

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**ESTUDO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE
NANOPARTÍCULAS DE PRATA EM FUNGOS DE
ARMAZENAMENTO DE SOJA (*Glycine max*)**

JOSIANE ENEVINA MENDES

São Carlos
2015

JOSIANE ENEVINA MENDES

**ESTUDO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE
NANOPARTÍCULAS DE PRATA EM FUNGOS DE
ARMAZENAMENTO DE SOJA (*Glycine max*)**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Bolsa CAPES

Orientadores: Prof. Dr. José Dalton Cruz Pessoa
Profª. Dra. Cristina Paiva de Sousa

São Carlos
2015

Mendes, Josiane Enevina.
ESTUDO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE
NANOPARTÍCULAS DE PRATA EM FUNGOS DE ARMAZENAMENTO DE
SOJA (*Glycine max*).

157f.

Orientadores: José Dalton Cruz Pessoa &
Cristina Paiva de Sousa

Tese (Doutorado)- Universidade Federal de São
Carlos, São Carlos, 2015.

1. Nanopartículas de Prata. 2. Síntese. 3.
Inibição. 4. Atividade Antifúngica I. Universidade
Federal de São Carlos. Programa de Pós-graduação em
Biotecnologia. II. Título.

JOSIANE ENEVINA MENDES

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia. Universidade Federal de São Carlos.

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Cristina Paiva de Sousa
Universidade Federal de São Carlos – UFSCar
Orientadora

Dr^a. Bruna Leite Simioni
Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

Dr. Daniel Souza Corrêa
Embrapa Instrumentação

Prof. Dr. Fernando Manuel Araujo Moreira
Embrapa Instrumentação

Prof. Dr. Gustavo Henrique de Almeida Teixeira
Universidade Estadual Paulista – UNESP

Dedicatória

*Dedico esta tese aos meus queridos pais, **Josias Mendes Costa e Geralda Leite Mendes**, por todo amor, carinho, dedicação e pelo apoio incondicional para a realização desse sonho. Nos momentos de dificuldade, de cansaço e de ausência, a imagem, o sorriso, a compreensão, as orações, as palavras de incentivo e o amor de vocês me fizeram continuar.*

Agradecimentos

Primeiramente a Deus pelo dom da vida, por ter me dado forças nos momentos de desânimo, de saudade da família e por me conceder a graça de concluir este sonho.

Aos meus pais por serem meus exemplos de vida, por acreditarem sempre em mim, me incentivarem e me amarem incondicionalmente, acima de tudo.

Ao meu noivo Fernando pelo companheirismo, pelo apoio, por toda ajuda, por me incentivar a lutar pelos meus sonhos e objetivos e por estar ao meu lado em todos os momentos.

Aos meus irmãos, Lidiane e Diedson, pelos momentos de carinho, alegria, pelo apoio e por estarem sempre presentes.

Ao meu cunhado, Aldo, que é como um irmão, por todo carinho, apoio e incentivo.

Ao querido prof. Dr. José Dalton Cruz Pessoa pela confiança, oportunidade, orientação, ensinamentos e amizade.

Á querida prof^a. Dr^a. Cristina Paiva de Sousa pela amizade, pela orientação e pela generosidade.

Ao prof. Dr. José António Couto Teixeira pela oportunidade, pela orientação e pela amizade.

Ao prof. Armando Venâncio pelo apoio durante este curso.

Ao prof. Emerson Rodrigues de Camargo pelo apoio durante este curso.

Á querida amiga Claudia Pastega pela amizade, paciência e pelo apoio durante o curso.

Aos meus queridos amigos do Laboratório de Ciência e Tecnologia Alimenta – LCTA, da Universidade do Minho: Ana Guimarães, Ana Sofia Carvalho, Ana Sofia Pereira, Célia, Thalita e Zlatina, agradeço pela confiança, disponibilidade de aprendizado e a todo conhecimento dedicado na realização desta tese, pelo apoio, pela amizade e pelas alegrias compartilhadas.

Aos meus queridos amigos de Rondonópolis: Célia, Luciane e João Acássio.

Ás minhas queridas amigas: Kenia, Meire, Natália e Stella.

Á todos os professores e funcionários da PPG- Biotecnologia da UFSCar.

Á Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

Agradeço a todos que contribuíram de alguma maneira direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

RESUMO

MENDES, J.E. **Estudo *in vitro* da atividade antifúngica de nanopartículas de prata em fungos de armazenamento de soja (*Glycine max*)**. 2015. 157 f. Tese de Doutorado. Programa de Pós Graduação em Biotecnologia/ UFSCar, São Carlos/SP, Brasil.

A nanotecnologia é a ciência responsável pelo desenvolvimento de novos materiais na escala nanométrica (1-100 nm). Devido às suas propriedades físico-químicas únicas, como tamanho, funcionalidade e biocompatibilidade, a aplicação de nanopartículas metálicas em diferentes áreas tem se tornado cada vez mais notória. Entre as nanopartículas metálicas, as de prata são amplamente reconhecidas por suas aplicações em diversas áreas, como: agricultura, medicina, biotecnologia e indústria de alimentos. As nanopartículas de prata são conhecidas por sua atividade antimicrobiana e por inibir uma ampla gama de bactérias, porém existem poucos estudos relacionados à sua atividade antifúngica. Desse modo, o presente trabalho avaliou o efeito de nanopartículas de prata (AgNPs) na atividade antifúngica *in vitro* de fungos micotóxicogênicos do gênero *Aspergillus* e do fitopatógeno *Phomopsis* sp. da cultura da soja. O método de síntese de nanopartículas de prata utilizado nesse trabalho foi o Método de Turkevich, também conhecido como Método Citrato. Esse método, já foi bem estabelecido e nele os íons de prata são reduzidos pelo citrato, em meio aquoso, que também atua como agente estabilizante da reação. A caracterização das AgNPs foi realizada utilizando as técnicas de espectroscopia no UV-visível (UV-vis), microscopia eletrônica de varredura (MEV-FEG) e espalhamento de luz dinâmico (DLS). O espectro de absorção UV-Vis do coloide mostrou uma banda *plasmon* característica de nanopartículas de prata, em aproximadamente 430 nm. As imagens de MEV-FEG confirmaram a forma esférica, regular e homogênea das partículas. Através do espalhamento de luz dinâmico (DLS) foi confirmado o tamanho médio de aproximadamente 52 nm das nanopartículas sintetizadas. Através da avaliação da taxa de crescimento micelial observou-se que as nanopartículas de prata foram eficientes nas concentrações 50, 180, 270 e 540 $\mu\text{g mL}^{-1}$, inibindo em 100% o crescimento e desenvolvimento fúngico em todas as estirpes do gênero *Aspergillus* avaliados. Neste trabalho também foi comprovada a eficiência das nanopartículas de prata no controle *in vitro* do fitopatógeno *Phomopsis* sp. (MES1154), causador de diversos problemas na cultura da soja, tais como: doença do cancro da haste da soja, da seca da vagem e da deterioração das sementes. Verificou-se ainda que, na presença de 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de nanopartículas de prata, a estirpe de *Aspergillus parasiticus* MUM 92.02 produziu a metade de aflatoxinas totais, em comparação com os controles, inibindo 50% da produção. A concentração inibitória mínima (CIM) de AgNPs foi de 6,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para todas as estirpes de *Aspergillus*. Em conclusão, contribuiu-se, desta forma, para o desenvolvimento de novas estratégias para prevenir e remediar a presença de micotoxinas (aflatoxinas, fumonisina e ocratoxina) em grãos e sementes de soja. Além disso, a utilização de nanopartículas de prata como agente antifúngico pode ser uma alternativa sustentável para substituir ou reduzir o uso indiscriminado de fungicidas comerciais evitando assim o desenvolvimento de resistência fúngica.

Palavras-chave: nanopartículas de prata, síntese, inibição, atividade antifúngica.

ABSTRACT

MENDES, J.E. *In vitro* study of antifungal activity of silver nanoparticles in storage fungi soybean (*Glycine max*). 2015. 157 f. Doctoral Thesis. Postgraduate Program in Biotechnology/UFSCar, São Carlos/SP, Brazil.

Nanotechnology is the science responsible for the development of new materials at the nanoscale (1-100nm). Due of its unique physical and chemical properties, such as size, functionality and biocompatibility, the application of metal nanoparticles has become increasingly apparent. Among metallic nanoparticles, the one made with silver are widely recognized for their applications in many areas, such as agriculture, medicine, biotechnology and food industry. Silver nanoparticles are known for their antimicrobial activity and inhibits a wide range of bacteria, however few studies related to its antifungal activity are performed. Therefore, this study evaluated the effect of silver nanoparticles (AgNPs) in antifungal activity in vitro of mycotoxigenic fungi *Aspergillus* and pathogen *Phomopsis* sp. of soybean. The synthesis of silver nanoparticles used in this work was the Turkevich method, also known as citrate method. This method has been well established, where the silver ions are reduced by citrate in an aqueous medium, which also acts as a stabilizer of the reaction. The AgNPs characterization was conducted using spectroscopic techniques in UV-visible (UV-vis), scanning electron microscopy (SEM-FEG) and dynamic light scattering (DLS). The UV-Vis absorption spectrum of the colloid revealed a *plasmon* band characteristic of silver nanoparticles, in approximately 430 nm. The SEM-FEG pictures confirmed the spherical, regular, and homogeneous shape of the particles. Through the dynamic light scattering (DLS), was confirmed the average size of approximately 52 nm of the synthesized nanoparticles. By assessing the mycelial rate of growth, it was observed that silver nanoparticles were effective at concentrations 50, 180, 270 and $\mu\text{g mL}^{-1}$. This concentration inhibits 100% of the fungal growth and development in all strains of the *Aspergillus* spp. This work also demonstrated the efficiency of silver nanoparticles in vitro control of the pathogen *Phomopsis* sp. (MES1154), which causes many problems in soybeans, such as soybean stem canker disease, dry pod and the deterioration of seeds. It was also found that in the presence of $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ of silver nanoparticles, the strain of *Aspergillus parasiticus* 92.02 MUM produced half of total aflatoxin in comparison with the controls, inhibiting 50% of production. The minimum inhibitory concentration (MIC) of AgNPS was $6,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ for all strains of *Aspergillus*. In conclusion, this work shows new strategies to prevent and remedy the presence of mycotoxins (aflatoxins, fumonisin and ochratoxin) in grains and soybeans. Furthermore, the use of silver nanoparticles as an antifungal agent can be a sustainable alternative to replace or reduce the widespread use of commercial fungicides thereby preventing the development of fungal resistance.

Keywords: silver nanoparticles, synthesis, inhibition, antifungal activity.

Lista de Abreviaturas e Símbolos

%	Porcentagem
β	Beta
λ	Comprimento de onda
λ_{em}	Comprimento de onda de emissão
λ_{ex}	Comprimento de onda de excitação
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
AFB1	Aflatoxinas B1
AFB2	Aflatoxinas B2
AFG1	Aflatoxinas G1
AFG2	Aflatoxinas G2
AFLs	Aflatoxinas
AgNO₃	Nitrato de prata
AgNPs	Nanopartículas de prata
ANOVA	Análise de variância
AuNPs	Nanopartículas de ouro
Ca	Cálcio
CIM	Concentração mínima inibitória
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
cm	Centímetros
DLS	Espalhamento dinâmico de luz
ELISA	Ensaio imunoadsorvente ligado à enzima
FB2	Fumonisina B2
Fe	Ferro
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IC₅₀	Capacidade inibitória
K	Potássio
L	Litro
mg	Miligrama

Mg	Magnésio
MEA	Malte extract agar
MEV-FEG	Microscópio eletrônico de varredura com fonte de emissão de campo
mL	Mililitros
Na	Sódio
NaCl	Cloreto de sódio
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
Na₃C₆H₅O₇	Citrato de sódio
NH₃	Amônia
OPA	O-ftaldeído
OTA	Ocratoxina A
°C	Graus Celsius
P	Fósforo
PDA	Potato dextrose Agar
PDI	Índice de polidispersividade
pH	Potencial hidrogeniônico
ppm	Parte por milhão
QELS	Espalhamento de luz quase elástico
R²	Coefficiente de determinação
rpm	Rotação por minuto
S	Enxofre
SPSS	<i>Statistic Package for Social Sciences</i>
TCR	Taxa de crescimento radial
Tween 20	Polisorbato 20
UV-Vis	Ultravioleta visível

Lista de Tabelas

Tabela 3.1- Reagentes utilizados na síntese de nanopartículas de prata.....	37
Tabela 4.1 - Taxa de crescimento radial de <i>Aspergillus parasiticus</i> MUM 92.02 crescido em meio PDA suplementado com 5, 50, 180, 270 e 540 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de nanopartículas de prata	53
Tabela 4.2- Inibição da taxa de crescimento radial de <i>Aspergillus parasiticus</i> MUM 92.02 relativamente ao controle H_2O	55
Tabela 4.3 - Diâmetro (cm) das colônias de <i>Aspergillus parasiticus</i> MUM 92.02 medido durante 7 dias inoculado em diferentes concentrações de nanopartículas de prata a 25 °C no escuro e, respectivas taxas de crescimento radial (TCR)	56
Tabela 4.4 - Taxa de crescimento radial de <i>Aspergillus flavus</i> 08MAsp567 crescido em meio PDA suplementado com 5, 50, 180, 270 e 540 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de nanopartículas de prata	60
Tabela 4.5 - Inibição da taxa de crescimento radial de <i>Aspergillus flavus</i> 08MAsp567 relativamente ao controle H_2O	61
Tabela 4.6 - Diâmetro (cm) das colônias de <i>Aspergillus flavus</i> 08MAsp567 medido durante 7 dias inoculado em diferentes concentrações de nanopartículas de prata a 25 °C no escuro e, respectivas taxas de crescimento radial (TCR).....	62
Tabela 4.7 - Taxa de crescimento radial de <i>Aspergillus flavus</i> 08Masp201 crescido em meio PDA suplementado com 5, 50, 180, 270 e 540 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de nanopartículas de prata	66
Tabela 4.8 - Inibição da taxa de crescimento radial de <i>Aspergillus flavus</i> 08Masp201 relativamente ao controle H_2O	67
Tabela 4.9 - Diâmetro (cm) das colônias de <i>Aspergillus flavus</i> 08Masp201 medido durante 7 dias inoculado em diferentes concentrações de nanopartículas de prata a 25 °C no escuro e, respectivas taxas de crescimento radial (TCR).....	67
Tabela 4.10 - Taxa de crescimento radial de <i>Aspergillus carbonarius</i> 01UAs293 crescido em meio MEA suplementado com 5, 50, 180, 270 e 540 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de nanopartículas de prata	72
Tabela 4.11 - Inibição da taxa de crescimento radial de <i>Aspergillus carbonarius</i> 01UAs293 relativamente ao controle H_2O	73
Tabela 4.12 - Diâmetro (cm) das colônias de <i>Aspergillus carbonarius</i> 01UAs293 medido durante 7 dias inoculado em diferentes concentrações de nanopartículas de prata a 25 °C no escuro e, respectivas taxas de crescimento radial (TCR)	74
Tabela 4.13 - Taxa de crescimento radial de <i>Aspergillus niger</i> 01UAs248 crescido em meio PDA suplementado com 5, 50, 180, 270 e 540 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de nanopartículas de prata	78

Tabela 4.14 - Inibição da taxa de crescimento radial de <i>Aspergillus niger</i> 01UAs248 relativamente ao controle H ₂ O	79
Tabela 4.15 - Diâmetro (cm) das colônias de <i>Aspergillus niger</i> 01UAs248 medido durante 7 dias inoculado em diferentes concentrações de nanopartículas de prata a 25 °C no escuro e, respectivas taxas de crescimento radial (TCR).....	80
Tabela 4.16 - Taxa de crescimento radial de <i>Phomopsis</i> sp. MES1154 crescido em meio PDA suplementado com 5, 50, 180, 270 e 540 µg mL ⁻¹ de nanopartículas de prata	84
Tabela 4.17 - Inibição da taxa de crescimento radial de <i>Phomopsis</i> sp. MES1154 relativamente ao controle H ₂ O	86
Tabela 4.18 - Diâmetro (cm) das colônias de <i>Phomopsis</i> sp. MES1154 medido durante 7 dias inoculado em diferentes concentrações de nanopartículas de prata a 25 °C no escuro e, respectivas taxas de crescimento radial (TCR).....	87
Tabela 4.19 - Inibição da taxa de crescimento radial de todas as estirpes avaliadas neste trabalho relativamente ao controle H ₂ O	91
Tabela 4.20 - Produção de Aflatoxinas (AFG2, AFB2, AFG1 e AFB1) de <i>Aspergillus parasiticus</i> MUM 92.02 crescido em meio PDA suplementado com 5, 50, 180, 270 e 540 µg mL ⁻¹ de nanopartículas de prata.....	94
Tabela 4.21 - Inibição da produção de Aflatoxinas totais (AFG2 + AFB2 + AFG1 + AFB1) de <i>Aspergillus parasiticus</i> MUM 92.02 crescido em meio PDA suplementado com 5, 50, 180, 270 e 540 µg mL ⁻¹ de nanopartículas de prata	94
Tabela 4.22 - Produção de Aflatoxinas (AFG1 e AFB1) de <i>Aspergillus flavus</i> 08MAsp567 crescido em meio PDA suplementado com 5, 50, 180, 270 e 540 µg mL ⁻¹ de nanopartículas de prata	96
Tabela 4.23 - Inibição da produção de Aflatoxinas totais (AFG1 + AFB1) de <i>Aspergillus flavus</i> 08MAsp567 crescido em meio PDA suplementado com 5, 50, 180, 270 e 540 µg mL ⁻¹ de nanopartículas de prata	97
Tabela 4.24 - Produção de Aflatoxinas (AFB2 e AFB1) de <i>Aspergillus flavus</i> 08Masp201 crescido em meio PDA suplementado com 5, 50, 180, 270 e 540 µg mL ⁻¹ de nanopartículas de prata	99
Tabela 4.25 - Inibição da produção de Aflatoxinas totais (AFB2 + AFB1) de <i>Aspergillus flavus</i> 08Masp201 crescido em meio PDA suplementado com 5, 50, 180, 270 e 540 µg mL ⁻¹ de nanopartículas de prata	99

Tabela 4.26 - Produção de ocratoxina A (OTA) de <i>Aspergillus carbonarius</i> 01UAs293 crescido em meio MEA suplementado com 5, 50, 180, 270 e 540 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de nanopartículas de prata	101
Tabela 4.27 - Inibição da produção de ocratoxina A (OTA) de <i>Aspergillus carbonarius</i> 01UAs293 crescido em meio MEA suplementado com 5, 50, 180, 270 e 540 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de nanopartículas de prata	101
Tabela 4.28 - Produção de fumonisina B2 (FB2) de <i>Aspergillus niger</i> 01UAs248 crescido em meio PDA suplementado com 5, 50, 180, 270 e 540 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de nanopartículas de prata	103
Tabela 4.29 - Inibição da produção de fumonisina B2 (FB2) de <i>Aspergillus niger</i> 01UAs248 crescido em meio PDA suplementado com 5, 50, 180, 270 e 540 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de nanopartículas de prata	104
Tabela 4.30 - IC_{50} de nanopartículas de prata para a estirpe de <i>Aspergillus parasiticus</i> MUM 92.02	106
Tabela 4.31 - IC_{50} de nanopartículas de prata para a estirpe de <i>Aspergillus flavus</i> 08MAsp567	109
Tabela 4.32 - IC_{50} de nanopartículas de prata para a estirpe de <i>Aspergillus flavus</i> 08Masp201	111
Tabela 4.33 - IC_{50} de nanopartículas de prata para a estirpe de <i>Aspergillus carbonarius</i> 01UAs293.....	114
Tabela 4.34 - IC_{50} de nanopartículas de prata para a estirpe de <i>Aspergillus niger</i> 01UAs248	116

Lista de Figuras

Figura 1.1 - Escala de comprimento que mostra o tamanho dos nanomateriais em comparação com os componentes biológicos e definição de nano e micro tamanhos. Adaptada de Buzea; Blandino; Robbie, 2007.....	21
Figura 1.2 - Classificação de nanopartículas inorgânicas e orgânicas. Adaptada de Xing et al., (2014).....	24
Figura 1.3 - Morfologia do gênero <i>Aspergillus</i> . Adaptada de Tsitsigiannis et al., (2004).	31
Figura 1.4 <i>Phomopsis</i> spp. em sementes de soja. Adaptada de Goulart (2005).....	35
Figura 3.1 - Esquema ilustrativo do procedimento de síntese de nanopartículas de prata.	38
Figura 3.2 - Cortes no ágar da placa contendo material fúngico para posterior extração das micotoxinas produzidas pelas estirpes do gênero <i>Aspergillus</i>	44
Figura 3.3 - Microplaca usada para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de nanopartículas de prata. (1) meio de cultura sem inóculo, (2) meio de cultura + resazurina sem inóculo, (3) controle H ₂ O, (4) controle negativo (Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ 0,3 mol L ⁻¹ + NH ₃ 1,4 mol L ⁻¹), (5) controle positivo (fungicida anfotericina B 1 µg mL ⁻¹), (6) AgNO ₃ (5,0×10 ⁻³ mol L ⁻¹), (7) AgNPs 1 µg mL ⁻¹ , (8) AgNPs 3 µg mL ⁻¹ , (9) AgNPs 6,25 µg mL ⁻¹ , (10) AgNPs 12,5 µg mL ⁻¹ , (11) AgNPs 25 µg mL ⁻¹ e (12) AgNPs 50 µg mL ⁻¹	46
Figura 4.1 - Solução coloidal de nanopartículas de prata com tonalidade amarela âmbar, que é um dos indicativos da formação destas nanopartículas.	48
Figura 4.2 - Gráfico de absorvância versus comprimento de onda do coloide obtido a partir da reação de redução da prata pelo citrato de sódio na temperatura de 90°C. O gráfico mostra a banda <i>plasmon</i> de absorção (430 nm) característica de nanopartículas de prata.....	49
Figura 4.3 - Modelo de estabilização por amônia utilizado no trabalho. O modelo é semelhante ao proposto por LaMer e Dinegar para crescimento de partículas monodispersas. Adaptada de Gorup et al., (2011).	50
Figura 4.4 - Gráfico obtido pela técnica DLS para distribuição de tamanho de partículas, através da intensidade de espalhamento em função do diâmetro.	51
Figura 4.5 - Imagens de MEV-FEG sintetizadas via redução dos íons prata do nitrato de prata pelo citrato. As nanopartículas de prata foram depositadas sobre o substrato de silício e após a secagem foram obtidas as imagens.....	52
Figura 4.6 - Crescimento das colônias de <i>Aspergillus parasiticus</i> MUM 92.02 medido ao longo de 7 dias inoculado em diferentes concentrações de nanopartículas de prata a 25 °C no escuro.....	57

Figura 4.7 - Inibição do crescimento de <i>Aspergillus parasiticus</i> MUM 92.02 na presença de AgNO ₃ .	57
Figura 4.8 - Efeito das nanopartículas de prata e respectivos controles no crescimento do <i>Aspergillus parasiticus</i> MUM 92.02 testados após 7 dias a 25 °C no escuro. (A) Controle H ₂ O, (B) Controle negativo (Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ 0,3 mol L ⁻¹ e NH ₃ 1,4 mol L ⁻¹), (C) Controle positivo (fungicida anfotericina B) e (D) Concentração 5 µg mL ⁻¹ de nanopartículas de prata.	58
Figura 4.9 - Efeito das nanopartículas de prata no crescimento do <i>Aspergillus parasiticus</i> MUM 92.02 testado após 7 dias a 25 °C no escuro. (E) Concentração 50 µg mL ⁻¹ , (F) Concentração 180 µg mL ⁻¹ , (G) Concentração 270 µg mL ⁻¹ e (H) Concentração 540 µg mL ⁻¹ .	59
Figura 4.10 - Crescimento das colônias de <i>Aspergillus flavus</i> 08MAsp567 medido ao longo de 7 dias inoculado em diferentes concentrações de nanopartículas de prata a 25 °C no escuro.	63
Figura 4.11 - Inibição do crescimento de <i>Aspergillus flavus</i> 08MAsp567 na presença de AgNO ₃ .	63
Figura 4.12 - Efeito das nanopartículas de prata e respectivos controles no crescimento do <i>Aspergillus flavus</i> 08MAsp567 testados após 7 dias a 25 °C no escuro. (A) Controle H ₂ O, (B) Controle negativo (Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ 0,3 mol L ⁻¹ e NH ₃ 1,4 mol L ⁻¹), (C) Controle positivo (fungicida anfotericina B) e (D) Concentração 5 µg mL ⁻¹ de nanopartículas de prata.	64
Figura 4.13 - Efeito das nanopartículas de prata no crescimento do <i>Aspergillus flavus</i> 08MAsp567 testado após 7 dias a 25 °C no escuro. (E) Concentração 50 µg mL ⁻¹ , (F) Concentração 180 µg mL ⁻¹ , (G) Concentração 270 µg mL ⁻¹ e (H) Concentração 540 µg mL ⁻¹ .	65
Figura 4.14 - Crescimento das colônias de <i>Aspergillus flavus</i> 08Masp201 medido ao longo de 7 dias inoculado em diferentes concentrações de nanopartículas de prata a 25 °C no escuro.	69
Figura 4.15 - Inibição do crescimento de <i>Aspergillus flavus</i> 08Masp201 na presença de AgNO ₃ .	69
Figura 4.16 - Efeito das nanopartículas de prata e respectivos controles no crescimento do <i>Aspergillus flavus</i> 08Masp201 testados após 7 dias a 25 °C no escuro. (A) Controle H ₂ O, (B) Controle negativo (Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ 0,3 mol L ⁻¹ e NH ₃ 1,4 mol L ⁻¹), (C) Controle positivo (fungicida anfotericina B) e (D) Concentração 5 µg mL ⁻¹ de nanopartículas de prata.	70
Figura 4.17 - Efeito das nanopartículas de prata no crescimento do <i>Aspergillus flavus</i> 08Masp201 testado após 7 dias a 25 °C no escuro. (E) Concentração 50 µg mL ⁻¹ , (F)	

Concentração 180 $\mu\text{g mL}^{-1}$, (G) Concentração 270 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e (H) Concentração 540 $\mu\text{g mL}^{-1}$	71
Figura 4.18 - Crescimento das colônias de <i>Aspergillus carbonarius</i> 01UAs293 medido ao longo de 7 dias inoculado em diferentes concentrações de nanopartículas de prata a 25 °C no escuro.....	75
Figura 4.19 - Inibição do crescimento de <i>Aspergillus carbonarius</i> 01UAs293 na presença de AgNO_3	75
Figura 4.20 - Efeito das nanopartículas de prata e respectivos controles no crescimento do <i>Aspergillus carbonarius</i> 01UAs293 testados após 7 dias a 25 °C no escuro. (A) Controle H_2O , (B) Controle negativo ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ 0,3 mol L^{-1} e NH_3 1,4 mol L^{-1}), (C) Controle positivo (fungicida anfotericina B) e (D) Concentração 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de nanopartículas de prata.....	76
Figura 4.21 - Efeito das nanopartículas de prata no crescimento do <i>Aspergillus carbonarius</i> 01UAs293 testado após 7 dias a 25 °C no escuro. (E) Concentração 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, (F) Concentração 180 $\mu\text{g mL}^{-1}$, (G) Concentração 270 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e (H) Concentração 540 $\mu\text{g mL}^{-1}$	77
Figura 4.22 - Crescimento das colônias de <i>Aspergillus niger</i> 01UAs248 medido ao longo de 7 dias inoculado em diferentes concentrações de nanopartículas de prata a 25 °C no escuro..	81
Figura 4.23 - Inibição do crescimento de <i>Aspergillus niger</i> 01UAs248 na presença de AgNO_3	81
Figura 4.24 - Efeito das nanopartículas de prata e respectivos controles no crescimento do <i>Aspergillus niger</i> 01UAs248 testados após 7 dias a 25 °C no escuro. (A) Controle H_2O , (B) Controle negativo ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ 0,3 mol L^{-1} e NH_3 1,4 mol L^{-1}), (C) Controle positivo (fungicida anfotericina B) e (D) Concentração 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de nanopartículas de prata.....	82
Figura 4.25 - Efeito das nanopartículas de prata no crescimento do <i>Aspergillus niger</i> 01UAs248 testado após 7 dias a 25 °C no escuro. (E) Concentração 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, (F) Concentração 180 $\mu\text{g mL}^{-1}$, (G) Concentração 270 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e (H) Concentração 540 $\mu\text{g mL}^{-1}$	83
Figura 4.26 - Crescimento das colônias de <i>Phomopsis</i> sp. MES1154 medido ao longo de 7 dias inoculado em diferentes concentrações de nanopartículas de prata a 25 °C no escuro....	88
Figura 4.27 - Inibição do crescimento de <i>Aspergillus carbonarius</i> 01UAs293 na presença de AgNO_3	88
Figura 4.28 - Efeito das nanopartículas de prata e respectivos controles no crescimento do <i>Phomopsis</i> sp. MES1154 testados após 7 dias a 25 °C no escuro. (A) Controle H_2O , (B)	

Controle negativo ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ 0,3 mol L ⁻¹ e NH_3 1,4 mol L ⁻¹), (C) Controle positivo (fungicida anfotericina B) e (D) Concentração 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de nanopartículas de prata.....	89
Figura 4.29 - Efeito das nanopartículas de prata no crescimento do <i>Phomopsis</i> sp. MES1154 testado após 7 dias a 25 °C no escuro. (E) Concentração 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, (F) Concentração 180 $\mu\text{g mL}^{-1}$, (G) Concentração 270 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e (H) Concentração 540 $\mu\text{g mL}^{-1}$	90
Figura 4.30 - Produção de aflatoxinas (AFG2, AFB2, AFG1 e AFB1) por <i>Aspergillus parasiticus</i> MUM 92.02 quando crescidos em PDA suplementado com concentrações 5, 50, 180, 270 e 540 $\mu\text{g mL}^{-1}$	92
Figura 4.31 - Produção de aflatoxinas (AFG1 e AFB1) por <i>Aspergillus flavus</i> 08MAsp567 quando crescidos em PDA suplementado com concentrações 5, 50, 180, 270 e 540 $\mu\text{g mL}^{-1}$	95
Figura 4.32 - Produção de aflatoxinas (AFB2 e AFB1) por <i>Aspergillus flavus</i> 08Masp201 quando crescidos em PDA suplementado com concentrações 5, 50, 180, 270 e 540 $\mu\text{g mL}^{-1}$	98
Figura 4.33 - Produção de ocratoxina A (OTA) por <i>Aspergillus carbonarius</i> 01UAs293 quando crescidos em MEA suplementado com concentrações 5, 50, 180, 270 e 540 $\mu\text{g mL}^{-1}$	100
Figura 4.34 - Produção de fumonisina B2 (FB2) por <i>Aspergillus niger</i> 01UAs248 quando crescidos em PDA suplementado com concentrações 5, 50, 180, 270 e 540 $\mu\text{g mL}^{-1}$	102
Figura 4.35 - Log(x) das concentrações de nanopartículas de prata sobre o crescimento de <i>Aspergillus parasiticus</i> MUM 92.02. Sem nanopartícula de prata (Log(x) =0) o fungo cresceu 100%.....	105
Figura 4.36 - A concentração inibitória mínima (CIM= 6,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$) de nanopartículas de prata em <i>Aspergillus parasiticus</i> MUM 92.02. (1) meio de cultura sem inóculo, (2) meio de cultura + resazurina sem inóculo, (3) controle H ₂ O, (4) controle negativo, (5) controle positivo, (6) AgNO ₃ , (7) AgNPs 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, (8) AgNPs 3 $\mu\text{g mL}^{-1}$, (9) AgNPs 6,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$, (10) AgNPs 12,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, (11) AgNPs 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e (12) AgNPs 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$	106
Figura 4.37 - Log(x) das concentrações de nanopartículas de prata sobre o crescimento de <i>Aspergillus flavus</i> 08MAsp567. Sem nanopartícula de prata (Log(x) =0) o fungo cresceu 100%.....	108
Figura 4.38 - A concentração inibitória mínima (CIM= 6,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$) de nanopartículas de prata em <i>Aspergillus flavus</i> 08MAsp567. (1) meio de cultura sem inóculo, (2) meio de cultura + resazurina sem inóculo, (3) controle H ₂ O, (4) controle negativo, (5) controle positivo, (6) AgNO ₃ , (7) AgNPs 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, (8) AgNPs 3 $\mu\text{g mL}^{-1}$, (9) AgNPs 6,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$, (10) AgNPs 12,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, (11) AgNPs 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e (12) AgNPs 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$	108

Figura 4.39 - Log(x) das concentrações de nanopartículas de prata sobre o crescimento de <i>Aspergillus flavus</i> 08Masp201. Sem nanopartícula de prata (Log(x) =0) o fungo cresceu 100%.....	110
Figura 4.40 - A concentração inibitória mínima (CIM= 6,25 µg mL ⁻¹) de nanopartículas de prata em <i>Aspergillus flavus</i> 08Masp201. (1) meio de cultura sem inóculo, (2) meio de cultura + resazurina sem inóculo, (3) controle H ₂ O, (4) controle negativo, (5) controle positivo, (6) AgNO ₃ , (7) AgNPs 1 µg mL ⁻¹ , (8) AgNPs 3 µg mL ⁻¹ , (9) AgNPs 6,25 µg mL ⁻¹ , (10) AgNPs 12,5 µg mL ⁻¹ , (11) AgNPs 25 µg mL ⁻¹ e (12) AgNPs 50 µg mL ⁻¹	111
Figura 4.41 - Log(x) das concentrações de nanopartículas de prata sobre o crescimento de <i>Aspergillus carbonarius</i> 01UAs293. Sem nanopartícula de prata (Log(x) =0) o fungo cresceu 100%.....	113
Figura 4.42 - A concentração inibitória mínima (CIM= 6,25 µg mL ⁻¹) de nanopartículas de prata em <i>Aspergillus carbonarius</i> 01UAs293. (1) meio de cultura sem inóculo, (2) meio de cultura + resazurina sem inóculo, (3) controle H ₂ O, (4) controle negativo, (5) controle positivo, (6) AgNO ₃ , (7) AgNPs 1 µg mL ⁻¹ , (8) AgNPs 3 µg mL ⁻¹ , (9) AgNPs 6,25 µg mL ⁻¹ , (10) AgNPs 12,5 µg mL ⁻¹ , (11) AgNPs 25 µg mL ⁻¹ e (12) AgNPs 50 µg mL ⁻¹	113
Figura 4.43 - Log(x) das concentrações de nanopartículas de prata sobre o crescimento de <i>Aspergillus niger</i> 01UAs248. Sem nanopartícula de prata (Log(x) =0) o fungo cresceu 100%.	115
Figura 4.44 - A concentração inibitória mínima (CIM= 6,25 µg mL ⁻¹) de nanopartículas de prata em <i>Aspergillus niger</i> 01UAs248. (1) meio de cultura sem inóculo, (2) meio de cultura + resazurina sem inóculo, (3) controle H ₂ O, (4) controle negativo, (5) controle positivo, (6) AgNO ₃ , (7) AgNPs 1 µg mL ⁻¹ , (8) AgNPs 3 µg mL ⁻¹ , (9) AgNPs 6,25 µg mL ⁻¹ , (10) AgNPs 12,5 µg mL ⁻¹ , (11) AgNPs 25 µg mL ⁻¹ e (12) AgNPs 50 µg mL ⁻¹	116
CARVALHO, C.L.; BAUMANN, S., OLIVEIRA, C.G. Avaliação da eficiência, período de ação e efeito fisiológico do fungicida Opera na cultura da soja [<i>Glycine max</i> (L.) Merrill]. In: Congresso Brasileiro de Soja, Londrina. Anais, EMBRAPA/ CNPSO, p.109-110, 2006.....	125

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
1.1 Nanotecnologia e nanomateriais	20
1.2 Classificação das nanopartículas	23
1.2.1 Nanopartículas de prata.....	25
1.3 Fungos	27
1.3.1 O gênero <i>Aspergillus</i>	30
1.3.2 O gênero <i>Phomopsis</i>	34
2. Objetivos.....	36
2.1 Objetivo Geral	36
2.2 Objetivos Específicos	36
3. MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1 Síntese de Nanopartículas de prata	37
3.2 Caracterização de nanopartículas de prata.....	38
3.2.1 Espectroscopia UV-Vis.....	38
3.2.2 Microscopia eletrônica de varredura com fonte de emissão de campo (MEV-FEG)	39
3.2.3 Espalhamento de luz dinâmico (Dynamic Light Scattering – DLS).....	39
3.3 Cultivo e crescimento dos fungos.....	40
3.3.1 Material biológico e preparação do inóculo.....	40
3.3.2 Ensaio antifúngico in vitro de nanopartículas de prata.....	41
3.3.3 Extração e quantificação das micotoxinas	42
3.3.4 Preparação da curva de calibração	44
3.3.5 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de nanopartículas de prata em <i>Aspergillus</i> spp. em microplaca.....	45
3.3.6 Procedimentos de segurança	47
3.3.7 Análise estatística.....	47
4. RESULTADOS	48
4.1 Síntese, caracterização e estabilização das nanopartículas de prata.....	48
4.2 Atividade biológica de nanopartículas de prata com potencial antifúngico.....	53
4.2.1 Inibição do crescimento radial de <i>Aspergillus parasiticus</i> MUM 92.02 em placa de Petri	
53	
4.2.2 Inibição do crescimento radial de <i>Aspergillus flavus</i> 08MAsp567 em placa de Petri....	59

4.2.3 Inibição do crescimento radial de <i>Aspergillus flavus</i> 08Masp201 em placa de Petri.....	65
4.2.4 Inibição do crescimento radial de <i>Aspergillus carbonarius</i> 01UAs293 em placa de Petri	71
4.2.5 Inibição do crescimento radial de <i>Aspergillus niger</i> 01UAs248 em placa de Petri.....	77
4.2.6 Inibição do crescimento radial de <i>Phomopsis</i> sp. MES1154 em placa de Petri	83
4.3 Avaliação da produção de micotoxinas por fungos <i>Aspergillus</i> spp.....	91
4.3.1 Curva de calibração.....	91
4.3.2 Inibição da produção de aflatoxinas de <i>Aspergillus parasiticus</i> MUM 92.02 por nanopartículas de prata em meio sólido	92
4.3.3 Inibição da produção de aflatoxinas de <i>Aspergillus flavus</i> 08MAsp567 por nanopartículas de prata em meio sólido	95
4.3.4 Inibição da produção de aflatoxinas de <i>Aspergillus flavus</i> 08Masp201 por nanopartículas de prata em meio sólido	97
4.3.5 Inibição da produção de ocratoxina A (OTA) de <i>Aspergillus carbonarius</i> 01UAs293 por nanopartículas de prata em meio sólido	100
4.3.6 Inibição da produção de fumonisina B2 (FB2) de <i>Aspergillus niger</i> 01UAs248 por nanopartículas de prata em meio sólido	102
4.4 Inibição do crescimento de <i>Aspergillus</i> spp. pela concentração inibitória mínima (CIM) de nanopartículas de prata em microplaca	104
4.4.1 Inibição do crescimento de <i>Aspergillus parasiticus</i> MUM 92.02 pela concentração inibitória mínima (CIM) de nanopartículas de prata em microplaca.....	104
4.4.2 Inibição do crescimento de <i>Aspergillus flavus</i> 08MAsp567 pela concentração inibitória mínima (CIM) de nanopartículas de prata em microplaca	107
4.4.3 Inibição do crescimento de <i>Aspergillus flavus</i> 08Masp201 pela concentração inibitória mínima (CIM) de nanopartículas de prata em microplaca	109
4.4.4 Inibição do crescimento de <i>Aspergillus carbonarius</i> 01UAs293 pela concentração inibitória mínima (CIM) de nanopartículas de prata em microplaca.....	112
4.4.5 Inibição do crescimento de <i>Aspergillus niger</i> 01UAs248 pela concentração inibitória mínima (CIM) de nanopartículas de prata em microplaca	114
5. DISCUSSÃO	117
6. CONCLUSÕES.....	123
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	124
Apêndice	136

1. INTRODUÇÃO

1.1 Nanotecnologia e nanomateriais

O cenário mundial em que a humanidade está inserida mostra claramente que mudanças são necessárias para a sobrevivência. Nunca antes as transformações foram tão dinâmicas, a ponto de afetar diretamente a economia mundial, de pequenos e grandes países, os avanços tecnológicos e o progresso da ciência. É nesse contexto de buscas por grandes inovações e abrangência mundial que se insere a nanotecnologia (KUBO, 2014).

As pesquisas em nanotecnologia se iniciaram em 29 de dezembro de 1959, no encontro da Sociedade Americana de Física em uma conferência no Instituto de Tecnologia da Califórnia, intitulada “There is a Plenty of Room at the Bottom”, proferida pelo físico norte-americano Richard Feynman, ganhador do Prêmio Nobel de Física em 1985 e que se tornou um artigo científico clássico no século XX. Nessa apresentação, Feynman compartilhou suas ideias quanto ao arranjo e manipulação de átomos, conforme fosse desejado, para a produção de novos materiais. Ele apresentou uma visão tecnológica de miniaturização extrema vários anos antes da palavra “chip” fazer parte do nosso vocabulário e também falou sobre as dificuldades de se manipular e controlar objetos de pequena escala. Para ele, todas essas possibilidades ocorreriam apenas por uma questão de conhecimento, tempo e tecnologia disponível, o que ele realmente estava correto (FEYNMAN, 1959). Extrapolando as leis físicas conhecidas, devido a esse pensamento visionário, Richard Feynman é considerado o pai da nanotecnologia.

A palavra “nanotecnologia” foi usada pela primeira vez em 1974 pelo professor da Universidade de Ciência de Tóquio, Norio Tanigushi, relacionando-a ao conjunto de estudos e aplicações de objetos e processos em escala nanométrica (FIGUEIREDO, 2006). Como citado acima *Nano* vem do grego “anão” e cientificamente é usado como notação para expressar um bilionésimo (10^{-9}). Assim, um nanômetro significa um bilionésimo de metro (10^{-9} m ou nm). Assim, nanotecnologia, pode ser definida hoje como a capacidade de manipular átomos em escala nanométrica, visando à formação de novos materiais (DURÁN et al., 2007),

Desde o surgimento do microscópio de varredura por tunelamento (STM), em 1981 por Gerd Binnig e Heinrich Rohrer no laboratório da IBM em Zurich, Suíça, muitos trabalhos foram desenvolvidos no campo da nanotecnologia. Um exemplo é a descoberta dos

nanotubos de carbono em 1991 pelo professor Sumio Iijama, da NEC, Tsukuba. Os estudos voltados para a área deu início a uma nova classe de materiais, os nanomateriais, em que pelo menos uma de suas dimensões é obtida em escala nanométrica. Diferentemente dos sólidos cristalinos e das moléculas, os nanomateriais apresentam propriedades distintas devido aos efeitos de tamanho e de superfície (IIJIMA, 1991).

A nanotecnologia é considerada uma forma de engenharia molecular que tem sido anunciada como a “nova revolução tecnológica” (WOOD; JONES; GELDART, 2003). Esta tecnologia está permitindo que a indústria possa manipular a matéria em nível atômico, oferecendo assim possibilidades inigualáveis através da biotecnologia, tecnologia da informação, agricultura, medicamentos e materiais (PERKEL, 2002).

Assis (2007) define a nanotecnologia como um conjunto de atividades ou mecanismos que ocorrem em uma escala extremamente pequena, mas que tenham implicações no mundo real. Esses mecanismos estão além da percepção do olho humano e operam em uma escala chamada nanométrica (Figura 1.1).

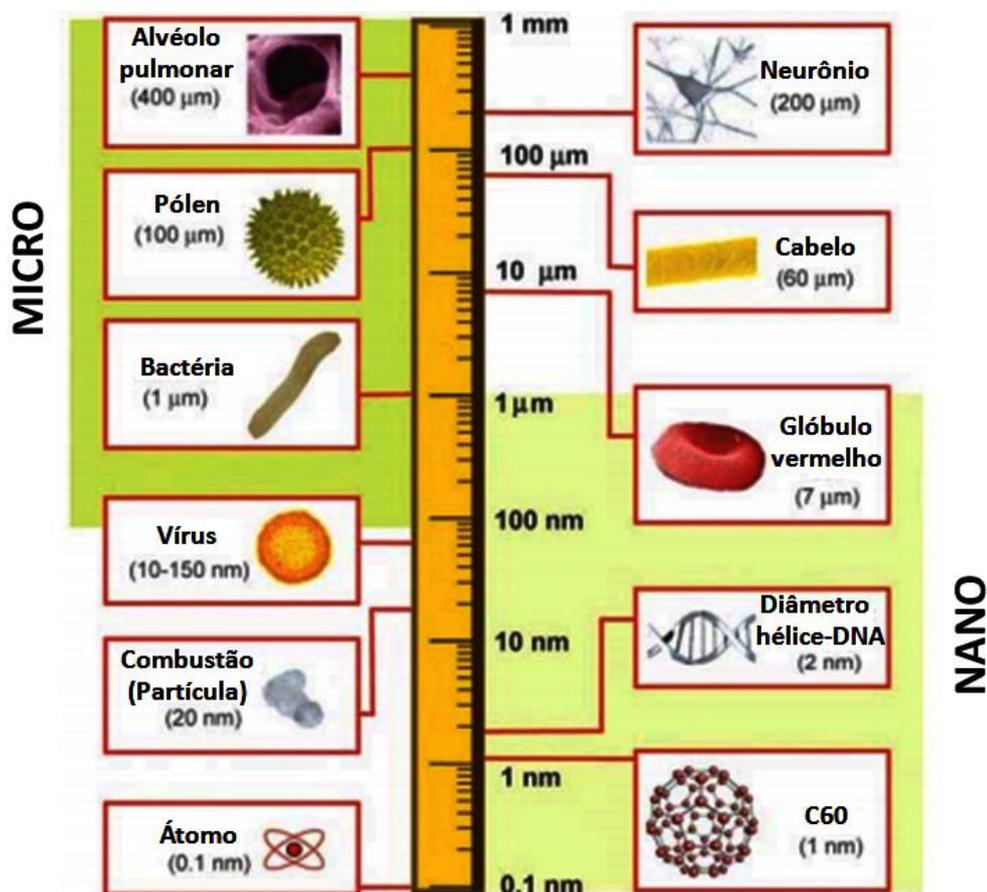


Figura 1.1 - Escala de comprimento que mostra o tamanho dos nanomateriais em comparação com os componentes biológicos e definição de nano e micro tamanhos. Adaptada de Buzea; Blandino; Robbie, 2007.

A nanotecnologia pode ter aplicações em diversas áreas tais como (BOWMAN, 2007):

- Nano-medicina: nano-fármacos, dispositivos médicos e engenharia de tecidos;
- Desenvolvimento de equipamentos científicos: microscópio de força atômica e microscópio de varredura por tunelamento eletrônico;
- Cosmetologia: substâncias químicas em nanoescala;
- Química: compostos, tintas e revestimentos;
- Agricultura: pesticidas e produção de alimentos;
- Materiais: nanopartículas, nanotubos de carbono, biopolímeros, tintas e revestimentos;
- Ciência dos alimentos: processos, alimentos funcionais e nutracêuticos e alimentos nanoencapsulados;
- Meio ambiente e energia: filtros de purificação do ar e da água, energia fotovoltaica e célula combustível;
- Segurança: biossensores e armas;
- Eletrônica: semicondutores, chips, armazenamento, fotônica e optoeletrônica.

Devido o grande potencial que a nanotecnologia possui nas diversas áreas citadas anteriormente, o mercado mundial é estimado em mais de um trilhão de Euros em 2011-2015 (STYLIOS; GIANNOUDIS; WAN, 2005). Os locais que mais investem em nanotecnologia são: USA, a Europa e Japão, cada um destes vem investindo cerca de um bilhão de dólares ao ano. Juntos são detentores de cerca da metade dos investimentos mundial. No Brasil o governo investiu R\$ 140 milhões entre 2001 e 2006 em redes de pesquisa e projetos na área de nanotecnologia (MENDES et al., 2006).

