M, Huang X (2004). "Nanoparticles Comprising a Mixed Monolayer for Specific Bindings with Biomolecules" J Am Chem Soc, **126** (38):12047-12054.

Zhou Y, Kong Y, Kundu S, Cirillo JD, Liang H (2012). "Antibacterial activities of gold and silver nanoparticles against *Escherichia coli* and *Bacillus Calmette-Guérin*". J Nanobiotechnol. **10**: 19.

Zussman RA, Lyon I, Vicher EE (1960). "Melanoid pigment production in a strain of *Trichophyton rubrum*". J Bact **80**: 708–713.