Segundo Opara (2004) as novas descobertas da biotecnologia, da informação e comunicação tecnológicas (ICT) e da nanotecnologia irão revolucionar a agricultura no século XXI, tais transformações serão mais inovadoras do que as da “revolução verde” no século XX.

O agronegócio brasileiro é apontado por muitos pesquisadores como uma das áreas de aplicação das nanotecnologias em que o Brasil teria condições de tornar-se extremamente competitivo (MATTOSO; MEDEIROS; NETO, 2005). Atualmente no Brasil, a maior parte das pesquisas relacionadas à bionanotecnologia e nanotecnologia na agricultura, é desenvolvida na Embrapa. Os Laboratórios da Embrapa Instrumentação, localizados em São Carlos-SP, tem realizado pesquisas nanotecnológicas para obter processos e produtos de melhor qualidade. Dentre as novas tecnologias criadas podem ser citadas três linhas de

pesquisa principais: sensores, que são superfícies capazes de interagir com moléculas de um composto (podem ser usados contra micro-organismos, agrotóxicos em meio aquoso e na detecção da qualidade de frutos); embalagens e revestimentos (biofilmes comestíveis), como os nanofilmes de alimentos que aumentam o tempo de conservação e o aproveitamento de resíduos, ou seja, reciclagem de dejetos provenientes da agroindústria. Nesta 3ª linha de pesquisa são utilizados processos que possibilitam reaproveitar os resíduos de diversas culturas (cana-de-açúcar, arroz, soja e frutas), reduzindo o impacto ambiental (EMBRAPA, 2007).

O Brasil está entre as dez nações que mais investem em patentes sobre fertilizantes à base de nanotecnologia do mundo. De acordo com dados do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior em 2007 o investimento correspondia a 12 bilhões de reais. Em seis anos, chega a uma média de R\$ 23,3 milhões por ano. Porém, esses investimentos são concentrados na área de fertilizantes, visto que o Brasil é um dos maiores consumidores desses produtos no mundo (MIDC, 2007).

Na nanotecnologia, uma classe que tem despertado grande interesse na sociedade científica nos últimos anos são as nanopartículas, por apresentarem propriedades físico-químicas únicas e um grande potencial em aplicações tecnológicas industriais, biológicas e médicas (KURODA, 1999; CRESPILO et al., 2006). As nanopartículas têm despertado grande atenção em áreas como catálise (QIU; BEDNAROVA; LEE 2006), nanoeletrônica (DABBOUSI et al., 1995), meio ambiente (YOON et al., 2008) e na área médica por apresentar propriedades antimicrobianas (CHEN; SCHLUESENER et al., 2008).

1.2 Classificação das nanopartículas

As nanopartículas podem ser agrupadas em duas classes: nanopartículas orgânicas e inorgânicas. As nanopartículas orgânicas podem incluir as nanopartículas de carbono (fulerenos), e as nanopartículas inorgânicas incluem as nanopartículas magnéticas, nanopartículas metálicas (prata e ouro) e as nanopartículas de semicondutores (dióxido de titânio e óxido de zinco) (SINGH; MANIKANDAN; KUMARAGURU, 2011).

Considera-se que os estudos sobre nanopartículas orgânicas são úteis para a compreensão dos materiais a granel e as moléculas individuais, incluindo os cristais moleculares orgânicos, sólidos amorfos, os materiais poliméricos orgânicos, soluções, cristais

líquidos, que são considerados estruturas e componentes moleculares (MASUHARA; NAKANISHI; SASAKI, 2003).

As nanopartículas inorgânicas têm grande potencial de uso, pois possuem características versáteis tais como: tamanho (largura), funcionalidade, biocompatibilidade, capacidade de entrega e liberação controlada de fármacos (XU et al., 2006). Além disso, as nanopartículas inorgânicas podem atuar como agentes antibacterianos e antifúngicos, podendo interagir com os micro-organismos (HERNANDEZ-SIERRA et al., 2008; RAI; YADAV; GADE, 2009).

Dentro da classificação de nanopartículas inorgânicas, as nanopartículas metálicas tem grande aplicação em diversas áreas como: tecnologia de sensores, aparelhos ópticos, catálise, marcadores biológicos e sistemas de transporte de drogas (DANIEL; ASTRUC, 2004). Estas nanopartículas também são usadas como aditivos de combustíveis, reduzindo as emissões através do aumento da eficiência de combustão. Podem ser citadas, as nanopartículas de óxidos metálicos, uma vez que promovem as reações de combustão *in situ* sem desgaste significativo do motor devido ao tamanho das nanopartículas envolvidas. Devido a sua elevada área superficial, estão sendo investigadas para o desenvolvimento e a produção de eletricidade solar (WILLEMS, 2005).



Figura 1.2 - Classificação de nanopartículas inorgânicas e orgânicas. Adaptada de Xing et al., (2014).

Nos últimos anos o número de artigos publicados em revistas internacionais relacionados à nanopartículas de metálicas cresceu exponencialmente, sendo que as publicações relacionadas às partículas metálicas têm sua maior fração sobre partículas de ouro

e de prata, também com um recente aumento no número de pedidos de patentes sobre processos de síntese de nanopartículas e de nanocompósitos, provavelmente devido à popularização das investigações sobre as propriedades da matéria em escala nanométrica. Os estudos sobre as nanopartículas são, em sua maioria, relacionados aos processos de síntese. Por outro lado, o número de artigos que descrevem as aplicações tem aumentado nos últimos anos, principalmente nas áreas de pesquisa relacionadas ao uso de nanopartículas em sistemas biológicos (GORUP, 2010).

Atualmente, as nanopartículas inorgânicas metálicas mais estudadas são as nanopartículas de: prata (AgNPs) e ouro (AuNPs) (KAMAT, 2002; WEI; QIAN, 2008; MALLIN; MURPHY, 2002). O interesse nestes dois metais, Ag e Au, estão em suas características intrínsecas, como estabilidade química, condutividade elétrica e alta atividade catalítica (MURUGADOSS; CHATTOPADHYAY, 2008; EVANOFF; CHUMANOV, 2004; MERGA et al., 2007). As AuNPs são muito usadas na construção de biossensores (STEHR et al., 2008), pois apresentam uma ótima estabilidade e interação com os grupos nitrila (-CN), tiol (-SH) e amina primária (-NH₂) (HUANG; YUAN; YANG, 2005), presentes em várias biomoléculas celulares. Já os estudos relacionados às AgNPs se concentram no seu efeito bactericida (MORONES et al., 2005; DURÁN et al., 2007), na facilidade destas nanopartículas formarem estruturas pouco convencionais, como nanoprismas (JIN et al., 2001).

Além disso, nanopartículas de prata, em particular, são de grande interesse devido a sua capacidade de interagir com a luz de forma eficiente, em virtude da ressonância plasmônica, que são as oscilações coletivas de elétrons conduzidas no metal. Nanopartículas de prata certamente têm o potencial para serem os blocos da construção de futuros dispositivos fotônicos e plasmônicos, isso com o amadurecimento da nanotecnologia (EVANOFF; CHUMANOV, 2004).

1.2.1 Nanopartículas de prata

O uso de coloides de prata, ou seja, partículas nanométricas (nanopartículas) em solução de tamanho entre 10^{-9} a 10^{-6} (KEY; MAASS, 2001) tem sido relatado em documentos científicos desde o fim do século 18 e a aplicação dessas partículas nanométricas foi intensificado entre 1910 e 1920 (GIBBS, 1999).

As nanopartículas de prata são conhecidas por sua atividade antimicrobiana e por inibir uma ampla gama de micro-organismos dentre eles bactérias Gram-positivas e Gram-negativas incluindo estirpes resistentes a antibióticos (BALAZS et al., 2004), fungos, protozoários e alguns tipos de vírus (MELAIYE; YOUNGS, 2005; STOBIE et al. 2008). Comparada com outros metais, a prata causa maior toxicidade aos micro-organismos ao mesmo tempo em que exibe menor toxicidade para células de mamíferos (ZHAO; STEVENS, 1998).

Nanopartículas de prata são muito eficazes, pois possuem uma alta relação superfície/volume, de modo que uma grande proporção de nanopartículas de prata está em contato direto com seu ambiente (INGLE et al., 2008). Essa característica possibilita uma maior ação no sítio alvo quando comparado com partículas não nanométricas (GUPTA; GUPTA, 2005; KARIMI; KARIMI; SHOKROLLAHI, 2013; MAURIN et al., 2013). Desse modo, estudiosos estão direcionando suas pesquisas para as nanopartículas de prata especialmente para resolver o problema dos patógenos, incluindo bactérias e fungos, resistentes a diversos fármacos (GEMMELL; EDWARDS; FRAINSE, 2006; CHOPRA, 2007).

Estudos com nanopartículas de prata têm se mostrado promissoras no combate de bactérias Gram positivas (*Staphylococcus aureus*). As nanopartículas foram incorporadas em tecido e mostraram causar esterilidade, contribuindo assim para minimizar infecções. Nanopartículas metálicas foram incorporadas a tintas sintetizadas a partir de óleos vegetais e mostraram ter uma boa atividade antibacteriana (KUMAR et al., 2008).

Além de agentes antimicrobianos, as nanopartículas de prata são usadas em biossensores e filtros (CAO, 2004), curativos, em tecidos têxteis e ataduras para os pacientes com queimaduras (DURÁN et al., 2007), em máscaras cirúrgicas (LI et al., 2006), em condicionadores de tecidos (próteses) (NAM, 2011), em cateteres, fios de sutura, tendões artificiais e adesivos ortodôntico (CHEN; SCHLUESENER, 2008). As nanopartículas de prata também estão sendo usadas em sistemas de purificação de água (MAYNARD, 2007) e em biofilmes para a conservação de alimentos (MATTOSO; RIBEIRO; NETO, 2008).

Em comparação com outros metais estudados, a prata é a que possui a maior toxicidade contra os micro-organismos na seguinte escala de toxicidade: Ag > Hg > Cu > Cd > Pb > Co > Au > Zn > Fe > Mn > Mo > Sn. Adicionalmente, a prata é o metal que apresenta a menor toxicidade para as células animais (MATTOSO; RIBEIRO; NETO, 2008).

As nanopartículas de prata são menos tóxicas para os seres humanos, pois em comparação com partículas de prata em dimensões maiores (micrométricas) nanopartículas

são dispersas e estão em baixas concentrações que podem circular pelas membranas celulares sem ocasionar danos aos organismos superiores, e visto que a concentração efetiva para a atuação contra micro-organismos é de 1 mg/L (CHOI et al., 2008) e a concentração tóxica para os seres humanos é de 10 mg/L. No entanto, as partículas de prata em dimensões maiores (micrométricas) causam a obstrução das membranas celulares, promovendo um envenenamento por prata, conhecido por Argiria. Essa intoxicação não ocorre com a utilização das nanopartículas (CARREIRA, 2009).

Assim, nanopartículas de prata é o candidato ideal para o desenvolvimento de novos produtos antimicrobianos e estes são referidos como sendo agentes antimicrobianos de novas gerações (RAI; YADAV; GADE, 2009).

1.3 Fungos

Os fungos (reino Fungi) constituem um grande e diversificado grupo de seres vivos (bolores, cogumelos e leveduras), que podem ser encontrados em quase todos os nichos ecológicos (WEBSTER; WEBER, 2007). Já foram descritas aproximadamente 100.000 espécies, no entanto, estima-se que existam mais de 1,5 milhões de espécies no planeta (WEBSTER; WEBER, 2007; MADIGAN et al., 2009). Atualmente os fungos constituem o Reino Fungi, sendo este reino é dividido em 4 filos (*Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Basidiomycota* e *Ascomycota*) (WEBSTER; WEBER, 2007), Tese Thalita

Os fungos são seres eucariontes multicelulares, podendo também ser unicelulares (como as leveduras), quimiorganotróficos e na sua maioria aeróbios (MADIGAN et al., 2009). Os fungos pluricelulares possuem estruturas filamentosas, as hifas. As hifas podem ser septadas ou não-septadas (cenocíticas). Os septos são paredes transversais que derivam das estruturas filamentosas. No caso das hifas septadas, há vários núcleos dispersos no citoplasma. Já as hifas não-septadas, estas podem ser de dois tipos: mononucleadas ou multinucleadas. A livre ramificação e entrelaçamento das hifas formam o corpo do fungo chamado de micélio (PELCZAR; CHAN; KRIEG; 1997).

Durante a fase reprodutiva, o micélio forma estruturas assexuadas e/ou sexuadas que originarão os esporos, responsáveis pela propagação das espécies. A grande maioria dos fungos se reproduz através de esporos, sendo que um pequeno fragmento do fungo é capaz de formar um novo indivíduo (PELCZAR; CHAN; KRIEG; 1997, KUBO, 2014).

Os esporos são estruturas utilizadas para proteção e reprodução. Os esporos sexuais, utilizados para a reprodução, são produzidos através da fusão de duas células reprodutivas especializadas, os gametas, em uma célula fertilizada. Já a formação dos esporos assexuados não envolve a fusão de gametas, e sua função é disseminar a espécie. Os esporos assexuados são normalmente brancos quando recém-produzidos, mas adquirem sua cor característica com a idade, com o amadurecimento do fungo (PELCZAR; CHAN; KRIEG; 1997; MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004).

Os micologistas dependem significativamente do reconhecimento dos esporos sexuais e assexuais característicos, tanto para classificar quanto para identificar os fungos (WALKER, 2000; MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004). Os tipos de esporos são distinguíveis em função de sua filogenia, juntamente com características estruturais, formam a base da taxonomia e sistemática (MORTON, 1993). Desse modo, a identificação dos fungos é baseada no modo de formação dos esporos, enquanto as características relacionadas com as propriedades da parede dos esporos, tais como: espessura, pigmentação e reações histoquímicas são utilizadas para identificação de espécies (BENTIVENGA; MORTON, 1994).

Muitos fungos apresentam apenas a fase assexuada e são, por isso, classificados como anamórficos, sendo também chamados de “fungos imperfeitos”. Tais fungos são disseminados por propágulos que se formam em células onde não ocorre meiose, e tipicamente reproduzem-se por mitose em estruturas chamadas conídios (KIRK et al., 2001)

Nos fungos, a estrutura celular é semelhante a dos outros eucariotos, constituída basicamente por uma membrana, um citoplasma com as organelas distribuídas aleatoriamente por todo interior celular e um compartimento especial, o núcleo, que armazena o material genético. As células podem ser encontradas na forma unicelular, como as leveduras, ou então formando conjuntos de hifas, septadas ou não, denominadas de micélio, como no caso dos fungos filamentosos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2005; MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004).

A parede celular dos fungos é uma estrutura rígida, essencial para a sobrevivência dos fungos, assemelha-se estruturalmente à parede celular dos vegetais, porém é quimicamente diferente. A composição química da parede celular é bastante complexa, constituída principalmente por polissacarídeos, ligada ou não a proteínas ou lipídeos, polifosfatos e íons inorgânicos formando a matriz amorfa. Quitina, glucanas (1,3- β - e 1,6- β -glucana), galactomananas e proteínas são os compostos mais frequentes, embora sua quantidade possa variar entre as diferentes espécies de fungos (ADAMS, 2004).

Outro aspecto da parede é a coloração, que nos fungos é determinada por diferentes pigmentos (SAKAKI et al., 2000), encontrados principalmente na parede, mas que também podem estar presentes nos fluídos, livres da parede e, então, geralmente, na forma de grânulos (Butler e Day, 1998). Os pigmentos da parede, frequentemente polifenólicos, funcionam presumivelmente como reforço da rede de proteínas e polissacarídeos, através de ligações cruzadas oxidativas ou pela impregnação com um polímero hidrofóbico (PETER, 2001).

Desse modo, estes pigmentos podem conferir diferentes colorações às culturas e às frutificações (ascomas, basidiomas): amarela (ancaflavina em *Monascuspurpureus*), amarelo-alaranjado (aurofusarina em *Fusarium culmorum*), laranja (β -caroteno em *Rhodotorula glutinis*), azul (boletol em *Boletus luridus*) e vermelha (auxarconjugatinas em *Auxarthon conjugatum*). A função de certos pigmentos é antioxidativa, como para os β -carotenos e a torularodina (BUZZINI; MARTINI, 1999; DURÁN et al., 2001).

Alguns fungos são completamente escuros, tanto na forma micelial quanto na de estruturas esporuladoras e/ou esporos. Neste caso, o pigmento responsável é a melanina, um exemplo é o *Aspergillus niger* (ascomicetos) cujos esporos são externamente escuros (BUTLER; DAY, 1998). As melaninas protegem os organismos do estresse ambiental (exposição a metais pesados, dessecação, condições hiperosmóticas e temperaturas extremas), do antagonismo de outros organismos (*Phellinus weirii*), da limitação de nutrientes, do choque de pH e contra a radiação ionizante e UV. No caso de fungos fitopatogênicos, a melanina pode desempenhar um papel importante na proteção contra os radicais livres de oxigênio, gerados pela planta, como resposta à infecção pelo fungo (HENSON; BUTLER; DAY, 1999).

Os fungos sobrevivem através da absorção de nutrientes, também conhecida nutrição absorptiva, geralmente apresentando exigências nutricionais simples. Eles podem ser aeróbios ou anaeróbios facultativos. Várias espécies podem crescer em ambientes com valores de pH extremamente baixos e com temperaturas altas ou baixas. Os principais macronutrientes são o carbono e o nitrogênio, seguido pelos elementos químicos P, S, K, Mg, Ca, Na e Fe, cada um deles desempenhando papéis fundamentais para a sobrevivência do micro-organismo no ambiente (TORTORA; FUNKE; CASE, 2000; MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004).

Os fungos são de grande interesse, pois atuam como parasitas de plantas, animais e de outros fungos (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996). Os fungos filamentosos, como os do gênero *Aspergillus*, contaminam alimentos e podem causar grandes perdas econômicas devido a sua proliferação, deterioração dos alimentos e pela síntese de compostos indesejáveis (VENÂNCIO; ABRUNHOSA; SERRA, 2005). Sendo assim, algumas espécies

de *Aspergillus* são responsáveis por contaminar produtos agrícolas em diferentes fases, como pré-colheita, colheita, processamento e ainda podem produzir micotoxinas (PERRONE et al., 2007).

1.3.1 O gênero *Aspergillus*

O gênero *Aspergillus* faz parte do filo Ascomycetes que contém cerca de 150 espécies catalogadas e foi catalogado pelo padre italiano e biólogo Pier Antonio Micheli em 1729 (HUBKA et al., 2013).

Em relação à taxonomia, o *Aspergillus* spp. é agrupado à divisão Deuteromycotina, à classe dos Hyphomycetes, à ordem Moniliales, e à família Moniliaceae. São fungos caracterizados pelo desenvolvimento de colônias coloridas e brilhantes e por produzir conídias em cabeças típicas (Figura 1.3), do tipo *mop-like* (escovão) (PITT; HOCKING, 1997).

A morfologia do conidióforo, as estruturas que dão origem os esporos assexuados, é de extrema importância na taxinomia dos fungos do gênero *Aspergillus*, uma vez que as características microscópicas de maior valor na classificação e identificação das espécies de *Aspergillus* são o tipo de aspergillum (unisseriados e bisseriados), a forma, a ornamentação e a cor dos esporos (BENNETT, 2010). Além das características microscópicas, também são usadas características culturais em meios e condições de incubação padronizada, como o tamanho, cor e textura da colônia (VRIES et al., 2005).

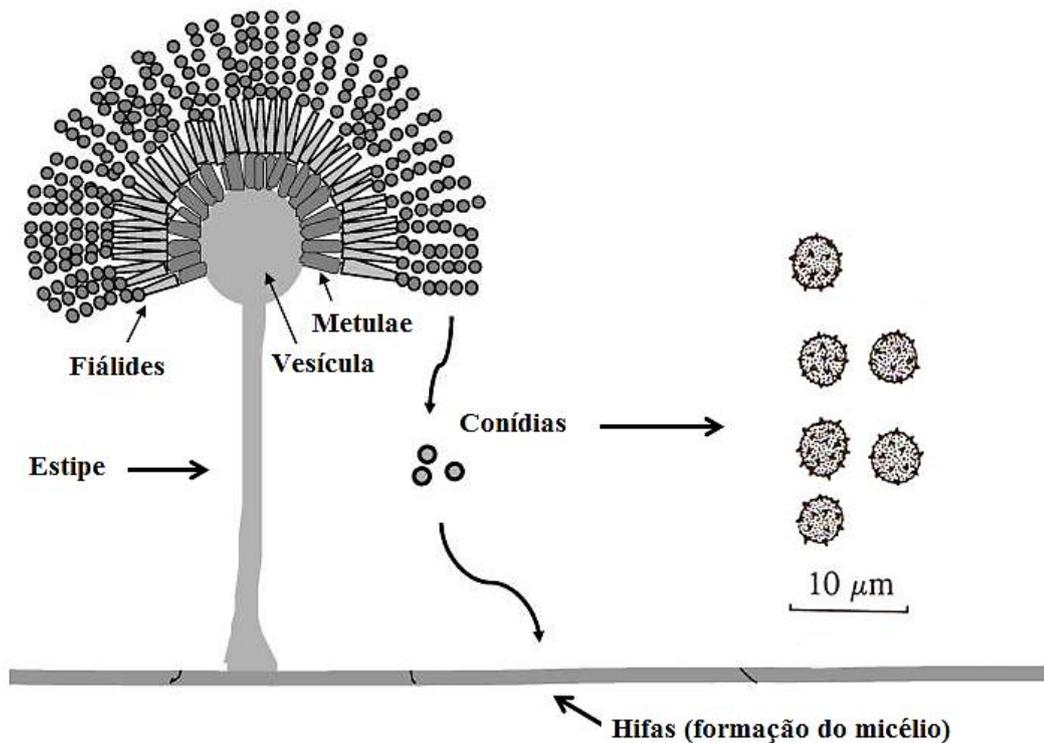


Figura 1.3 - Morfologia do gênero *Aspergillus*. Adaptada de Tsitsigiannis et al., (2004).

As espécies de *Aspergillus* desempenham um papel importante nos ecossistemas naturais e na sua relação com o homem. Este gênero compreende micro-organismos com grandes potencialidades biotecnológicas, devido às suas capacidades de produzir enzimas, ácidos orgânicos e metabólitos secundários. No entanto, algumas espécies de *Aspergillus* podem causar doenças em plantas e em animais e são os fungos contaminantes de produtos agro-alimentares mais comuns. Desse modo, estas espécies patogênicas provocam grandes perdas na agricultura, pois deterioram os alimentos armazenados (TEIXEIRA; FERNANDES; LUNA, 1994; NIELSEN, 2009; BENNETT, 2010).

O desenvolvimento destes micro-organismos não ocorre somente no campo, mas também durante o processo de formação das sementes, na colheita, nas fases de secagem, beneficiamento e armazenamento (ROSSETTO; SILVA; ARAÚJO, 2005); e ainda no manuseio e transporte até o consumidor (SANTOS; LOPES; KOSSEKI, 2001). O impacto econômico da contaminação fúngica inclui a diminuição do poder de germinação, emboloramento visível, descoloração, odor desagradável, perda de matéria seca, perda de viabilidade e vigor, mudanças químicas e nutricionais com conseqüente perda da qualidade, produção de micotoxinas, tornando o seu consumo impróprio (PASTER; BULLERMAN, 1988).

Os esporos dos *Aspergillus* são facilmente dispersos pelo vento e são espalhados pelo ambiente, até que se depositam em alguma superfície. Dependendo das condições do local onde o esporo se depositou este pode germinar ou não (BENNETT, 2010). Normalmente, produtos alimentícios como: frutos, cereais, grãos e sementes, são locais excelentes para a germinação dos esporos uma vez que apresentam condições apropriadas para o crescimento dos fungos (WEBSTER; WEBER, 2007). Este fator de dispersão confere aos fungos a ubiquidade na natureza, ou seja, podendo estar presentes em diversos lugares (Bennett, 2010). Além disso, os esporos conferem proteção aos fungos, preservando a sua viabilidade até longe do seu local de origem e estes podem permanecer latentes por longos períodos de tempo até as condições ambientais se mostrarem favoráveis à sua germinação (SOARES, 2007).

Além disso, os fungos do gênero *Aspergillus* são xerofílicos ou xerotolerantes, ou seja, podem crescer em baixo potencial de água, sendo os primeiros a se desenvolverem nas condições de baixa umidade dos grãos e sementes assim facilitando o desenvolvimento de outros gêneros que necessitam mais umidade (PUZZI, 2000).

Os fungos, gênero *Aspergillus*, são capazes de produzir em condições naturais e laboratoriais, metabólitos secundários tóxicos (WEBSTER; WEBER, 2007). Os metabólitos secundários são compostos biossintetizados e excretados através de um conjunto de vias metabólicas que não são essenciais para o crescimento e sobrevivência do micro-organismo (SERRA, 2005; WEBSTER, WEBER, 2007). Estes compostos secundários estão presentes no meio de cultura ou no substrato (um alimento) onde os fungos crescem. Alguns metabólitos secundários fúngicos têm propriedades antibióticas e alguns demonstram toxicidade para animais, chamados de micotoxinas (SERRA, 2005).

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos filamentosos, isto é, são metabólitos não essenciais ao desenvolvimento e reprodução dos fungos e que demonstram propriedades tóxicas em animais e para o ser humano (VENÂNCIO; ABRUNHOSA; SERRA, 2005; NIELSEN et al., 2009). São produzidas a partir das vias metabólicas dos acetatos e dos terpenóides e de alguns processos que usam aminoácidos essenciais (PATERSON; BRIDGE, 2006; WEBSTER; WEBER, 2007).

A ingestão de micotoxinas por seres humanos ocorre principalmente pela ingestão de alimentos vegetais contaminados, bem como pelo consumo de produtos derivados dos alimentos, tais como: leite, queijo, carnes e outros produtos de origem animais (SMITH et al., 1995).

Quando micotoxinas são ingeridas elas podem produzir diversos efeitos nocivos à saúde. Os efeitos tóxicos produzidos pelas micotoxinas devem-se às diferentes estruturas

químicas, aos níveis de contaminação de cada micotoxina existente no alimento, a possível interação toxicológica produzida por diferentes micotoxinas, tempo de consumo do alimento contaminado, e no caso de micotoxinas conjugadas, o risco de que as formas originais de micotoxinas sejam liberadas após digestão no trato gastrointestinal (BERTHILLER et al., 2013; HUSSEIN; BRASEL, 2001). Além disso, os efeitos tóxicos das micotoxinas podem variar entre os organismos vivos, dependendo da espécie afetada, sexo, idade, condições nutricionais e fatores ambientais (MALLMANN; DILKIN, 2007).

A Agência Internacional para Pesquisa sobre Câncer (*International Agency for Research on Cancer*, IARC) tem classificado diversas micotoxinas de acordo com seu potencial carcinogênico para humanos. As aflatoxinas são classificadas no grupo I, compostos carcinógenos para humanos (IARC 2002), já as fumonisinas e as ocratoxina (OTA A) são classificadas no grupo 2B, compostos possivelmente carcinogênicos para humanos (IARC, 1993). Em animais, micotoxinas podem causar redução no desempenho, causar imunossupressão, afetar órgãos vitais, interferir na capacidade reprodutiva e em casos de intoxicações agudas causarem a morte dos animais (BHAT et al., 2010).

Em grãos e produtos processados de soja, as principais micotoxinas relatadas são: aflatoxinas (B1, B2, G1, G2), fumonisina, deoxinivalenol, nivalenol, ocratoxina A e zearalenona, (GONÇALEZ et al., 2001; SASSAHARA et al., 2003; MARTINELLI et al., 2004). As aflatoxinas e as ocratoxinas são produzidas pelos fungos do gênero *Aspergillus*, enquanto deoxinivalenol, nivalenol e zearalenona, pelos fungos do gênero *Fusarium* (SALINAS, 2006). A produção de micotoxinas em grãos desta cultura é um dado alarmante, levando em consideração que a cultura da soja é a que possui maior expressão no cenário agrícola nacional, com importante papel socioeconômico. A contaminação por micotoxinas poderá prejudicar futuramente as exportações dessa *commodity*.

A crescente preocupação dos países importadores quanto à presença de micotoxinas nos alimentos tem levado à elaboração de legislações cada vez mais rígidas, no que se refere aos níveis máximos de micotoxinas permitidos. O Brasil, a exemplo de outros celeiros mundiais, deverá enfrentar em breve dificuldades cada vez maiores para exportação de seus produtos agrícolas. Além disso, estudos conduzidos no Brasil têm comprovado que muitos alimentos, rações e ingredientes apresentam níveis de contaminação por micotoxinas muitas vezes superior ao permitido pela legislação brasileira, bem como pela internacional (FREIRE et al., 2007).

No Brasil o limite máximo tolerado (LMT) para micotoxinas (aflatoxinas) em alimentos é de 50 µg/kg, nos Estados Unidos esse limite é de 20 µg/kg e na Suécia, um dos

países com a legislação para micotoxinas mais rigorosa esse limite máximo tolerado é de apenas 5 µg/kg (ANVISA, 2011).

Desse modo, a descoberta de agentes que possam inibir essas micotoxinas é uma necessidade real, devido a comunidade agrícola internacional está cada vez mais rigorosa com a comercialização de alimentos contaminados com substâncias toxicogênicas.

1.3.2 O gênero *Phomopsis*

A soja é a oleaginosa mais importante cultivada no mundo e, atualmente, o Brasil é o segundo maior produtor mundial desta cultura. Na safra 2013/14 de soja do Brasil, 27 milhões de hectares de soja foram plantados, o que corresponde a quase metade (52%) da área total de culturas de campo no país, chegando a uma produção total de 86,57 milhões de toneladas e um rendimento médio de 2939 kg / ha (USDA, 2015).

A soja produzida no Brasil tornou-se uma das culturas com maior lucratividade na agricultura nacional. A cada nova safra essa cultura também incorpora novas tecnologias que permitem ampliar a produtividade e proporcionar novos aproveitamentos ao grão (VENCATO et al., 2005).

No entanto, alguns fatores podem influenciar negativamente a produtividade da cultura da soja. Dentre eles, destacam-se a ocorrência de plantas daninhas, pragas e doenças. As doenças são ocasionadas por patógenos que podem atuar durante todo o ciclo da cultura, e aquelas que ocorrem principalmente no final do ciclo acarretam prejuízos de até 21% na produção de grãos, ocasionando danos principalmente na redução de massa de grãos (SANTOS et al., 2005, CARVALHO et al., 2006).

No entanto, essas doenças não são as únicas responsáveis pelas perdas na cultura da soja. O armazenamento inadequado das sementes também ocasiona a perda do potencial fisiológico das sementes. Vários fatores afetam o desempenho das sementes durante o armazenamento, incluindo o genótipo, estágio de maturação, viabilidade, teor de água inicial das sementes, temperatura, umidade relativa do ar e deterioração das sementes por patógenos (fungos e bactérias) (CARVALHO et al., 2006).

A maioria das doenças de importância econômica que ocorre na soja é causada por patógenos que são transmitidos pelas sementes. Sementes com má sanidade ou contaminadas, introduzem doenças em áreas novas ou reintroduzem a doença em áreas já cultivadas. A transmissão via semente é considerado um foco primário da doença, sendo que o processo de

infecção geralmente ocorre nos estádios iniciais de desenvolvimento da planta (GOULART, 1997).

O fungo *Phomopsis* spp. anamorfo de *Diaporthe* spp. (Figura 1.4) causador do cancro da haste da soja, da seca da haste e da vagem da soja, também provoca a deterioração das sementes e é responsável pelo descarte de grande número de lotes de sementes. Seu maior dano é em dias com altas temperaturas e chuvosos, nos estádios iniciais de formação das vagens e na maturação, quando ocorre o retardamento de colheita por excesso de umidade (GOULART, 2005).

Devido a atividade desses fitopatógenos para provocar grandes danos à cultura da soja é necessário que seja feito um controle eficiente desses micro-organismos. Desta forma, é indispensável empregar tecnologias que controlem esses patógenos de maneira eficaz. Por isso, atualmente o uso da nanotecnologia (em particular as nanopartículas) pode contribuir para reduzir perdas na agricultura ocasionadas por micro-organismos.

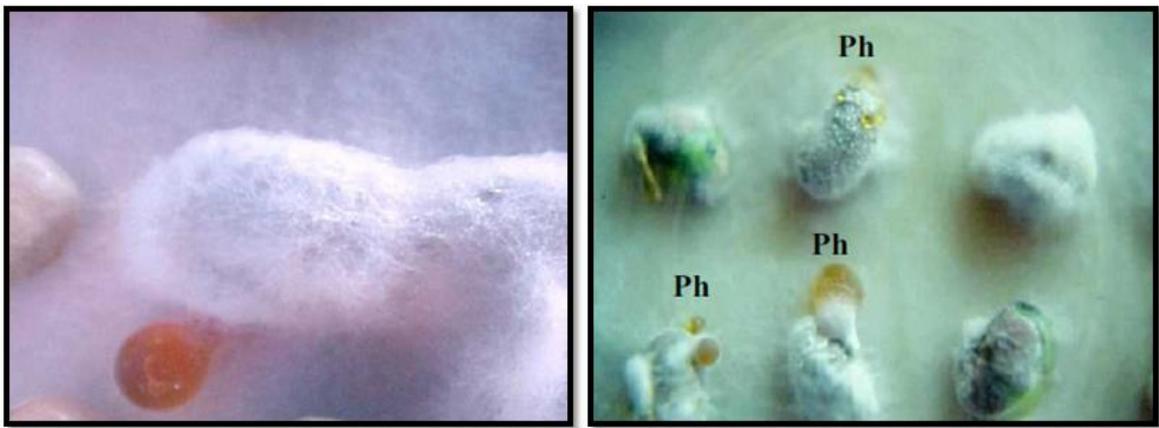


Figura 1.4 *Phomopsis* spp. em sementes de soja. Adaptada de Goulart (2005).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antifúngica *in vitro* de nanopartículas de prata (AgNPs) no controle de fungos micotoxigênicos do gênero *Aspergillus* e do fitopatógeno *Phomopsis* da cultura da soja.

2.2 Objetivos Específicos

Desta forma, definiu-se os seguintes objetivos específicos:

- Sintetizar e caracterizar as nanopartículas de prata pelo método do citrato;
- Avaliar o efeito das nanopartículas de prata através do diâmetro de crescimento diário dos gêneros *Aspergillus* e *Phomopsis*;
- Determinar as propriedades inibitórias das nanopartículas de prata contra microorganismos patogênicos de soja;
- Estudar o modo de ação de nanopartículas de prata sobre o crescimento e formação de colônias fúngica;
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) das nanopartículas de prata;
- Quantificar a produção de micotoxinas pelas espécies micotoxigênicas de *Aspergillus* tratados com nanopartículas de prata.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Síntese de Nanopartículas de prata

As nanopartículas de prata que foram testadas neste trabalho foram sintetizadas no Laboratório Interdisciplinar de Eletroquímica e Cerâmica (LIEC) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), com a colaboração do Prof. Dr. Emerson Rodrigues de Camargo.

As dispersões coloidais de prata foram preparadas utilizando o Método do Citrato, originalmente proposto por Turkevich; Stevenson; Hillier (1951) como descrito por Gorup et al., (2011). O sal de citrato foi utilizado como agente redutor e estabilizante. Os reagentes e solventes foram utilizados na síntese estão descritos na Tabela 1.1. Todos os reagentes e solventes foram utilizados conforme recebidos. A água utilizada no procedimento experimental foi destilada e deionizada, utilizando-se um equipamento Millipore Elix-3.

Tabela 3.1- Reagentes utilizados na síntese de nanopartículas de prata

Reagente	Marca	Pureza (%)
Nitrato de prata (AgNO_3)	Sigma-Aldrich	99
Citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$)	Synth	99
Amônia (NH_3)	Sigma-Aldrich	28

O procedimento de preparação das dispersões coloidais de prata foi realizado em capela de fluxo laminar rigorosamente esterilizada com hipoclorito de sódio, álcool etílico 70% e luz ultravioleta visível por 30 minutos com o intuito de evitar a contaminação por outros fungos e bactérias presentes no ar atmosférico, garantindo a ausência de micro-organismos dentro do fluxo laminar.

A síntese das nanopartículas foi realizada em um *becker* contendo 200 mL de água destilada e deionizada, previamente autoclavada (a 121 °C por 30 minutos), foram aquecidas a temperatura de 90 °C, sob agitação mecânica constante, utilizando uma barra magnética (Figura 1.1). Em seguida, foram adicionadas 5 mL de nitrato de prata (AgNO_3 , concentração $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$). Após a solução aquosa de AgNO_3 atingir a temperatura de 90 °C foi adicionado 5 mL de uma solução aquosa de citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, concentração 0,3

mol L⁻¹). A mistura foi mantida sob constante agitação (400 rpm) e aquecimento até o aparecimento da coloração amarelo âmbar. As nanopartículas de prata coloidal foram estabilizadas por adição de 5 mL de uma solução aquosa de amônia (NH₃, concentração 1,4 mol L⁻¹). Em seguida, a amostra foi retirada do aquecimento e resfriada até a temperatura ambiente. Posteriormente, as nanopartículas de prata foram refrigeradas a 10 °C. As imagens da síntese de nanopartículas de prata encontram-se no apêndice (Figura A.1 e Figura A.2).

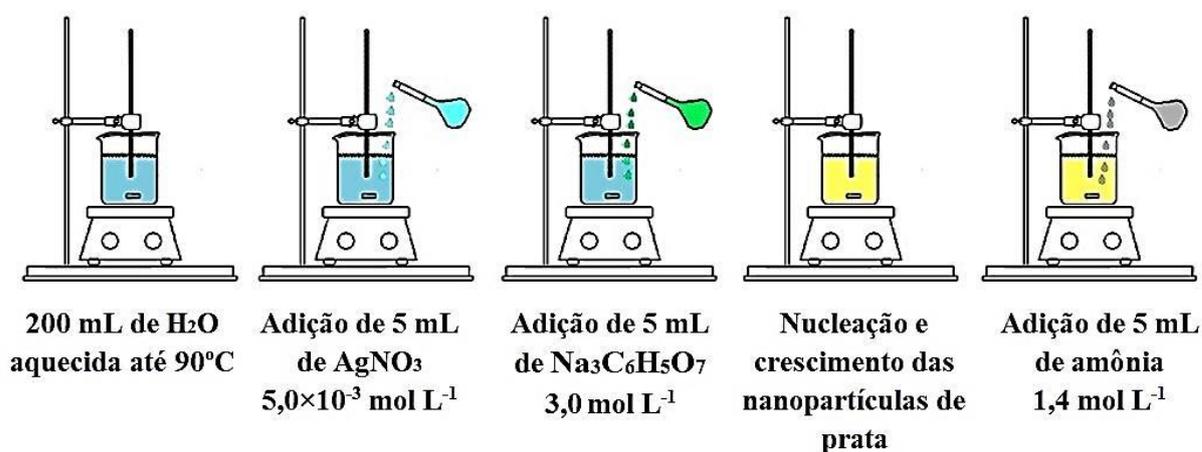


Figura 3.1 - Esquema ilustrativo do procedimento de síntese de nanopartículas de prata.

3.2 Caracterização de nanopartículas de prata

3.2.1 Espectroscopia UV-Vis

As medidas de absorção de luz pela banda *plasmon* de nanopartículas de prata podem ser obtidas nas regiões do ultravioleta, visível e infravermelho próximo. O aumento no tamanho das partículas resulta em um deslocamento da banda *plasmon* de superfície do metal para a região espectral de maior comprimento de onda (FENG et al., 2000; SONG; KIM, 2009).

Os espectros UV-Vis das nanopartículas de prata foram obtidos a partir das soluções aquosas usando um espectrofotômetro de absorção UV-vis (Shimadzu Multspec 1501), na região de 190 a 800 nm, em cubeta de quartzo com 1 cm de caminho ótico e utilizando-se água como solvente.

3.2.2 Microscopia eletrônica de varredura com fonte de emissão de campo (MEV-FEG)

As características morfológicas das nanopartículas de prata foram verificadas por microscopia eletrônica de varredura com fonte de emissão de campo. Foi utilizado um microscópio Zeiss Supra 35VP com canhão de emissão de elétrons por efeito de campo (MEV-FEG) trabalhando a 10 kV. As amostras foram preparadas depositando-se gota-a-gota no substrato de silício a partir da dispersão coloidal, com posterior evaporação do solvente a temperatura ambiente, sem auxílio de agentes dessecadores. A amostra desidratada foi colocada diretamente no microscópio, sem qualquer preparação especial prévia para análise.

3.2.3 Espalhamento de luz dinâmico (Dynamic Light Scattering – DLS)

O espalhamento de luz dinâmico (*Dynamic Light Scattering* - DLS) também conhecido como espalhamento de luz quase elástico (QELS) foi utilizado para medir o tamanho das nanopartículas sintetizadas, tendo em vista a distribuição de tamanho da partícula em função de intensidade, área, volume e quantidade. Vale ressaltar que as medidas de espalhamento também foram utilizadas no estudo da estabilidade das AgNPs, mostrando o grau de agregação das partículas. Esta técnica mede o tamanho das partículas por meio do espalhamento de luz, a partícula atua como uma esfera difusa que se movimenta em meio aquoso, de maneira que a velocidade da partícula no meio determina o seu tamanho. Um laser incide sobre a amostra que espalha a luz. Esse padrão de espalhamento é projetado em um anteparo e a aquisição dos dados é tomada em função do tempo. Dessa forma são analisadas as flutuações devido ao espalhamento da luz, estimando assim a velocidade das partículas em solução (BERNE; PECORA, 2000; FRISKEN, 2001).

O equipamento utilizado foi o Zeta Sizer Nano ZS da Malvern Instruments, pertencente ao Laboratório de Caracterização de Materiais Nanoestruturados da Embrapa Instrumentação, localizada em São Carlos – SP. Este equipamento é capaz de determinar tamanhos de partículas desde 0,6 nm até 6 μ m. Os parâmetros selecionados para a medição foram: índice de refração da prata 1.390, coeficiente de absorção da partícula de 0.002, índice de refração da água 1.330, viscosidade 0.8872 cP, tempo de equilíbrio de 2 minutos e

temperatura de 25 °C. Foram realizados quinze ciclos de medição com 10 segundos cada. As medidas foram realizadas em triplicata e foi considerada a média das distribuições do tamanho das partículas. Os resultados foram analisados pelo software DTS 5.0 (Malvern Instruments, UK).

3.3 Cultivo e crescimento dos fungos

3.3.1 Material biológico e preparação do inóculo

Os fungos utilizados neste trabalho foram: *Aspergillus parasiticus* MUM 92.02, *Aspergillus flavus* 08MAsp567, *Aspergillus flavus* 08MAsp201, *Aspergillus carbonarius* 01UAs293 e *Aspergillus niger* 01UAs248, todos preservados e fornecidos pela Micoteca da Universidade do Minho (MUM coleção cultura, Braga, Portugal). Essas estirpes do gênero *Aspergillus* são micotoxigênicos. As estirpes MUM 92,02, 08MAsp567 e 08MAsp201 produtoras de aflatoxinas (AFLs), a estirpe 01UAs293 produz ocratoxina A (OTA) e a estirpe 01UAs248 produz fumonisina B2 (FB2). Neste trabalho também foi testado o fungo *Phomopsis* sp. MES1154 fornecido pela Micoteca da Embrapa Soja (Coleção de fungos fitopatogênicos da Embrapa Soja, localizada em Londrina, Paraná).

As estirpes do gênero *Aspergillus* estavam congeladas na Micoteca da Universidade do Minho já na sua forma ativa em tubos de Falcon contendo solução estoque de glicerol. As estirpes foram revividas em *Potato dextrose Agar* (PDA), com exceção da estirpe *Aspergillus carbonarius* 01UAs293 que foi revivida em *Malte extract agar* (MEA). Os meios de cultura foram autoclavados durante 15 min a 121 °C. Depois de autoclavados e arrefecidos verteu-se o meio em placas de 90×15 mm e armazenou-se à temperatura ambiente, em local seco e sem luz. Desse modo, as placas de Petri contendo meio de cultura foram então inoculadas e incubadas a 25 °C, no escuro durante 7 dias. Posteriormente, completados os 7 dias de incubação para o crescimento fúngico, foram preparadas as suspensões de esporos com 10 mL de solução salina (0,9% de NaCl e 0,01% de Tween 20) e a sua concentração foi ajustada a $2,5 \times 10^6$ esporos mL⁻¹, usando uma câmara de Neubauer. O procedimento experimental para o fungo *Phomopsis* sp. MES1154 foi realizado no Laboratório de Amostras Biológicas, da Embrapa Instrumentação. Este fungo também foi revivido em *Potato dextrose Agar* (PDA). O

meio de cultura foi autoclavado durante 15 min a 121 °C. Depois de autoclavado e arrefecido, verteu-se o meio em placas de 90×15 mm e armazenou-se à temperatura ambiente, em local seco e sem luz. Posteriormente, as placas de Petri com meio de cultura foram inoculadas com um disco de ágar de 5 mm contendo o micélio *Phomopsis* sp. MES1154. Em seguida, as placas foram incubadas a 25 °C, no escuro durante 7 dias. Posteriormente, após a incubação para o crescimento fúngico, foram feitos cortes de 5 mm nas placas para a inoculação das placas e realização do teste de atividade antifúngica com as nanopartículas de prata.

3.3.2 Ensaio antifúngico in vitro de nanopartículas de prata

Os meios de cultura, PDA e MEA, foram usados para testar a atividade antifúngica de nanopartículas de prata sintetizadas. Os meios foram preparados e autoclavados a 121 °C durante 15 minutos e deixados arrefecer. Quando os meios de cultura atingiram 50 °C, 5 ml de nanopartículas de prata coloidal nas concentrações 5, 50, 180, 270 e 540 µg mL⁻¹ foram adicionadas em placas de Petri de 90×15 mm e, em seguida, alíquotas de 20 mL do meio de cultura foram acrescentados nas placas. Movimentos circulares em forma de oito, (aproximadamente dez vezes consecutivas) foram empregados para favorecer a difusão das nanopartículas de prata no meio de cultura e conseqüentemente a homogeneização. Esses movimentos foram moderados, para evitar a projeção do líquido contra as paredes e a tampa da placa. As placas foram repousadas para a solidificação do meio de cultura juntamente com as nanopartículas de prata. As placas com os controles foram preparadas de modo semelhante com 5 ml de soluções de: H₂O, Na₃C₆H₅O₇ (0,3 mol L⁻¹) + NH₃ (1,4 mol L⁻¹) o controle negativo e anfotericina B (1 µg mL⁻¹, A-4888, Sigma-Aldrich) o controle positivo. O composto AgNO₃ (5,0×10⁻³ mol L⁻¹) também foi testado para avaliar o seu efeito antifúngico contra as estirpes do gênero *Aspergillus* e o fitopatógeno *Phomopsis* sp.

As placas foram inoculadas no centro com 10 µL da suspensão de esporos e incubadas a 25 °C no escuro, durante 7 dias. Contudo, as placas para os testes *in vitro* com *Phomopsis* sp. foram inoculadas no centro com um disco de ágar de 5 mm contendo esta estirpe, após esse procedimento as placas foram incubadas a 25 °C no escuro, durante 7 dias. Todos os experimentos foram realizados em triplicata com três repetições cada concentração de nanopartículas de prata coloidal e os respectivos controles. Os diâmetros das colônias dos fungos foram registrados diariamente. O diâmetro das colônias foi medido diariamente com uma régua ao longo de 7 dias. A média das 9 réplicas foi calculada e a representação gráfica

do diâmetro das colônias em função dos dias foi efetuada. A taxa de crescimento radial foi obtida por regressão linear utilizando os dados que correspondem à fase exponencial de crescimento e os gráficos foram confeccionados utilizando o programa informático Prism 6, GraphPad Software, Inc, San Diego, CA, USA (MOTULSKY e CHRISTOPOULOS, 2003).

3.3.3 Extração e quantificação das micotoxinas

Após o período de incubação de 7 dias, o conteúdo das placas foi cortado em pequenos pedaços (Figura 3.2) e transferidos para tubos Falcon de 50 mL. Em seguida, 30 mL de acetonitrila / metanol / ácido acético (78/20/2, v/v/v) foram adicionados e agitaram-se os tubos fortemente durante 1 min utilizando o equipamento *vórtex-mixer*. Logo após a agitação, os tubos foram deixados em repouso durante a noite (8 horas) para extrair as micotoxinas. Após as 8 horas de repouso, os sobrenadantes das amostras foram filtrados por filtros PP estéreis de seringa (Polipropileno, 0,45 µm, Merck). Desse modo, 2 mL do material filtrado foi colocado em um frasco de vidro borosilicato de cor âmbar, também chamados de *vials*. As amostras foram preservadas a -20 °C até a análise por HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) ou também conhecida como CLAE (µµµ).

As amostras foram analisadas por HPLC com detecção por fluorescência. Utilizou-se um cromatógrafo (HPLC) constituído por uma bomba Varian ProStar 210, um auto injetor Varian Prostar 410 e um detector de fluorescência Jasco FP-920. O instrumento e os dados cromatográficos foram geridos por uma interface de sistema de dados Varian 850-MIB e um sistema de dados de cromatografia Galaxie, respectivamente. A separação cromatográfica foi realizada a 35 °C em uma coluna analítica C₁₈ de fase reversa YMC-Pack ODS-AQ (250 × 4,6 mm I.D., 5 µm) protegida por uma pré-coluna com o mesmo enchimento e mesma fase estacionária, mantida a 35 °C.

Para analisar as aflatoxinas, foi preparada uma fase móvel constituída por H₂O/acetonitrila/metanol (3:1:1, v/v/v), em seguida essa mistura foi homogeneizada e filtrada sob vácuo utilizando um filtro de membrana de polipropileno hidrofílico com porosidade de 0,2 µm (GHP, Gelman), para reter pequenas partículas presentes na solução e desgaseificá-la. O fluxo da fase móvel foi de 1,0 mL min⁻¹, durante 30 minutos e foi selecionado o modo de eluição isocrático (SOARES et al., 2010). O volume de injeção foi de 50 µL. As aflatoxinas foram derivatizadas utilizando um reator fotoquímico de derivatização pós-coluna (unidade

PHRED - Aura Industries, EUA) e detectadas utilizando um comprimento de onda de excitação e emissão de 365 e 435 nm, respectivamente ($\lambda_{\text{ex}}= 365 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}}= 435 \text{ nm}$).

Para analisar OTA, foi preparada uma fase móvel constituída por acetonitrila/H₂O/ácido acético (99:99:2, v/v/v), essa mistura foi homogeneizada e filtrada sob vácuo utilizando um filtro de membrana de polipropileno hidrofílico com porosidade de 0,2 μm (GHP, Gelman), para reter pequenas partículas presentes na solução e desgaseificá-la. O fluxo da fase móvel utilizada foi de 0,8 mL min⁻¹, durante 20 minutos e foi selecionado o modo de eluição isocrático. O volume de injeção foi de 50 μL . A excitação e emissão dos comprimentos de onda foram ajustadas para 333 e 460 nm, respectivamente ($\lambda_{\text{ex}}= 333 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}}= 460 \text{ nm}$) (ABRUNHOSA et al., 2007).

Para analisar FB2, as amostras foram quimicamente derivatizadas com o-ftaldialdeído (OPA). Como as FB2s não absorvem a luz ultravioleta ou luz visível, e não são substâncias fluorescentes, elas requerem a sua derivação, através da adição de o-ftaldeído (OPA) (NDUBE et al., 2009). Resumidamente, 200 μL da amostra foram misturados com 200 μL de reagente OPA (Sigma-Aldrich) e após 2 minutos, 50 mL foram injetadas no sistema de HPLC. O fluxo da fase móvel utilizada foi de 1,0 mL min⁻¹, durante 20 minutos com modo de eluição isocrático. A fase móvel utilizada foi constituída por metanol/dihidrogenofosfato de sódio 0,1 M (77:23, v/v) e o pH ajustado para 3,35 com ácido fosfórico. Os comprimentos de onda de excitação e de emissão foram fixados a 335 e 440 nm, respectivamente, ($\lambda_{\text{ex}}= 335 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}}= 440 \text{ nm}$).

As micotoxinas foram identificadas por comparação do tempo de retenção dos picos das amostras com padrões (Sigma-Aldrich). Esses padrões foram utilizados para elaboração das curvas de calibração, que foram verificados regularmente. A quantificação foi realizada por medição da área dos picos e comparando-as com a respectiva curva de calibração. Os cálculos da área dos picos foram realizados no *software Galaxie (Galaxie Chromatography Data System)* de aquisição de dados do HPLC.

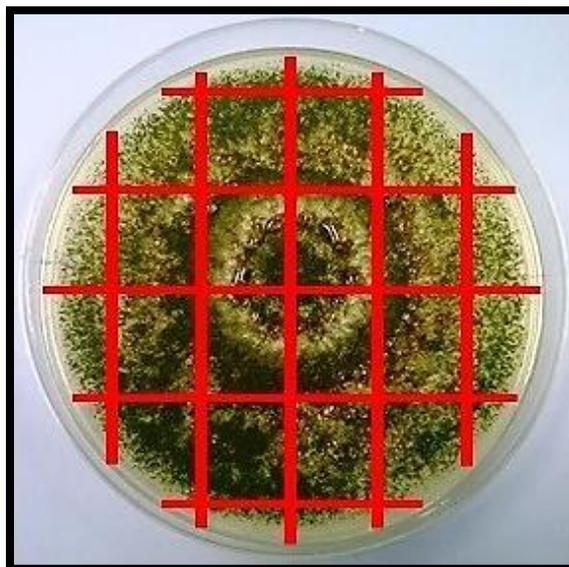


Figura 3.2 - Cortes no ágar da placa contendo material fúngico para posterior extração das micotoxinas produzidas pelas estirpes do gênero *Aspergillus*.

3.3.4 Preparação da curva de calibração

O procedimento utilizado para preparar a curvas de calibração envolveu, em primeiro lugar, preparar soluções com $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ (*stock-1*) a partir dos diferentes padrões comerciais de ocratoxina A (OTA, O1877, Sigma), aflatoxinas (AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2, respectivamente, A6636, A9887, A0138 e A0263, Sigma) e fumonisina B2 (FB2, F3771, Sigma) em 50 mL metanol. A partir deste *stock* e por diluição elaboraram-se soluções com $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ em metanol (*stock-2*). A partir destas prepararam-se, por diluições sucessivas, soluções padrão com 15, 10, 7,5, 5, 2,5, 1 e 0,05 ng OTA/mL; com 200, 100, 50, 10 e 1 ng AFLs/mL para a sensibilidade 10; com 10, 8, 4, 2 e 1 $\mu\text{g AFLs/mL}$ para a sensibilidade 1 (a partir do *stock-1*); e com 4, 2, 1 e 0,5 $\mu\text{g FB2/mL}$ (a partir do *stock-1*). Estas foram analisadas por HPLC em simultâneo com as amostras. Regularmente, novos padrões foram preparados e injectados de forma a verificar o seu ajuste à curva de calibração. O *stock-1* foi guardado a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ e o *stock-2* a $4 \text{ }^\circ\text{C}$, tendo a sua concentração regularmente verificada. Para calcular a regressão linear dos pontos e a concentração das micotoxinas a partir da área dos picos nos cromatogramas será usada a Equação 1:

$$y = bx + a \quad (1)$$

Onde y representa a área do pico em $\mu\text{Volts min}^{-1}$, x representa a concentração da micotoxina expressa em ng mL^{-1} ou $\mu\text{g mL}^{-1}$, b é o declive da reta e o a é a ordenada na origem. A curva foi associada ao *software* Galaxie (Galaxie Chromatography Data System) de aquisição de dados do HPLC, o que permitiu calcular de forma automática a concentração de micotoxina presente nas amostras analisadas.

3.3.5 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de nanopartículas de prata em *Aspergillus* spp. em microplaca

A concentração inibitória mínima (CIM) de nanopartículas de prata em fungos micotoxigênicos foi determinado através da adaptação do método de microdiluição em caldo descrito por Monteiro et al. (2012b). Resumidamente, uma solução *stock* estéril de resazurina sódica (R7017, Sigma-Aldrich) foi preparada por adição de 0,02 g de 100 ml de água destilada e por filtração utilizando um filtro de seringa estéril de 0,2 μm . A resazurina sódica possui coloração azul que é oxidada na presença de micro-organismos, ocorrendo mudança para a coloração rosa, facilitando assim a verificação da presença do crescimento fúngico (PALOMINO et al., 2002). Desta forma, foi possível determinar a CIM de nanopartículas de prata capaz de inibir o crescimento das estirpes de *Aspergillus* avaliadas. Uma solução estoque com a suspensão de esporos também foi preparada como descrito anteriormente. MEA meio líquido (2% de extracto de malte, 2% de glucose e 0,1% de peptona) foi preparada em Tris 0,1 M-HCl (pH 7) e o seu pH ajustado para 7, antes de ser autoclavada a 121 ° C durante 15 min. O ensaio foi realizado pelo preenchimento (por cavidade) da placa de 96 poços: 10 μL de diferentes concentrações de nanopartículas de prata ou respectivos controles; 150 μL de MEA adicionado a suspensão de esporos ($2,5 \times 10^6$ esporos mL^{-1}) e resazurina (para atingir 0,002%, w/v). Na microplaca cada poço da coluna foi preenchido da esquerda para direita com os seguintes compostos (Figura 3.3): (1) meio de cultura sem inóculo, (2) meio de cultura + resazurina sem inóculo, (3) controle H_2O , (4) controle negativo ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ 0,3 mol L^{-1} + NH_3 1,4 mol L^{-1}), (5) controle positivo (fungicida anfotericina B 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, A-4888, Sigma-Aldrich), (6) AgNO_3 ($5,0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1}), (7) AgNPs 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, (8) AgNPs 3 $\mu\text{g mL}^{-1}$, (9) AgNPs 6,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$, (10) AgNPs 12,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, (11) AgNPs 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e (12) AgNPs 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Foram confeccionadas placas individuais com cada estirpe do fungo para avaliar a CIM das nanopartículas de prata (*Aspergillus parasiticus* MUM 92.02, *Aspergillus flavus*

08MAsp567, *Aspergillus flavus* 08MAsp201, *Aspergillus carbonarius* 01UAs293 e *Aspergillus niger* 01UAs248). Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Todas as placas foram incubadas a 30 °C, e os resultados foram lidos espectrofotometricamente (620 nm), após 24, 48 e 72 horas de incubação. Para determinar o crescimento fúngico, a densidade óptica (OD) foi medida utilizando um leitor de microplacas ELISA (Synergy HT, Biotech, EUA) no comprimento de onda de 600 nm e os dados foram analisados no *software* Gen5™ 2.01. Também foi calculada a concentração de nanopartículas de prata capaz de inibir 50% (IC₅₀) do crescimento fúngico na microplaca de 96 poços. O IC₅₀ foi determinado por ajuste dos dados experimentais à equação de Hill (função sigmoideal) utilizando o programa informático Prism 6, GraphPad *Software*, Inc, San Diego, CA, USA (MOTULSKY e CHRISTOPOULOS, 2003).

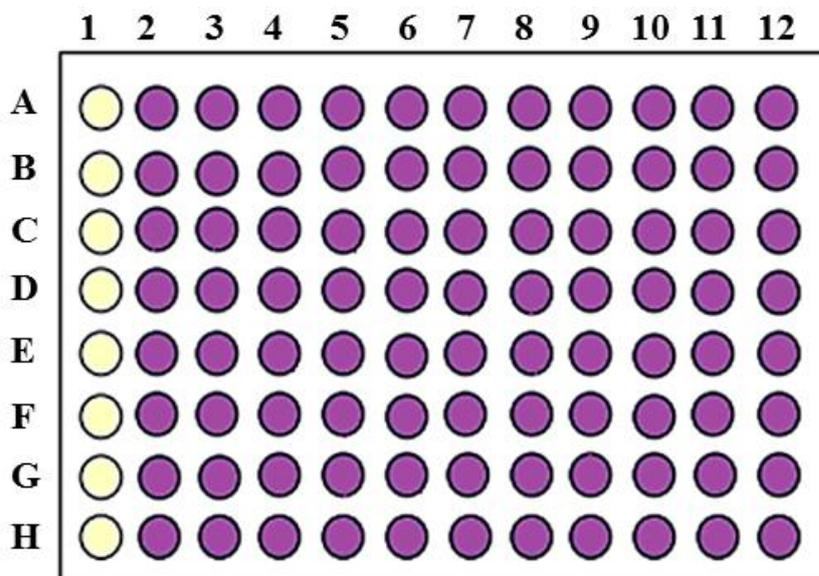


Figura 3.3 - Microplaca usada para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de nanopartículas de prata. (1) meio de cultura sem inóculo, (2) meio de cultura + resazurina sem inóculo, (3) controle H₂O, (4) controle negativo (Na₃C₆H₅O₇ 0,3 mol L⁻¹ + NH₃ 1,4 mol L⁻¹), (5) controle positivo (fungicida anfotericina B 1 µg mL⁻¹), (6) AgNO₃ (5,0×10⁻³ mol L⁻¹), (7) AgNPs 1 µg mL⁻¹, (8) AgNPs 3 µg mL⁻¹, (9) AgNPs 6,25 µg mL⁻¹, (10) AgNPs 12,5 µg mL⁻¹, (11) AgNPs 25 µg mL⁻¹ e (12) AgNPs 50 µg mL⁻¹.

3.3.6 Procedimentos de segurança

As micotoxinas, fumonisina (IARC, 2002), ocratoxina (FREIRE et al., 2007) e aflatoxinas (LIN et al., 2006; TONG et al., 2006) são agentes cancerígenos, podendo também causar doenças que afetam órgãos e tecidos, induzindo várias patologias, tais como Síndrome de Reye, hepatocarcinoma, necrose aguda, cirrose e encefalopatia (HOCKING, 2006; SCHMIDT; RODRICK, 2003). Portanto, devem ser tomadas as devidas precauções com o manuseio e descarte de material contendo micotoxinas. Neste trabalho os descartes laboratoriais dos materiais contaminados com as micotoxinas (fumonisina, ocratoxina e aflatoxinas) foram submetidos a um processo de descontaminação por desativação das micotoxinas com solução de hipoclorito de sódio. Para tal procedeu-se à oxidação das micotoxinas com solução hipoclorito de sódio com pelo menos 5% de cloro, durante 24 h (CASTEGNARO et al., 1991; SERRA, 2005).

Os fungos utilizados neste trabalho não apresentam grande patogenicidade em humanos. No entanto, devido à formação de esporos foi necessária atenção redobrada para que não houvesse contaminações cruzadas nem contaminação dos materiais do laboratório (RODRIGUES et al., 2003a).

Os solventes orgânicos foram manipulados na capela de modo a evitar a exposição aos seus vapores (RODRIGUES et al., 2003b).

Os resíduos de produtos químicos foram seletivamente acondicionados em recipientes devidamente rotulados com o tipo de resíduo e código LER correspondente, sendo posteriormente encaminhados para processamento por empresas credenciadas.

Os resíduos biológicos foram devidamente autoclavados antes de serem encaminhados para o descarte de resíduos (MATOS et al., 2006).

3.3.7 Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas, *a posteriori*, pelo teste de Ducan utilizando o programa informático SPSS (*Statistic Package for Social Sciences* versão 19.0 para *Windows*), com um nível de significância de 5% (para $P < 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1 Síntese, caracterização e estabilização das nanopartículas de prata

O método de síntese de nanopartículas de prata utilizado nesse trabalho foi o Método de Turkevich, também conhecido como Método Citrato, proposto originalmente por Turkevich; Stevenson; Hillier (1951). Esse método, já foi bem estabelecido e nele os íons de prata são reduzidos pelo citrato, em meio aquoso, que também atua como agente estabilizante da reação (GORUP, 2010).

Um indício da formação de nanopartículas de prata foi à alteração da coloração do coloide para amarelo âmbar e que foi utilizada como parâmetro de referência da ocorrência da reação. Essa coloração amarela foi observada após 4 minutos da adição do agente redutor, indicando a formação de nanopartículas de prata (Figura 4.1).



Figura 4.1 - Solução coloidal de nanopartículas de prata com tonalidade amarela âmbar, que é um dos indicativos da formação destas nanopartículas.

Essa mudança para a coloração amarela é o resultado da absorção do comprimento de onda em torno de 430 nm (Figura 4.2), característico de nanopartículas de prata coloidal, chamada de banda *plasmon* de absorção (GORUP et al., 2011). A utilização do UV-vis confirmou a formação das nanopartículas de prata e através dessa metodologia foi possível avaliar qualitativamente o rendimento da reação por meio da intensidade de absorção. Desse modo, o espectro de absorção óptico das nanopartículas de prata dominados por ressonância de superfície de *plasmon*, decorrentes de seus tamanhos, move-se para comprimentos de onda mais longos com o aumento do tamanho das partículas. A posição e a forma do *plasmon* ressonante são fortemente dependentes do meio dielétrico das nanopartículas e das espécies adsorvidas na superfície. Segundo a teoria de Mie (1908) apenas uma única banda de *plasmon* é esperada no espectro de absorção de nanopartículas esféricas enquanto partículas anisotrópicas podem dar origem a duas ou mais faixas de *plasmon* dependendo das formas diferentes das nanopartículas (KLABUNDE, 2001). Desse modo, de acordo com essa teoria as partículas de prata com tamanho menor que 40 nm de diâmetro, mostrarão um pico acentuado localizado na faixa entre 380 a 420 nm. Este pico é o resultado de uma combinação de absorção e espalhamento de luz devido às interações com o campo de *plasmon* (BREGGIN et al, 2009).

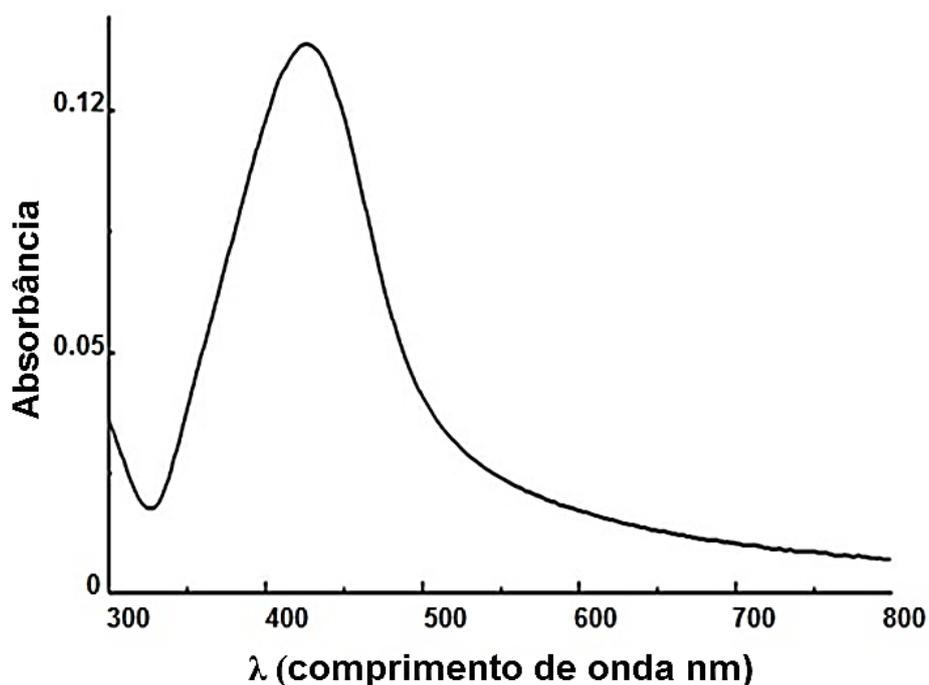


Figura 4.2 - Gráfico de absorbância versus comprimento de onda do coloide obtido a partir da reação de redução da prata pelo citrato de sódio na temperatura de 90°C. O gráfico mostra a banda *plasmon* de absorção (430 nm) característica de nanopartículas de prata.

Além disso, a reação de formação dos coloides foi interrompida após o aparecimento da cor amarela âmbar e a estabilização das nanopartículas em meio aquoso ocorreu por meio da adição de solução amoniacal, a fim de evitar a agregação. Para a compreensão mais detalhada dos processos que envolvem o efeito moderador da amônia na cinética de reação das nanopartículas de prata, foi utilizado um modelo descrito por Gorup (2010) que se assemelha ao modelo proposto por LaMer e Dinegar. A vantagem do modelo utilizado neste trabalho foi a de proporcionar um melhor entendimento do efeito da amônia sobre a extinção da supersaturação, que representa a etapa inicial do processo de formação e crescimento das partículas (GORUP, 2010). Na Figura 4.3 está ilustrado a primeira fase da transformação de fase, que é idêntica ao modelo LaMer e Dinegar (LAMER; DINEGAR, 1950). Para o modelo de LaMer e Dinegar os núcleos crescem de modo uniforme através da difusão de solutos da solução para a sua superfície, até que as condições de equilíbrio sejam atingida. No modelo proposto por Gorup, construído com base nos resultados da síntese de nanopartículas de prata e estabilização com amônia, observa-se que a condição de equilíbrio é atingida abruptamente. Isso ocorre devido à adição de amônia no coloide, essa amônia coordena com os íons em solução impedindo que eles sejam reduzidos e assim impedindo a formação da saturação. Isso impede os processos de nucleação e crescimento, permitindo que o coloide seja armazenado sem que haja alteração no número de partículas ou tamanho de partícula (GORUP et al., 2011).

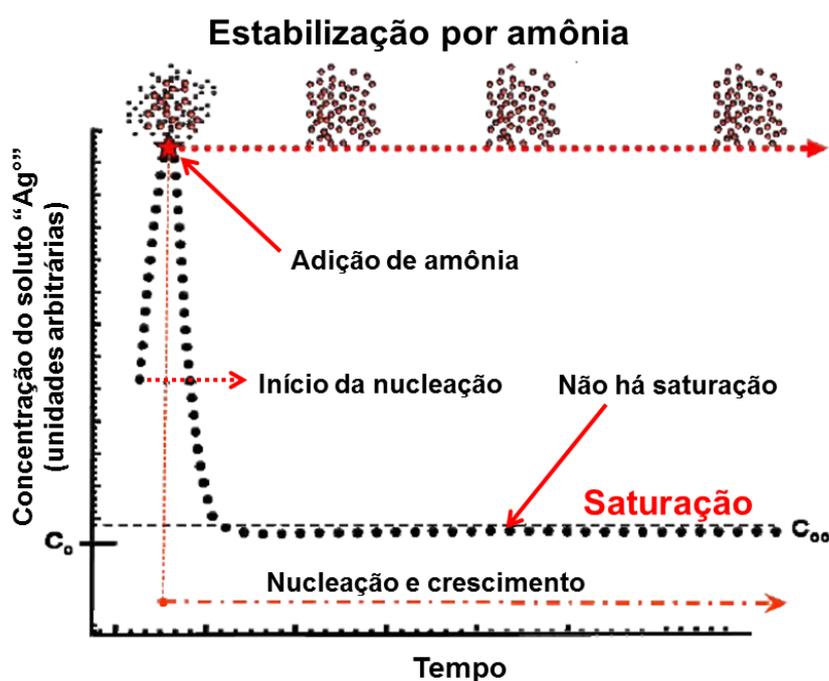


Figura 4.3 - Modelo de estabilização por amônia utilizado no trabalho. O modelo é semelhante ao proposto por LaMer e Dinegar para crescimento de partículas monodispersas. Adaptada de Gorup et al., (2011).

Através da análise de dados do espalhamento de luz dinâmico (DLS) foi confirmado o tamanho médio de aproximadamente 52 nm das nanopartículas sintetizadas e um índice de polidispersividade (PDI) de 0,093, esse valor obtido indicou uma ótima qualidade das nanopartículas de prata, mostrando que o material analisado possui boa homogeneidade e baixa dispersividade no tamanho (Figura 4.4). Segundo Nidhin et al. (2008) um valor de PDI de 0,01 indica a formação de partículas monodispersas, ou seja, que as partículas do coloide são aproximadamente do mesmo tamanho. Valores de até 0,5-0,7 são aceitáveis para partículas monodispersas, amostras com distribuição muito ampla de tamanho têm valores de $PDI > 0,7$, indicando a formação de partículas com tamanhos diferentes (polidispersas).

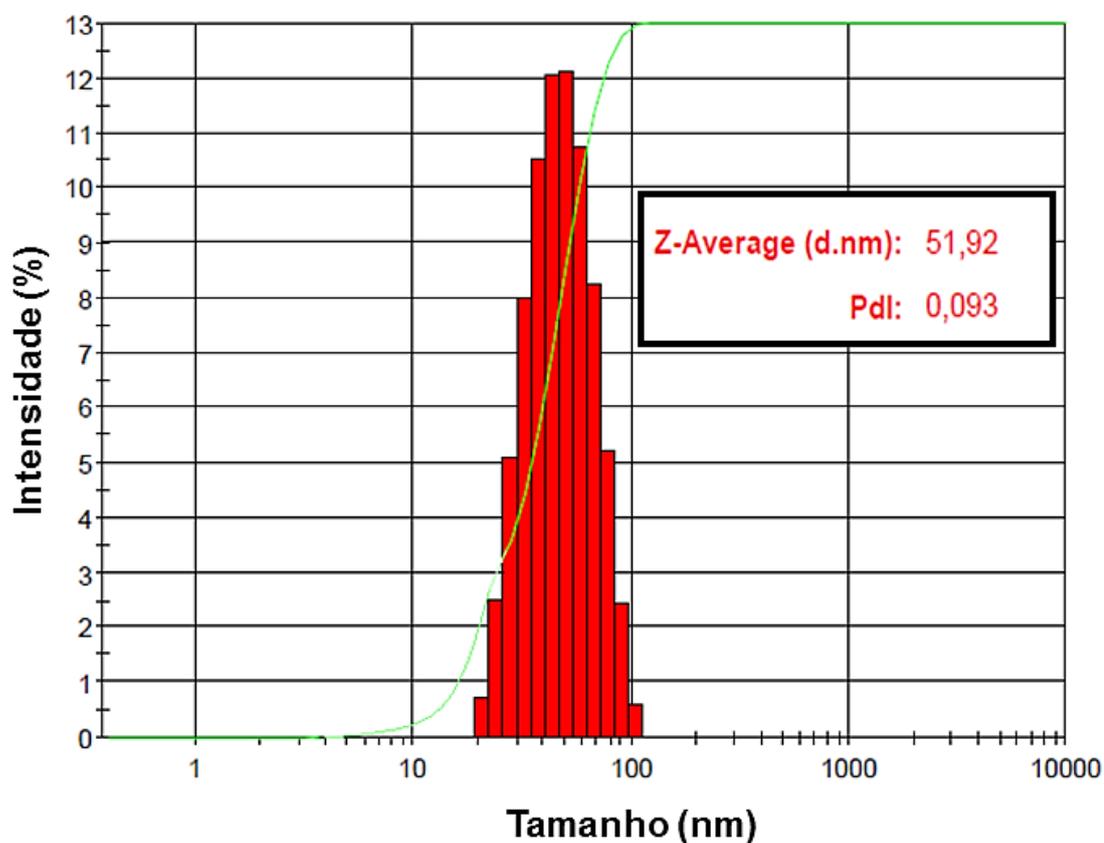


Figura 4.4 - Gráfico obtido pela técnica DLS para distribuição de tamanho de partículas, através da intensidade de espalhamento em função do diâmetro.

As imagens de MEV-FEG confirmaram a forma esférica, regular e homogênea das partículas (Figura 4.5). As nanopartículas de prata são evidenciadas por pontos ou áreas mais claras e brilhantes nas imagens de MEV-FEG. Através das respectivas imagens, é possível verificar a distribuição e o formato dessas nanopartículas. Estudos realizados por Monteiro et al. (2012a) evidenciaram que a banda *plasmon* de absorção em torno 430 nm geralmente atribui-se as nanopartículas que têm um formato esférico ou esferoidal.

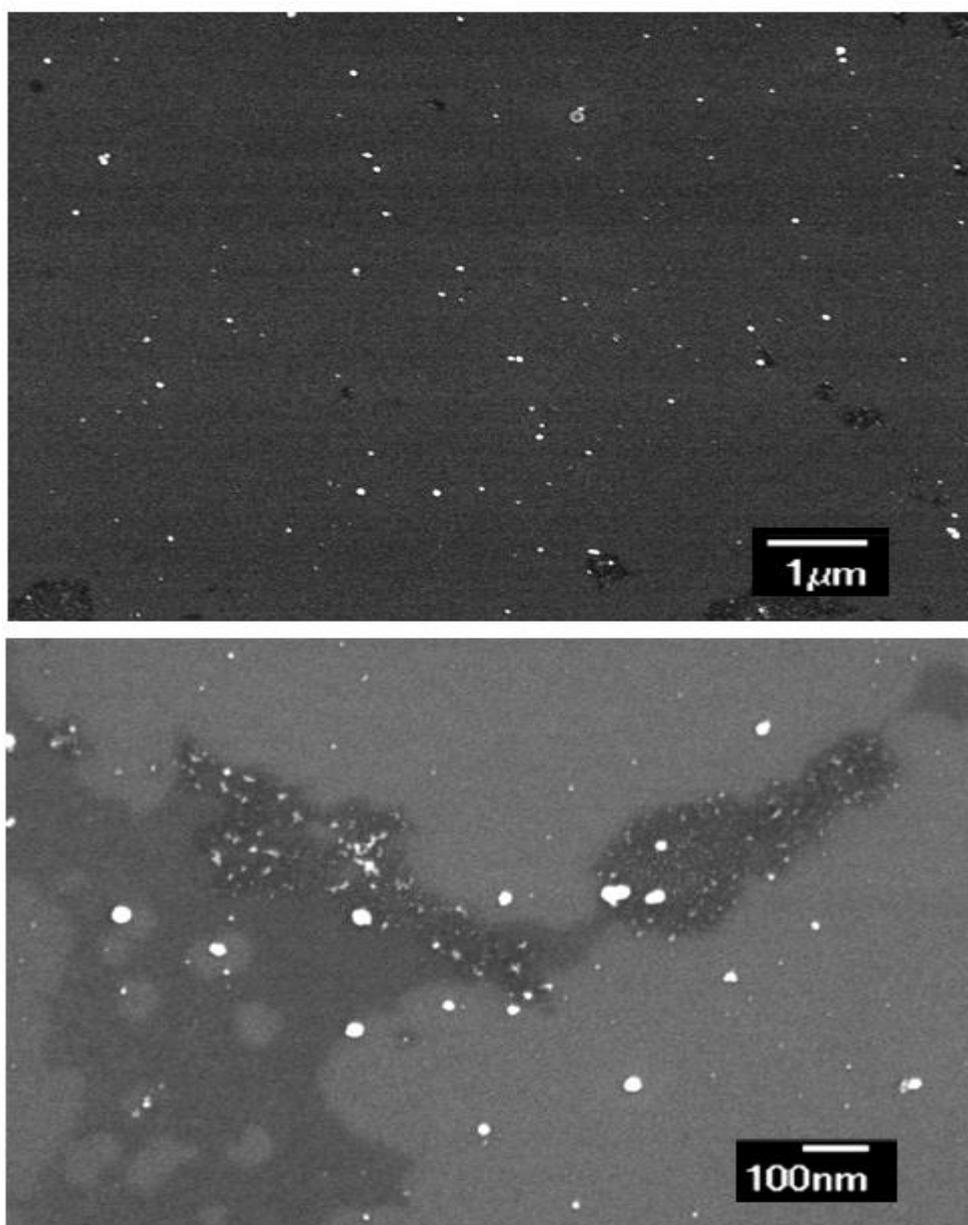


Figura 4.5 - Imagens de MEV-FEG sintetizadas via redução dos íons prata do nitrato de prata pelo citrato. As nanopartículas de prata foram depositadas sobre o substrato de silício e após a secagem foram obtidas as imagens.

4.2 Atividade biológica de nanopartículas de prata com potencial antifúngico

4.2.1 Inibição do crescimento radial de *Aspergillus parasiticus* MUM 92.02 em placa de Petri

Os resultados das taxas de crescimento radial das colônias de *Aspergillus parasiticus* MUM 92.02 testadas com diferentes concentrações de nanopartículas de prata e crescidas em meio PDA estão apresentadas na Tabela 4.1. Essas taxas foram comparadas com os respectivos controles utilizando o teste de Duncan ($P < 0,05$) de forma a determinar reduções significativas do crescimento.

Tabela 4.1 - Taxa de crescimento radial de *Aspergillus parasiticus* MUM 92.02 crescido em meio PDA suplementado com 5, 50, 180, 270 e 540 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de nanopartículas de prata

Compostos	Taxa de crescimento radial (cm/dia)
Controle H ₂ O	1,24±0,007 ^a
Controle negativo	1,23±0,006 ^a
Controle positivo	1,03±0,012 ^b
AgNO ₃	0,00±0,000 ^d
AgNPs 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$	1,10±0,008 ^c
AgNPs 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,00±0,000 ^d
AgNPs 180 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,00±0,000 ^d
AgNPs 270 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,00±0,000 ^d
AgNPs 540 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,00±0,000 ^d

Os valores apresentados são a média de nove réplicas \pm desvio padrão. Na coluna, letras diferentes correspondem a valores significativamente diferentes entre si para $P < 0,05$ segundo o teste de Duncan.

Os resultados apresentados neste estudo confirmaram que as nanopartículas de prata têm efeitos inibitórios significativos, atividade antifúngica e fungicida na formação de colônias de *Aspergillus parasiticus* MUM 92.02. Verificou-se que a concentração 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$

de nanopartículas de prata inibiu significativamente a taxa de crescimento radial do fungo testado. O *Aspergillus parasiticus* MUM 92.02 é sensível a concentração $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ e teve o seu diâmetro de colônia reduzido de 8,57 cm para 7,45 cm, quando comparado ao controle H_2O .

No tratamento controle positivo, com o fungicida anfotericina B, também foi observado uma inibição significativa do crescimento da colônia do fungo micotoxigênico avaliado. O crescimento do *Aspergillus parasiticus* MUM 92.02 não foi significativamente afetado nos tratamentos controle H_2O e controle negativo ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ e NH_3 $1,4 \text{ mol L}^{-1}$), não sendo observada inibição da taxa de crescimento radial. Além disso, os resultados mostraram que não houve diferença estatisticamente significativa do crescimento entre as médias do controle H_2O e controle negativo, obtidas após 7 dias de incubação.

O fungo *Aspergillus parasiticus* MUM 92.02 é sensível as nanopartículas de prata e verificou-se com os resultados que ocorreu inibição total do crescimento fúngico nas concentrações 50, 180, 270 e $540 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Em termos percentuais, a concentração $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ reduziu a taxa de crescimento radial do *Aspergillus parasiticus* MUM 92.02 em 17%, comparada relativamente ao controle H_2O . As nanopartículas de prata nas concentrações 50, 180, 270 e $540 \mu\text{g mL}^{-1}$ inibiram em 100% a taxa de crescimento radial do fungo micotoxigênico *Aspergillus parasiticus* MUM 92.02. Quanto ao controle positivo, foi observada uma inibição do crescimento desta estirpe em 24%.

Os percentuais de inibição da taxa de crescimento de todos os tratamentos avaliados neste trabalho estão apresentados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2- Inibição da taxa de crescimento radial de *Aspergillus parasiticus* MUM 92.02 relativamente ao controle H₂O

Compostos	Inibição da taxa de crescimento radial (%)
Controle negativo	-
Controle positivo	24
AgNO₃	100
AgNPs 5 µg mL⁻¹	17
AgNPs 50 µg mL⁻¹	100
AgNPs 180 µg mL⁻¹	100
AgNPs 270 µg mL⁻¹	100
AgNPs 540 µg mL⁻¹	100

- sem inibição significativa do crescimento

As medições diárias dos diâmetros das colônias do *Aspergillus parasiticus* MUM 92.02 referentes a estes ensaios podem ser consultadas na Tabela 4.3 e na Figura 4.6. Neste estudo, utilizou-se o teste de Duncan ($P < 0,05$) para verificar as diferenças significativas entre os dados obtidos. Este teste permitiu comparar as diferentes taxas de crescimento não apenas com os respectivos controles, mas também entre si, possibilitando assim, verificar se existiam diferenças significativas entre as 5 concentrações de nanopartículas utilizadas.

Tabela 4.3 - Diâmetro (cm) das colônias de *Aspergillus parasiticus* MUM 92.02 medido durante 7 dias inoculado em diferentes concentrações de nanopartículas de prata a 25 °C no escuro e, respectivas taxas de crescimento radial (TCR)

Composto		Dias							TCR (cm/dia)	R ^{2***}
		1	2	3	4	5	6	7		
Controle H ₂ O	Média*	0,28	2,13	3,27	5,67	6,52	7,39	8,57 ^a	1,24	0,9922
	SD**	0,041	0,082	0,052	0,151	0,172	0,065	0,052		
Controle negativo	Média	0,23	2,08	3,20	5,65	6,45	7,32	8,55 ^a	1,23	0,9910
	SD	0,052	0,075	0,063	0,187	0,055	0,050	0,084		
Controle positivo	Média	0,00	1,43	2,98	4,03	5,33	6,42	7,32 ^b	1,03	0,9939
	SD	0,000	0,103	0,041	0,103	0,052	0,223	0,050		
AgNO ₃	Média	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ^d	0,00	0,0000
	SD	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		
AgNPs 5 µg mL ⁻¹	Média	0,00	2,08	3,12	4,00	5,35	6,47	7,45 ^c	1,10	0,9843
	SD	0,000	0,075	0,098	0,000	0,084	0,175	0,187		
AgNPs 50 µg mL ⁻¹	Média	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ^d	0,00	0,0000
	SD	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		
AgNPs 180 µg mL ⁻¹	Média	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ^d	0,00	0,0000
	SD	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		
AgNPs 270 µg mL ⁻¹	Média	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ^d	0,00	0,0000
	SD	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		
AgNPs 540 µg mL ⁻¹	Média	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ^d	0,00	0,0000
	SD	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		

Na coluna, letras diferentes correspondem a valores significativamente diferentes entre si para P<0,05 segundo o teste de Duncan.

* Os valores apresentados são as médias dos diâmetros de nove réplicas.

** Os valores apresentados são os desvios padrões das médias dos diâmetros de nove réplicas.

***Os valores apresentados são os coeficientes de determinação.

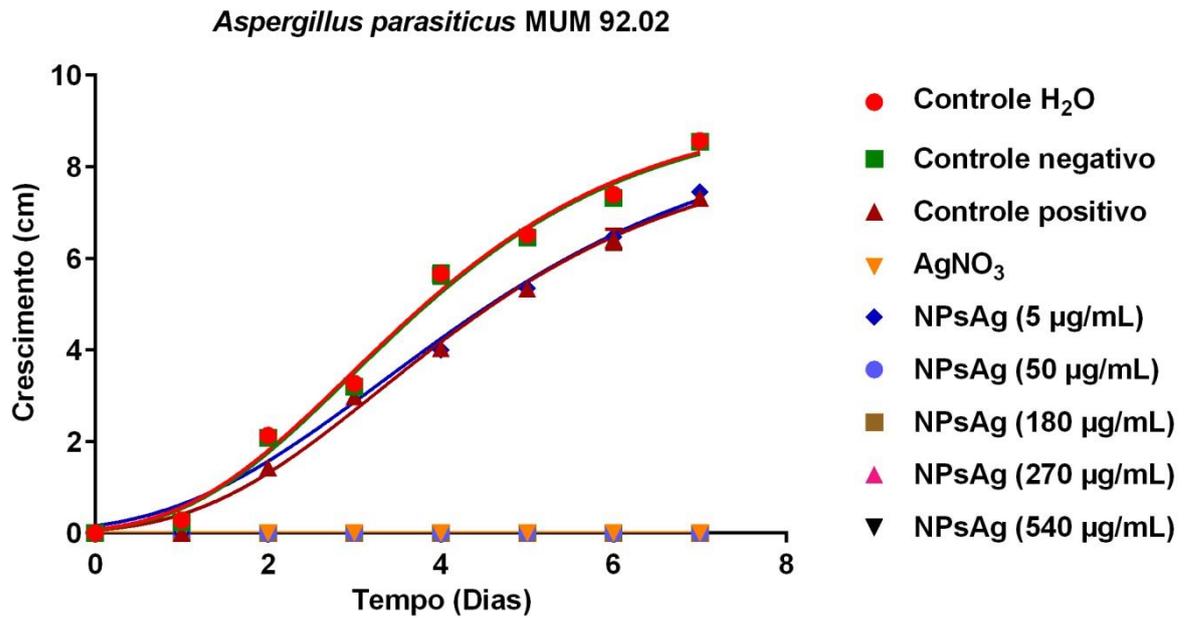


Figura 4.6 - Crescimento das colônias de *Aspergillus parasiticus* MUM 92.02 medido ao longo de 7 dias inoculado em diferentes concentrações de nanopartículas de prata a 25 °C no escuro.

O resultado apresentado na Figura 4.7 mostra a inibição do crescimento do *Aspergillus parasiticus* MUM 92.02 na presença de AgNO₃, porém este tratamento ocasionou oxidação do meio de cultura, impedindo assim o desenvolvimento da colônia do fungo.



Figura 4.7 - Inibição do crescimento de *Aspergillus parasiticus* MUM 92.02 na presença de AgNO₃.

Os resultados apresentados na Figura 4.8 e Figura 4.9 mostram a inibição do crescimento do *Aspergillus parasiticus* MUM 92.02 na presença de nanopartículas de prata e dos controles, confirmando a atividade antifúngica de nanopartículas de prata.

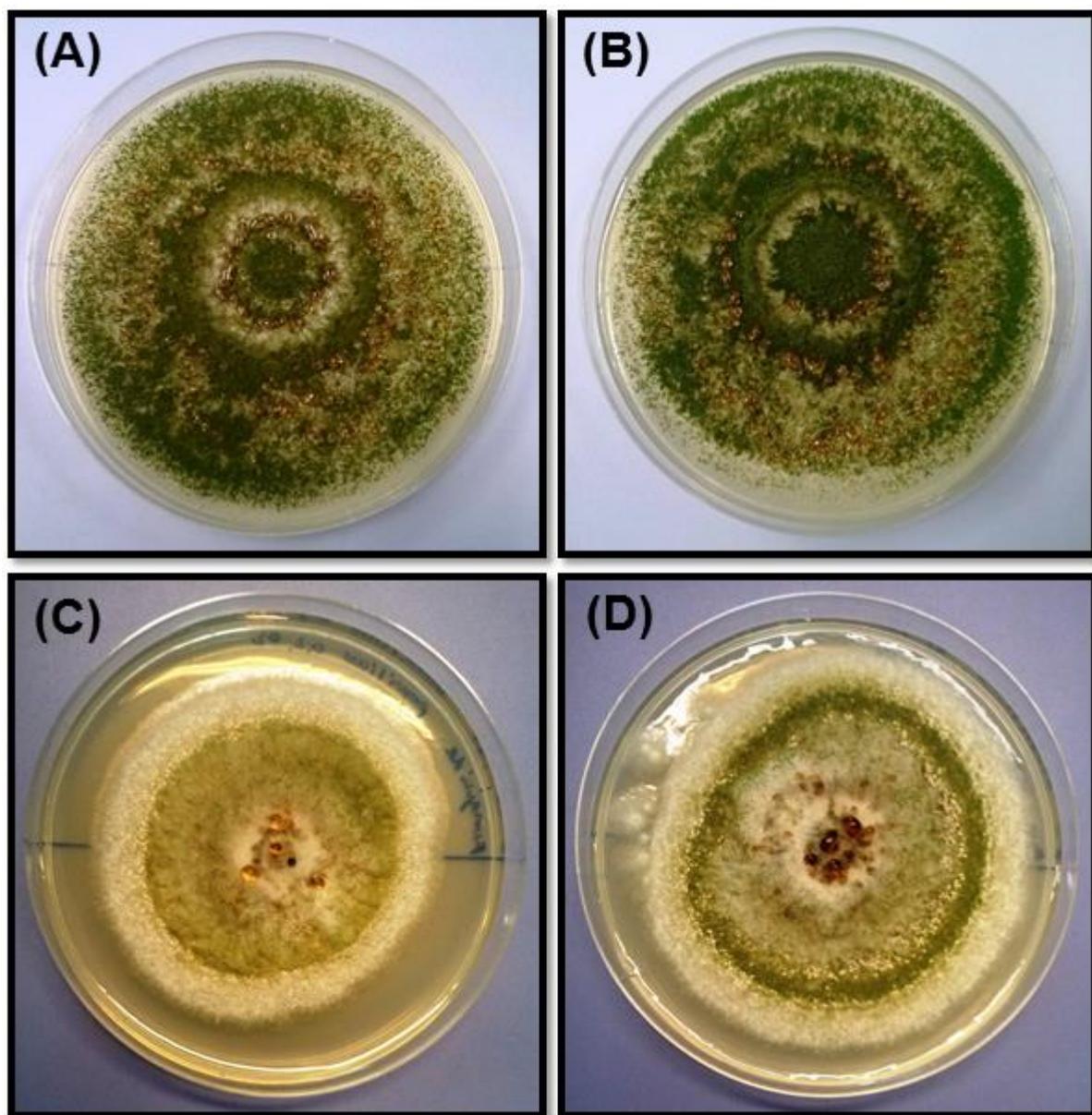


Figura 4.8 - Efeito das nanopartículas de prata e respectivos controles no crescimento do *Aspergillus parasiticus* MUM 92.02 testados após 7 dias a 25 °C no escuro. (A) Controle H₂O, (B) Controle negativo (Na₃C₆H₅O₇ 0,3 mol L⁻¹ e NH₃ 1,4 mol L⁻¹), (C) Controle positivo (fungicida anfotericina B) e (D) Concentração 5 µg mL⁻¹ de nanopartículas de prata.

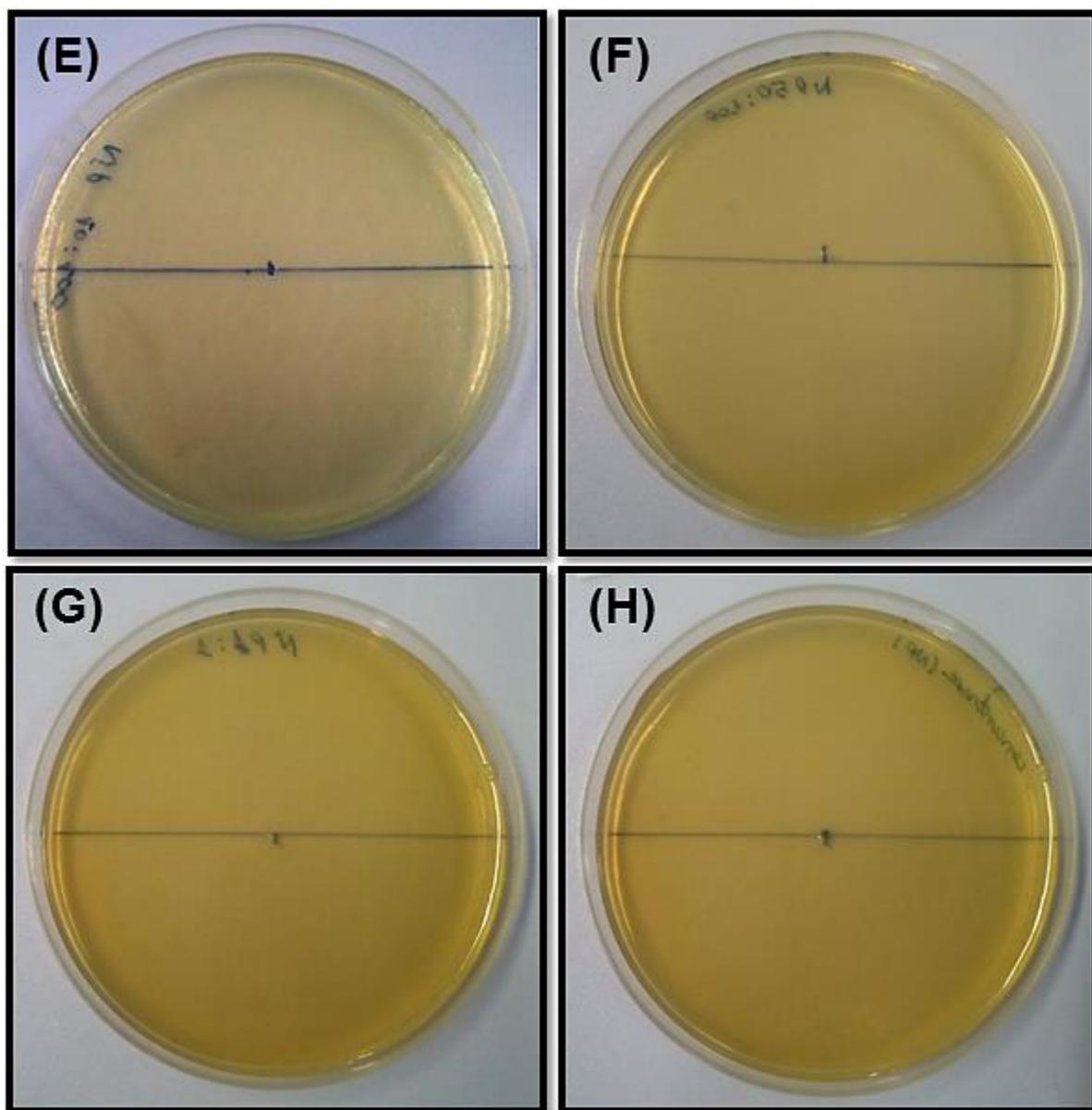


Figura 4.9 - Efeito das nanopartículas de prata no crescimento do *Aspergillus parasiticus* MUM 92.02 testado após 7 dias a 25 °C no escuro. **(E)** Concentração 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, **(F)** Concentração 180 $\mu\text{g mL}^{-1}$, **(G)** Concentração 270 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e **(H)** Concentração 540 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

4.2.2 Inibição do crescimento radial de *Aspergillus flavus* 08MAsp567 em placa de Petri

Os resultados do efeito das concentrações de nanopartículas de prata sobre o crescimento radial das colônias de *Aspergillus flavus* 08MAsp567 crescidas em meio PDA estão apresentados na Tabela 4.4. As taxas de crescimento radial das colônias foram

comparadas com os respectivos controles utilizando o teste de Duncan ($P < 0,05$) de forma a determinar reduções ou inibições significativas do crescimento.

Tabela 4.4 - Taxa de crescimento radial de *Aspergillus flavus* 08MAsp567 crescido em meio PDA suplementado com 5, 50, 180, 270 e 540 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de nanopartículas de prata

Compostos	Taxa de crescimento radial (cm/dia)
Controle H ₂ O	1,04±0,012 ^a
Controle negativo	1,05±0,011 ^a
Controle positivo	1,04±0,015 ^a
AgNO ₃	0,00±0,000 ^b
AgNPs 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$	1,01±0,008 ^a
AgNPs 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,00±0,000 ^b
AgNPs 180 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,00±0,000 ^b
AgNPs 270 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,00±0,000 ^b
AgNPs 540 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,00±0,000 ^b

Os valores apresentados são a média de nove réplicas \pm desvio padrão. Na coluna, letras diferentes correspondem a valores significativamente diferentes entre si para $P < 0,05$ segundo o teste de Duncan.

A análise da evolução do crescimento micelial de *Aspergillus flavus* 08MAsp567 em contato com as diferentes concentrações de nanopartículas de prata demonstra que, após o sétimo dia de avaliação, houve o efeito direto das concentrações de nanopartículas de prata na evolução do crescimento micelial das colônias. Estes dados sugerem que, quanto maior a concentração de nanopartículas de prata, maior será a inibição do crescimento micelial, ocorrendo inibição total do crescimento e desenvolvimento fúngico. Desse modo, os resultados apresentados neste estudo confirmaram que as nanopartículas de prata têm efeitos inibitórios significativos e atividade antifúngica no crescimento de colônias de *Aspergillus flavus* 08MAsp567, com concentração maiores que 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Observou-se que a concentração 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de nanopartículas de prata não inibiu significativamente a taxa de crescimento radial do fungo testado. O *Aspergillus flavus* 08MAsp567 demonstrou resistência e não foi sensível a concentração 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O crescimento do *Aspergillus flavus* 08MAsp567 também não foi significativamente afetado nos tratamentos controle H₂O e controle negativo

($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ e NH_3 $1,4 \text{ mol L}^{-1}$), não sendo observada inibição da taxa de crescimento radial. Além disso, os resultados mostraram que não houve diferença estatisticamente significativa do crescimento entre as médias do controle H_2O , controle negativo quando comparados com a concentração $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de nanopartículas de prata, obtidas após 7 dias de incubação.

Contudo, no tratamento controle positivo, com o fungicida anfotericina B, também não foi observado uma inibição significativa do crescimento da colônia do fungo micotoxigênico avaliado.

As concentrações $50, 180, 270$ e $540 \mu\text{g mL}^{-1}$ de nanopartículas de prata apresentaram atividade fungicida contra o fungo *Aspergillus flavus* 08MAsp567 e verificou-se com os resultados que ocorreu inibição total do crescimento fúngico.

Em termos percentuais, as nanopartículas de prata nas concentrações $50, 180, 270$ e $540 \mu\text{g mL}^{-1}$ inibiram em 100% a taxa de crescimento radial do fungo *Aspergillus flavus* 08MAsp567. Os percentuais de inibição da taxa de crescimento de todos os tratamentos avaliados neste trabalho estão apresentados na Tabela 4.5.

Tabela 4.5 - Inibição da taxa de crescimento radial de *Aspergillus flavus* 08MAsp567 relativamente ao controle H_2O

Compostos	Inibição da taxa de crescimento radial (%)
Controle negativo	-
Controle positivo	-
AgNO_3	100
$\text{AgNPs } 5 \mu\text{g mL}^{-1}$	-
$\text{AgNPs } 50 \mu\text{g mL}^{-1}$	100
$\text{AgNPs } 180 \mu\text{g mL}^{-1}$	100
$\text{AgNPs } 270 \mu\text{g mL}^{-1}$	100
$\text{AgNPs } 540 \mu\text{g mL}^{-1}$	100

- sem inibição significativa do crescimento

As medições diárias dos diâmetros das colônias do *Aspergillus flavus* 08MAsp567 referentes aos ensaios antifúngicos de nanopartículas de prata podem ser consultadas na Tabela 4.6 e na Figura 4.10. Neste estudo, utilizou-se o teste de Duncan ($P < 0,05$) para verificar

as diferenças significativas entre os dados obtidos. Este teste permitiu comparar as diferentes taxas de crescimento não apenas com os respectivos controles, mas também entre si, possibilitando assim, verificar se existiam diferenças significativas entre as 5 concentrações de nanopartículas utilizadas.

Tabela 4.6 - Diâmetro (cm) das colônias de *Aspergillus flavus* 08MAsp567 medido durante 7 dias inoculado em diferentes concentrações de nanopartículas de prata a 25 °C no escuro e, respectivas taxas de crescimento radial (TCR)

Composto		Dias							TCR (cm/dia)	R ^{2***}
		1	2	3	4	5	6	7		
Controle H ₂ O	Média*	0,31	2,12	3,16	4,06	5,41	6,32	7,30 ^a	1,04	0,9897
	SD**	0,000	0,078	0,097	0,113	0,159	0,118	0,139		
Controle negativo	Média	0,32	2,07	3,08	4,06	5,49	6,41	7,30 ^a	1,05	0,9899
	SD	0,000	0,067	0,053	0,113	0,100	0,156	0,207		
Controle positivo	Média	0,32	2,16	3,14	4,07	5,42	6,36	7,22 ^a	1,04	0,9917
	SD	0,000	0,067	0,071	0,083	0,159	0,163	0,154		
AgNO ₃	Média	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ^b	0,00	0,0000
	SD	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		
AgNPs 5 µg mL ⁻¹	Média	0,00	1,93	2,94	3,97	5,06	6,20	7,30 ^a	1,01	0,9860
	SD	0,000	0,000	0,100	0,088	0,100	0,073	0,071		
AgNPs 50 µg mL ⁻¹	Média	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ^b	0,00	0,0000
	SD	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		
AgNPs 180 µg mL ⁻¹	Média	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ^b	0,00	0,0000
	SD	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		
AgNPs 270 µg mL ⁻¹	Média	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ^b	0,00	0,0000
	SD	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		
AgNPs 540 µg mL ⁻¹	Média	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ^b	0,00	0,0000
	SD	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		

Na coluna, letras diferentes correspondem a valores significativamente diferentes entre si para P<0,05 segundo o teste de Duncan.

* Os valores apresentados são as médias dos diâmetros de nove réplicas.

** Os valores apresentados são os desvios padrões das médias dos diâmetros de nove réplicas.

***Os valores apresentados são os coeficientes de determinação.

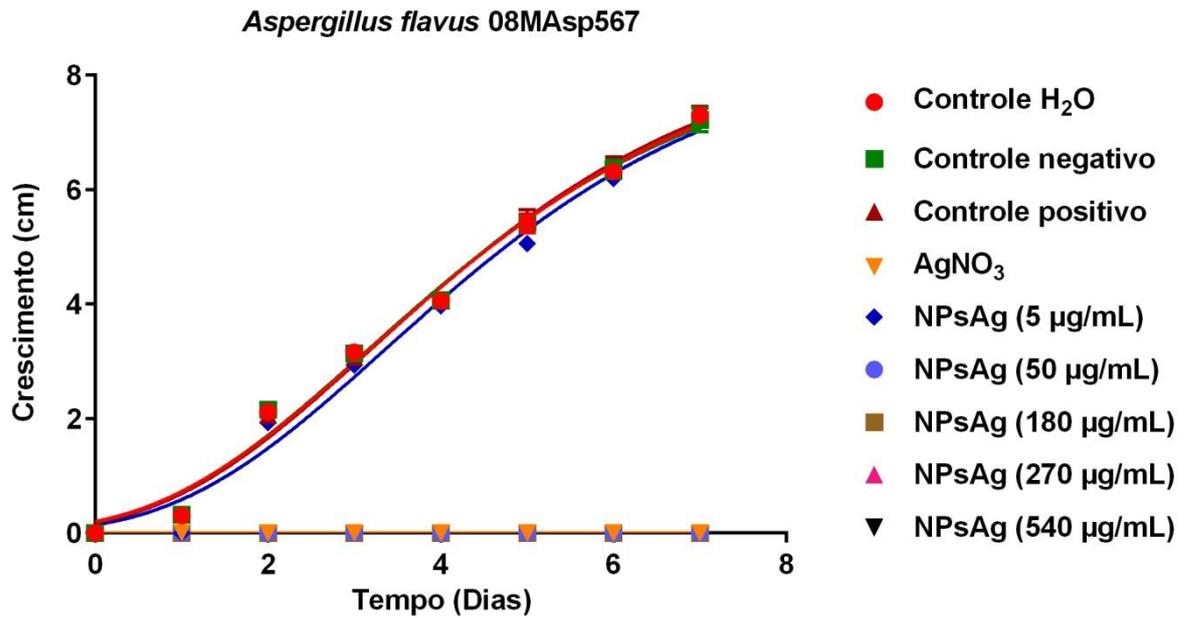


Figura 4.10 - Crescimento das colônias de *Aspergillus flavus* 08MAsp567 medido ao longo de 7 dias inoculado em diferentes concentrações de nanopartículas de prata a 25 °C no escuro.

O resultado apresentado na Figura 4.11 mostra a inibição do crescimento do *Aspergillus flavus* 08MAsp567 na presença de AgNO₃, porém este tratamento ocasionou oxidação do meio de cultura, impedindo assim o desenvolvimento da colônia do fungo. Desse modo, é inviável a utilização de AgNO₃ como agente antifúngico por inviabilizar o experimento, não podendo avaliar a real potencialidade antifúngica do composto.

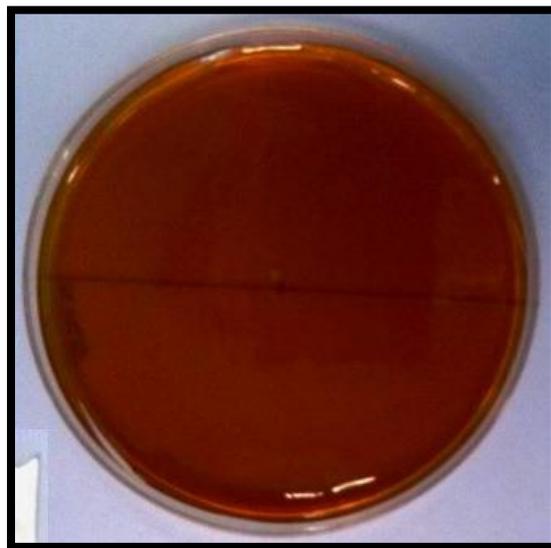


Figura 4.11 - Inibição do crescimento de *Aspergillus flavus* 08MAsp567 na presença de AgNO₃.

Os resultados apresentados na Figura 4.12 e Figura 4.13 mostram a inibição do crescimento do *Aspergillus flavus* 08MAsp567 na presença de nanopartículas de prata e dos controles, confirmando a atividade antifúngica de nanopartículas de prata.

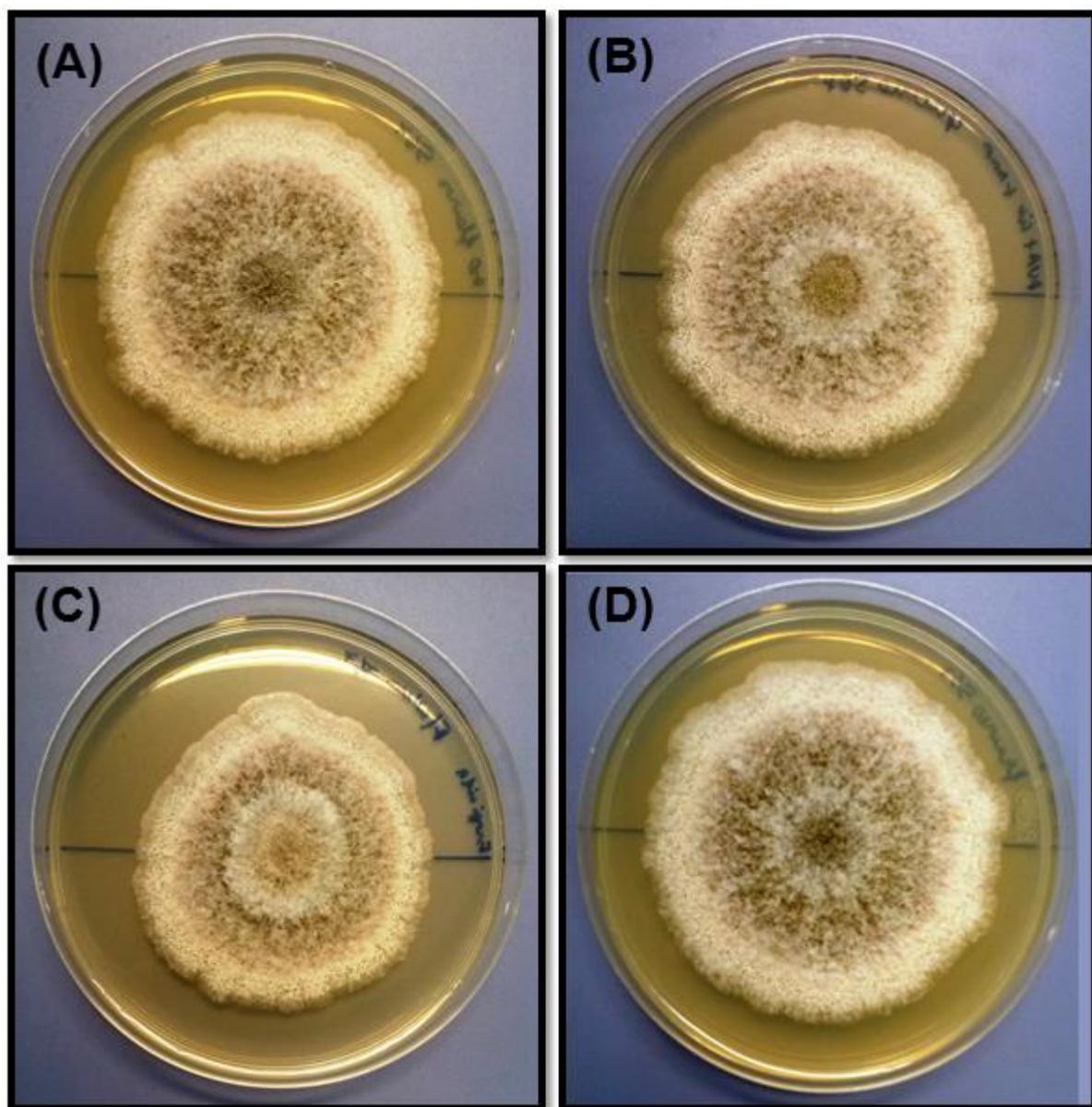


Figura 4.12 - Efeito das nanopartículas de prata e respectivos controles no crescimento do *Aspergillus flavus* 08MAsp567 testados após 7 dias a 25 °C no escuro. (A) Controle H₂O, (B) Controle negativo (Na₃C₆H₅O₇ 0,3 mol L⁻¹ e NH₃ 1,4 mol L⁻¹), (C) Controle positivo (fungicida anfolerina B) e (D) Concentração 5 µg mL⁻¹ de nanopartículas de prata.

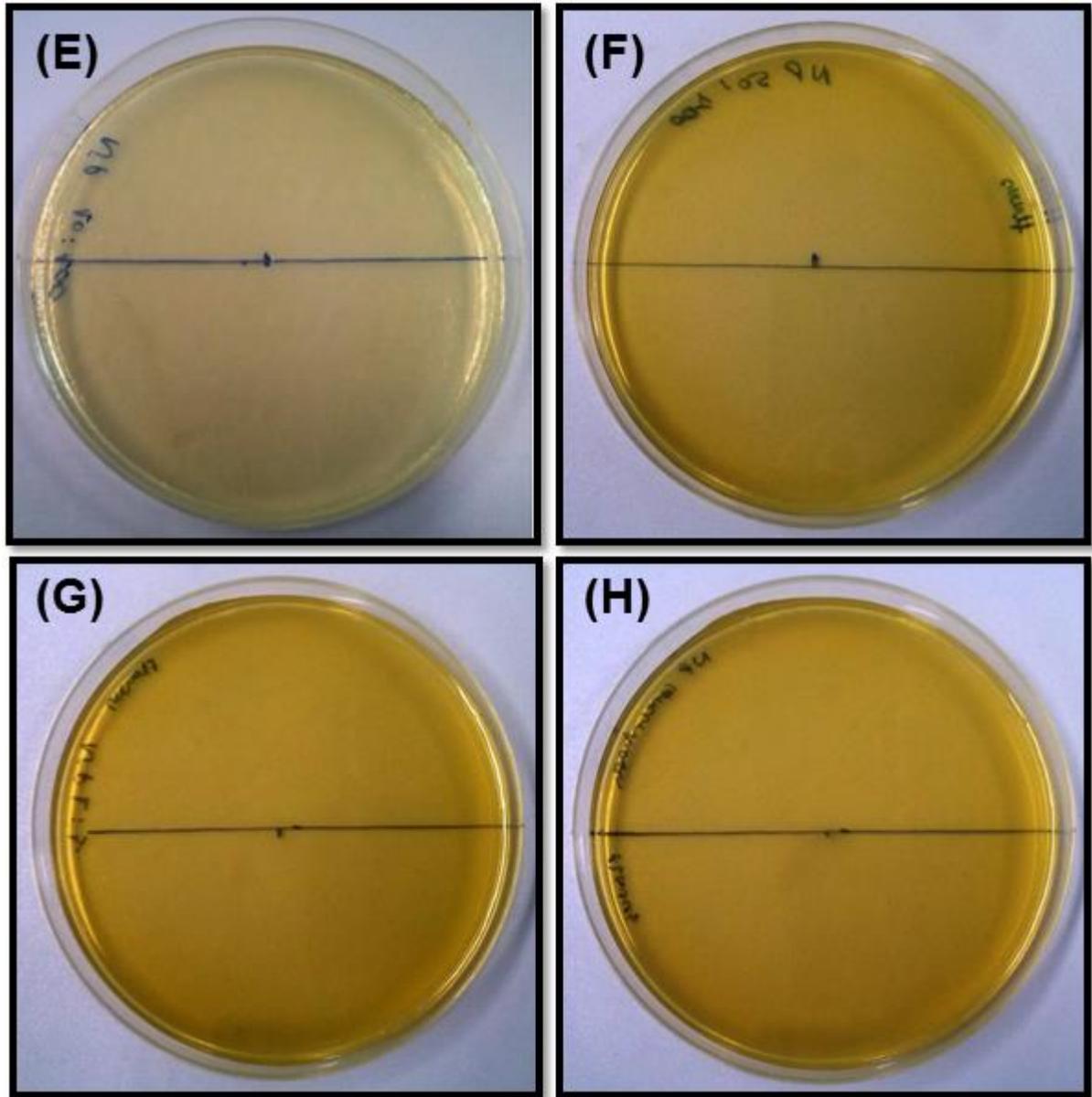


Figura 4.13 - Efeito das nanopartículas de prata no crescimento do *Aspergillus flavus* 08Masp567 testado após 7 dias a 25 °C no escuro. **(E)** Concentração 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, **(F)** Concentração 180 $\mu\text{g mL}^{-1}$, **(G)** Concentração 270 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e **(H)** Concentração 540 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

4.2.3 Inibição do crescimento radial de *Aspergillus flavus* 08Masp201 em placa de Petri

Na Tabela 4.7 podem-se encontrar as taxas de crescimento radial das colônias de *Aspergillus flavus* 08Masp201 testado quando crescido em meio PDA suplementado com 5, 50, 180, 270 e 540 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de nanopartículas de prata. Essas taxas foram comparadas com os

respectivos controles utilizando o teste de Duncan ($P < 0,05$) de forma a determinar reduções significativas do crescimento.

Tabela 4.7 - Taxa de crescimento radial de *Aspergillus flavus* 08Masp201 crescido em meio PDA suplementado com 5, 50, 180, 270 e 540 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de nanopartículas de prata

Compostos	Taxa de crescimento radial (cm/dia)
Controle H₂O	1,22±0,004 ^a
Controle negativo	1,20±0,009 ^a
Controle positivo	1,13±0,006 ^a
AgNO₃	0,00±0,000 ^b
AgNPs 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,00±0,000 ^b
AgNPs 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,00±0,000 ^b
AgNPs 180 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,00±0,000 ^b
AgNPs 270 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,00±0,000 ^b
AgNPs 540 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,00±0,000 ^b

Os valores apresentados são a média de nove réplicas \pm desvio padrão. Na coluna, letras diferentes correspondem a valores significativamente diferentes entre si para $P < 0,05$ segundo o teste de Duncan.

Os resultados apresentados neste estudo confirmaram que as nanopartículas de prata têm efeito fungicida contra o fungo *Aspergillus flavus* 08Masp201. Verificou-se que todas as concentrações de nanopartículas de prata (5, 50, 180, 270 e 540 $\mu\text{g mL}^{-1}$) inibiu o crescimento micelial do fungo, não permitindo a formação e o desenvolvimento da colônia fúngica. Através dos resultados obtidos foi constatado que o fungo *Aspergillus flavus* 08Masp201 é extremamente sensível as nanopartículas de prata mesmo em concentrações muito baixas (5 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

No tratamento controle positivo, com o fungicida anfotericina B, não foi observado uma inibição significativa do crescimento da colônia do fungo micotoxigênico avaliado. O crescimento do *Aspergillus flavus* 08Masp201 também não foi significativamente afetado nos tratamentos controle H₂O e controle negativo ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ 0,3 mol L⁻¹ e NH_3 1,4 mol L⁻¹), não sendo observada inibição da taxa de crescimento radial. Além disso, os resultados mostraram

que não houve diferença estatisticamente significativa do crescimento entre as médias do controle H₂O, controle negativo e controle positivo, obtidas após 7 dias de incubação.

Em termos percentuais, as nanopartículas de prata nas concentrações 5, 50, 180, 270 e 540 µg mL⁻¹ inibiram a taxa de crescimento radial do fungo micotóxico *Aspergillus flavus* 08Masp201 em 100%, comparadas relativamente ao controle H₂O. Os percentuais de inibição da taxa de crescimento de todos os tratamentos avaliados neste trabalho estão apresentados na Tabela 4.8.

Tabela 4.8 - Inibição da taxa de crescimento radial de *Aspergillus flavus* 08Masp201 relativamente ao controle H₂O

Compostos	Inibição da taxa de crescimento radial (%)
Controle negativo	-
Controle positivo	-
AgNO ₃	100
AgNPs 5 µg mL ⁻¹	100
AgNPs 50 µg mL ⁻¹	100
AgNPs 180 µg mL ⁻¹	100
AgNPs 270 µg mL ⁻¹	100
AgNPs 540 µg mL ⁻¹	100

- sem inibição significativa do crescimento

As medições diárias dos diâmetros das colônias do *Aspergillus flavus* 08Masp201 referentes a estes ensaios podem ser consultadas na Tabela 4.9 e na Figura 4.14. Neste estudo, utilizou-se o teste de Ducan (P<0,05) para verificar as diferenças significativas entre os dados obtidos. Este teste permitiu comparar as diferentes taxas de crescimento não apenas com os respectivos controles, mas também entre si, possibilitando assim, verificar se existiam diferenças significativas entre as 5 concentrações de nanopartículas utilizadas.

Tabela 4.9 - Diâmetro (cm) das colônias de *Aspergillus flavus* 08Masp201 medido durante 7 dias inoculado em diferentes concentrações de nanopartículas de prata a 25 °C no escuro e, respectivas taxas de crescimento radial (TCR)

Composto		Dias							TCR (cm/dia)	R ^{2***}
		1	2	3	4	5	6	7		
Controle H ₂ O	Média*	0,29	2,17	3,28	5,22	6,16	7,28	8,66 ^a	1,22	0,9918
	SD**	0,060	0,132	0,130	0,087	0,101	0,067	0,088		
Controle negativo	Média	0,31	2,18	3,19	5,02	6,04	7,24	8,56 ^a	1,20	0,9924
	SD	0,060	0,109	0,169	0,148	0,073	0,142	0,073		
Controle positivo	Média	0,24	1,33	2,64	4,02	5,91	7,08	8,51 ^a	1,13	0,9982
	SD	0,074	0,112	0,130	0,130	0,078	0,156	0,078		
AgNO ₃	Média	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ^b	0,00	0,0000
	SD	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		
AgNPs 5 µg mL ⁻¹	Média	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ^b	0,00	0,0000
	SD	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		
AgNPs 50 µg mL ⁻¹	Média	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ^b	0,00	0,0000
	SD	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		
AgNPs 180 µg mL ⁻¹	Média	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ^b	0,00	0,0000
	SD	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		
AgNPs 270 µg mL ⁻¹	Média	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ^b	0,00	0,0000
	SD	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		
AgNPs 540 µg mL ⁻¹	Média	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ^b	0,00	0,0000
	SD	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		

Na coluna, letras diferentes correspondem a valores significativamente diferentes entre si para P<0,05 segundo o teste de Duncan.

* Os valores apresentados são as médias dos diâmetros de nove réplicas.

** Os valores apresentados são os desvios padrões das médias dos diâmetros de nove réplicas.

***Os valores apresentados são os coeficientes de determinação.

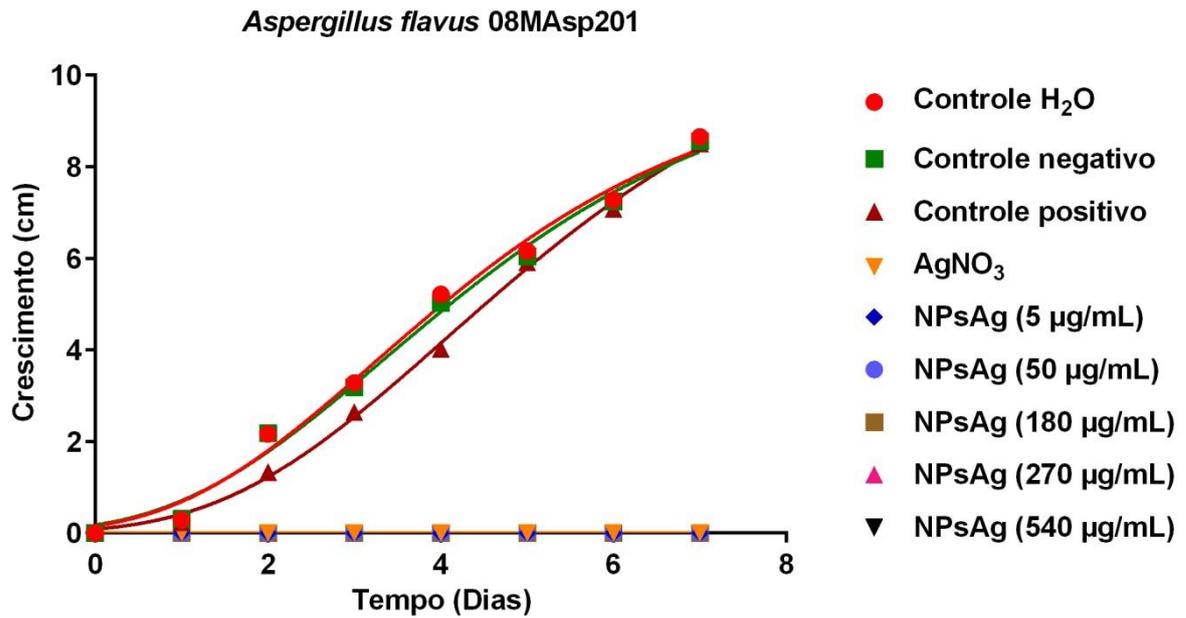


Figura 4.14 - Crescimento das colônias de *Aspergillus flavus* 08Masp201 medido ao longo de 7 dias inoculado em diferentes concentrações de nanopartículas de prata a 25 °C no escuro.

O resultado apresentado na Figura 4.15 mostra a inibição do crescimento do *Aspergillus flavus* 08Masp201 na presença de AgNO₃, porém este tratamento ocasionou oxidação do meio de cultura, impedindo assim o desenvolvimento da colônia do fungo.

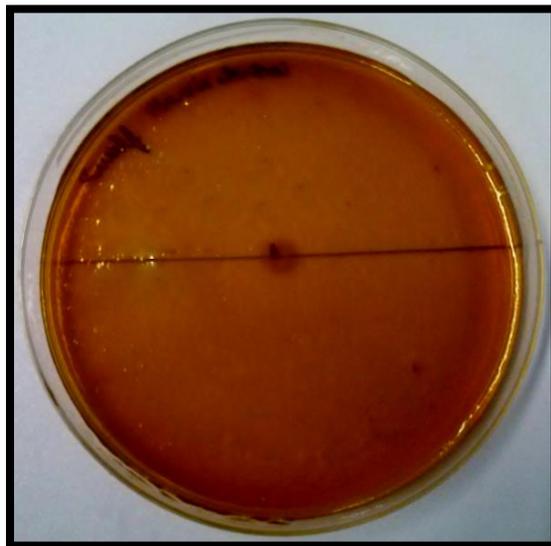


Figura 4.15 - Inibição do crescimento de *Aspergillus flavus* 08Masp201 na presença de AgNO₃.

Os resultados apresentados na Figura 4.16 e Figura 4.17 mostram a inibição do crescimento do *Aspergillus flavus* 08Masp201 na presença de nanopartículas de prata e dos controles, confirmando a atividade antifúngica de nanopartículas de prata.

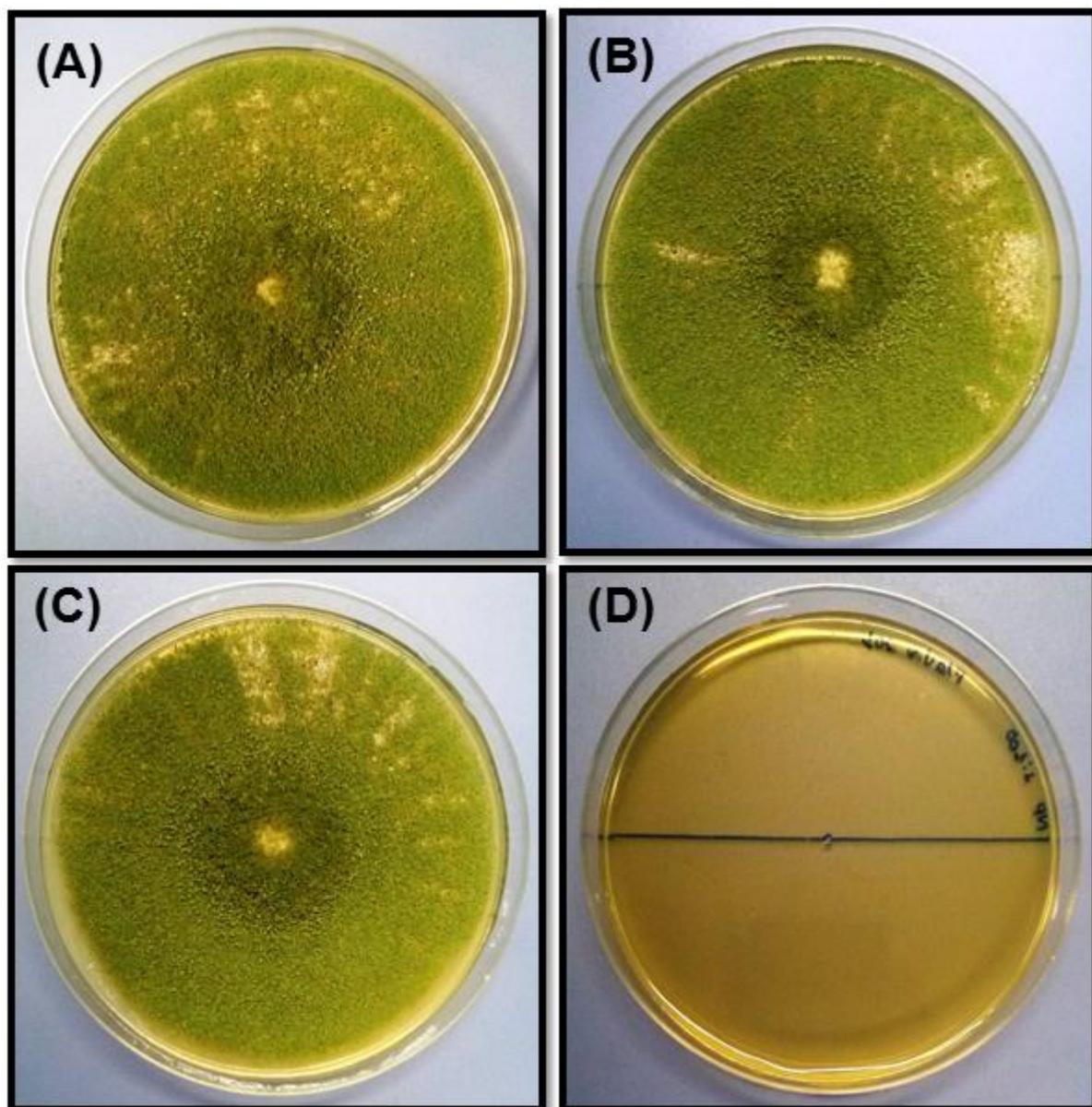


Figura 4.16 - Efeito das nanopartículas de prata e respectivos controles no crescimento do *Aspergillus flavus* 08Masp201 testados após 7 dias a 25 °C no escuro. (A) Controle H₂O, (B) Controle negativo (Na₃C₆H₅O₇ 0,3 mol L⁻¹ e NH₃ 1,4 mol L⁻¹), (C) Controle positivo (fungicida anfotericina B) e (D) Concentração 5 µg mL⁻¹ de nanopartículas de prata.

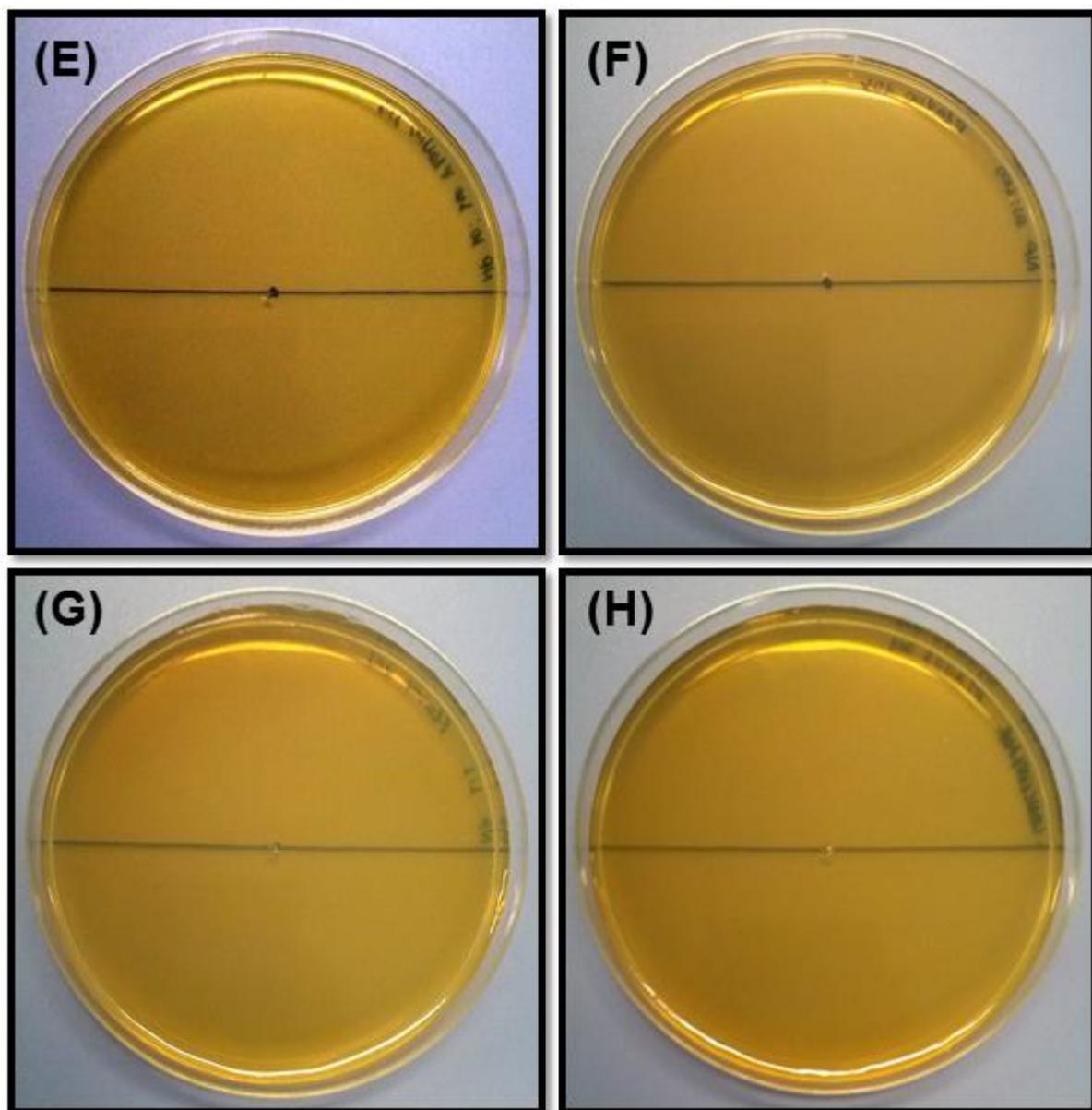


Figura 4.17 - Efeito das nanopartículas de prata no crescimento do *Aspergillus flavus* 08Masp201 testado após 7 dias a 25 °C no escuro. **(E)** Concentração 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, **(F)** Concentração 180 $\mu\text{g mL}^{-1}$, **(G)** Concentração 270 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e **(H)** Concentração 540 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

4.2.4 Inibição do crescimento radial de *Aspergillus carbonarius* 01UAs293 em placa de Petri

Os resultados do efeito das concentrações avaliadas de nanopartículas de prata sobre o crescimento radial das colônias de *Aspergillus carbonarius* 01UAs293, crescidas em meio MEA, podem ser consultados na Tabela 4.10. Essas taxas foram comparadas com os

respectivos controles utilizando o teste de Duncan ($P < 0,05$) de forma a determinar reduções significativas do crescimento.

Tabela 4.10 - Taxa de crescimento radial de *Aspergillus carbonarius* 01UAs293 crescido em meio MEA suplementado com 5, 50, 180, 270 e 540 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de nanopartículas de prata

Compostos	Taxa de crescimento radial (cm/dia)
Controle H ₂ O	0,99±0,023 ^a
Controle negativo	0,99±0,023 ^a
Controle positivo	1,00±0,009 ^a
AgNO ₃	0,00±0,000 ^b
AgNPs 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,00±0,000 ^b
AgNPs 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,00±0,000 ^b
AgNPs 180 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,00±0,000 ^b
AgNPs 270 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,00±0,000 ^b
AgNPs 540 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,00±0,000 ^b

Os valores apresentados são a média de nove réplicas \pm desvio padrão. Na coluna, letras diferentes correspondem a valores significativamente diferentes entre si para $P < 0,05$ segundo o teste de Duncan.

Os resultados apresentados neste estudo confirmaram que as nanopartículas de prata têm efeito fungicida e antifúngico contra o fungo *Aspergillus carbonarius* 01UAs293. Observou-se que todas as concentrações de nanopartículas de prata (5, 50, 180, 270 e 540 $\mu\text{g mL}^{-1}$) inibiu o crescimento micelial do fungo, não permitindo a formação e o desenvolvimento da colônia fúngica. Além disso, não houve diferença estatisticamente significativa na inibição do fungo nas diferentes concentrações de nanopartículas de prata, ou seja, não diferiram, entre si, estatisticamente.

Através dos resultados obtidos foi constatado que o fungo *Aspergillus carbonarius* 01UAs293 é extremamente sensível as nanopartículas de prata mesmo em concentrações muito baixas (5 $\mu\text{g mL}^{-1}$), este mesmo resultado também foi verificado no fungo *Aspergillus flavus* 08Masp201, descrito anteriormente.

No tratamento controle positivo, com o fungicida anfotericina B, não foi observado uma inibição significativa do crescimento da colônia do fungo micotoxigênico avaliado. O

crescimento do *Aspergillus carbonarius* 01UAs293 também não foi significativamente reduzido nos tratamentos controle H₂O e controle negativo (Na₃C₆H₅O₇ 0,3 mol L⁻¹ e NH₃ 1,4 mol L⁻¹), não sendo observada inibição da taxa de crescimento radial. Além disso, os resultados mostraram que não houve diferença estatisticamente significativa do crescimento entre as médias do controle H₂O, controle negativo e controle positivo, obtidas após 7 dias de incubação.

Em termos percentuais, as nanopartículas de prata nas concentrações 5, 50, 180, 270 e 540 µg mL⁻¹ inibiram a taxa de crescimento radial do fungo *Aspergillus carbonarius* 01UAs293 em 100%, comparadas relativamente ao controle H₂O. Na Tabela 4.11 apresenta-se, em porcentagem, a inibição da taxa de crescimento radial de forma a comparar e compreender melhor o efeito antifúngico de cada concentração de nanopartículas de prata.

Tabela 4.11 - Inibição da taxa de crescimento radial de *Aspergillus carbonarius* 01UAs293 relativamente ao controle H₂O

Compostos	Inibição da taxa de crescimento radial (%)
Controle negativo	-
Controle positivo	-
AgNO₃	100
AgNPs 5 µg mL⁻¹	100
AgNPs 50 µg mL⁻¹	100
AgNPs 180 µg mL⁻¹	100
AgNPs 270 µg mL⁻¹	100
AgNPs 540 µg mL⁻¹	100

- sem inibição significativa do crescimento

As medições diárias dos diâmetros das colônias do *Aspergillus carbonarius* 01UAs293 referentes a estes ensaios podem ser consultadas na Tabela 4.12 e na Figura 4.18. Neste estudo, utilizou-se o teste de Duncan (P<0,05) para verificar as diferenças significativas entre os dados obtidos. Este teste permitiu comparar as diferentes taxas de crescimento não apenas com os respectivos controles, mas também entre si, possibilitando assim, verificar se existiam diferenças significativas entre as 5 concentrações de nanopartículas de prata testadas.

Tabela 4.12 - Diâmetro (cm) das colônias de *Aspergillus carbonarius* 01UAs293 medido durante 7 dias inoculado em diferentes concentrações de nanopartículas de prata a 25 °C no escuro e, respectivas taxas de crescimento radial (TCR)

Composto		Dias							TCR (cm/dia)	R ^{2***}
		1	2	3	4	5	6	7		
Controle H ₂ O	Média*	0,00	1,24	2,11	3,11	5,03	6,08	7,02 ^a	0,99	0,9926
	SD**	0,000	0,133	0,093	0,093	0,071	0,120	0,319		
Controle negativo	Média	0,00	1,26	2,13	3,07	5,07	6,07	7,01 ^a	0,99	0,9918
	SD	0,000	0,088	0,122	0,100	0,166	0,071	0,136		
Controle positivo	Média	0,00	1,30	2,26	3,19	5,02	6,04	7,02 ^a	1,00	0,9913
	SD	0,000	0,194	0,113	0,169	0,148	0,073	0,139		
AgNO ₃	Média	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ^b	0,00	0,0000
	SD	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		
AgNPs 5 µg mL ⁻¹	Média	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ^b	0,00	0,0000
	SD	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		
AgNPs 50 µg mL ⁻¹	Média	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ^b	0,00	0,0000
	SD	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		
AgNPs 180 µg mL ⁻¹	Média	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ^b	0,00	0,0000
	SD	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		
AgNPs 270 µg mL ⁻¹	Média	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ^b	0,00	0,0000
	SD	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		
AgNPs 540 µg mL ⁻¹	Média	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ^b	0,00	0,0000
	SD	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		

Na coluna, letras diferentes correspondem a valores significativamente diferentes entre si para P<0,05 segundo o teste de Duncan.

* Os valores apresentados são as médias dos diâmetros de nove réplicas.

** Os valores apresentados são os desvios padrões das médias dos diâmetros de nove réplicas.

***Os valores apresentados são os coeficientes de determinação.

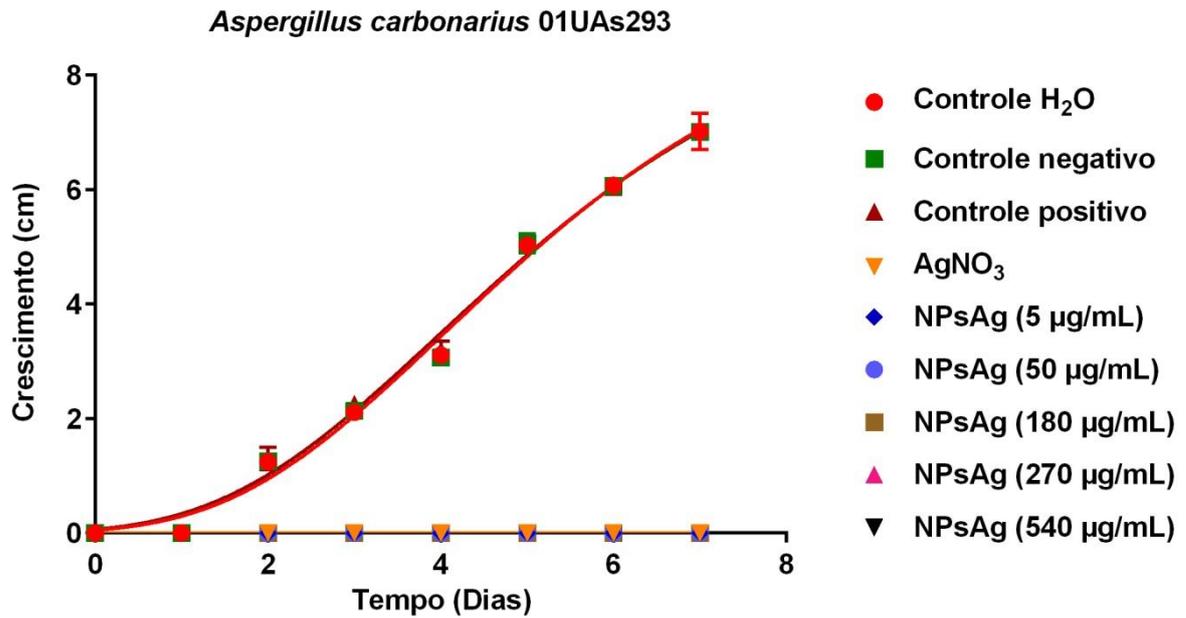


Figura 4.18 - Crescimento das colônias de *Aspergillus carbonarius* 01UAs293 medido ao longo de 7 dias inoculado em diferentes concentrações de nanopartículas de prata a 25 °C no escuro.

No tratamento AgNO₃ não houve crescimento e desenvolvimento da colônia de *Aspergillus carbonarius* 01UAs293. Além disso, também foi observada a oxidação do meio de cultura (Figura 4.19).



Figura 4.19 - Inibição do crescimento de *Aspergillus carbonarius* 01UAs293 na presença de AgNO₃.

Os resultados apresentados na Figura 4.20 e Figura 4.21 mostram a inibição do crescimento do *Aspergillus carbonarius* 01UAs293 na presença de nanopartículas de prata e dos controles, confirmando a atividade antifúngica de nanopartículas de prata.

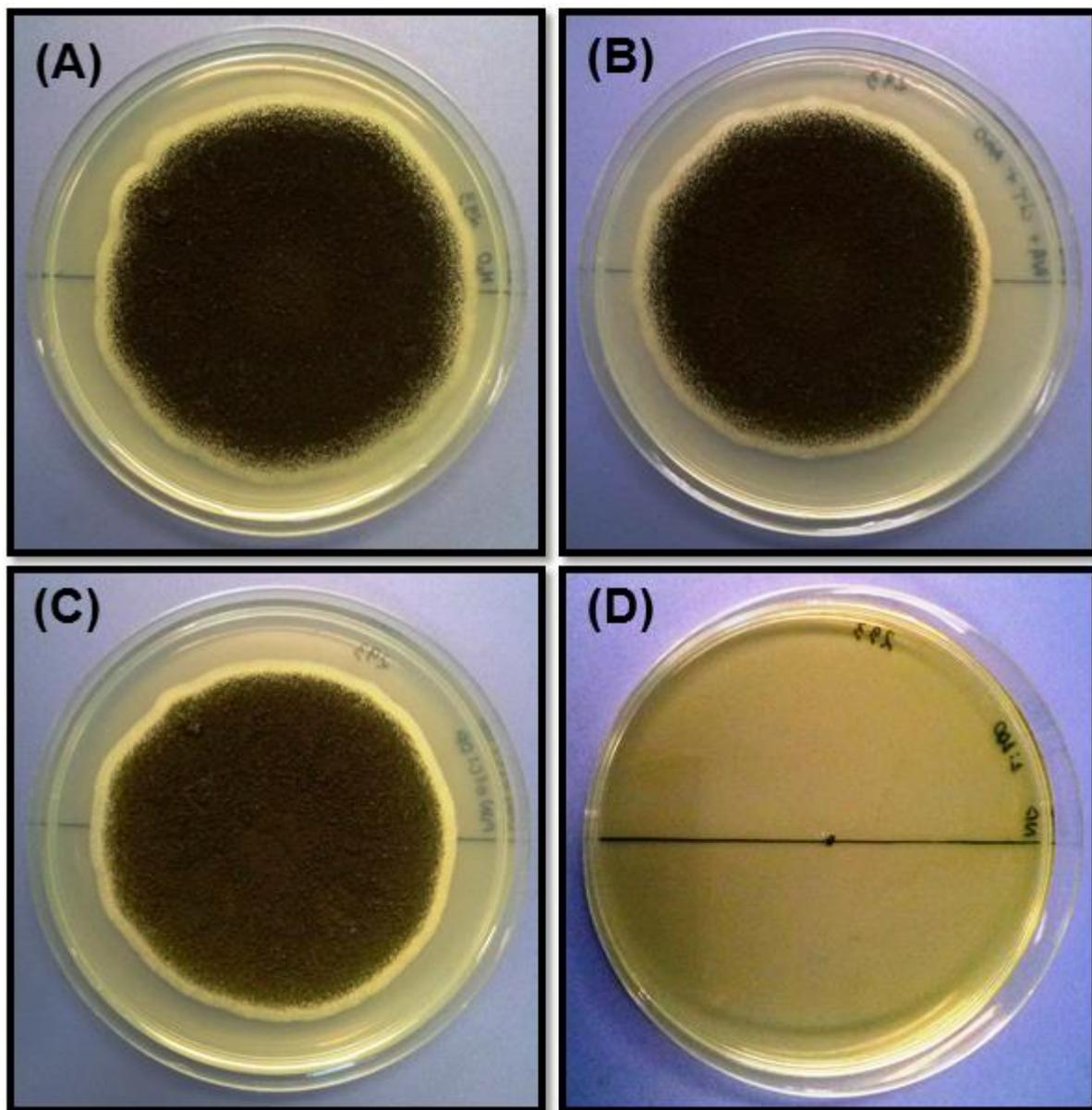


Figura 4.20 - Efeito das nanopartículas de prata e respectivos controles no crescimento do *Aspergillus carbonarius* 01UAs293 testados após 7 dias a 25 °C no escuro. (A) Controle H₂O, (B) Controle negativo (Na₃C₆H₅O₇ 0,3 mol L⁻¹ e NH₃ 1,4 mol L⁻¹), (C) Controle positivo (fungicida antronic B) e (D) Concentração 5 µg mL⁻¹ de nanopartículas de prata.

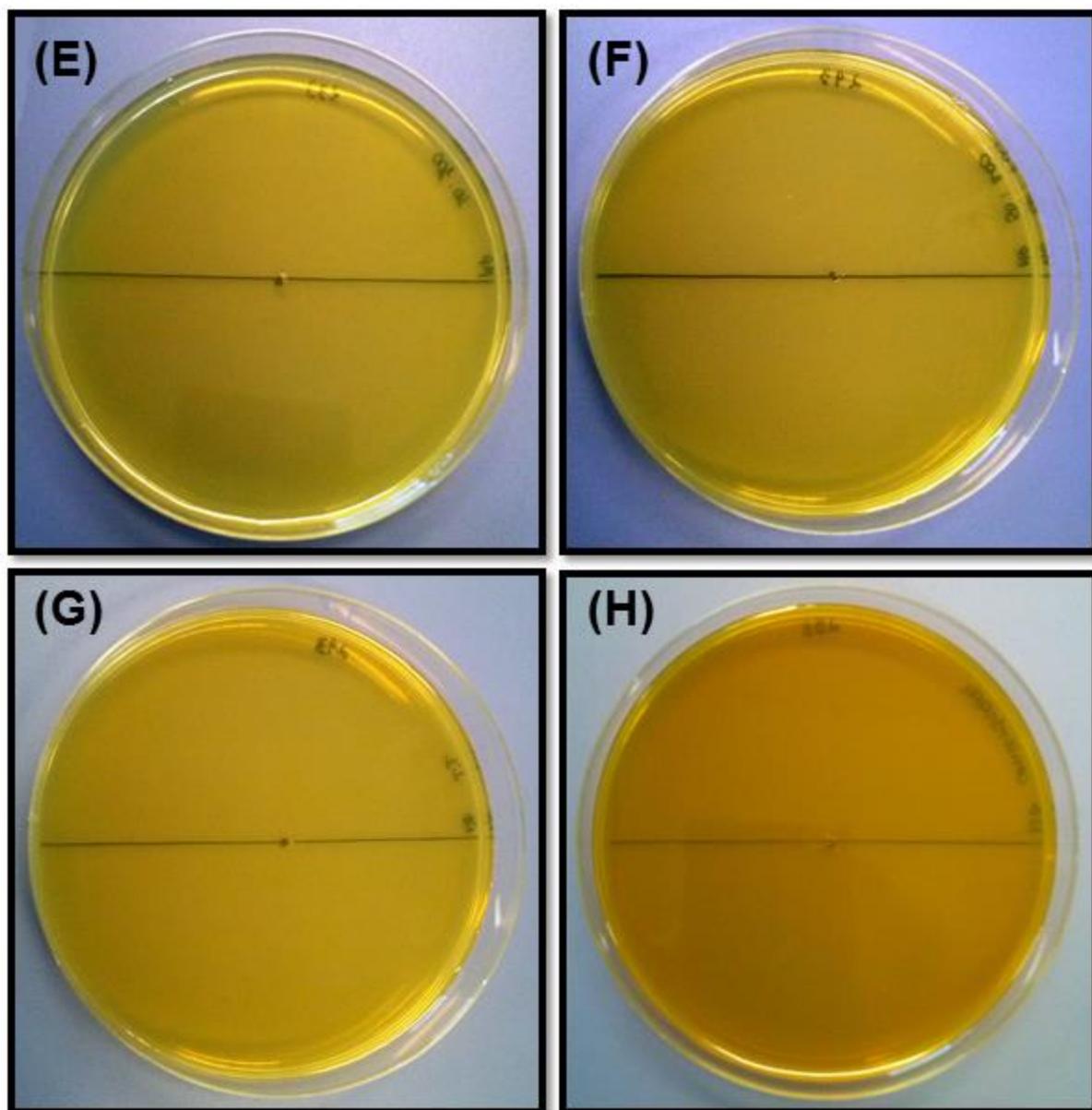


Figura 4.21 - Efeito das nanopartículas de prata no crescimento do *Aspergillus carbonarius* 01UAs293 testado após 7 dias a 25 °C no escuro. **(E)** Concentração 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, **(F)** Concentração 180 $\mu\text{g mL}^{-1}$, **(G)** Concentração 270 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e **(H)** Concentração 540 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

4.2.5 Inibição do crescimento radial de *Aspergillus niger* 01UAs248 em placa de Petri

Na Tabela 4.13 podem-se encontrar as taxas de crescimento radial das colônias de *Aspergillus niger* 01UAs248 testado quando crescido em meio PDA suplementado com 5, 50, 180, 270 e 540 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de nanopartículas de prata. Essas taxas foram comparadas com os

respectivos controles utilizando o teste de Duncan ($P < 0,05$) de forma a determinar reduções significativas do crescimento.

Tabela 4.13 - Taxa de crescimento radial de *Aspergillus niger* 01UAs248 crescido em meio PDA suplementado com 5, 50, 180, 270 e 540 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de nanopartículas de prata

Compostos	Taxa de crescimento radial (cm/dia)
Controle H ₂ O	1,19±0,006 ^a
Controle negativo	1,19±0,009 ^a
Controle positivo	1,01±0,010 ^b
AgNO ₃	0,00±0,000 ^d
AgNPs 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,83±0,008 ^c
AgNPs 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,00±0,000 ^d
AgNPs 180 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,00±0,000 ^d
AgNPs 270 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,00±0,000 ^d
AgNPs 540 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,00±0,000 ^d

Os valores apresentados são a média de nove réplicas \pm desvio padrão. Na coluna, letras diferentes correspondem a valores significativamente diferentes entre si para $P < 0,05$ segundo o teste de Duncan.

Os resultados apresentados neste estudo confirmaram que as nanopartículas de prata têm efeitos inibitórios significativos, atividade antifúngica e fungicida na formação de colônias de *Aspergillus niger* 01UAs248. Verificou-se que a concentração 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de nanopartículas de prata inibiu significativamente a taxa de crescimento radial do fungo testado. O *Aspergillus niger* 01UAs248 é sensível a concentração 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e teve o seu diâmetro de colônia reduzido de 8,37 cm para 6,14 cm, quando comparado ao controle H₂O.

No tratamento controle positivo, com o fungicida anfotericina B, também foi observado uma inibição significativa do crescimento da colônia do fungo micotoxigênico avaliado, porém uma redução menor do que a concentração 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de nanopartículas de prata. O diâmetro da colônia foi reduzido de 8,37 cm para 7,31 cm, quando também comparado ao controle H₂O.

O crescimento do *Aspergillus niger* 01UAs248 não foi significativamente afetado nos tratamentos controle H₂O e controle negativo ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ 0,3 mol L⁻¹ e NH_3 1,4 mol L⁻¹), não

sendo observada inibição da taxa de crescimento radial. Além disso, os resultados mostraram que não houve diferença estatisticamente significativa do crescimento entre as médias do controle H₂O e controle negativo, obtidas após 7 dias de incubação.

O fungo *Aspergillus niger* 01UAs248 é sensível as nanopartículas de prata e verificou-se com os resultados que ocorreu inibição total do crescimento fúngico nas concentrações 50, 180, 270 e 540 µg mL⁻¹.

Em termos percentuais, a concentração 5 µg mL⁻¹ reduziu a taxa de crescimento radial do *Aspergillus niger* 01UAs248 em 21%, comparada relativamente ao controle H₂O. As nanopartículas de prata nas concentrações 50, 180, 270 e 540 µg mL⁻¹ inibiram em 100% a taxa de crescimento radial do fungo micotoxigênico *Aspergillus niger* 01UAs248. Quanto ao controle positivo, foi observada uma baixa inibição do crescimento desta estirpe em apenas 7%.

Os percentuais de inibição da taxa de crescimento de *Aspergillus niger* 01UAs248 de todos os tratamentos avaliados neste trabalho estão apresentados na Tabela 4.14.

Tabela 4.14 - Inibição da taxa de crescimento radial de *Aspergillus niger* 01UAs248 relativamente ao controle H₂O

Compostos	Inibição da taxa de crescimento radial (%)
Controle negativo	-
Controle positivo	7
AgNO₃	100
AgNPs 5 µg mL⁻¹	21
AgNPs 50 µg mL⁻¹	100
AgNPs 180 µg mL⁻¹	100
AgNPs 270 µg mL⁻¹	100
AgNPs 540 µg mL⁻¹	100

- sem inibição significativa do crescimento

As medições diárias dos diâmetros das colônias do *Aspergillus niger* 01UAs248 referentes a estes ensaios podem ser consultadas na Tabela 4.15 e na Figura 4.22. Neste estudo, utilizou-se o teste de Duncan (P<0,05) para verificar as diferenças significativas entre os dados obtidos. Este teste permitiu comparar as diferentes taxas de crescimento não apenas

com os respectivos controles, mas também entre si, possibilitando assim, verificar se existiam diferenças significativas entre as 5 concentrações de nanopartículas utilizadas.

Tabela 4.15 - Diâmetro (cm) das colônias de *Aspergillus niger* 01UAs248 medido durante 7 dias inoculado em diferentes concentrações de nanopartículas de prata a 25 °C no escuro e, respectivas taxas de crescimento radial (TCR)

Composto		Dias							TCR (cm/dia)	R ^{2***}
		1	2	3	4	5	6	7		
Controle H ₂ O	Média*	0,32	2,11	3,16	5,13	6,08	7,17	8,37 ^a	1,19	0,9933
	SD**	0,044	0,033	0,053	0,109	0,083	0,158	0,050		
Controle negativo	Média	0,31	2,09	3,11	4,98	5,98	7,21	8,52 ^a	1,19	0,9930
	SD	0,033	0,078	0,093	0,083	0,097	0,215	0,109		
Controle positivo	Média	0,00	1,38	2,46	4,02	5,28	6,27	7,31 ^b	1,01	0,9962
	SD	0,000	0,097	0,074	0,130	0,067	0,158	0,093		
AgNO ₃	Média	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ^d	0,00	0,0000
	SD	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		
AgNPs 5 µg mL ⁻¹	Média	0,00	0,67	2,16	3,22	4,14	5,19	6,14 ^c	0,83	0,9943
	SD	0,000	0,050	0,073	0,044	0,073	0,105	0,101		
AgNPs 50 µg mL ⁻¹	Média	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ^d	0,00	0,0000
	SD	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		
AgNPs 180 µg mL ⁻¹	Média	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ^d	0,00	0,0000
	SD	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		
AgNPs 270 µg mL ⁻¹	Média	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ^d	0,00	0,0000
	SD	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		
AgNPs 540 µg mL ⁻¹	Média	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ^d	0,00	0,0000
	SD	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		

Na coluna, letras diferentes correspondem a valores significativamente diferentes entre si para P<0,05 segundo o teste de Duncan.

* Os valores apresentados são as médias dos diâmetros de nove réplicas.

** Os valores apresentados são os desvios padrões das médias dos diâmetros de nove réplicas.

***Os valores apresentados são os coeficientes de determinação.

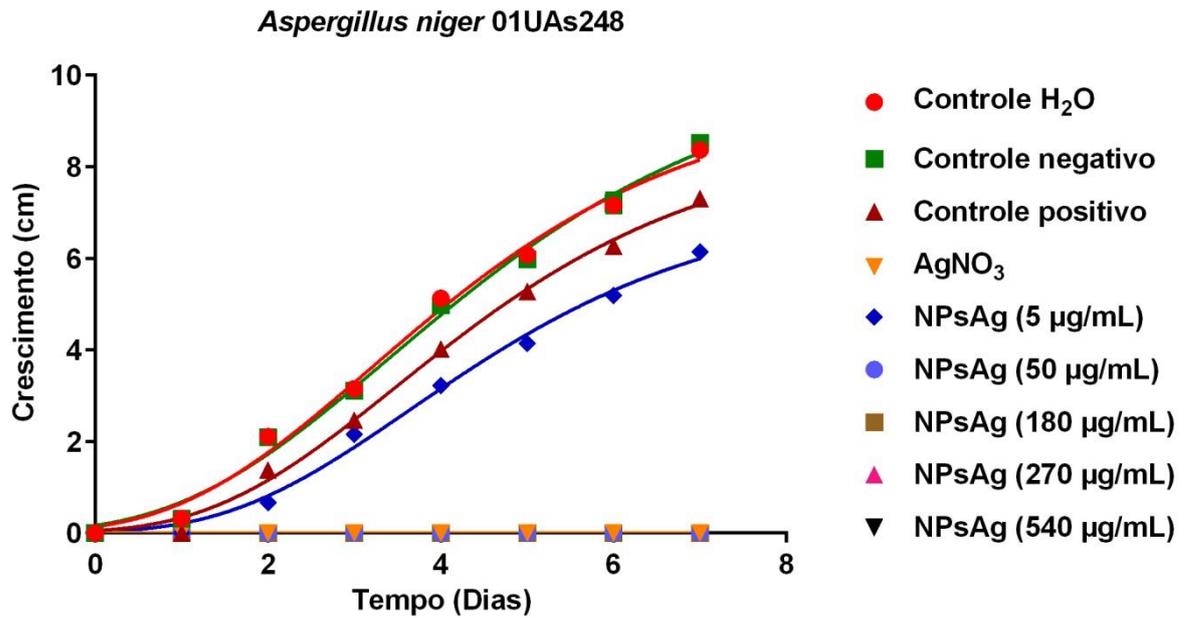


Figura 4.22 - Crescimento das colônias de *Aspergillus niger* 01UAs248 medido ao longo de 7 dias inoculado em diferentes concentrações de nanopartículas de prata a 25 °C no escuro.

O resultado apresentado na Figura 4.23 mostra a inibição do crescimento do *Aspergillus niger* 01UAs248 na presença de AgNO₃, porém este tratamento ocasionou oxidação do meio de cultura, impedindo assim o desenvolvimento da colônia fúngica. Neste tratamento também não ocorreu crescimento da estirpe *Aspergillus niger* 01UAs248.

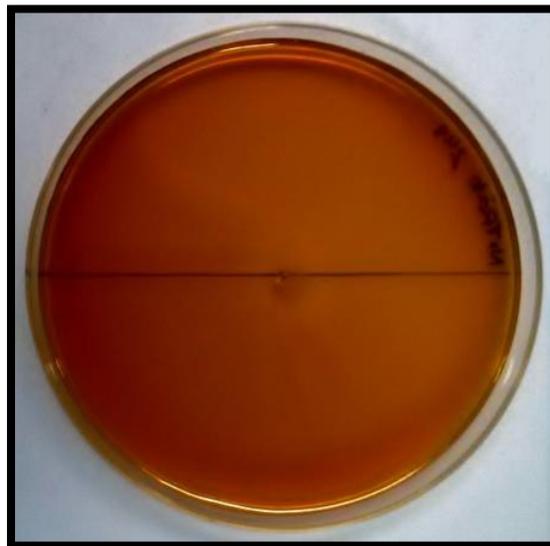


Figura 4.23 - Inibição do crescimento de *Aspergillus niger* 01UAs248 na presença de AgNO₃.

Os resultados apresentados na Figura 4.24 e Figura 4.25 mostram a inibição do crescimento do *Aspergillus niger* 01UAs248 na presença de nanopartículas de prata e dos controles, confirmando a atividade antifúngica de nanopartículas de prata.

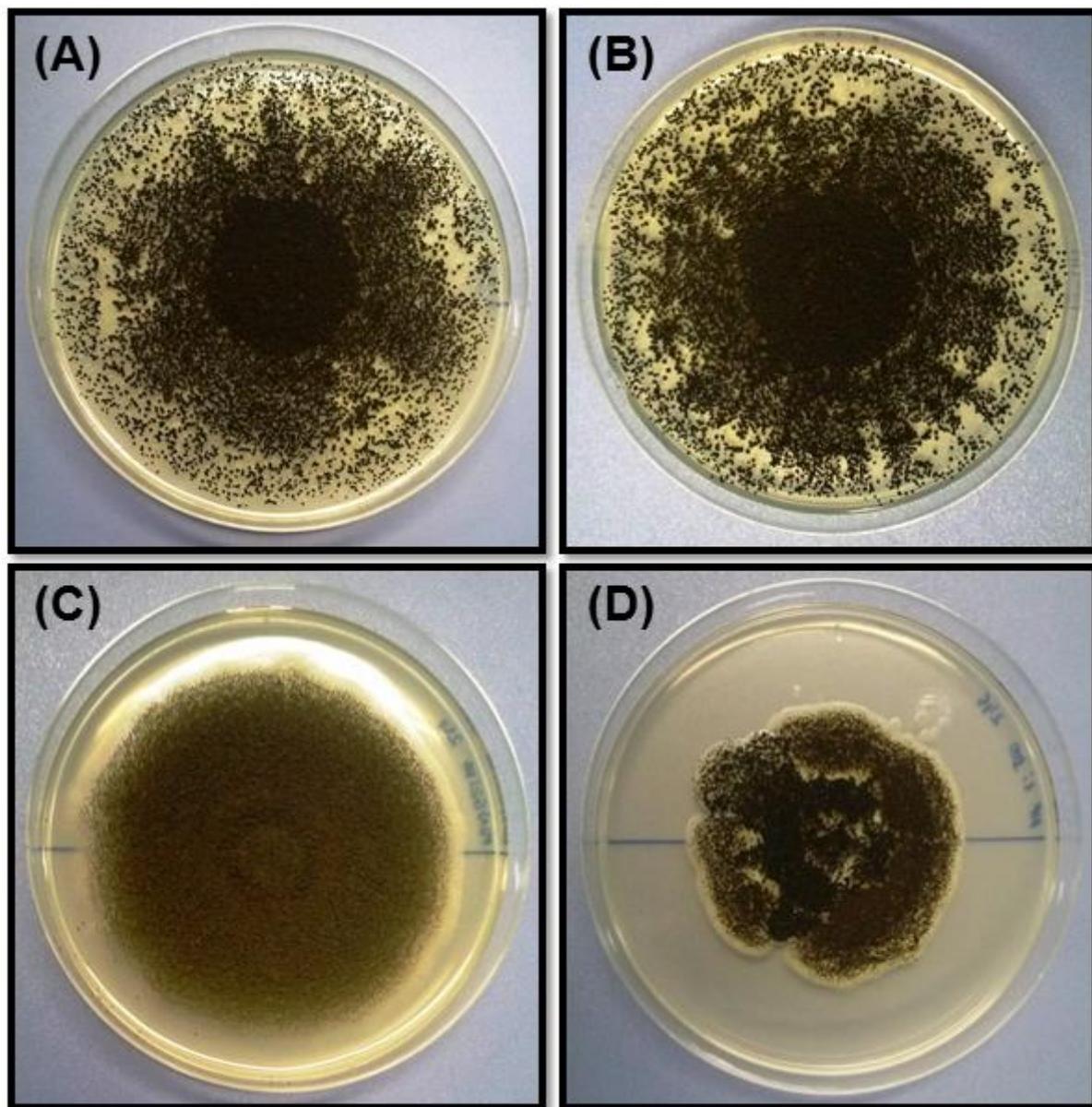


Figura 4.24 - Efeito das nanopartículas de prata e respectivos controles no crescimento do *Aspergillus niger* 01UAs248 testados após 7 dias a 25 °C no escuro. (A) Controle H₂O, (B) Controle negativo (Na₃C₆H₅O₇ 0,3 mol L⁻¹ e NH₃ 1,4 mol L⁻¹), (C) Controle positivo (fungicida anfolericina B) e (D) Concentração 5 µg mL⁻¹ de nanopartículas de prata.

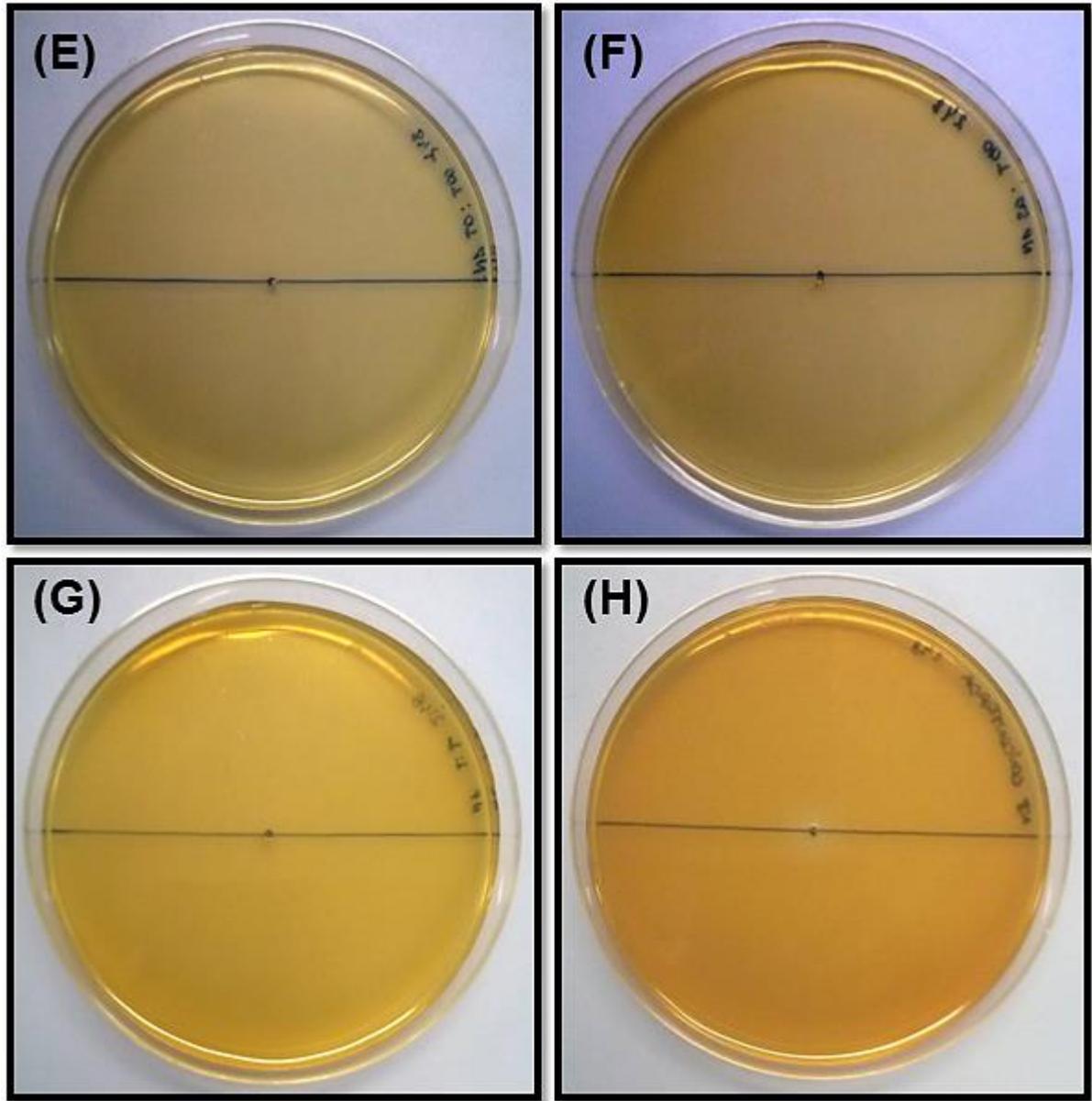


Figura 4.25 - Efeito das nanopartículas de prata no crescimento do *Aspergillus niger* 01UAs248 testado após 7 dias a 25 °C no escuro. **(E)** Concentração 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, **(F)** Concentração 180 $\mu\text{g mL}^{-1}$, **(G)** Concentração 270 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e **(H)** Concentração 540 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

4.2.6 Inibição do crescimento radial de *Phomopsis* sp. MES1154 em placa de Petri

Os resultados das taxas de crescimento radial das colônias de *Phomopsis* sp. MES1154 testadas com diferentes concentrações de nanopartículas de prata e crescidas em meio PDA suplementado estão apresentados na Tabela 4.16. Essas taxas foram comparadas com os

respectivos controles utilizando o teste de Duncan ($P < 0,05$) de forma a determinar reduções significativas do crescimento.

Tabela 4.16 - Taxa de crescimento radial de *Phomopsis* sp. MES1154 crescido em meio PDA suplementado com 5, 50, 180, 270 e 540 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de nanopartículas de prata

Compostos	Taxa de crescimento radial (cm/dia)
Controle H₂O	1,38±0,010 ^a
Controle negativo	1,37±0,020 ^a
Controle positivo	1,25±0,008 ^a
AgNO₃	0,00±0,000 ^d
AgNPs 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$	1,16±0,034 ^a
AgNPs 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$	1,43±0,040 ^b
AgNPs 180 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,34±0,102 ^c
AgNPs 270 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,00±0,000 ^d
AgNPs 540 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,00±0,000 ^d

Os valores apresentados são a média de nove réplicas \pm desvio padrão. Na coluna, letras diferentes correspondem a valores significativamente diferentes entre si para $P < 0,05$ segundo o teste de Duncan.

Os resultados apresentados neste estudo confirmaram que as nanopartículas de prata também têm efeitos inibitórios significativos, atividade antifúngica e fungicida na formação de colônias de *Phomopsis* sp. MES1154. Contudo, este fungo apresentou uma maior resistência à inibição quando crescido em baixas concentrações de nanopartículas de prata (5, 50, 180 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

Verificou-se que a concentração 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de nanopartículas de prata não inibiu significativamente a taxa de crescimento radial do fungo testado. O fungo *Phomopsis* sp. MES1154 não teve o seu diâmetro de colônia reduzido quando testado nesta concentração, porém ocorreu um retardamento no crescimento fúngico, sendo observado após 48 horas de incubação.

Observou-se que a concentração 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de nanopartículas de prata inibiu significativamente a taxa de crescimento radial do fungo testado. O *Phomopsis* sp. MES1154

é sensível à concentração $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ e teve o seu diâmetro de colônia reduzido de 8,52 cm para 7,57 cm, quando comparado ao controle H_2O .

O crescimento do *Phomopsis* sp. MES1154 foi significativamente afetado pela concentração $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de nanopartículas de prata, tendo uma redução de 7,22 cm no diâmetro da colônia fúngica, quando comparado com o controle H_2O . O diâmetro da colônia foi reduzido de 8,52 cm (controle H_2O) para 1,30 cm ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de nanopartículas de prata).

As nanopartículas de prata nas concentrações 270 e $540 \mu\text{g mL}^{-1}$ inibiram totalmente o crescimento fúngico apenas em duas concentrações, não ocorrendo formação da colônia fúngica.

No tratamento controle positivo, com o fungicida anfotericina B, também não foi observado inibição do crescimento da colônia do fungo avaliado. O crescimento do *Phomopsis* sp. MES1154 não foi significativamente afetado nos tratamentos controle H_2O e controle negativo ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ e NH_3 $1,4 \text{ mol L}^{-1}$), não sendo observada inibição da taxa de crescimento radial. Além disso, os resultados mostraram que não houve diferença estatisticamente significativa do crescimento entre as médias do controle H_2O , controle negativo, controle positivo e nanopartículas de prata (concentração $5 \mu\text{g mL}^{-1}$), obtidas após 7 dias de incubação.

Em termos percentuais, as concentrações 50 e $180 \mu\text{g mL}^{-1}$ reduziram a taxa de crescimento radial do *Phomopsis* sp. MES1154 em 21 e 64%, respectivamente, quando comparadas relativamente ao controle H_2O . As nanopartículas de prata nas concentrações 270 e $540 \mu\text{g mL}^{-1}$ inibiram em 100% a taxa de crescimento radial do fungo *Phomopsis* sp. MES1154, mais eficientes no teste de crescimento micelial.

Os percentuais de inibição da taxa de crescimento de todos os tratamentos avaliados neste trabalho estão apresentados na Tabela 4.17.

Tabela 4.17 - Inibição da taxa de crescimento radial de *Phomopsis* sp. MES1154 relativamente ao controle H₂O

Compostos	Inibição da taxa de crescimento radial (%)
Controle negativo	-
Controle positivo	-
AgNO₃	100
AgNPs 5 µg mL⁻¹	-
AgNPs 50 µg mL⁻¹	21
AgNPs 180 µg mL⁻¹	64
AgNPs 270 µg mL⁻¹	100
AgNPs 540 µg mL⁻¹	100

- sem inibição significativa do crescimento

As medições diárias dos diâmetros das colônias do *Phomopsis* sp. MES1154 referentes a estes ensaios podem ser consultadas na Tabela 4.18 e na Figura 4.26. Neste estudo, utilizou-se o teste de Duncan ($P < 0,05$) para verificar as diferenças significativas entre os dados obtidos. Este teste permitiu comparar as diferentes taxas de crescimento não apenas com os respectivos controles, mas também entre si, possibilitando assim, verificar se existiam diferenças significativas entre as 5 concentrações de nanopartículas utilizadas.

Tabela 4.18 - Diâmetro (cm) das colônias de *Phomopsis* sp. MES1154 medido durante 7 dias inoculado em diferentes concentrações de nanopartículas de prata a 25 °C no escuro e, respectivas taxas de crescimento radial (TCR)

Composto		Dias							TCR (cm/dia)	R ^{2***}
		1	2	3	4	5	6	7		
Controle H ₂ O	Média*	0,27	2,12	3,22	5,59	6,52	7,35	8,52 ^a	1,38	0,9924
	SD**	0,050	0,067	0,097	0,219	0,172	0,075	0,067		
Controle negativo	Média	0,24	2,09	3,21	5,59	6,49	7,33	8,49 ^a	1,37	0,9923
	SD	0,053	0,078	0,117	0,196	0,154	0,049	0,154		
Controle positivo	Média	0,27	2,10	3,23	4,23	5,42	6,51	8,39 ^a	1,25	0,9843
	SD	0,071	0,100	0,100	0,122	0,098	0,220	0,093		
AgNO ₃	Média	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ^d	0,00	0,0000
	SD	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		
AgNPs 5 µg mL ⁻¹	Média	0,00	2,07	3,14	4,23	5,42	6,51	8,00 ^a	1,16	0,9837
	SD	0,000	0,071	0,133	0,122	0,098	0,220	0,113		
AgNPs 50 µg mL ⁻¹	Média	0,00	0,39	2,37	3,47	5,23	6,51	7,57 ^b	1,43	0,9950
	SD	0,000	0,078	0,112	0,087	0,265	0,220	0,212		
AgNPs 180 µg mL ⁻¹	Média	0,00	0,00	0,00	0,26	0,39	0,67	1,30 ^c	0,34	0,9872
	SD	0,000	0,000	0,000	0,053	0,060	0,050	0,357		
AgNPs 270 µg mL ⁻¹	Média	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ^d	0,00	0,0000
	SD	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		
AgNPs 540 µg mL ⁻¹	Média	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ^d	0,00	0,0000
	SD	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		

Na coluna, letras diferentes correspondem a valores significativamente diferentes entre si para P<0,05 segundo o teste de Duncan.

* Os valores apresentados são as médias dos diâmetros de nove réplicas.

** Os valores apresentados são os desvios padrões das médias dos diâmetros de nove réplicas.

***Os valores apresentados são os coeficientes de determinação.

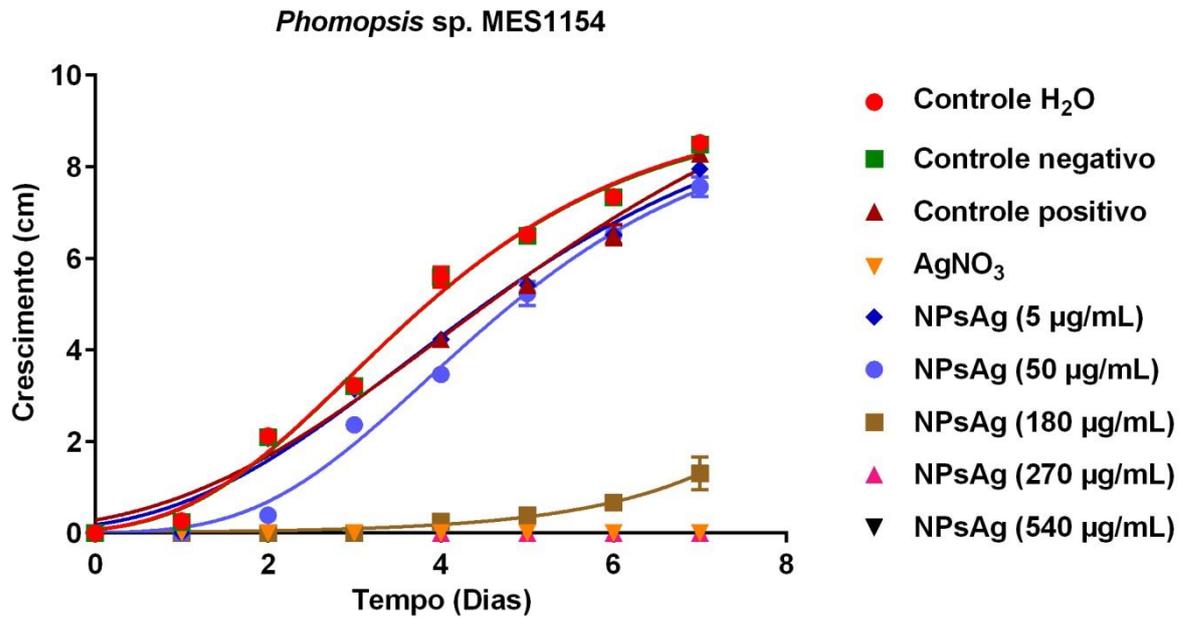


Figura 4.26 - Crescimento das colônias de *Phomopsis* sp. MES1154 medido ao longo de 7 dias inoculado em diferentes concentrações de nanopartículas de prata a 25 °C no escuro.

O resultado apresentado na Figura 4.27 mostra a inibição de 100% do crescimento do *Phomopsis* sp. MES1154 na presença de AgNO₃, porém este tratamento ocasionou oxidação do meio de cultura, impedindo assim o desenvolvimento da colônia do fungo.

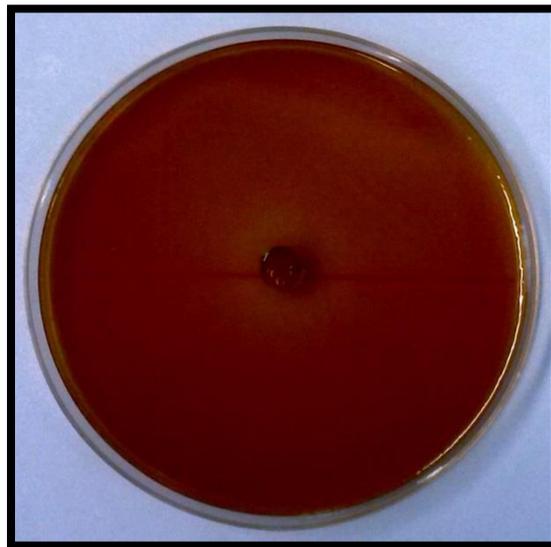


Figura 4.27 - Inibição do crescimento de *Aspergillus carbonarius* 01UAs293 na presença de AgNO₃.

Os resultados apresentados na Figura 4.28 e Figura 4.29 mostram a inibição do crescimento do *Phomopsis* sp. MES1154 na presença de nanopartículas de prata e dos controles, confirmando a atividade antifúngica de nanopartículas de prata.

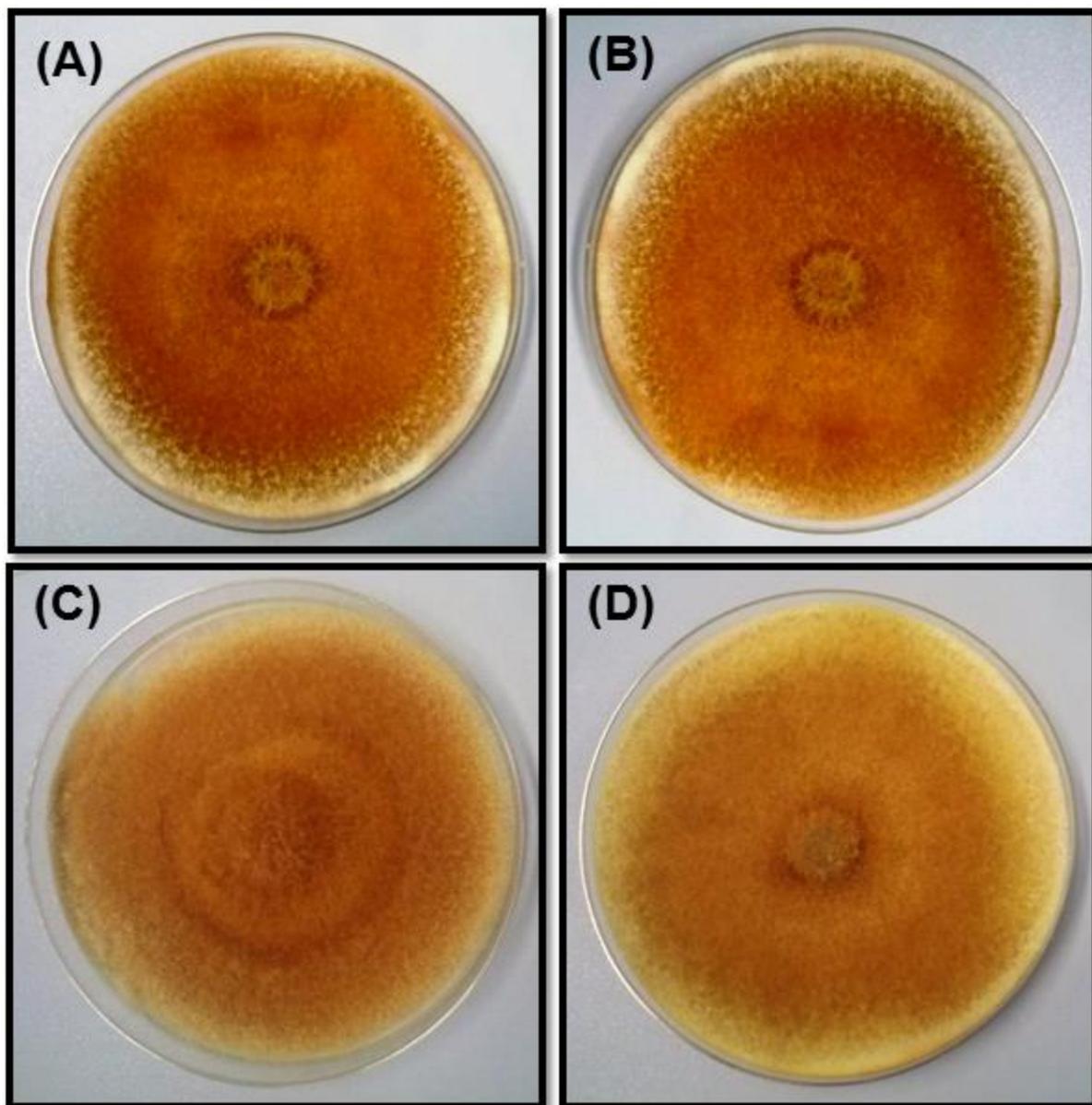


Figura 4.28 - Efeito das nanopartículas de prata e respectivos controles no crescimento do *Phomopsis* sp. MES1154 testados após 7 dias a 25 °C no escuro. (A) Controle H₂O, (B) Controle negativo (Na₃C₆H₅O₇ 0,3 mol L⁻¹ e NH₃ 1,4 mol L⁻¹), (C) Controle positivo (fungicida anfotericina B) e (D) Concentração 5 µg mL⁻¹ de nanopartículas de prata.

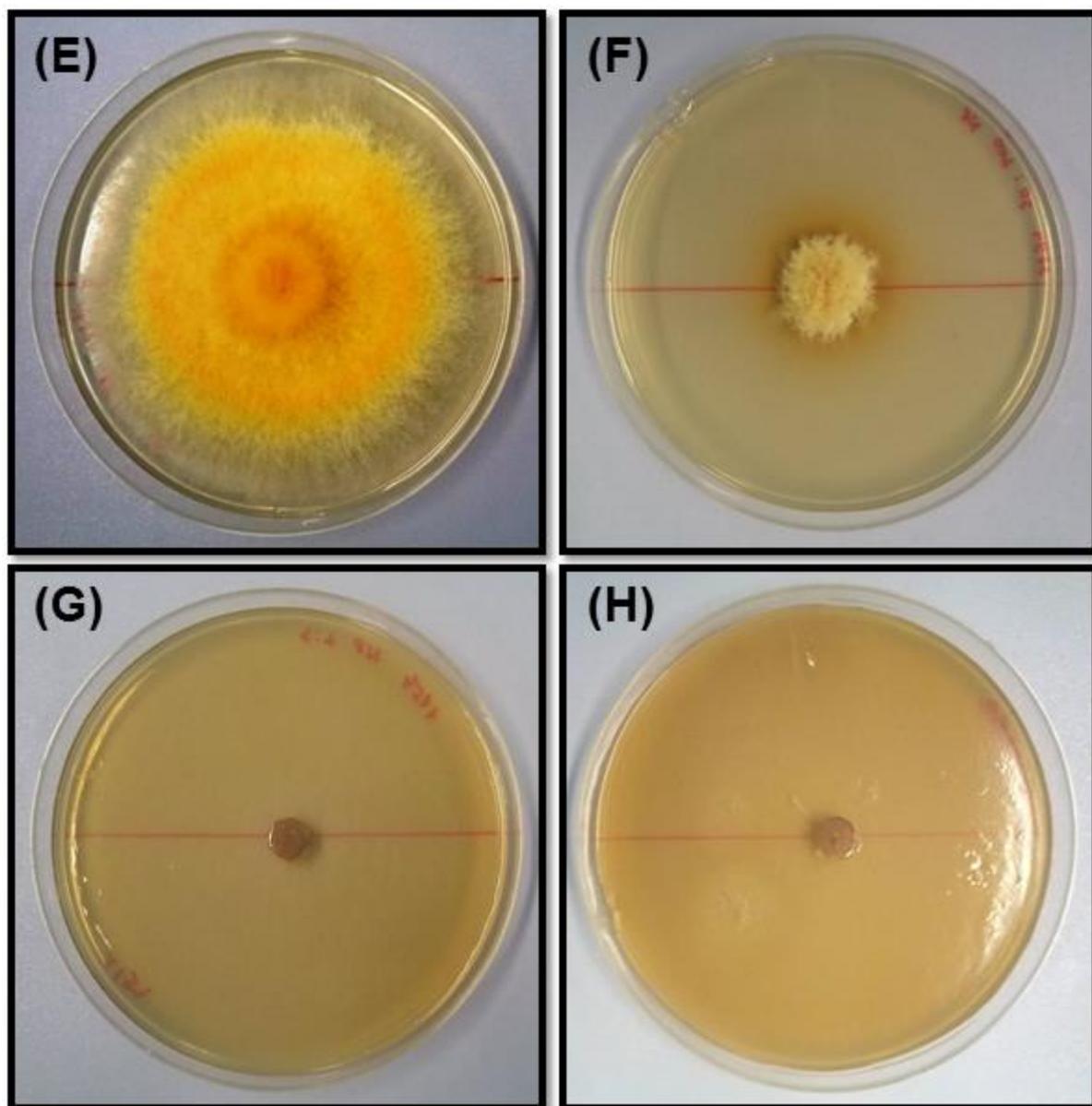


Figura 4.29 - Efeito das nanopartículas de prata no crescimento do *Phomopsis* sp. MES1154 testado após 7 dias a 25 °C no escuro. **(E)** Concentração 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, **(F)** Concentração 180 $\mu\text{g mL}^{-1}$, **(G)** Concentração 270 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e **(H)** Concentração 540 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Os percentuais de inibição da taxa de crescimento de todas as estirpes dos fungos testadas com nanopartículas de prata nas concentrações 5, 50, 180, 270 e 540 $\mu\text{g mL}^{-1}$ avaliados neste trabalho estão apresentados na Tabela 4.19.

Tabela 4.19 - Inibição da taxa de crescimento radial de todas as estirpes avaliadas neste trabalho relativamente ao controle H₂O

Compostos	Fungos					
	Inibição da taxa de crescimento radial (%)					
	92.02 ¹	567 ²	201 ³	293 ⁴	248 ⁵	1154 ⁶
Controle H ₂ O	-	-	-	-	-	-
Controle negativo	-	-	-	-	-	-
Controle positivo	24	-	-	-	7	-
AgNO ₃	100	100	100	100	100	100
AgNPs 5 µg mL ⁻¹	17	-	100	100	21	-
AgNPs 50 µg mL ⁻¹	100	100	100	100	100	21
AgNPs 180 µg mL ⁻¹	100	100	100	100	100	64
AgNPs 270 µg mL ⁻¹	100	100	100	100	100	100
AgNPs 540 µg mL ⁻¹	100	100	100	100	100	100

¹*Aspergillus parasiticus* MUM 92.02.

²*Aspergillus flavus* 08MAsp567.

³*Aspergillus flavus* 08Masp201.

⁴*Aspergillus carbonarius* 01UAs293.

⁵*Aspergillus niger* 01UAs248.

⁶*Phomopsis* sp. MES1154.

- sem inibição significativa do crescimento.

4.3 Avaliação da produção de micotoxinas por fungos *Aspergillus* spp.

4.3.1 Curva de calibração

Elaboraram-se, regularmente, curvas de calibração utilizando padrões de ocratoxina A (OTA, O1877, Sigma), aflatoxinas (AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2, respectivamente, A6636, A9887, A0138 e A0263, Sigma) e fumonisina B2 (FB2, F3771, Sigma) como já descrito no item 3.3.4. A taxa de degradação da OTA, aflatoxinas e fumonisina foram calculadas utilizando a equação 2.1. Os tempos de retenção verificados nestas condições foram de 19,35 minutos para a OTA, de 28,43, 22,90, 20, 16,70 minutos para AFB1, AFB2, AFG1 e

AFG2, respectivamente. O tempo de retenção da fumonisina B2 foi de 22,72 minutos. O limite de quantificação considerado foi à concentração do padrão mais baixo utilizado na curva de calibração. Nas Figuras A.3 a A.12 no apêndice desta tese encontram-se as curvas de calibração calculadas.

4.3.2 Inibição da produção de aflatoxinas de *Aspergillus parasiticus* MUM 92.02 por nanopartículas de prata em meio sólido

Após ser mensurado o efeito antifúngico das nanopartículas de prata no crescimento micelial, as micotoxinas foram extraídas e avaliou-se o efeito das concentrações 5, 50, 180, 270 e 540 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de nanopartículas de prata na produção de aflatoxinas (AFG2, AFB2, AFG1 e AFB1) por *Aspergillus parasiticus* MUM 92.02. Os resultados obtidos com os tratamentos de nanopartículas de prata sobre a produção de aflatoxinas estão apresentados na Figura 4.30.

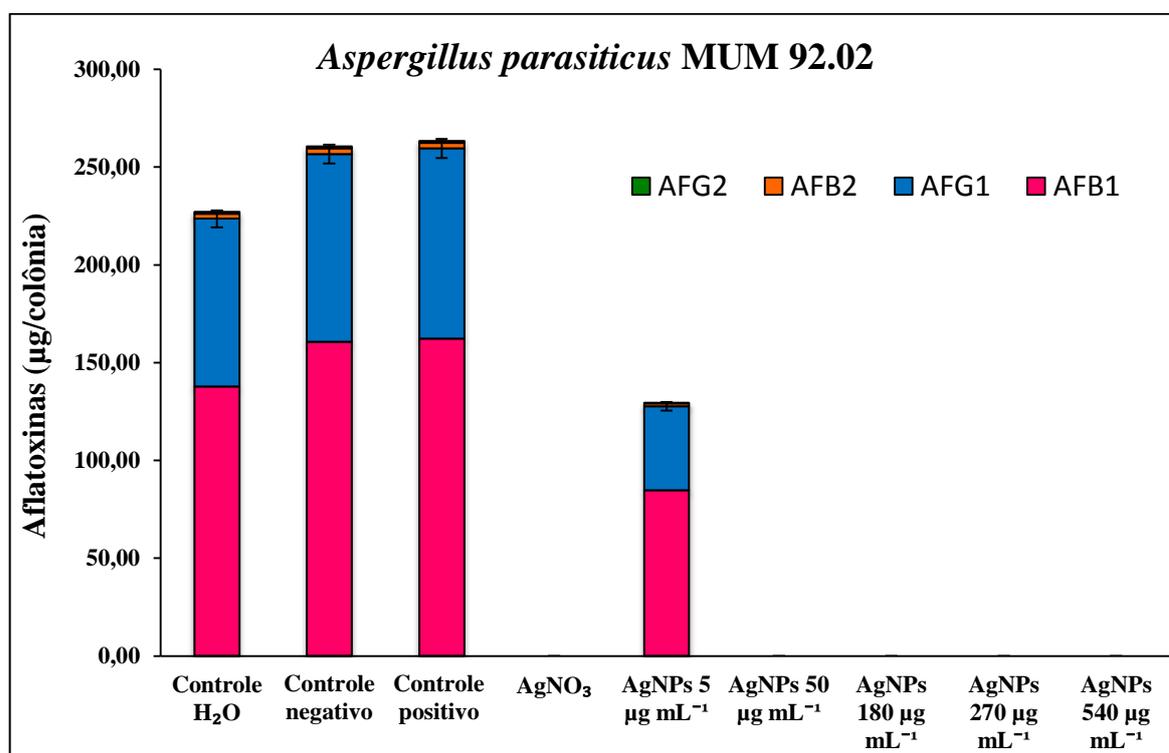


Figura 4.30 - Produção de aflatoxinas (AFG2, AFB2, AFG1 e AFB1) por *Aspergillus parasiticus* MUM 92.02 quando crescidos em PDA suplementado com concentrações 5, 50, 180, 270 e 540 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

As aflatoxinas produzidas por *Aspergillus parasiticus* MUM 92.02 em meio PDA na presença de 5, 50, 180, 270 e 540 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foram quantificadas e as médias comparadas pelo teste de Duncan ($P < 0,05$) buscando encontrar as diferenças significativas entre elas. Os resultados obtidos na fase de produção de AFG2, AFB2, AFG1 e AFB1 por esta estirpe em estudo encontram-se na Tabela 4.20.

Verificaram-se reduções significativas da produção de aflatoxinas (AFG2, AFB2, AFG1 e AFB1) comparadas relativamente ao respectivo controle quando *Aspergillus parasiticus* MUM 92.02 foi crescido na concentração de 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de nanopartículas de prata. Observou-se que nesta concentração o fungo *Aspergillus parasiticus* MUM 92.02 produziu significativamente menos aflatoxinas, 0,40, 1,40, 42,92 e 84,76 μg por placa de AFG2, AFB2, AFG1 e AFB1, respectivamente. Estes valores, quando comparados com os seus controles, traduzem-se em diminuições na produção de aflatoxinas totais (soma dos 4 tipos de aflatoxinas, AFG2, AFB2, AFG1 e AFB1) de 48%.

Observou-se que nas concentrações 50, 180, 270 e 540 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de nanopartículas de prata não houve produção de aflatoxinas (AFG2, AFB2, AFG1 e AFB1), evidenciando com este resultado o grande potencial como agente antifúngico destas nanopartículas, sendo capazes de inibir até a produção dessas substâncias tóxicas, conhecidas como micotoxinas.

No tratamento controle positivo, com o fungicida anfotericina B, não foi observada diminuição significativa na produção de aflatoxinas (AFG2, AFB2, AFG1 e AFB1), mostrando que este fungicida na concentração 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, não foi eficiente na inibição da produção de aflatoxinas do fungo *Aspergillus parasiticus* MUM 92.02.

No tratamento AgNO_3 (nitrato de prata) também não observou-se produção de aflatoxinas (AFG2, AFB2, AFG1 e AFB1).

Para as outras situações não se observaram reduções significativas na produção de aflatoxinas. Na Tabela 4.21 as diferenças da produção de aflatoxinas totais relativamente ao controle estão expressas em porcentagem.

Os cromatogramas referentes aos ensaios que produziram aflatoxinas (AFG2, AFB2, AFG1 e AFB1) podem ser consultados nas Figuras A.13 a A.16 no apêndice.

Tabela 4.20 - Produção de Aflatoxinas (AFG2, AFB2, AFG1 e AFB1) de *Aspergillus parasiticus* MUM 92.02 crescido em meio PDA suplementado com 5, 50, 180, 270 e 540 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de nanopartículas de prata

Compostos	Aflatoxinas ($\mu\text{g por col\^onia}$)			
	AFG2	AFB2	AFG1	AFB1
Controle H ₂ O	0,90±0,153 ^a	2,57±0,354 ^a	85,83±12,678 ^{a,b}	137,70±14,976 ^{a,b}
Controle negativo	0,93±0,094 ^a	2,90±0,300 ^a	96,00±11,816 ^b	160,63±14,831 ^b
Controle positivo	1,00±0,163 ^{a,b}	2,73±0,275 ^a	97,23±9,761 ^b	162,30±16,669 ^b
AgNO ₃	0,00±0,000 ^d	0,00±0,000 ^c	0,00±0,000 ^d	0,00±0,000 ^d
AgNPs 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,40±0,000 ^c	1,40±0,000 ^b	42,92±1,440 ^c	84,76±0,720 ^c
AgNPs 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,00±0,000 ^d	0,00±0,000 ^c	0,00±0,000 ^d	0,00±0,000 ^d
AgNPs 180 μg	0,00±0,000 ^d	0,00±0,000 ^c	0,00±0,000 ^d	0,00±0,000 ^d
AgNPs 270 μg	0,00±0,000 ^d	0,00±0,000 ^c	0,00±0,000 ^d	0,00±0,000 ^d
AgNPs 540 μg	0,00±0,000 ^d	0,00±0,000 ^c	0,00±0,000 ^d	0,00±0,000 ^d

Os valores apresentados são a média de nove réplicas \pm desvio padrão. Na coluna, letras diferentes correspondem a valores significativamente diferentes entre si para $P < 0,05$ segundo o teste de Duncan.

Tabela 4.21 - Inibição da produção de Aflatoxinas totais (AFG2 + AFB2 + AFG1 + AFB1) de *Aspergillus parasiticus* MUM 92.02 crescido em meio PDA suplementado com 5, 50, 180, 270 e 540 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de nanopartículas de prata

Compostos	Aflatoxinas totais (%)
Controle negativo	-
Controle positivo	-
AgNO ₃	100
AgNPs 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$	48
AgNPs 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$	100
AgNPs 180 $\mu\text{g mL}^{-1}$	100
AgNPs 270 $\mu\text{g mL}^{-1}$	100
AgNPs 540 $\mu\text{g mL}^{-1}$	100

- sem redução significativa da produção de aflatoxinas.

4.3.3 Inibição da produção de aflatoxinas de *Aspergillus flavus* 08MAsp567 por nanopartículas de prata em meio sólido

Os resultados do efeito das concentrações 5, 50, 180, 270 e 540 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de nanopartículas de prata sobre a produção de aflatoxinas (AFG1 e AFB1) de *Aspergillus flavus* 08MAsp567 estão apresentados na Figura 4.31.

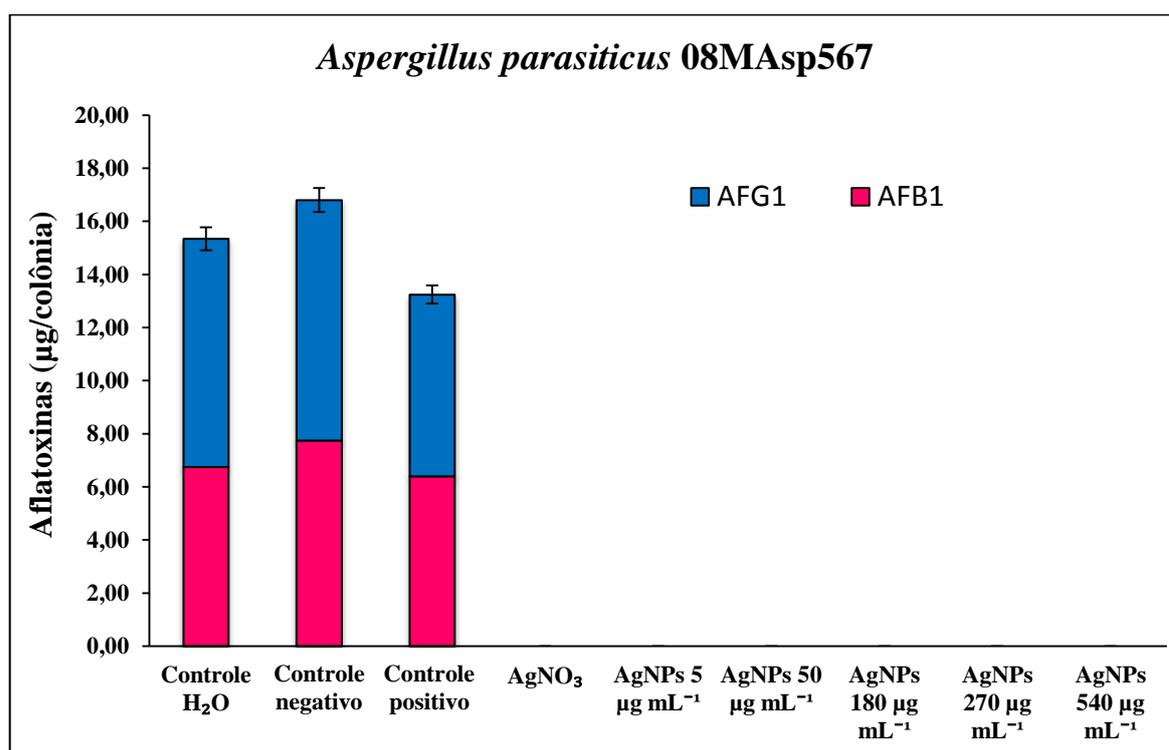


Figura 4.31 - Produção de aflatoxinas (AFG1 e AFB1) por *Aspergillus flavus* 08MAsp567 quando crescidos em PDA suplementado com concentrações 5, 50, 180, 270 e 540 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

As aflatoxinas produzidas por *Aspergillus flavus* 08MAsp567 em meio PDA na presença de 5, 50, 180, 270 e 540 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foram quantificadas e as médias comparadas pelo teste de Duncan ($P < 0,05$) buscando encontrar as diferenças significativas entre elas. Os resultados obtidos na fase de produção de AFG1 e AFB1 por *Aspergillus flavus* 08MAsp567 encontram-se na Tabela 4.22.

Constatou-se que as nanopartículas de prata em todas as concentrações (5, 50, 180, 270 e 540 $\mu\text{g mL}^{-1}$) inibiram em 100% a produção de aflatoxinas AFG1 e AFB1 por *Aspergillus flavus* 08MAsp567.

No tratamento AgNO₃ (nitrato de prata) também não observou-se produção de aflatoxinas (AFG1 e AFB1).

No tratamento controle positivo, com o fungicida anfotericina B, verificou-se uma redução significativa de 14% na produção de aflatoxinas totais (AFG1 + AFB1) comparadas relativamente ao controle H₂O e controle negativo, respectivamente. Observou-se que neste tratamento o fungo *Aspergillus flavus* 08MAsp567 produziu significativamente menos aflatoxinas, porém foi um resultado inferior comparado as concentrações de nanopartículas de prata.

Para as outras situações não se observaram reduções significativas na produção de aflatoxinas. Na Tabela 4.23 a inibição da produção de aflatoxinas totais relativamente ao controle H₂O estão expressas em porcentagem.

Os cromatogramas referentes aos ensaios que produziram aflatoxinas (AFG1 e AFB1) podem ser consultados nas Figuras A.17 a A.19 no apêndice.

Tabela 4.22 - Produção de Aflatoxinas (AFG1 e AFB1) de *Aspergillus flavus* 08MAsp567 crescido em meio PDA suplementado com 5, 50, 180, 270 e 540 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de nanopartículas de prata

Compostos	Aflatoxinas ($\mu\text{g por col\^onia}$)	
	AFG1	AFB1
Controle H ₂ O	8,60±1,802 ^a	6,74±1,255 ^a
Controle negativo	9,06±1,194 ^a	7,74±0,905 ^a
Controle positivo	6,84±2,693 ^b	6,40±1,906 ^a
AgNO ₃	0,00±0,000 ^c	0,00±0,000 ^b
AgNPs 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,00±0,000 ^c	0,00±0,000 ^b
AgNPs 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,00±0,000 ^c	0,00±0,000 ^b
AgNPs 180 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,00±0,000 ^c	0,00±0,000 ^b
AgNPs 270 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,00±0,000 ^c	0,00±0,000 ^b
AgNPs 540 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,00±0,000 ^c	0,00±0,000 ^b

Os valores apresentados são a média de nove réplicas \pm desvio padrão. Na coluna, letras diferentes correspondem a valores significativamente diferentes entre si para $P < 0,05$ segundo o teste de Duncan.

Tabela 4.23 - Inibição da produção de Aflatoxinas totais (AFG1 + AFB1) de *Aspergillus flavus* 08Masp567 crescido em meio PDA suplementado com 5, 50, 180, 270 e 540 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de nanopartículas de prata

Compostos	Aflatoxinas totais (%)
Controle negativo	-
Controle positivo	-
AgNO₃	100
AgNPs 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$	100
AgNPs 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$	100
AgNPs 180 $\mu\text{g mL}^{-1}$	100
AgNPs 270 $\mu\text{g mL}^{-1}$	100
AgNPs 540 $\mu\text{g mL}^{-1}$	100

- sem redução significativa da produção de aflatoxinas.

4.3.4 Inibição da produção de aflatoxinas de *Aspergillus flavus* 08Masp201 por nanopartículas de prata em meio sólido

Os resultados apresentados na Figura 4.32 expressam o efeito de nanopartículas de prata sobre a produção de aflatoxinas (AFB2 e AFB1) de *Aspergillus flavus* 08Masp201.

As aflatoxinas produzidas por *Aspergillus flavus* 08Masp201 em meio PDA na presença de 5, 50, 180, 270 e 540 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foram quantificadas e as médias comparadas pelo teste de Duncan ($P < 0,05$) buscando encontrar as diferenças significativas entre elas. Os resultados obtidos na fase de produção de AFB2 e AFB1 por *Aspergillus flavus* 08Masp201 encontram-se na Tabela 4.24.

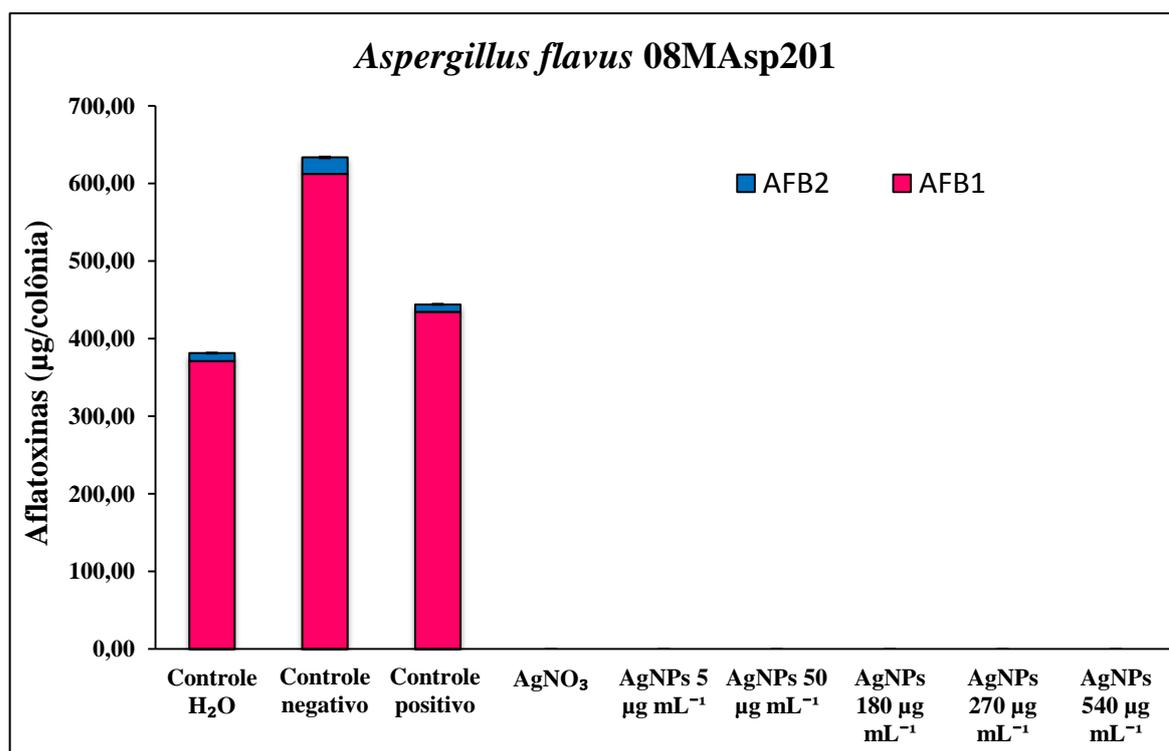


Figura 4.32 - Produção de aflatoxinas (AFB2 e AFB1) por *Aspergillus flavus* 08Masp201 quando crescidos em PDA suplementado com concentrações 5, 50, 180, 270 e 540 µg mL⁻¹.

Constatou-se que as nanopartículas de prata em todas as concentrações (5, 50, 180, 270 e 540 µg mL⁻¹) influenciou a produção de aflatoxinas AFB2 e AFB1 por *Aspergillus flavus* 08Masp201, inibindo em 100% a produção de AFB2 e AFB1.

No tratamento AgNO₃ (nitrito de prata) também não observou-se a produção de aflatoxinas (AFB2 e AFB1).

No tratamento controle positivo, com o fungicida anfotericina B, não foi verificado uma redução significativa na produção de aflatoxinas totais (AFB2 + AFB1) comparadas relativamente ao controle H₂O. No entanto, no controle negativo ocorreu uma maior produção de AFB2 e AFB1, comparada aos controles H₂O e positivo, esse aumento foi de 40 e 30%, respectivamente. Na Tabela 4.25 a inibição da produção de aflatoxinas totais comparada relativamente ao controle H₂O está expressa em porcentagem.

Os cromatogramas referentes aos ensaios que produziram aflatoxinas (AFB2 e AFB1) podem ser consultados nas Figuras A.20 a A.22 no apêndice.

Tabela 4.24 - Produção de Aflatoxinas (AFB2 e AFB1) de *Aspergillus flavus* 08Masp201 crescido em meio PDA suplementado com 5, 50, 180, 270 e 540 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de nanopartículas de prata

Compostos	Aflatoxinas ($\mu\text{g por col\^onia}$)	
	AFB2	AFB1
Controle H ₂ O	9,98±1,966 ^a	371,53±43,265 ^a
Controle negativo	21,23±4,300 ^b	612,54±68,568 ^b
Controle positivo	9,69±3,015 ^a	434,69±75,783 ^a
AgNO ₃	0,00±0,000 ^c	0,00±0,000 ^c
AgNPs 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,00±0,000 ^c	0,00±0,000 ^c
AgNPs 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,00±0,000 ^c	0,00±0,000 ^c
AgNPs 180 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,00±0,000 ^c	0,00±0,000 ^c
AgNPs 270 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,00±0,000 ^c	0,00±0,000 ^c
AgNPs 540 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,00±0,000 ^c	0,00±0,000 ^c

Os valores apresentados são a média de nove réplicas \pm desvio padrão. Na coluna, letras diferentes correspondem a valores significativamente diferentes entre si para $P < 0,05$ segundo o teste de Duncan.

Tabela 4.25 - Inibição da produção de Aflatoxinas totais (AFB2 + AFB1) de *Aspergillus flavus* 08Masp201 crescido em meio PDA suplementado com 5, 50, 180, 270 e 540 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de nanopartículas de prata

Compostos	Aflatoxinas totais (%)
Controle negativo	-
Controle positivo	-
AgNO ₃	100
AgNPs 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$	100
AgNPs 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$	100
AgNPs 180 $\mu\text{g mL}^{-1}$	100
AgNPs 270 $\mu\text{g mL}^{-1}$	100
AgNPs 540 $\mu\text{g mL}^{-1}$	100

- sem redução significativa da produção de aflatoxinas.

4.3.5 Inibição da produção de ocratoxina A (OTA) de *Aspergillus carbonarius* 01UAs293 por nanopartículas de prata em meio sólido

Na figura 4.33 estão os resultados das concentrações 5, 50, 180, 270 e 540 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de nanopartículas de prata sobre a produção de OTA em *Aspergillus carbonarius* 01UAs293.

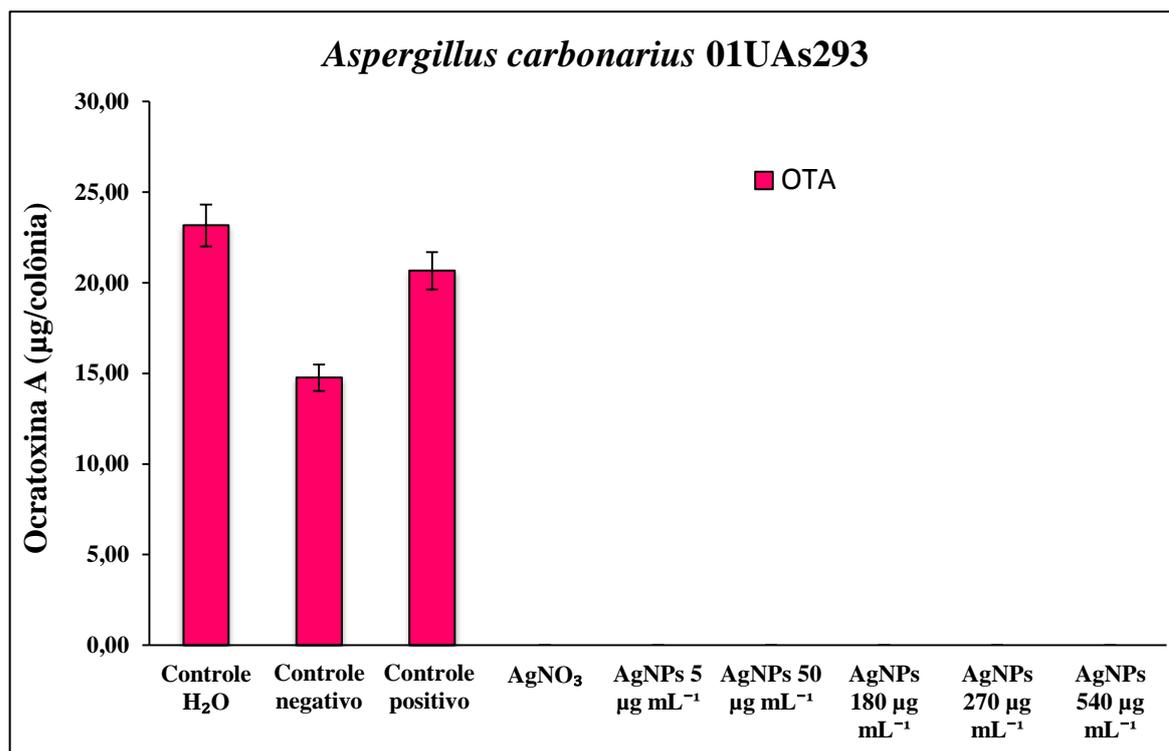


Figura 4.33 - Produção de ocratoxina A (OTA) por *Aspergillus carbonarius* 01UAs293 quando crescidos em MEA suplementado com concentrações 5, 50, 180, 270 e 540 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

A OTA produzida por *Aspergillus carbonarius* 01UAs293 em meio MEA na presença de 5, 50, 180, 270 e 540 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foram quantificadas e as médias comparadas pelo teste de Duncan ($P < 0,05$) buscando encontrar as diferenças significativas entre elas. Os resultados obtidos na fase de produção de OTA por esta estirpe em estudo encontram-se na Tabela 4.26

Verificou-se que nas concentrações 5, 50, 180, 270 e 540 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de nanopartículas de prata não houve produção de OTA por *Aspergillus carbonarius* 01UAs293, evidenciando com este resultado o grande potencial como agente antifúngico destas nanopartículas, sendo capazes de inibir até a produção dessas substâncias tóxicas, conhecidas como micotoxinas que causam sérios problemas de saúde quando ingeridas. No tratamento AgNO₃ (nitrato de prata) também não foi verificada a produção de OTA.

No tratamento controle positivo, com o fungicida anfotericina B, não foi observada diminuição significativa na produção OTA mostrando que este fungicida na concentração 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, não foi eficiente na inibição da produção de OTA do fungo por *Aspergillus carbonarius* 01UAs293.

Para as outras situações não se observaram reduções significativas na produção de OTA. Na Tabela 4.27 as diferenças da inibição de OTA relativamente ao controle H₂O estão expressas em porcentagem. Os cromatogramas referentes aos ensaios que produziram ocratoxina A podem ser consultados nas Figuras A.23 a A.25 no apêndice.

Tabela 4.26 - Produção de ocratoxina A (OTA) de *Aspergillus carbonarius* 01UAs293 crescido em meio MEA suplementado com 5, 50, 180, 270 e 540 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de nanopartículas de prata

Compostos	Ocratoxina A ($\mu\text{g por colônia}$)
Controle H ₂ O	23,17±4,031 ^a
Controle negativo	14,76±4,023 ^{a,b}
Controle positivo	20,67±3,687 ^a
AgNO ₃	0,00±0,000 ^c
AgNPs 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,00±0,000 ^c
AgNPs 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,00±0,000 ^c
AgNPs 180 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,00±0,000 ^c
AgNPs 270 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,00±0,000 ^c
AgNPs 540 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,00±0,000 ^c

Os valores apresentados são a média de nove réplicas \pm desvio padrão. Na coluna, letras diferentes correspondem a valores significativamente diferentes entre si para $P < 0,05$ segundo o teste de Duncan.

Tabela 4.27 - Inibição da produção de ocratoxina A (OTA) de *Aspergillus carbonarius* 01UAs293 crescido em meio MEA suplementado com 5, 50, 180, 270 e 540 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de nanopartículas de prata

Compostos	Ocratoxina A (%)
Controle negativo	-
Controle positivo	-
AgNO ₃	100
AgNPs 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$	100
AgNPs 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$	100
AgNPs 180 $\mu\text{g mL}^{-1}$	100
AgNPs 270 $\mu\text{g mL}^{-1}$	100
AgNPs 540 $\mu\text{g mL}^{-1}$	100

- sem redução significativa da produção de ocratoxina.

4.3.6 Inibição da produção de fumonisina B2 (FB2) de *Aspergillus niger* 01UAs248 por nanopartículas de prata em meio sólido

Após ser mensurado o efeito antifúngico das nanopartículas de prata no crescimento micelial fúngico, avaliou-se o efeito das concentrações 5, 50, 180, 270 e 540 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de nanopartículas de prata na produção de fumonisina B2 (FB2) por *Aspergillus niger* 01UAs248. Os resultados obtidos com os tratamentos de nanopartículas de prata nas 5 diferentes concentrações sobre a produção de fumonisina estão apresentados na Figura 4.34. Os cromatogramas referentes aos ensaios que produziram fumonisina B2 (FB2) podem ser consultados nas Figuras A.26 a A.29 no apêndice.

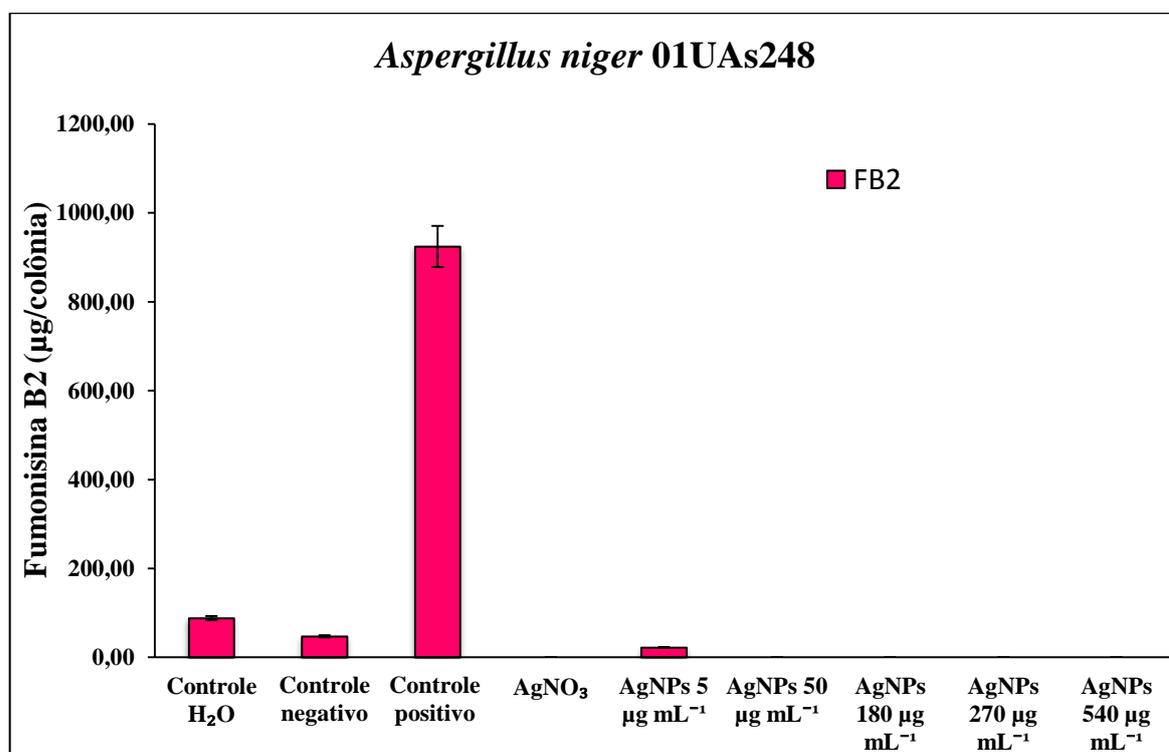


Figura 4.34 - Produção de fumonisina B2 (FB2) por *Aspergillus niger* 01UAs248 quando crescidos em PDA suplementado com concentrações 5, 50, 180, 270 e 540 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

A fumonisina B2 (FB2) produzida por *Aspergillus niger* 01UAs248 em meio PDA na presença de 5, 50, 180, 270 e 540 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foram quantificadas e as médias comparadas pelo teste de Duncan ($P < 0,05$) buscando encontrar as diferenças significativas entre elas. Os resultados obtidos na fase de produção de FB2 por *Aspergillus niger* 01UAs248 encontram-se na Tabela 4.28.

Observou-se uma redução significativa da produção de fumonisina B2 (FB2) por *Aspergillus niger* 01UAs248 na concentração de 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de nanopartículas de prata. Os resultados mostraram que nesta concentração esta estirpe do fungo inibiu 98% a produção de FB2, quando comparado aos controles H₂O, negativo e positivo.

Nas concentrações 50, 180, 270 e 540 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de nanopartículas de prata não houve produção de fumonisina B2 (FB2), evidenciando novamente o grande potencial como agente antifúngico destas nanopartículas, inibindo a produção de FB2. No tratamento AgNO₃ (nitrato de prata) também não foi verificada a produção de fumonisina B2 (FB2).

No tratamento controle positivo, com o fungicida anfotericina B, não foi observada diminuição significativa na produção fumonisina B2, mostrando que este fungicida na concentração 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, não foi eficiente na inibição da produção de FB2. No entanto, o uso deste fungicida, provocou um estresse biológico no fungo *Aspergillus niger* 01UAs248 ocasionando uma produção muito elevada de FB2. Neste tratamento, a estirpe avaliada produziu 924,22 μg por colônia, em comparação a concentração de 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de nanopartículas de prata produziu 21,98 μg por colônia, o que corresponde a uma exagerada produção de fumonisina B2. Desse modo, o fungicida anfotericina B ao invés de inibir, estimulou a produção de FB2. Para os outros tratamentos não se observaram reduções significativas na produção de FB2. Na Tabela 4.29 as diferenças de inibição de fumonisina B2 (FB2) relativamente ao controle H₂O estão expressas em porcentagem.

Tabela 4.28 - Produção de fumonisina B2 (FB2) de *Aspergillus niger* 01UAs248 crescido em meio PDA suplementado com 5, 50, 180, 270 e 540 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de nanopartículas de prata

Compostos	Fumonisina B2 (μg por colônia)
Controle H ₂ O	88,26±70,078 ^a
Controle negativo	47,18±44,021 ^{a,b}
Controle positivo	924,22±197,726 ^c
AgNO ₃	0,00±0,000 ^e
AgNPs 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$	21,98±10,549 ^d
AgNPs 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,00±0,000 ^e
AgNPs 180 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,00±0,000 ^e
AgNPs 270 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,00±0,000 ^e
AgNPs 540 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,00±0,000 ^e

Os valores apresentados são a média de nove réplicas \pm desvio padrão. Na coluna, letras diferentes correspondem a valores significativamente diferentes entre si para P<0,05 segundo o teste de Duncan.

Tabela 4.29 - Inibição da produção de fumonisina B2 (FB2) de *Aspergillus niger* 01UAs248 crescido em meio PDA suplementado com 5, 50, 180, 270 e 540 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de nanopartículas de prata

Compostos	Fumonisin B2 (%)
Controle negativo	-
Controle positivo	-
AgNO₃	100
AgNPs 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$	98
AgNPs 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$	100
AgNPs 180 $\mu\text{g mL}^{-1}$	100
AgNPs 270 $\mu\text{g mL}^{-1}$	100
AgNPs 540 $\mu\text{g mL}^{-1}$	100

- sem redução significativa da produção de fumonisina.

4.4 Inibição do crescimento de *Aspergillus* spp. pela concentração inibitória mínima (CIM) de nanopartículas de prata em microplaca

4.4.1 Inibição do crescimento de *Aspergillus parasiticus* MUM 92.02 pela concentração inibitória mínima (CIM) de nanopartículas de prata em microplaca

A figura 4.35 indica a redução em percentual de germinação dos esporos de *Aspergillus parasiticus* MUM 92.02 em relação ao aumento das concentrações de nanopartículas de prata em comparação aos controles onde não houve adição de nanopartículas de prata.

No ensaio de microdilução em caldo com o corante resazurina na avaliação de 24 horas foi constatado que todas as leituras estavam abaixo de zero, ou seja, não houve crescimento do fungo e também não foi observada mudança na coloração. Como foi mencionado anteriormente, a resazurina possui coloração azul que é oxidada na presença de micro-organismos, ocorrendo mudança para a coloração rosa, sendo possível visualizar a presença do crescimento fúngico. No ensaio 48 horas foram observadas o efeito das nanopartículas de prata. Com base nas leituras espectrofotométricas efetuadas foi determinada a CIM= 6,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$. De acordo com os resultados 6,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (CIM) foi a concentração mais baixa na qual se deu a inibição total do crescimento do fungo. No ensaio 72 horas os resultados foram idênticos ao das 48 horas. A única diferença entre os dois tempos (48 e 72

horas) foi o maior crescimento fúngico nos tratamentos (poços) controle H₂O, controle negativo e controle positivo, por isso a absorbância foi maior. Desse modo, o aumento da absorbância é visualizado pela coloração amarela na microplaca, que é onde teve o maior crescimento do fungo (Figura 4.36). Nos poços de coloração azul não foi constatado a germinação dos esporos. Observou-se que o fungicida não inibiu significativamente o crescimento fúngico, pois a concentração utilizada deve ter sido baixa, sendo necessária uma concentração mais elevada.

O valor de IC₅₀ de nanopartículas de prata para *Aspergillus parasiticus* MUM 92.02 é de 3,6 µg mL⁻¹, como pode ser visto na Tabela 4.30. Nesta tabela encontram-se os resultados estatísticos do ajuste não linear dos dados de acordo com o modelo utilizado.

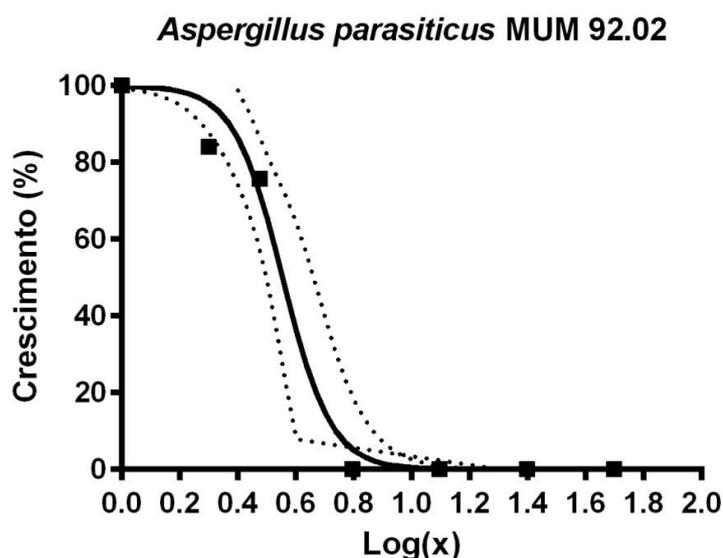


Figura 4.35 - Log(x) das concentrações de nanopartículas de prata sobre o crescimento de *Aspergillus parasiticus* MUM 92.02. Sem nanopartícula de prata (Log(x) =0) o fungo cresceu 100%.

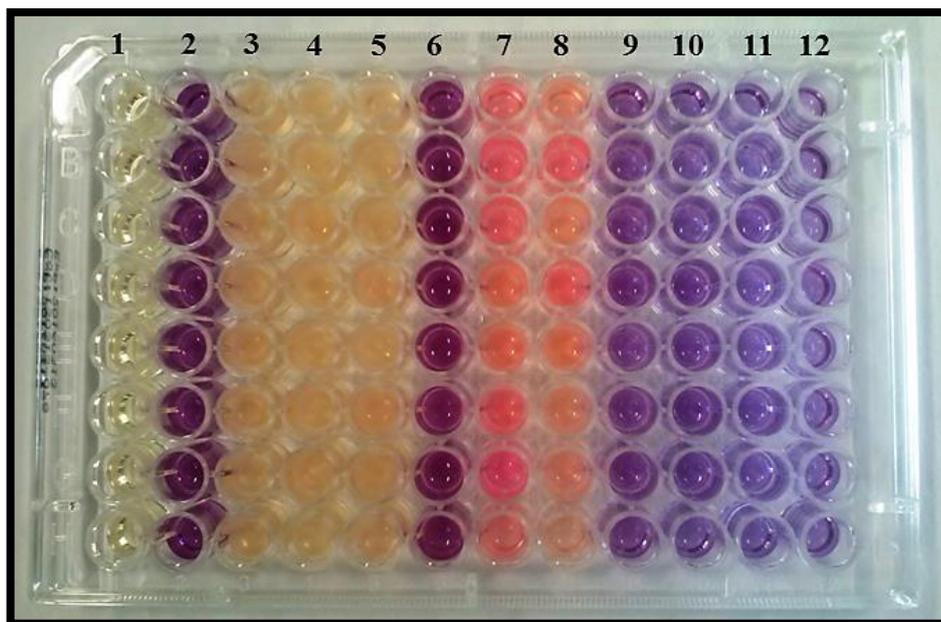


Figura 4.36 - A concentração inibitória mínima (CIM= $6,25 \mu\text{g mL}^{-1}$) de nanopartículas de prata em *Aspergillus parasiticus* MUM 92.02. (1) meio de cultura sem inóculo, (2) meio de cultura + resazurina sem inóculo, (3) controle H_2O , (4) controle negativo, (5) controle positivo, (6) AgNO_3 , (7) AgNPs $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, (8) AgNPs $3 \mu\text{g mL}^{-1}$, (9) AgNPs $6,25 \mu\text{g mL}^{-1}$, (10) AgNPs $12,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, (11) AgNPs $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ e (12) AgNPs $50 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Tabela 4.30 - IC_{50} de nanopartículas de prata para a estirpe de *Aspergillus parasiticus* MUM 92.02

Cálculo de IC_{50}						
Log(x)	Compostos $\mu\text{g mL}^{-1}$	Absorbância	% ^a	IC_{50} (μg) ^b	IC_{95} (μg) ^c	R^2 ^d
-	1*	1,44	100	3,6	3,013 - 4,293	0,9841
0,30103	1	1,21	84,03			
0,47712	3	1,09	75,76			
0,79588	6,25	0	0			
1,09691	12,5	0	0			
1,39794	25	0	0			
1,69897	50	0	0			

*Fungicida anfotericina B $1 \mu\text{g mL}^{-1}$;

^a Porcentagem de inibição do crescimento fúngico.

^b IC_{50} = concentração de nanopartículas de prata para a qual existe uma inibição de 50% determinada por ajuste dos dados experimentais à equação de Hill utilizando o programa informático Prism 6, GraphPad Software, Inc, San Diego, CA, USA.

^c Intervalo de confiança de 95% para o valor de IC_{50} obtido.

^d Coeficiente de correlação da curva ajustada.

4.4.2 Inibição do crescimento de *Aspergillus flavus* 08MAsp567 pela concentração inibitória mínima (CIM) de nanopartículas de prata em microplaca

A figura 4.37 indica a redução em percentual de germinação dos esporos de *Aspergillus flavus* 08MAsp567 em relação ao aumento das concentrações de nanopartículas de prata em comparação aos controles onde não houve adição de nanopartículas de prata.

No ensaio 24 horas para o teste de microdiluuição em caldo com o corante resazurina para a estirpe *Aspergillus flavus* 08MAsp567 foi constatado que todas as leituras são inferiores a zero, ou seja, não houve crescimento do fungo e também não foi observada mudança na coloração. No ensaio 48 horas foi possível visualizar o efeito das nanopartículas de prata na germinação dos esporos.

De acordo com os resultados $6,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ (CIM) foi a concentração mais baixa na qual se deu a inibição total do crescimento do fungo. Os ensaios das 48 e 72 horas mostram os resultados semelhantes. A diferença entre os dois tempos de leitura (48 e 72 horas) foi o maior crescimento fúngico nos tratamentos (poços) controle H_2O , controle negativo e controle positivo, por isso a absorbância foi maior. Desse modo, o aumento da absorbância é visualizado pela coloração amarela na microplaca, que é onde teve o maior crescimento do fungo (Figura 4.38).

Nos poços de coloração azul não foi constatado a germinação dos esporos. Observou-se que o fungicida na concentração $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ não foi suficiente para inibir significativamente o crescimento de *Aspergillus flavus* 08MAsp567, pois a concentração utilizada deve ter sido baixa, sendo necessária uma concentração mais elevada.

O valor de IC_{50} de nanopartículas de prata para *Aspergillus flavus* 08MAsp567 é de $3,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, como pode ser visto na Tabela 4.31. Nesta tabela também encontram-se os resultados estatísticos do ajuste não linear dos dados de acordo com o modelo utilizado.

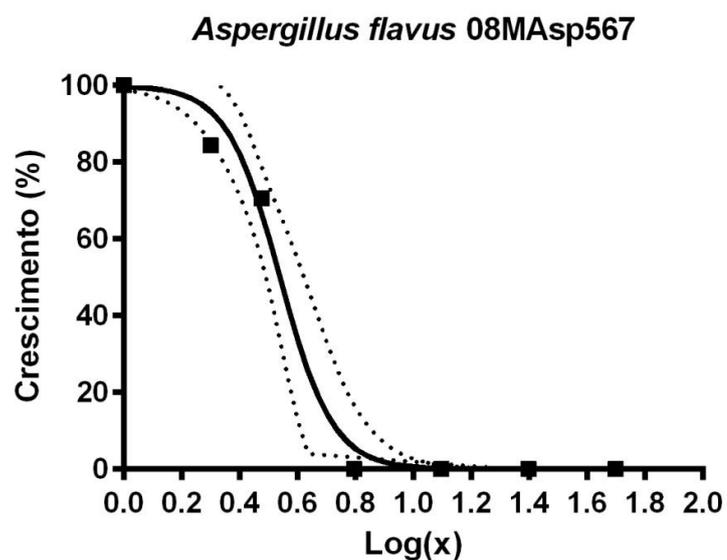


Figura 4.37 - Log(x) das concentrações de nanopartículas de prata sobre o crescimento de *Aspergillus flavus* 08MAsp567. Sem nanopartícula de prata (Log(x) =0) o fungo cresceu 100%.

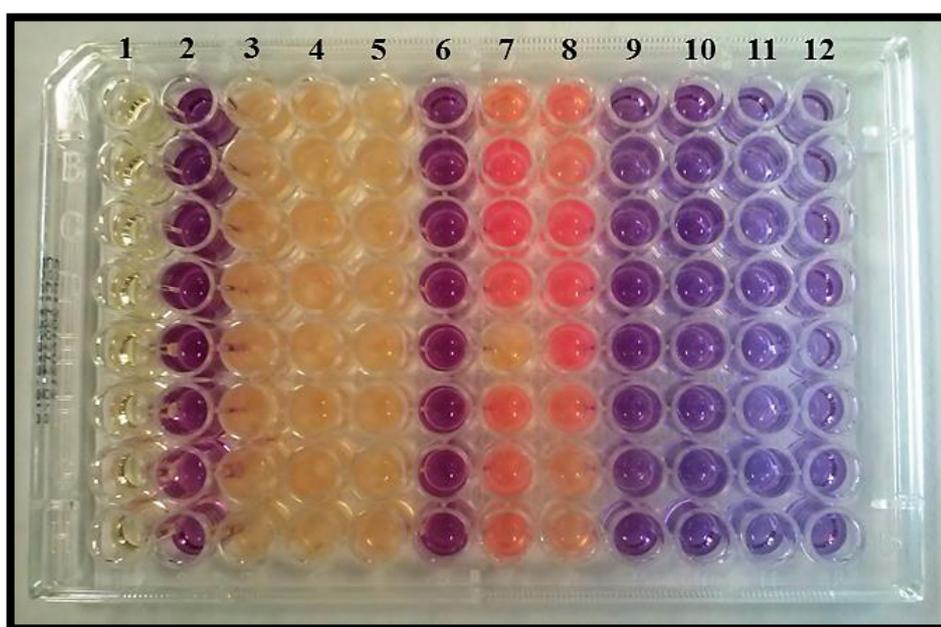


Figura 4.38 - A concentração inibitória mínima (CIM= $6,25 \mu\text{g mL}^{-1}$) de nanopartículas de prata em *Aspergillus flavus* 08MAsp567. (1) meio de cultura sem inóculo, (2) meio de cultura + resazurina sem inóculo, (3) controle H_2O , (4) controle negativo, (5) controle positivo, (6) AgNO_3 , (7) AgNPs $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, (8) AgNPs $3 \mu\text{g mL}^{-1}$, (9) AgNPs $6,25 \mu\text{g mL}^{-1}$, (10) AgNPs $12,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, (11) AgNPs $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ e (12) AgNPs $50 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Tabela 4.31 - IC₅₀ de nanopartículas de prata para a estirpe de *Aspergillus flavus* 08MAsp567

Cálculo de IC ₅₀						
Log(x)	Compostos µg mL ⁻¹	Absorbância	% ^a	IC ₅₀ (µg) ^b	IC ₉₅ (µg) ^c	R ² ^d
-	1*	1,79	100	3,5	3,021 - 3,986	0,9882
0,30103	1	1,51	84,40			
0,47712	3	1,26	70,58			
0,79588	6,25	0	0			
1,09691	12,5	0	0			
1,39794	25	0	0			
1,69897	50	0	0			

*Fungicida anfotericina B 1 µg mL⁻¹.

^a Porcentagem de inibição do crescimento fúngico.

^b IC₅₀ = concentração de nanopartículas de prata para a qual existe uma inibição de 50% determinada por ajuste dos dados experimentais à equação de Hill utilizando o programa informático Prism 6, GraphPad Software, Inc, San Diego, CA, USA.

^c Intervalo de confiança de 95% para o valor de IC₅₀ obtido.

^d Coeficiente de correlação da curva ajustada.

4.4.3 Inibição do crescimento de *Aspergillus flavus* 08Masp201 pela concentração inibitória mínima (CIM) de nanopartículas de prata em microplaca

A figura 4.39 indica a redução em percentual de germinação dos esporos de *Aspergillus flavus* 08Masp201 em relação ao aumento das concentrações de nanopartículas de prata em comparação aos controles onde não houve adição de nanopartículas de prata.

No ensaio 24 horas para o teste de microdiluuição em caldo com o corante resazurina para a estirpe *Aspergillus flavus* 08Masp201 não houve crescimento do fungo e também não foi observada mudança na coloração. No ensaio 48 horas foi possível visualizar o efeito das nanopartículas de prata de prata na germinação dos esporos.

De acordo com os resultados 6,25 µg mL⁻¹ (CIM) foi a concentração mais baixa na qual se deu a inibição total do crescimento do fungo. Os ensaios das 48 e 72 horas mostram os resultados semelhantes. Nas leituras de 72 horas o crescimento fúngico foi mais pronunciado nos tratamentos (poços) controle H₂O, controle negativo e controle positivo, por isso a absorbância foi maior. Desse modo, o aumento da absorbância é visualizado pela coloração

amarela na microplaca, que é onde teve o maior crescimento do fungo e conseqüentemente uma maior oxidação do corante resazurina (Figura 4.40).

Nos poços de coloração azul (na presença das nanopartículas de prata nas concentrações 6,25, 12,5, 25 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) não ocorreu a germinação dos esporos. Observou-se que o fungicida na concentração 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ não foi suficiente para inibir significativamente o crescimento de *Aspergillus flavus* 08Masp201, pois a concentração utilizada deve ter sido baixa, sendo necessária uma concentração mais elevada.

Na Tabela 4.32 podem ser consultados os resultados estatísticos do ajuste não linear dos dados de acordo com o modelo utilizado e o valor de IC_{50} de nanopartículas de prata para *Aspergillus flavus* 08Masp201 ($\text{IC}_{50} = 3,3 \mu\text{g mL}^{-1}$).

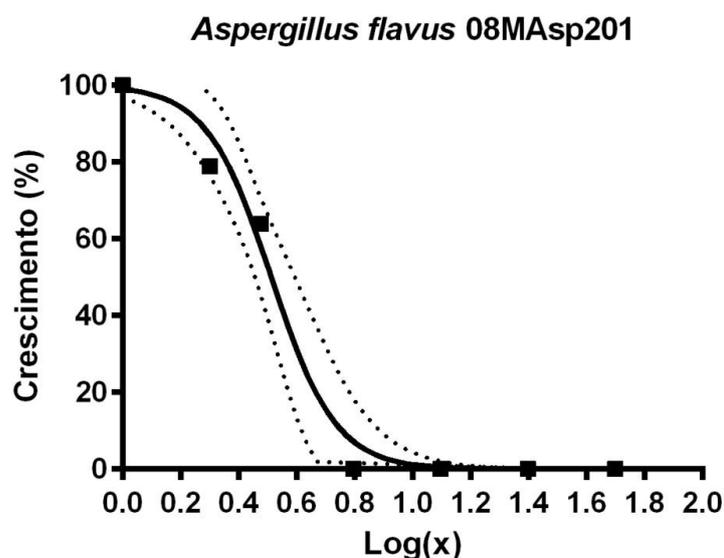


Figura 4.39 - Log(x) das concentrações de nanopartículas de prata sobre o crescimento de *Aspergillus flavus* 08Masp201. Sem nanopartícula de prata (Log(x) =0) o fungo cresceu 100%.

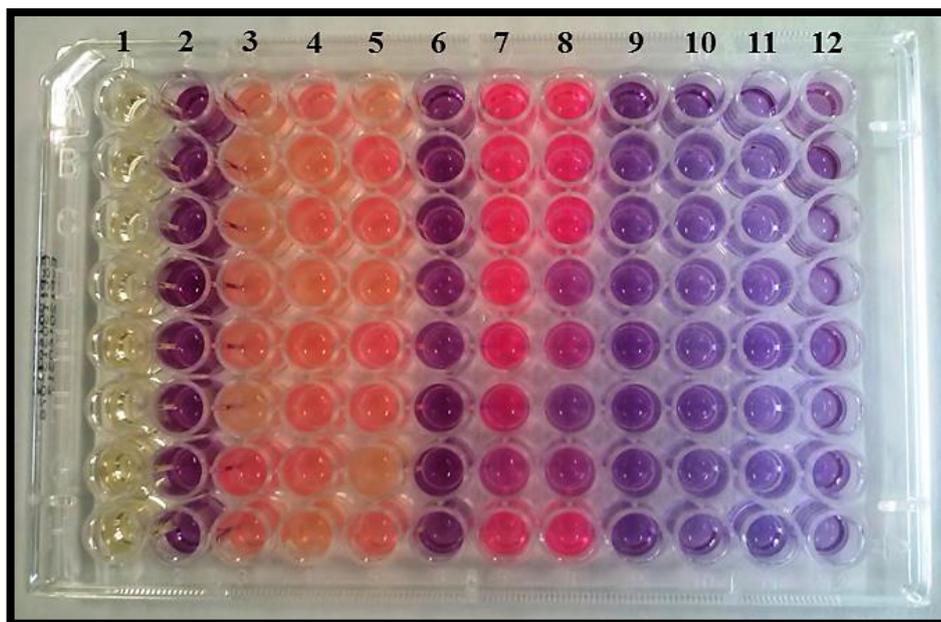


Figura 4.40 - A concentração inibitória mínima (CIM= $6,25 \mu\text{g mL}^{-1}$) de nanopartículas de prata em *Aspergillus flavus* 08Masp201. (1) meio de cultura sem inóculo, (2) meio de cultura + resazurina sem inóculo, (3) controle H_2O , (4) controle negativo, (5) controle positivo, (6) AgNO_3 , (7) AgNPs $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, (8) AgNPs $3 \mu\text{g mL}^{-1}$, (9) AgNPs $6,25 \mu\text{g mL}^{-1}$, (10) AgNPs $12,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, (11) AgNPs $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ e (12) AgNPs $50 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Tabela 4.32 - IC_{50} de nanopartículas de prata para a estirpe de *Aspergillus flavus* 08Masp201

Cálculo de IC_{50}						
Log(x)	Compostos $\mu\text{g mL}^{-1}$	Absorbância	% ^a	IC_{50} (μg) ^b	IC_{95} (μg) ^c	R^2 ^d
-	1*	1,91	100	3,3	2,824 - 3,765	0,9845
0,30103	1	1,51	78,97			
0,47712	3	1,22	63,86			
0,79588	6,25	0	0			
1,09691	12,5	0	0			
1,39794	25	0	0			
1,69897	50	0	0			

*Fungicida anfotericina B $1 \mu\text{g mL}^{-1}$.

^a Porcentagem de inibição do crescimento fúngico.

^b IC_{50} = concentração de nanopartículas de prata para a qual existe uma inibição de 50% determinada por ajuste dos dados experimentais à equação de Hill utilizando o programa informático Prism 6, GraphPad Software, Inc, San Diego, CA, USA.

^c Intervalo de confiança de 95% para o valor de IC_{50} obtido.

^d Coeficiente de correlação da curva ajustada.

4.4.4 Inibição do crescimento de *Aspergillus carbonarius* 01UAs293 pela concentração inibitória mínima (CIM) de nanopartículas de prata em microplaca

A figura 4.41 indica a redução em percentual de germinação dos esporos de *Aspergillus carbonarius* 01UAs293 em relação ao aumento das concentrações de nanopartículas de prata em comparação aos controles onde não houve adição de nanopartículas de prata.

No ensaio 24 horas as leituras estavam abaixo de zero, ou seja, não houve crescimento do fungo e também não foi observada mudança na coloração. No ensaio 48 horas foi observado o efeito das nanopartículas de prata e com base nas leituras efetuadas foi determinada a CIM= 6,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$, a concentração mais baixa a que se deu a inibição total do crescimento fúngico. No ensaio 72 horas os resultados foram idênticos ao das 48 horas. A única diferença é que o fungo teve um maior crescimento mais por isso a absorvância foi maior. A coloração amarela é onde teve o maior crescimento do fungo.

Nos poços de coloração azul (na presença das nanopartículas de prata nas concentrações 6,25, 12,5, 25 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) não ocorreu a germinação dos esporos.

Observou-se que o fungicida não inibiu significativamente o crescimento fúngico, pois a concentração utilizada deve ter sido baixa (1 $\mu\text{g mL}^{-1}$), sendo necessária uma concentração mais elevada (Figura 4.42).

Na Tabela 4.33 podem ser consultados os resultados estatísticos do ajuste não linear dos dados de acordo com o modelo utilizado e o valor de IC₅₀ de nanopartículas de prata para *Aspergillus carbonarius* 01UAs293 (IC₅₀= 1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Este fungo mostrou ser mais sensível as nanopartículas de prata tendo 50% do seu crescimento inibido com uma concentração menor de nanopartículas de prata em comparação com as outras estirpes avaliadas neste trabalho.

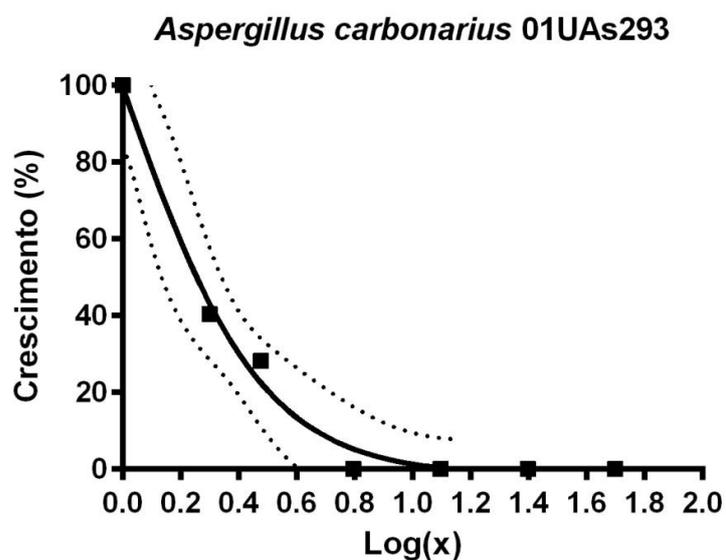


Figura 4.41 - Log(x) das concentrações de nanopartículas de prata sobre o crescimento de *Aspergillus carbonarius* 01UAs293. Sem nanopartícula de prata (Log(x) =0) o fungo cresceu 100%.

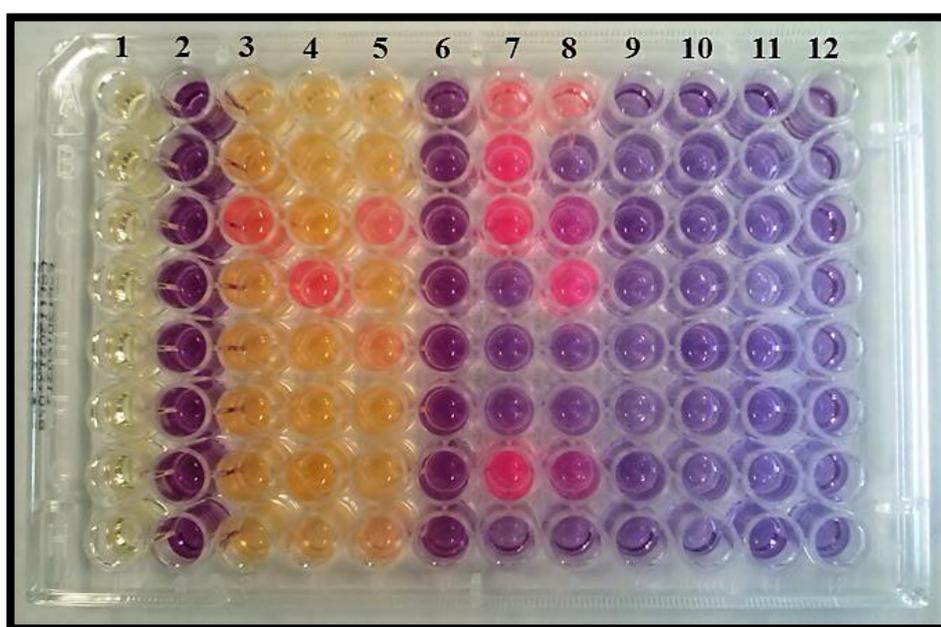


Figura 4.42 - A concentração inibitória mínima (CIM= 6,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$) de nanopartículas de prata em *Aspergillus carbonarius* 01UAs293. (1) meio de cultura sem inóculo, (2) meio de cultura + resazurina sem inóculo, (3) controle H₂O, (4) controle negativo, (5) controle positivo, (6) AgNO₃, (7) AgNPs 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, (8) AgNPs 3 $\mu\text{g mL}^{-1}$, (9) AgNPs 6,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$, (10) AgNPs 12,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, (11) AgNPs 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e (12) AgNPs 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Tabela 4.33 - IC₅₀ de nanopartículas de prata para a estirpe de *Aspergillus carbonarius* 01UAs293

Cálculo de IC ₅₀						
Log(x)	Compostos µg mL ⁻¹	Absorbância	% ^a	IC ₅₀ (µg) ^b	IC ₉₅ (µg) ^c	R ² ^d
-	1*	1,24	100	1,0	1,376 - 1,379	0,9830
0,30103	1	0,50	50			
0,47712	3	0,35	28,18			
0,79588	6,25	0	0			
1,09691	12,5	0	0			
1,39794	25	0	0			
1,69897	50	0	0			

*Fungicida anfotericina B 1 µg mL⁻¹.

^a Porcentagem de crescimento fúngico.

^b IC₅₀ = concentração de nanopartículas de prata para a qual existe uma inibição de 50% determinada por ajuste dos dados experimentais à equação de Hill utilizando o programa informático Prism 6, GraphPad Software, Inc, San Diego, CA, USA.

^c Intervalo de confiança de 95% para o valor de IC₅₀ obtido.

^d Coeficiente de correlação da curva ajustada.

4.4.5 Inibição do crescimento de *Aspergillus niger* 01UAs248 pela concentração inibitória mínima (CIM) de nanopartículas de prata em microplaca

A figura 4.43 indica a redução em percentual de germinação dos esporos de *Aspergillus flavus* 08Masp201 em relação ao aumento das concentrações de nanopartículas de prata em comparação aos controles onde não houve adição de nanopartículas de prata

No ensaio 24 horas foi constatado que todas as leituras estavam abaixo de zero, ou seja, não houve crescimento do fungo e também não foi observada mudança na coloração. No ensaio 48 horas foram observados os efeitos das nanopartículas de prata. Com base nas leituras a concentração mais baixa que inibiu o crescimento total do fungo foi determinada (CIM= 6,25 µg mL⁻¹). Os ensaios 48 e 72 horas apresentaram resultados idênticos, uma diferença observada entre eles, foi que o ensaio de 72 horas apresentou uma maior absorvância nos controles H₂O, negativo e positivo. Esta maior absorvância é visualizada pela coloração amarela onde teve o maior crescimento do fungo.

Nos poços de coloração azul (na presença das nanopartículas de prata nas concentrações 6,25, 12,5, 25 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) não ocorreu a germinação dos esporos.

Verificou-se que o fungicida não inibiu significativamente o crescimento fúngico, pois a concentração utilizada deve ter sido baixa (1 $\mu\text{g mL}^{-1}$), sendo necessária uma concentração mais elevada.

O valor de IC_{50} de nanopartículas de prata para *Aspergillus niger* 01UAs248 é de 3,7 $\mu\text{g mL}^{-1}$, como pode ser consultado na Tabela 4.34.

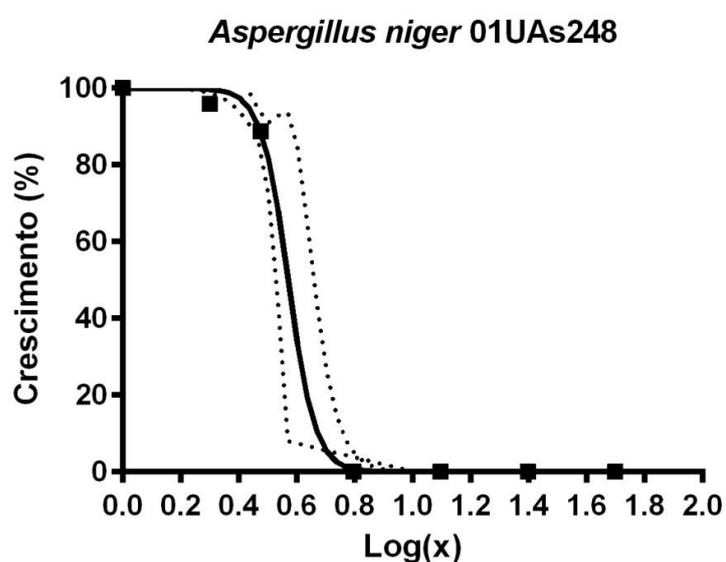


Figura 4.43 - Log(x) das concentrações de nanopartículas de prata sobre o crescimento de *Aspergillus niger* 01UAs248. Sem nanopartícula de prata (Log(x) = 0) o fungo cresceu 100%.

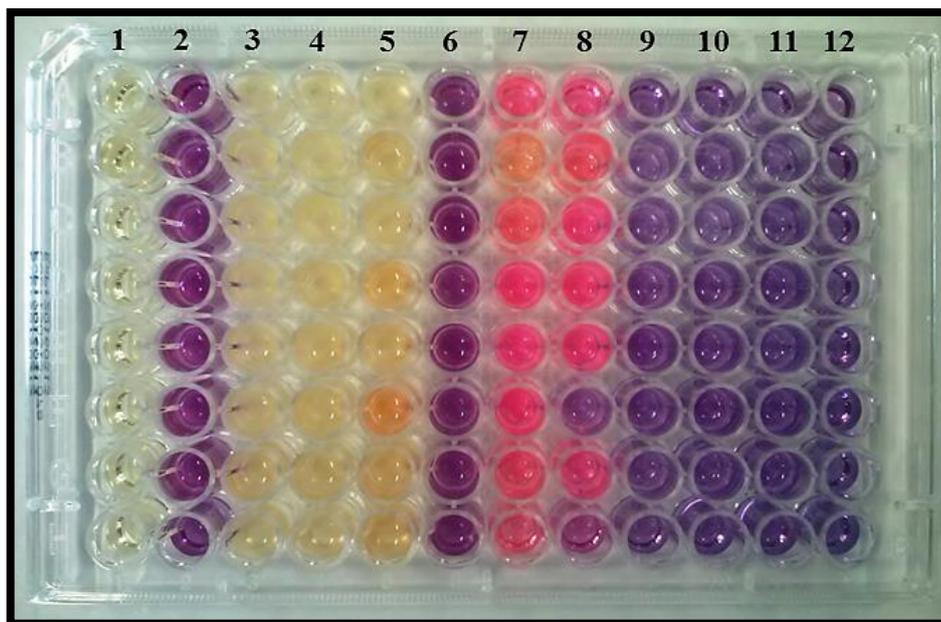


Figura 4.44 - A concentração inibitória mínima (CIM= $6,25 \mu\text{g mL}^{-1}$) de nanopartículas de prata em *Aspergillus niger* 01UAs248. (1) meio de cultura sem inóculo, (2) meio de cultura + resazurina sem inóculo, (3) controle H_2O , (4) controle negativo, (5) controle positivo, (6) AgNO_3 , (7) AgNPs $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, (8) AgNPs $3 \mu\text{g mL}^{-1}$, (9) AgNPs $6,25 \mu\text{g mL}^{-1}$, (10) AgNPs $12,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, (11) AgNPs $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ e (12) AgNPs $50 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Tabela 4.34 - IC_{50} de nanopartículas de prata para a estirpe de *Aspergillus niger* 01UAs248

Cálculo de IC_{50}						
Log(x)	Compostos $\mu\text{g mL}^{-1}$	Absorbância	% ^a	IC_{50} (μg) ^b	IC_{95} (μg) ^c	R^2 ^d
-	1*	1,73	100	3,7	3,103 - 4,490	0,9988
0,30103	1	1,65	95,88			
0,47712	3	1,53	84,70			
0,79588	6,25	0	0			
1,09691	12,5	0	0			
1,39794	25	0	0			
1,69897	50	0	0			

*Fungicida anfotericina B $1 \mu\text{g mL}^{-1}$.

^a Porcentagem de inibição do crescimento fúngico.

^b IC_{50} = concentração de nanopartículas de prata para a qual existe uma inibição de 50% determinada por ajuste dos dados experimentais à equação de Hill utilizando o programa informático Prism 6, GraphPad Software, Inc, San Diego, CA, USA.

^c Intervalo de confiança de 95% para o valor de IC_{50} obtido.

^d Coeficiente de correlação da curva ajustada.

5. DISCUSSÃO

O presente trabalho avaliou o efeito antifúngico *in vitro* de nanopartículas de prata, no controle de fitopatógenos e fungos de armazenamento da cultura da soja. Desse modo, os resultados da primeira parte deste trabalho foram dedicados à síntese e caracterização das nanopartículas de prata. Como já foi citado no capítulo anterior, o método de síntese de nanopartículas de prata utilizado no trabalho foi o Método de Turkevich (Método Citrato). A formação de nanopartículas de prata foi devido à coloração amarela âmbar observado na solução após a etapa de adição do agente redutor, citrato de sódio. Essa mudança para a coloração amarela é o resultado da absorção do comprimento de onda em torno de 430 nm (Figura 4.2), característico de nanopartículas de prata coloidal, chamada de banda *plasmon* de absorção (GORUP et al., 2011). Posteriormente, o tamanho médio das nanopartículas de prata foi confirmado através da análise de dados da dispersão de luz dinâmica (DLS) (Figura 4.4) e das imagens de MEV-FEG (Figura 4.5). Através dessas técnicas de caracterização, foi possível verificar que as nanopartículas formadas possuem alta homogeneidade de formato e de tamanho médio. O tamanho médio das nanopartículas de prata testadas neste trabalho é de aproximadamente 52 nm.

A segunda parte do trabalho foi direcionada para avaliar o efeito antifúngico das diferentes concentrações de nanopartículas de prata na inibição do crescimento micelial dos fungos: *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus niger* e *Phomopsis* sp. Segundo Min et al. (2009), pouco é conhecido e estudado sobre o efeito de nanopartículas de prata em fungos fitopatogênicos e de armazenamento, pois muitos estudos focaram em atividade antibacteriana e atividade antiviral contra patógenos de animais, evidenciando assim a importância da realização deste trabalho.

As nanopartículas de prata foram adicionadas no meio de cultura, utilizando a técnica de diluição em ágar em placa de Petri. Observou-se, nestes ensaios, que as concentrações 50, 180, 270 e 540 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de nanopartículas de prata foram as mais ativas, apresentando os melhores resultados na inibição do crescimento fúngico. Nos fungos *Aspergillus parasiticus* MUM 92.02, *Aspergillus flavus* 08MAsp567, *Aspergillus flavus* 08Masp201, *Aspergillus carbonarius* 01UAs293 e *Aspergillus niger* 01UAs248, estas concentrações não permitiram o crescimento e o desenvolvimento micelial da colônia fúngica, ou seja, ocorreu uma inibição de 100% e morte dos fungos avaliados. Nestas 5 estirpes de *Aspergillus* avaliadas uma total inibição do crescimento foi observada a partir da concentração 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os resultados

apresentados nesta tese foram superiores aos resultados do estudo realizado por Kim et al. (2012). Estes autores estudaram a atividade antifúngica de nanopartículas de prata no controle de 18 fungos fitopatogênicos, causadores de doenças em diversos tipos de cultura. Foram utilizadas as concentrações de 10, 25, 50 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ diluídas em meios de cultura e também foi realizado o teste de crescimento micelial. Segundo este trabalho, a maior taxa de inibição deve-se à concentração de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de nanopartículas de prata contra as espécies *Alternaria solani*, *Cylindrocarpon destructans*, *Fusarium sp.*, *Pythium aphanidermatum* e *Pythium spinosum*. Em nossos estudos foi constatada a inibição de 100% da germinação dos esporos e do crescimento fúngico na concentração 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de nanopartículas de prata em todas as estirpes de *Aspergillus* avaliadas.

No entanto, *Aspergillus flavus* 08Masp201 e *Aspergillus carbonarius* 01UAs293, já apresentavam inibição total do crescimento micelial e morte do fungo na concentração 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, evidenciando que estas duas estirpes de *Aspergillus* são mais sensíveis a presença de nanopartículas de prata quando adicionadas ao meio de cultivo.

Na concentração 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, a menor concentração testada neste trabalho, os fungos *Aspergillus parasiticus* MUM 92.02 e *Aspergillus niger* 01UAs248, tiveram uma redução do crescimento micelial em torno de 17 e 21%, respectivamente (Tabela 4.19). Desse modo, apesar da baixa concentração de nanopartículas de prata, esta inibição micelial de 21% do fungo *Aspergillus niger* 01UAs248 foi excelente. Este resultado foi superior ao do estudo realizado por Pulit et al. (2013) que relataram uma redução significativa do crescimento fúngico de *Aspergillus niger* na concentração de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. No entanto, vale ressaltar que esta estirpe é conhecida por ser um dos agentes patogênicos mais resistentes entre fungos, principalmente pela atividade de componentes químicos (tais como ácido ascórbico), que são produzidas por *Aspergillus niger* (PULIT et al., 2013). Sendo assim, os resultados obtidos neste trabalho podem auxiliar no combate deste fungo de armazenamento, evitando a deterioração de grãos armazenados e as perdas econômicas.

Além disso, os resultados mostraram que as nanopartículas de prata inibem a produção de micotoxinas mesmo quando ocorre o crescimento fúngico, este resultado foi visualizado no fungo *Aspergillus flavus* 08Masp567 que na concentração de 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ não inibiu significativamente o crescimento fúngico, porém a inibição das micotoxinas foi de 100%, ou seja, não foram produzidas micotoxinas nesta concentração de nanopartículas de prata. Este resultado comprova a eficiência das AgNPs como agente inibidor dessas micotoxinas.

De acordo com estudos realizados por Kim et al. (2008) um dos principais mecanismos de ação das nanopartículas é a sua interação com a membrana celular fúngica,

crescimento micelial causando desarranjos em suas funções principais, o que justifica sua alta eficiência contra esses micro-organismos. Além disso, estudos indicam que um importante mecanismo de ação inibitória dos íons prata é o ataque ao DNA. Quando em contato com Ag^+ , o mesmo perde a capacidade de se replicar, impedindo assim a divisão celular (FENG et al., 2000).

Desse modo, tem sido relatado que o modo de ação antifúngica das nanopartículas de prata seja similar ao dos íons prata (DIBROV et al., 2002) e pode ser explicado da seguinte maneira: (1) interação com proteínas contendo grupos sulfúricos ou grupos tiol nas membranas dos micro-organismos, causando desregulação de sua permeabilidade e, com isso, a morte da célula microbiana, (2) causam desequilíbrio da integridade de parede e membrana celular, (3) reduzem os níveis de ATP (3) ligam-se ao DNA, levando à desnaturação desta molécula e prevenção da reprodução celular, (4) interferência na duplicação do DNA e (5) bloqueiam a cadeia respiratória dos micro-organismos pela interação com enzimas como a citocromo oxidase e succinase desidrogenase (LOK et al., 2006; LOK et al., 2007; ZHENG et al., 2008; DAMM; MUNSTEDT; ROSCH, 2008; KIM et al., 2009; RAI; YADAV; GADE, 2009; COSTA et al., 2010).

Além disso, segundo Min et al. (2009) foi observado que as nanopartículas de prata foram eficientes na inibição da germinação de escleródios. O estudo realizado por Morones et al. (2005) relata que as nanopartículas de prata podem interromper os sistemas de transporte na célula, incluindo o efluxo de íons. Esta disfunção no efluxo de íons pode causar rápida acumulação dos íons de prata, que interrompem os processos celulares mesmo em baixas concentrações, tais como o metabolismo e a respiração (SAMUEL; GUGGENBICHLER, 2004).

As nanopartículas de prata nas concentrações, 50 e 180 $\mu\text{g mL}^{-1}$, também foram capazes de reduzir significativamente o crescimento micelial do fungo *Phomopsis* sp. MES1154. A taxa de redução do crescimento micelial das duas concentrações citadas acima foi de 21 e 64%, respectivamente. A inibição de 100% do crescimento micelial para esta estirpe foi observada nas concentrações 270 e 540 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Estes dados sugerem que ocorre um efeito concentração-dependentes, ou seja, com o aumento da concentração de nanopartículas de prata, a inibição foi pronunciada e o crescimento micelial será mais reduzido (Tabela 4.19).

Sendo assim, devido as suas propriedades antifúngicas, as nanopartículas de prata possuem a capacidade de ancorar e se fixar na superfície da célula. Essa interação com a superfície da membrana celular interfere de forma negativa em suas funções de

permeabilidade. Essas mudanças estruturais ocasionam danos perturbadores nas funções celulares vitais, causando buracos e lacunas, deprimindo a atividade de enzimas da cadeia respiratória, e, finalmente, levando à morte celular (RAI; YADAV; GADE, 2009; MORONES et al., 2005; SHARMA, YNGARD e LIN, 2009). Pode-se afirmar que a ligação destas partículas na célula depende da área superficial disponível para a interação. Partículas menores possuem uma área muito maior de superfície disponível para interagir com o micro-organismo, sendo, por isso, mais eficazes no combate a este, se comparadas às partículas maiores (MORONES et al., 2005, MONTEIRO et al., 2012a).

Esse ataque das nanopartículas de prata à superfície da membrana celular e a interferência na sua permeabilidade citados acima foram comprovados em estudos de microscopia eletrônica de transmissão realizados por Kim et al. (2009). Estes autores constataram que o fungo *Candida albicans*, quando exposto a nanopartículas de prata, induzem a formação de “lesões” na superfície da membrana celular que evoluíram para poros e ocasionando maiores fissuras na membrana celular fúngica. Este dano grave observado na estrutura da membrana é o que provoca a morte celular. Nestes estudos também foi observado à presença de nanopartículas de prata espalhadas pelo interior do citoplasma e em diferentes regiões da parede celular. Além disso, a permeabilidade da membrana celular fúngica também foi alterada pelas nanopartículas de prata através de perturbações nas bicamadas lipídicas, fazendo com que ocorra a fuga de íons e outros materiais (KIM et al., 2009).

Desse modo, todos esses danos citados acima na estrutura e no metabolismo dos fungos são os fatores que comprovam o efeito antifúngico da nanopartículas de prata que foram avaliadas neste trabalho.

No tratamento AgNO_3 (Tabela 4.19), também foi verificada a inibição de 100% do crescimento fúngico em todas as estirpes avaliadas neste trabalho, porém numa concentração muito maior ($5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) comparada as das nanopartículas de prata. A inibição do crescimento fúngico através de AgNO_3 só foi possível por ser uma elevada concentração. Contudo, o uso elevadas concentrações não foi necessário nas nanopartículas de prata, pois as nanopartículas possuem uma melhor interação com os micro-organismos devido a sua elevada área superficial. Desta forma, estas nanopartículas atacam a superfície celular e também penetram no interior desses organismos (WONG; LIU, 2010), sendo necessárias doses muito menores para eliminar esses fungos.

Os resultados dos ensaios com o fungicida anfotericina B, mostraram que não houve redução significativamente do crescimento dos fungos avaliados, em comparação com os resultados dos ensaios das nanopartículas de prata. Dentre todas as estirpes testadas com o

fungicida, apenas *Aspergillus parasiticus* MUM 92.02 e *Aspergillus niger* 01UAs248, apresentaram uma pequena taxa de inibição quando tratadas com anfotericina B, 24 e 7%, respectivamente. Nos ensaios de inibição da produção de micotoxinas e CIM este fungicida não apresentou resultados significativos. Nos estudos de Ismaiel e Tharwat (2014) também mostraram que anfotericina B não possui efeito antifúngico *Aspergillus flavus* e *Penicillium vulpinum*, não reduzindo significativamente a taxa de crescimento das estirpes avaliadas no trabalho.

Além disso, os resultados mostraram que o uso deste fungicida induziu produção da fumonisina B2 (FB2) no fungo *Aspergillus niger* 01UAs248, ocasionando assim uma produção muito elevada de FB2. Essa maior produção de micotoxinas induzida pelo uso de fungicidas já foi descrita pelos autores D'Mello et al. (1998) e Simpson et al. (2001). Segundo estes autores, alguns fungicidas podem contribuir direta ou indiretamente para o aumento da presença de certas micotoxinas, pois perturbam o metabolismo normal das estirpes levando-as a produzirem maiores quantidades destes compostos. Por exemplo, verificou-se que a utilização de azoxistrobina provocou um aumento da produção de desoxinivalenol em ensaios artificialmente inoculados com *Fusarium* sp. e *Microdochium nivale* (SIMPSON et al., 2001); que o miconazole e fenpropimorfe levaram o *A. parasiticus* a produzir quantidades mais elevadas de aflatoxina em ensaios *in vitro* (D'MELLO et al., 1998) e que o fenehexamida, mancozebe e uma mistura de sais de cobre aumentaram a produção de OTA em *Aspergillus carbonarius* (BELLÍ et al., 2006). Desse modo, a aplicação de determinados fungicidas deve ser avaliada para evitarem a superprodução de compostos micotoxicogênicos, como foi observada neste trabalho.

Relativamente ao efeito sobre a produção de micotoxinas, verificou-se que as maiores reduções foram observadas com as estirpes *Aspergillus flavus* 08MAsp567, *Aspergillus flavus* 08Masp201, *Aspergillus carbonarius* 01UAs293 quando foram testadas na presença de 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de nanopartículas de prata. Em 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ AgNps estas estirpes não produziram micotoxinas nos ensaios realizados em meio sólido, respectivamente 100% de inibição comparadas aos controles. Al-Othman et al. (2014) relataram a inibição de aproximadamente 61,8% na concentração de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de nanopartículas de prata e a inibição total (100%) só foi observada em 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de nanopartículas de prata.

A inibição de micotoxinas com nanopartículas de prata é um tema inovador na comunidade científica, desse modo, existem poucos artigos relacionados a este assunto. Sendo assim, estes resultados apresentados podem auxiliar nas pesquisas para combaterem essas micotoxinas que são prejudiciais para a saúde.

Nesta tese também foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) de nanopartículas de prata necessária para inibir, na totalidade, a germinação dos esporos das diferentes estirpes testadas. Realizaram-se, para tal, ensaios numa microplaca de 96 poços. Os resultados demonstram que a CIM de nanopartículas de prata foi de $6,25 \mu\text{g mL}^{-1}$, concentração esta que foi suficiente para inibir a germinação dos esporos e o crescimento fúngico de todas as estirpes testadas (*Aspergillus parasiticus* MUM 92.02, *Aspergillus flavus* 08MAsp567, *Aspergillus flavus* 08Masp201, *Aspergillus carbonarius* 01UAs293 e *Aspergillus niger* 01UAs248). Kim et al. (2008) demonstraram o efeito antifúngico de AgNPs nessas baixas concentrações, CIM= $7 \mu\text{g mL}^{-1}$ de nanopartículas de prata inibiu 80% do crescimento fúngico de *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* e *Trichophyton mentagrophytes* foi similar à da anfotericina B ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$) e uma concentração inferior à do fluconazol ($10\text{-}30 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Além disso, os nossos resultados foram superiores ao do estudo realizado por Wady et al., (2014) que constataram uma concentração inibitória mínima de $15,63 \mu\text{g mL}^{-1}$ no controle do crescimento de *Candida glabrata*. Esta CIM de $15,63 \mu\text{g mL}^{-1}$ foi uma concentração superior (mais concentrada) quando comparada com a CIM de $6,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ verificada nesta tese.

Desse modo, os resultados desta tese contribuem para o desenvolvimento de novos compostos com ação antifúngica é uma necessidade constante devido, por exemplo, ao aparecimento de fungos resistentes a certos fungicidas ou, ainda, devido à necessidade de produtos mais sustentáveis e com menor impacto ambiental.

6. CONCLUSÕES

A formação das nanopartículas de prata (AgNPs) foi evidenciada pelas medidas de UV-visíveis através da formação de bandas plasmônicas características de partículas de tamanho nanométrico. O espectro de absorção UV-Vis do coloide mostrou uma banda *plasmon* característica de nanopartículas de prata, em aproximadamente 430 nm. O presente estudo indicou que as AgNPs estabilizadas com amônia evitaram a agregação das nanopartículas e a formação de grandes precipitados. O principal objetivo desta tese foi avaliar a atividade antifúngica *in vitro* de nanopartículas de prata (AgNPs) no controle de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Phomopsis* da cultura da soja subsequente.

Os resultados desta tese demonstram de forma clara e objetiva que as nanopartículas de prata são capazes de inibir significativamente o crescimento e o desenvolvimento do fungo fitopatogênico *Phomopsis* sp. Através da realização do teste de crescimento micelial a eficácia da atividade antifúngica foi detectada nas concentrações 50 e 180 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Na avaliação da atividade antifúngica para controle *in vitro* de fungos micotoxicogênicos do gênero *Aspergillus* as nanopartículas de prata ($5\mu\text{g mL}^{-1}$) apresentaram maior atividade contra as estirpes de *Aspergillus flavus* 08Masp201 e *Aspergillus carbonarius* 01UAs293, não sendo visualizado o crescimento fúngico nestes ensaios.

Na avaliação da atividade inibitória *in vitro* das micotoxinas produzidas por fungos do gênero *Aspergillus*, as nanopartículas de prata na concentração 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ inibiram em 100% a produção de micotoxinas em todas as estirpes avaliadas.

Em conclusão, os resultados apresentados nesta tese contribuíram para o desenvolvimento de novas estratégias para prevenir e remediar a presença de micotoxinas (aflatoxinas, fumonisina e ocratoxina) em grãos e sementes de soja. Nossos resultados sugerem a possibilidade de utilização de nanopartículas de prata no controle de fungos micotoxicogênicos e fitopatogênicos, como uma alternativa para colaborar na redução do uso de agroquímicos com elevada toxicidade. Além disso, a utilização de nanopartículas de prata como agente antifúngico pode ser uma alternativa sustentável para reduzir o desenvolvimento da resistência fúngica.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, D.J. Fungal cell wall chitinases and glucanases. **Microbiology**, v.150, p. 2029-2035, 2004.

ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. *Introductory Mycology*. 4th ed. John Wiley & Sons, New York, USA, 1996, 869p.

AL-OTHMAN, M. R., M.ABD EL-AZIZ, A. R., MAHMOUD; M. A., EIFAN, S. A., EL-SHIKH, M. S., MAJRASHI, M. application of silver nanoparticles as antifungal and antiaflatoxin b1 produced by *Aspergillus flavus*. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**, v. 9, p. 151-157, 2014.

ASSIS, O.B.G. Embrapa oferece curso de nanotecnologia a novos pesquisadores, 2007. Disponível em <<http://www.portaldoagronegocio.com.br/conteudo.php?id=17893>>. Acesso em: 05 de janeiro de 2013.

BALAZS, D. J.; TRIANDAFILLU, K.; WOOD, P.; CHEVOLOT, Y.; VAN DELDEN, C.; HARMS, H.; HOLLENSTEIN, C.; MATHIEU, H. J. Inhibition of bacterial adhesion on PVC endotracheal tubes by RF-oxygen glow discharge, sodium hydroxide and silver nitrate treatments. **Biomaterials**, v. 25, p. 2139-2151, 2004.

BELLÍ, N.; MARÍN, S.; SANCHIS, V.; RAMOS, A.J. Impact of fungicides on *Aspergillus carbonarius* growth and ochratoxin A production on synthetic grape-like medium and on grapes. **Food Additives and Contaminants**, v. 23, p. 1021-1029, 2006.

BENTIVENGA, S.P.; MORTON, J.B. Systematics of glomalean endomycorrhizal fungi: current views and future directions. Pp. 283-308. In: F.L. Pflieger & R.G. Linderman. (Eds.). *Mycorrhizae and Plant Health*. APS Press, St. Paul. 1994.

BERNE, B.J.; PECORA, R. *Dynamic light scattering with applications to chemistry, biology and physics*. New York: John Wiley and Sons, Inc., 2000.

BERTHILLER, F.; CREWS, C., DALL'ASTA, C.; SAEGER, S.D.; HAESAERT, G.; KARLOVSKY, P.; OSWALD, I.P.; SEEFELDER, W.; SPEIJERS, G.; STROKA, J.; OSWALD, I.P.; SEEFELDER, W.; SPEIJERS, G.; STROKA, J. Masked mycotoxins: a review. **Molecular Nutrition and Food Research**, v.57, n.1, p.165-186, 2013.

BHAT, R., RAI, R. V. & KARIM A. A. Mycotoxins in Food and Feed: Present Status and Future Concerns. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. v.9, p.57-81, 2010.

BREGGIN, L.; FALKNER, R.; JASPERS, N.; PENDERGRASS, J.; PRTER, R., Securing the Promise of Nanotechnologies. **Royal Institute of International Affairs**, n.208223, 2009.

BUTLER, M.J.; DAY, A.W. Fungal melanins: a review. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 44, p. 1115-1136, 1998.

BUZZINI, P.; MARTINI, A. Production of carotenoids by strains of *Rhodospirillum rubrum* cultured in raw material of agro-industrial origin. **Bioresearch Technology**, v. 71, p. 41-44, 1999.

BOWMAN, D.M. Patently obvious: Intellectual property rights and nanotechnology. **Technology in Society**, v.29, p.307-315, 2007.

BUZEA, C.; BLANDINO, I.I.P.; ROBBIE, K. Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. **Biointerphases**, v. 2, p. MR17-MR172, 2007.

CAO, G. Nanostructure and nanomaterials: synthesis, properties and applications. **Imperial college press**, London 2004.

CARREIRA, C.M. Avaliação *in vitro* do controle microbiano e da neutralização de endotoxinas presentes em canais radiculares por nanopartículas de prata. 2009. 119f. Tese (Doutorado em Ciências Odontológicas) – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

CARVALHO, C.L.; BAUMANN, S., OLIVEIRA, C.G. Avaliação da eficiência, período de ação e efeito fisiológico do fungicida Opera na cultura da soja [*Glycine max* (L.) Merrill]. In: Congresso Brasileiro de Soja, Londrina. Anais, EMBRAPA/ CNPSO, p.109-110, 2006.

CASTEGNARO, M.; BAREK, J.; FREMY, J.; LAFONTAINE, M.; MIRAGLIA, M.; TELLING, G. Laboratory decontamination and destruction of carcinogens in laboratory wastes: Some mycotoxins. IARC Scientific Publications, n.113. **International Agency for Research on Cancer**. Lyon, France, 1991.

CHEN, X.; SCHLUESENER, H. J. Nanosilver: A nanoparticle in medical application. **Toxicology Letters**. n.176, p.1-12, 2008.

CHOI, O.; DENG, K.K.; KIM, N.J.; ROSS, L.J.R.; SURAMPALII RY, H.U. Z. The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth. **Water Research**, v. 42, p. 3066-3074, 2008.

CHOPRA, I. The increasing use of silver-based products as antimicrobial agents: a useful development or a cause for concern? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, p. 587-590, 2007.

COSTA, C.S.; RONCONI, J.V.; DAUFENBACH, J.F.; GONCALVES, C.L.; REZIN, G.T.; STRECK, E.L.; PAULA, M.M. In vitro effects of silver nanoparticles on the mitochondrial respiratory chain. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 342, p. 51-56, 2010.

CRESPILHO, F. N.; ZUCOLOTTI, V.; BRETT, C. M. A.; OLIVEIRA, O. N.; NART, F. C. Enhanced charge transport and incorporation of redox mediators in layer-by-layer films containing PAMAM encapsulated gold nanoparticles. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, p. 17478-17483, 2006.

DABBOUSI, B.O.; BAWENDI, M.G.; ONITSUKA, O.; RUBNER, M.F. Electroluminescence from CdSe quantum-dot/polymer composites. **Applied Physics Letters**, v. 66, p. 1316-1318, 1995.

DANIEL, M.C.; ASTRUC, D. Gold nanoparticles: Assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. **Chemical Reviews**, v. 104, p. 293-346, 2004.

DAMM, C.; MUNSTEDT, H.; ROSCH, A. The antimicrobial efficacy of polyamide 6/silver-nano- and microcomposites. **Materials Chemistry and Physics**, v. 108, p. 61-66, 2008.

DIBROV, P.; DZIOBA, J.; GOSINK, K.K.; HASE, C.C. Chemiosmotic mechanism of antimicrobial activity of Ag⁺ in *Vibrio cholerae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, p. 2668-2670, 2002.

D'MELLO, J.P.F.; MACDONALD, A.M.C.; POSTEL, D.; DIJKSMA, W.T.P.; DUJARDIN, A.; PLACINTA, C.M. Pesticide use and mycotoxin production in *Fusarium* and *Aspergillus* phytopathogens. **European Journal of Plant Pathology**; v. 104, p. 741-751, 1998.

DURÁN, N.; MARCATO, P.D.; DE SOUZA, G.I.; ALVES, H.; ESPOSITO, E. Antibacterial effect of silver nanoparticles produced by fungal process on textile fabrics and their effluent treatment. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 3, p. 203-208, 2007.

DURÁN, N.; TEIXEIRA, M.F.S.; DE CONTI, R.; ESPOSITO, E. Ecological-friendly pigments from fungi. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 42, p. 53-66, 2001.

EMBRAPA. Nanotecnologia na Agricultura Aumenta seu Papel Social e de Inclusão. 2007. Disponível em: < <http://www.embrapa.br/imprensa/noticias/2007/outubro/2a-semana/nanotecnologia-na-agricultura-aumenta-seu-papel-social-e-de-inclusao/>>. Acesso em: 09 mar. 2011.

EVANOFF, D.D.; CHUMANOV, G. Size-controlled synthesis of nanoparticles. 1. Silver-only aqueous suspensions via hydrogen reduction. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 108, p. 13948-13956, 2004.

FENG, Q.L.; WU, J.; CHENG, G.Q.; CUI, F.Z.; KIM, T.N.; KIM, J.O. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.52, p. 662-668, 2000.

FEYNMAN, R.P. There's plenty of room at the bottom. **Encontro Anual da Sociedade Americana de Física**, Caltech, California, 1959.

FIGUEIREDO, J. L. As inimagináveis potencialidades da nanotecnologia. Departamento de Física da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade do Algarve, Portugal, 2006. Disponível em: <<http://w3.ualg.pt/~jlongras/Entrevista-Mundus-Agosto-2006-20060825are.pdf>>. Acessado em 18 de abril de 2014.

FREIRE, F.C.O.; VIEIRA, I.G.P.; GUEDES, M.I.F.; MENDES, F.N.P. Micotoxinas: importância na alimentação e na saúde humana e animal. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2007. 48 p. Embrapa Agroindústria Tropical. Documentos, 110. Disponível em: <http://www.cnpat.embrapa.br/cnpat/cd/jss/acervo/Dc_110.pdf>. Acesso em: 19 maio 2014.

FRISKEN, B.J. Revisiting the method of cumulants for the analysis of dynamic light-scattering data. **Applied Optics**, v. 40, n. 24, p. 4087-4091, 2001.

GEMMELL, C.G; EDWARDS, D.I.; FRAINSE, A.P. Guidelines for the prophylaxis and treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections in the UK. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, p. 589-608, 2006.

GIBBS, R. Silver colloids do they work. S. I: Edição do Autor, 1999.

GONÇALEZ, E.; PINTO, M.M.; FELICIO, J.D. Análise de micotoxinas no instituto biológico de 1989 a 1999. **Biológico**, v. 63, n. 1/2, p. 15-19, 2001.

GORUP, L. F. Nanopartículas coloidais de ouro e prata e sua funcionalização com dibutil-dicalcogenetos. 2010. 127 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Programa de Pós-Graduação em Química, UFSCar, São Carlos, São Paulo.

GORUP, L. F.; LONGO, E.; LEITE, E .R.; CAMARGO, E. R. Moderating effect of ammonia on particle growth and stability of quasi-monodisperse silver nanoparticles synthesized by the Turkevich method. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 360, p. 355-358, 2011.

GOULART, A.C.P. Fungos em sementes de soja: detecção e importância. Dourados: EMBRAPA-CPAO (Documentos, 11), 58 p., 1997.

GOULART, A.C.P. Fungos em sementes de soja: detecção, importância e controle. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2005. 72 p.

GUPTA, A.K.; GUPTA, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. **Biomaterials**, v.26, p.3995-4021, 2005.

HENSON, J.M.; BUTLER, M.J.; DAY, A.W. The dark side of the mycelium: melanins of phytopathogenic fungi. **Annual Review of Phytopatology**, v. 37, p. 447-471, 1999.

HERNANDEZ-SIERRA, J.F.; RUIZ, F.; PENA, D.C.; MARTÍNEZ-GUTIÉRREZ, F.; MARTÍNEZ, A.E.; GUILLÉN, A.J.P.; TAPIA-PÉREZ, H.; CASTAÑÓN, G. M. The antimicrobial sensitivity of *Streptococcus mutans* to nanoparticles of silver, zinc oxide and gold. **Nanomedicine NBM**, v. 4, p. 237-240, 2008.

HOCKING, A.D. *Aspergillus* and related teleomorphs. In: BLACKBURN, C.W. (Ed). Food Spoilage Microorganisms. Boston: Woodhead Publishg Ltd, p.451-477, 2006.

HUANG, H.; YUAN, Q.; YANG, X. Morphology study of gold-chitosan nanocomposites. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 282, p. 26-31, 2005.

HUBKA, V.; KOLARIK, M.; KUBATOVA, A.; PETERSON, S.W. Taxonomic revision of Eurotium and transfer of species to *Aspergillus*. **Mycologia**, v. 105, n.4, p. 912-937, 2013.

HUSSEIN, H.S.; BRASEL, J. M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on human and animals. **Toxicology**. v.67. p.101-134, 2001.

IJIMA, S. Helical microtubules of graphitic carbon. **Nature**, v. 354, p.6348-6356, 1991.

INGLE, A.; GADE, A.; PIERRAT, S.; SONNICHSEN, C.; RAI, M. Mycosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium acuminatum* and its activity against some human pathogenic bacteria. **Current Nanoscience**, v. 4, p. 141-44, 2008.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER - IARC. Toxins derived from *Fusarium graminearum*, *F. culmorum* and *F. crookwellense*: zearalenone, deoxynivalenol, nivalenol and fusarenone x (Group 3). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, v.56, p.397, 1993.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER - IARC. Traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene, and styrene. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, v.82, p.169-366, 2002.

ISMAIEL, A.A.; THARWAT, N.A. Antifungal activity of silver ion on ultrastructure and production of aflatoxin B1 and patulin by two mycotoxigenic strains, *Aspergillus flavus* OC1 and *Penicillium vulpinum* CM1. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 24, p. 193-204, 2014.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Biologia celular e molecular. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

KAMAT, P.V. Photophysical, photochemical and photocatalytic aspects of metal nanoparticles. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 2, p.7729-7744, 2002.

KARIMI, Z.; KARINI, L.; SHOKROLLAHI H. Nano-magnetic particles used in biomedicine: Core and coating materials. **Material Science and Engineering C**, v. 33, p. 2465-2474, 2013.

KEY, F.S.; MAASS, G. Ions, Atoms and Charged Particles. 2001. Disponível em< <http://www.silvercolloids.com/Papers/IonsAtoms&ChargedParticles.PDF>>. Acesso em: 04 out. 2014.

KIM, S.W.; JUNG, J.H.; LAMSAL, K.; KIM, Y.S.; MIN, J.S.; LEE, Y.S. Antifungal effects of silver nanoparticles (AgNPs) against various plant pathogenic fungi. **Mycobiology**, v. 40, p. 53-58, 2012.

KIM, K.J.; SUNG, W.S.; MOON, S.K.; CHOI, J.S.; KIM, J.G.; LEE, D.G. Antifungal effect of silver nanoparticles on dermatophytes. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, p. 1482-1484, 2008.

KIM, K.J.; SUNG, W.S.; SUH, B.K.; MOON, S.K.; CHOI, J.S.; KIM, J.G.; LEE, D.G. Antifungal activity and mode of action of silver nano-particles on *Candida albicans*. **Biometals**, v. 22, p. 235-242, 2009.

KIRK, P.M.; CANNON, P.F.; DAVID, J.C.; STALPERS, J.A. Ainsworth & Bisby's Dictionary of the th Fungi. 9 ed. CABI Bioscience, Egham, 2001.

KLABUNDE, K. J. Nanoscale materials in chemistry, New York: John Wiley & Sons, Inc., 2001.

KUBO, A.M. Uso de biotemplates na obtenção de microtubos com nanopartículas de ouro. 2014. 62 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Departamento de Química Universidade Federal de São Carlos, UFSCar, São Carlos, São Paulo.

KUMAR, A.; KUMAR, P.; AJAYAN, M.P.; JOHN, G. Silver nanoparticle embedded antimicrobial paints based on vegetable oil. **Nature Materials**, v.7, p.236-241, 2008.

KURODA, C.S.; KIM, T.Y.; HIRANO, T.; YOSHIDA, K.; NAMIKAWA, T.; YAMAZAKI, Y. Preparation of nano-sized Bi-YIG particles for micro optics applications. **Electrochimica Acta**, v. 44, p.3921-3925, 1999.

JIN, R.C.; CAO, Y.; MIRKIN, C.A.; KELLY, K.L.; SCHATZ, G.C.; ZHENG, J.G. Photoinduced conversion of silver nanospheres to nanoprisms. **Science**, v.v294, p. 1901-1903, 2001.

LAMER, V. K.; DINEGAR, R. H. Theory, production and mechanism of formation of monodispersed hydrosols. **Journal of the American Chemical Society**, v.72, 4847 p., 1950.
LI, Y.; LEUNG, P.; SONG, Q.W.; NEWTON, E. Antimicrobial effects of surgical masks coated with nanoparticles. **Journal of Hospital Infection**, v. 62, p. 58-63, 2006.

LIN, W.C.; LIAO, Y.C.; LIAU, M.C.; LII, C.K.; SHEEN, L.Y. Inhibitory effect of CDA-II, a urinary preparation, on aflatoxin B(1)-induced oxidative stress and DNA damage in primary cultured rat hepatocytes. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v.44, n.4, p.546-551, 2006.

LOK, C.N.; HO, C.M.; CHEN, R.; HE,Q.Y.; YU, W.Y.; SUN, H.; TAM, P.K.; CHIU, J.F.; CHE, C.M. Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver **nanoparticles**. **Journal of Proteome Research**, v. 5, p. 916-924, 2006.

LOK, C.N.; HO, C.M.; CHEN, R.; HE,Q.Y.; YU, W.Y.; SUN, H.; TAM, P.K.; CHIU, J.F.; CHE, C.M. Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v.12, p. 527-534, 2007.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. Microbiologia de Brock. 10^a ed. São Paulo, Pearson Education do Brasil, 2004.

MALLMANN, C. A.; DILKIN, P. Micotoxinas e Micotoxicoses em Suínos. 1 ed. Santa Maria: Ed. Do Autor, 2007. 240 p.

MALLIN, M. P.; CATHERINE J. M. Solution-phase synthesis of sub-10 nm Au-Ag alloy nanoparticles. **Nano Letters**, v. 2, p. 1-16, 2002.

MARTINELLI, J. A.; BOCCHESI, C.A.C.; XIE, W.; O'DONNELL, K.; KISTLER, H.C. Soybean oid blight and root rot caused by lineages of the *Fusarium graminearum* and the production of mycotoxins. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 5, p. 492-498, 2004.

MASUHARA, H.; NAKANISHI, H.; SASAKI, K. Single Organic Nanoparticles, **Springer**, Berlin, 32 p., 2003.

MATOS, C.; MARTINS, F.; SALES, G.; MARTINS, I.; ROSAS, M.; MORAIS, S. Guia de segurança para laboratórios. ALABE, Porto, p. 46-48, 67-74, 2006.

MATTOSO, L. H. C.; MEDEIROS, E. S. DE; NETO, L.M. A Revolução nanotecnológica e o potencial para o agronegócio. **Revista de Política Agrícola**, n.4, p.38-46, 2005.

MAURIN, I.; DANTELLE, G.; BOILOT, J.; GACION, T. A protected annealing process for the production of high quality colloidal oxide nanoparticles with optimized physical properties. **Journal of Materials Chemistry C**, v. 1, p. 13-21, 2013.

MAYNARD, A.D. Nanotechnology: the next big thing, or much ado about nothing? **Annals of Occupational Hygiene**, v. 5, p.1-12, 2007.

MENDES, A. de S.; ANJOS, M. A. dos; TAVARES, E. de S.; FONSECA, E. F.; OLIVEIRA, L. M. de; GALLINA, R. Relatório nanotecnologia: investimentos, resultados e demandas, **Ministério De Ciência E Tecnologia**, Brasil, 2006.

MELAIYE, A.; YOUNGS, W. J. Silver and its application as an antimicrobial agent. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 15, p. 125-130, 2005.

MERGA, G.; WILSON, R.; LYNN, G.; MILOSAVLJEVIC, B.H., MEISEL, D. Redox catalysis on “naked” silver nanoparticles. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 111, p. 12220-12226, 2007.

MIE, G. Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen. **Annalen der Physik (Leipzig)**, v. 25, p. 377-445, 1908.

MIN, J.S.; KIM, K.S.; KIM, S.W.; JUNG, J.H.; LAMSAL, K.; KIM, S.B.; JUNG, M.; LEE, Y.S. Effects of colloidal silver nanoparticles on sclerotium-forming phytopathogenic fungi. **Journal of Plant Pathology**, v. 25, p. 376-380, 2009.

MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR - MDIC. Disponível em: < <http://www.mdic.gov.br/sitio/>>. Acesso em: 15 jan. 2014.

MONTEIRO, M.C.; DE LA CRUZ, M.; CANTIZANI, J.; MORENO, C.; TORMO, J.R.; MELLADO, E.; DE LUCAS, J.R.; ASENSIO, F.; VALIANTE, V.; BRAKHAGE, A.A.; *ET AL.* A new approach to drug discovery: high-throughput screening of microbial natural extracts against *Aspergillus fumigatus* Using Resazurin. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 17, p. 542–549, 2012b.

MONTEIRO, D.R.; SILVA, S.; NEGRI, M.; GORUP, L.F.; CAMARGO, E.R.DE; OLIVEIRA, R.; BARBOSA, D.B.; HENRIQUES, M. Silver nanoparticles: influence of stabilizing agent and diameter on antifungal activity against *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. **Letters in Applied Microbiology**, v. 54, p. 383–391, 2012a.

MORONES, J.R.; ELECHIGUERRA, J.L.; CAMACHO, A.; HOLT, K.; KOURI, J.B.; RAMÍREZ, J.T.; YACAMAN, M.J. The bactericidal effect of silver nanoparticles. **Nanotechnology**, v.16, p. 2346-2353, 2005.

MORTON, J.B. Problems and solutions for the integration of glomalean taxonomy, systematic biology, and the study of endomycorrhizal phenomena. **Mycorrhiza**, v. 2, p. 97-109, 1993.

MURUGADOSS, A.; CHATTOPADHYAY, A. A 'green' chitosan-silver nanoparticle composite as a heterogeneous as well as micro-heterogeneous catalyst. **Nanotechnology**, v. 19, p. 015603-015611, 2008.

NAM, K.Y. *In vitro* antimicrobial effect of the tissue conditioner containing silver nanoparticles. **Journal of Advanced Prosthodontics**, v. 3, p. 20-24, 2011.

NIELSEN, K.; MOGENSEN, J.; JOHANSEN, M.; LARSEN, T.; FRISVAD, J. Review of secondary metabolites and mycotoxins from the *Aspergillus niger* group. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 395, p. 1225-1242, 2009.

NIDHIN, M.; INDUMATHY, R.; SREERAM, K.J.; NAIR, B.U. Synthesis of iron oxide nanoparticles of narrow size distribution on polysaccharide templates. **Bulletin of Materials Science**, v. 31, p.93-96, 2008.

OPARA, L.U. Emerging technological innovation triad for smart agriculture in the 21st century. Part I. Prospects and impacts of nanotechnology in agriculture. Oman. 2004.

PASTER, N.; BULLERMAN, L.B. Mould spoilage and mycotoxins formation in grains as controlled by physical means. **International Journal of Food Microbiology**, v. 7, p. 257-265, 1988.

PALOMINO, J.C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin microtiter plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, p. 2720-2722, 2002.

PATERSON, R; BRIDGE, P. Biochemical Techniques for Filamentous Fungi. International Mycological Institute. Cab International. v.1, 1994.

PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. Microbiologia. 3^a ed. V. 1. São Paulo, Makron Books do Brasil, 1997.

PETER, M.G.. Chitin and Chitosan in Fungi. **Biopolymers**, p.44-52, 2001.

PERKEL, J. M. Nanotech dreams. **Scientist**, v. 16, n.5, p.34-36, 2002.

PERRONE, G.; SUSCA, A.; COZZI, G.; EHRLICH, K.; VARGA, J.; FRISVAD, J.; MEIJER, M.; NOONIM, P.; MAHAKARNCHANAKUL, W.; SAMSON, R. Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. **Studies in Mycology**, v.59, p. 53-66, 2007.

PITT, J.I.; HOCKING, A.D. Fungi and Food Spoilage. London: Blackie Academic Professional, 1997. 593 p.

PULIT, J.; BANACH, M.; SZCZYGLÓWSKA, R.; BRYK, M. Nanosilver against fungi. Silver nanoparticles as an effective biocidal factor. **Acta Biochimica Polonica**, v. 60, n. 4, p. 795-798, 2013.

PUZZI, D. Abastecimento e Armazenagem de Grãos. Instituto Campineiro de Ensino Agrícola. 2000. 660p.

QIU, H.; BEDNAROVA, L.; LEE, W. Y. Infiltration and immobilization of catalyst particles into the confined space of microstructured reactors via layer-by-layer self-assembly. **Applied Catalysis A: General**, v. 314, p. 200-207, 2006.

RAI, M.; YADAV, A.; GADE, A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 76-83, 2009.

RODRIGUES, A.; OLIVEIRA, A.; OLIVEIRA, B.; TELO, E.; FRANCO, H. Exposição a agentes químicos. IDICT - Instituto de desenvolvimento e inspeção das condições de trabalho. Divulgação 13, p. 31 - 39. (2003a)

RODRIGUES, A.; OLIVEIRA, A.; OLIVEIRA, B.; TELO, E.; FRANCO, H. Exposição a agentes biológicos. IDICT - Instituto de desenvolvimento e inspeção das condições de trabalho. Divulgação 12, p. 27-43, 2003b.

ROSSETTO, C.A.V.; SILVA, O.F.; ARAÚJO, A.E.S. Influência da calagem, da época de colheita e da secagem na incidência de fungos e aflatoxinas em grãos de amendoim armazenados. **Ciência Rural**, v. 35, n. 2, p. 309-315, 2005.

SAKAKI, H.; NAKANISHI, T.; SATONAKA, K.Y.; MIKI, W.; FUJITA, T.; KOMEMUSHI, S. Properties of a high-torularhodin mutant of *Rhodotorula glutinis* cultivated under oxidative stress. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 89, p. 203-205, 2000.

SALINAS, V.M.V. Micotoxinas: un factor de riesgo la seguridad alimenticia. **Revista Aniane**, v. 11, n. 54, p.10-14, 2006.

SAMUEL, U.; GUGGENBICHLER, J.P. Prevention of catheter-related infections: The potential of a new nano-silver impregnated catheter. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 23, p. S75-S78, 2004.

SANTOS, C. C. M.; LOPES, M. R. V.; KOSSEKI, S. Y. Ocorrência de aflatoxinas em amendoim e produtos de amendoim comercializados na região de São José de Rio Preto/SP. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 60, n. 2, p. 153-157, 2001.

SANTOS, P.M.; REIS, M.S.; SEDIYAMA, T.; ARAÚJO, E.F.; CECON, P.R.; SANTOS, M.R. Efeito da classificação por tamanho da semente de soja na sua qualidade fisiológica durante o armazenamento. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 27, p. 395-402, 2005.

SASSAHARA, M.; YANAKA, E.K.; PONTES NETO, D. Ocorrência de aflatoxina e zearalenona em alimentos destinados ao gado leiteiro na Região Norte do Estado do Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 24, n. 1, p. 63-72, 2003.

SCHMIDT, R.H.; RODRICK, G.E. Food safety Handbook. New Jersey: John Wiley & Sons Inc, 2003. 850p.

SERRA, R. Microflora das uvas portuguesas e seu potencial para a contaminação das uvas com micotoxinas, com destaque para a ocratoxina A. 2005. 339 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica). Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Braga. Portugal.

SHARMA, V.K.; YNGARD, R.A.; LIN, Y. Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 145, p.83-96, 2009.

SIMPSON, D.R.; WESTON, G.E.; TURNER, J.A.; JENNINGS, P.; NICHOLSON, P. Differential control of head blight pathogens of wheat by fungicides and consequences for mycotoxin contamination of grain. **European Journal of Plant Pathology**, v. 107, p. 421-431, 2001.

SINGH, M.; MANIKANDAN, S.; KUMARAGURU, A. K. Nanoparticles: A new technology with wide applications. **Research Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v.1, n.1, p.1-11, 2011.

SOARES, C. Caracterização de estirpes de *Aspergillus* secção Flavi isoladas de uvas vinícolas. 2007. Mestrado, Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Portugal.

STEHR, J.; HRELESCU, C.; SPERLING, R.A.; RASCHKE, G.; WUNDERLICH, M.; NICHTL, A.; HEINDL, D.; KÜRZINGER, K.; PARAK, W. J.; KLAR, T.A.; FELDMANN, J. Gold nanostoves for microsecond DNA melting analysis. **Nano Letters**, v. 2, p. 619-623, 2008.

STOBIE, N.; DUFFY, B.; MCCORMACK, D.E.; COLREAVY, J.; HIDALGO, M.; MCHALE, P.; HINDER, S.J. Prevention of staphylococcus epidermidis biofilm formation using a low-temperature processed silver-doped phenyltriethoxysilane sol-gel coating. **Biomaterials**, v.29, p.963-969, 2008.

STYLIOS, G. K.; GIANNOUDIS, P. V.; WAN, T. Application of nanotechnologies in medical practice. **International journal of the Care of the Injured**, v. 365, p. S6-S13, 2005.

TEIXEIRA, M.F.S.; FERNANDES, M.J.S.; LUNA, E.A. Taxonomia de *Aspergillus*. **Revista da Universidade do Amazonas: Série Ciências da saúde**, v.3, p. 13-26, 1994.

TONG, W.M.; LEE, M.K.; GALENDO, D.; WANG, Z.Q.; SABAPATHY, K. Aflatoxin-B exposure does not lead to p53 mutations but results in enhanced liver cancer of Hupki (human p53 knock-in) mice. **International Journal of Cancer**, v.119, p.745-749, 2006.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiologia. 6ª ed. Porto Alegre, Artmed, 2000.

TSITSIGIANNIS, D.I.; KOWIESKI, T.M.; ZARNOWSKI, R.; KELLER, N.P. Endogenous lipogenic regulators of spore balance in *Aspergillus nidulans*. **Eukaryot Cell**, v.3, p. 1398-1411, 2004.

TURKEVICH, J.; STEVENSON, P.C.; HILLIER, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. **Discussions of the Faraday Society**, v. 11, p. 55-75, 1951.

VENÂNCIO, A.; ABRUNHOSA, L; SERRA, R. Microflora e Micotoxinas em Uvas. Centro de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Portugal. . (2005) Disponível em:<http://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/5952/1/resumo_alabe_2005%5b1%5d.pdf>. Acesso em: 10 jan. 2014.

VENCATO, A.; ROSA, G. R.; RIGON, L.; CORRÊA, S.; REETZ, E.; BELING, R. R.; SANTOS, C. Anuário Brasileiro de Soja. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz.136p. 2005.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE – USDA. 2015. World Agricultural Supply and Demand Estimates. Disponível em: <<http://www.usda.gov/oce/commodity/wasde/latest.pdf>>. Acesso em: 15 mar. 2015.

VRIES , R.; FRISVAD, J.; VONDERVOORT, P.; BURGERS, K.; KUIJPERS, A.; SAMSON, R.; VISSER, J. *Aspergillus vadensis*, a new species of the group of black *Aspergilli*. **Antonie van Leeuwenhoek Journal of Microbiology**, v. 87, p. 195-203, 2005.

XING, Y.; ZHAO, J.; CONTI P.S.; CHEN, K. Radiolabeled nanoparticles for multimodality tumor imaging. **Theranostics**, v. 3, p. 290-306, 2014.

XU, Z.P.; ZENG, Q.H.; LU, G.Q.; YU, A. B. Inorganic nanoparticles as carriers for efficient cellular delivery. **Chemical Engineering Science**, v. 61, p.1027-1040, 2006.

YOON, K.Y.; BYEON, J.H.; PARK, C.W.; HWANG, J. Antimicrobial effect of silver particles on bacterial contamination of activated carbon fibers. **Environmental Science and Technology**, v. 42, p. 1251-1255, 2008.

WADY, A.F.; MACHADO, A.L; FOGGI, C.C.; ZAMPERINI, C. A.; ZUCOLOTTI, V.; MOFFA, E. B.; VERGANI, C.E. Effect of a Silver Nanoparticles Solution on *Staphylococcus aureus* and *Candida* spp. **Journal of Nanomaterials**, p. 1-7, 2014.

WALKER, T. S. Microbiologia. 1ª ed. Rio de Janeiro, Revinter Ltda, 2002.

WILLEMS, W. Roadmap report on nanoparticles, Barcelona, Spain, 2005.

WEBSTER, J.; WEBER, R. 2007, Introduction to Fungi. Cambridge University Press.

WEI, D.W.; QIAN, W.P. Facile synthesis of Ag and Au nanoparticles utilizing chitosan as a mediator agent. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 62, p. 136-142, 2008.

WOOD, S.; JONES, R.; GELDART, A. The social and economic challenges of nanotechnology. London: Economic and Social Research Council, 2003.

WONG, K.K.Y.; LIU, X. Silver Nanoparticles – The real “silver bullet” in clinical medicine? **Medicinal Chemistry Communications**, v.1, p.125-131, 2010.

ZHAO, G.J.; STEVENS, S.E. Multiple parameters for the comprehensive evaluation of the susceptibility of *Escherichia coli* to the silver ion. **Biometals**, v. 11, p. 27-32, 1998.

ZHENG; J.; WU, X.; WANG, M.; RAN, D.; XU, W.; YANG, J. Study on the interaction between silver nanoparticles and nucleic acids in the presence of cetyltrimethylammonium bromide and its analytical application. **Talanta**, v. 74, p. 526-532, 2008.

.

APÊNDICE

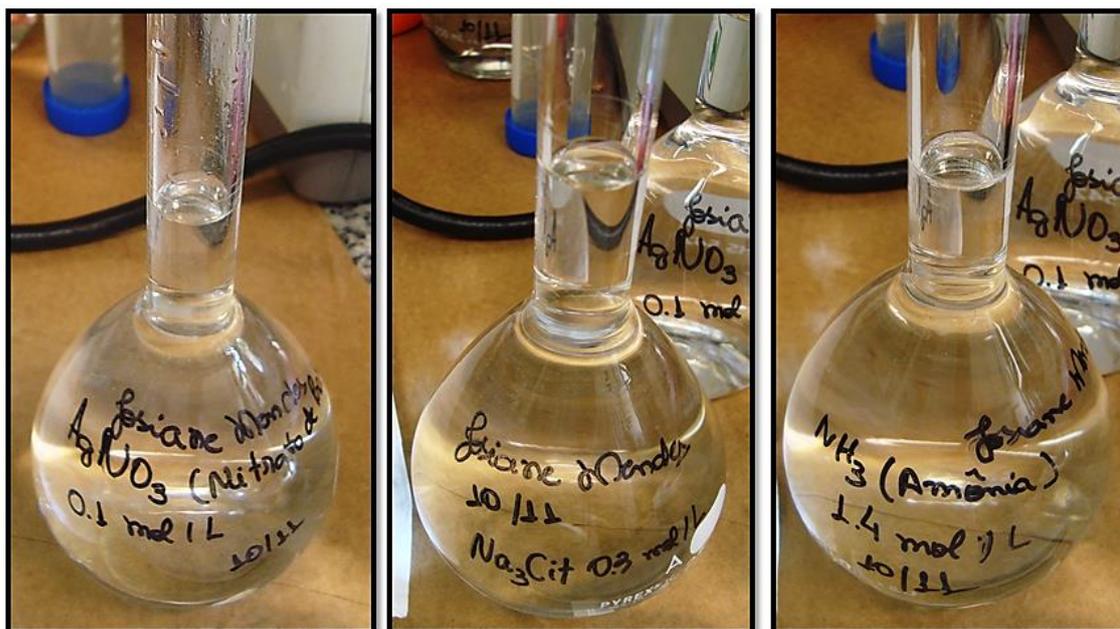


Figura A.1 - Soluções de nitrato de prata, citrato de sódio e amônia, respectivamente, utilizadas na síntese das nanopartículas de prata.



Figura A.2 - Síntese das nanopartículas de prata sob agitação magnética e aquecimento a 90°C por cerca de 4 minutos.

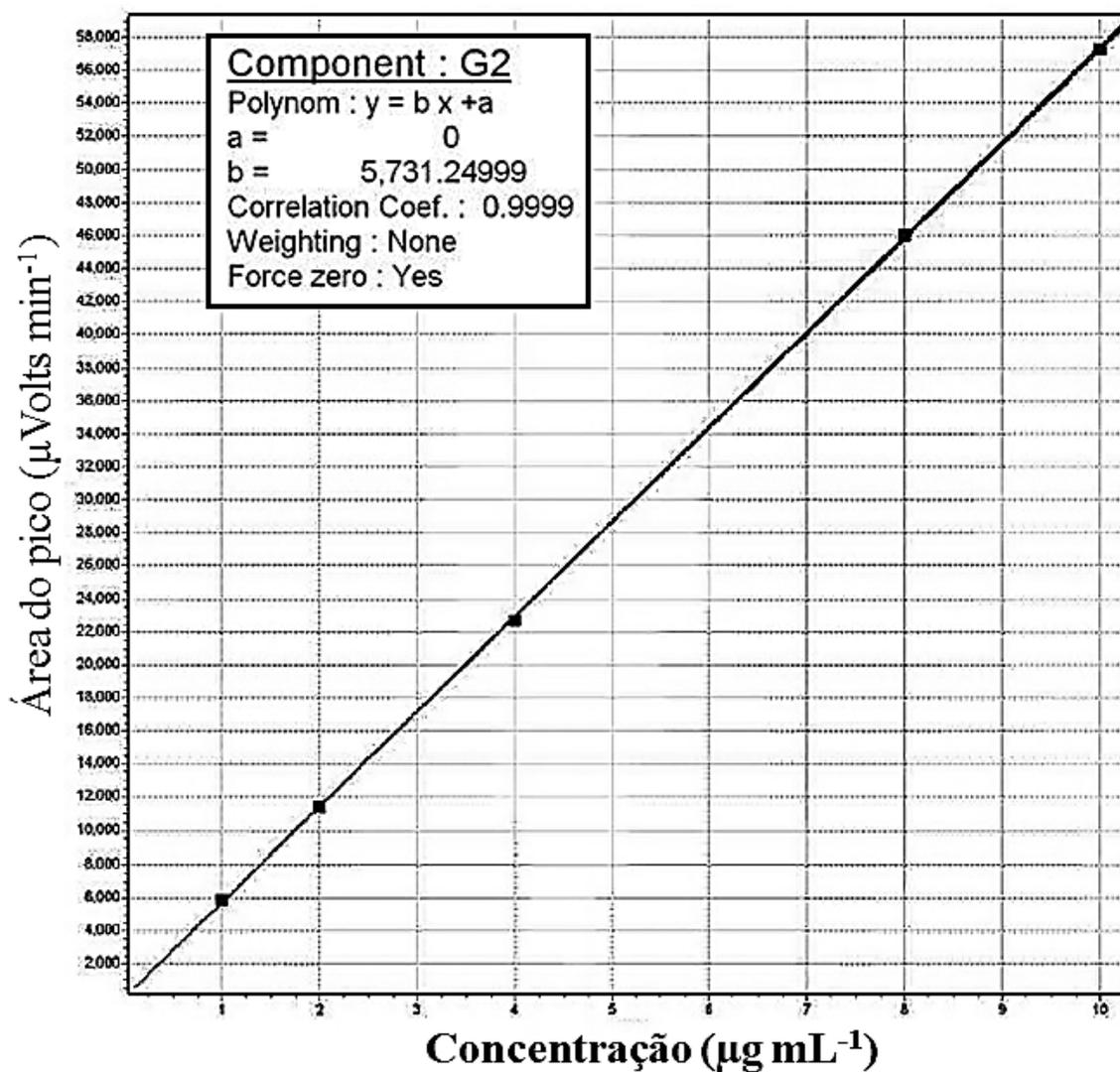


Figura A.3 - Curva de calibração utilizada para a quantificação da aflatoxina AFG2 ($\mu\text{g mL}^{-1}$). Os pontos considerados na curva de calibração são os pontos os cheios, em cor preta.

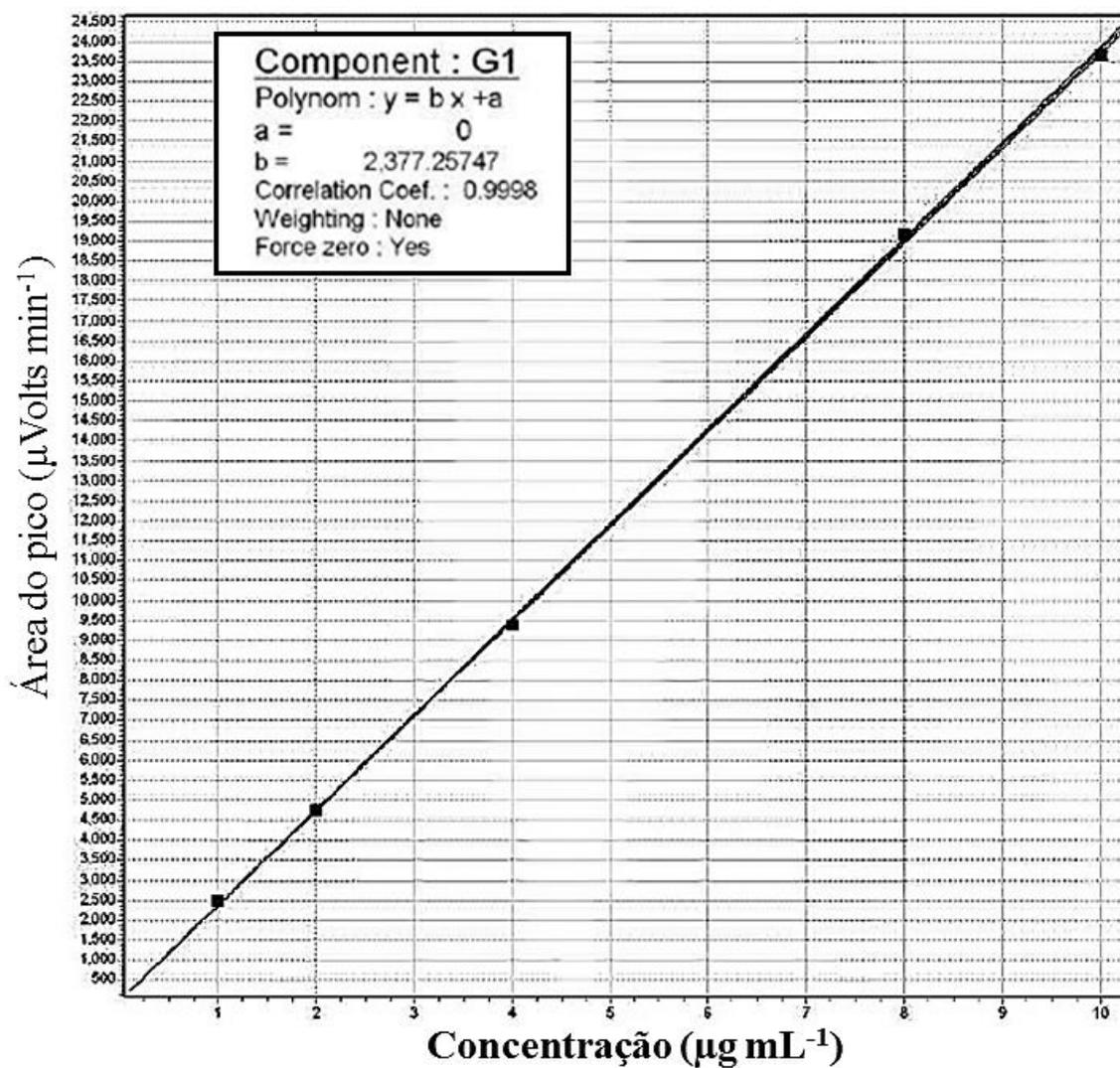


Figura A.4 - Curva de calibração utilizada para a quantificação da aflatoxina AFG1 ($\mu\text{g mL}^{-1}$). Os pontos considerados na curva de calibração são os pontos os cheios, em cor preta.

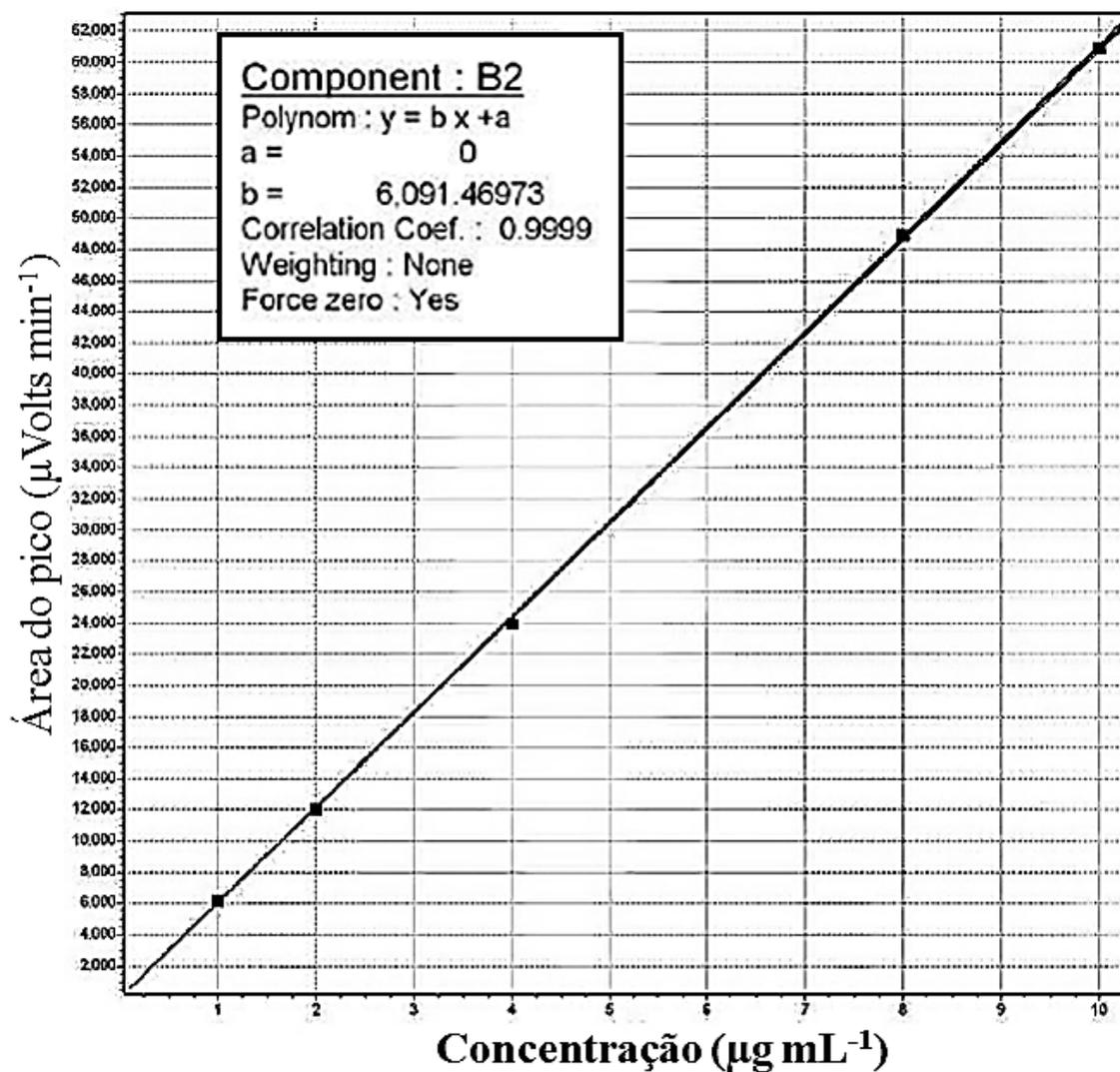


Figura A.5 - Curva de calibração utilizada para a quantificação da aflatoxina AFB2 ($\mu\text{g mL}^{-1}$). Os pontos considerados na curva de calibração são os pontos os cheios, em cor preta.

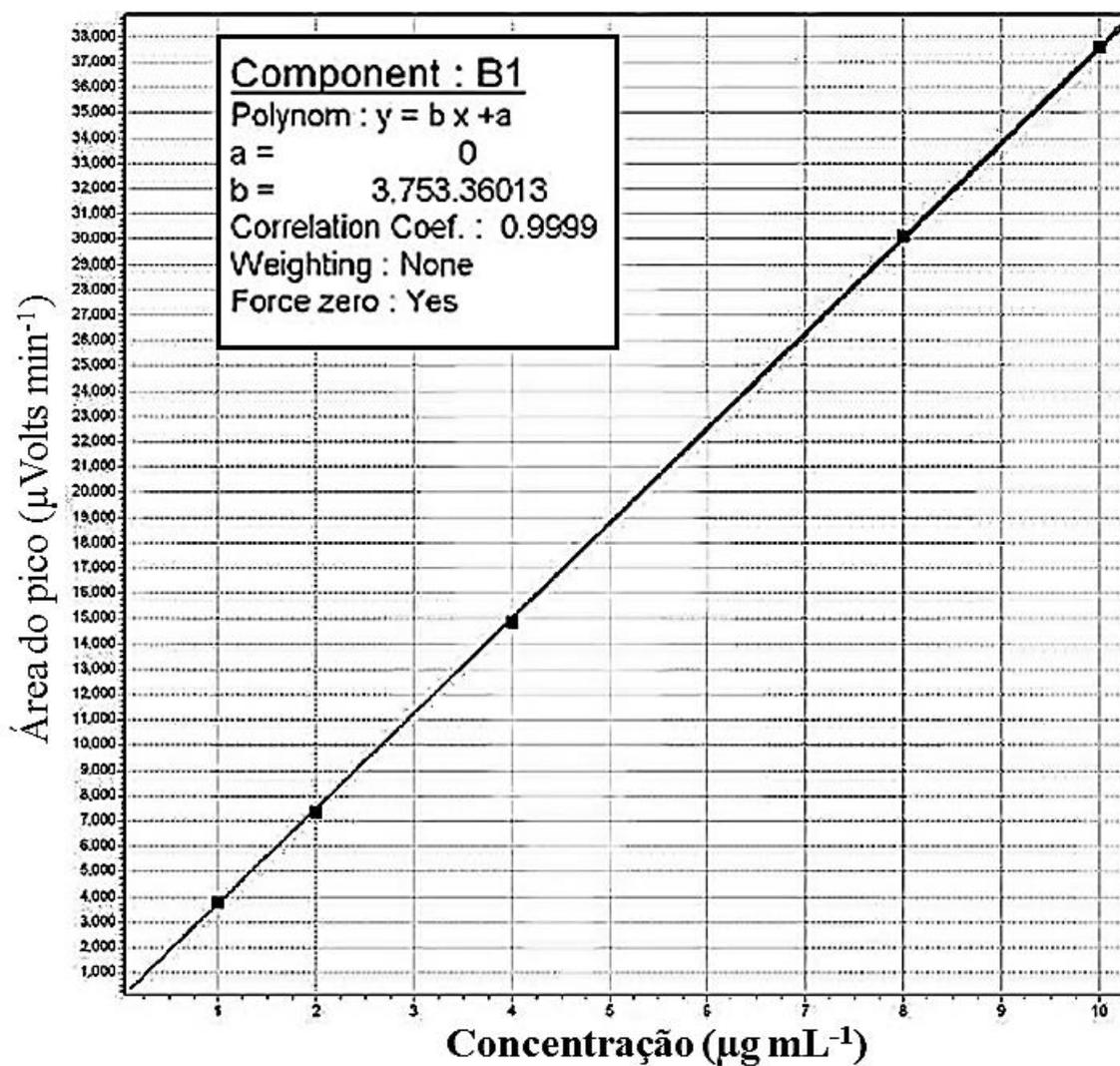


Figura A.6 - Curva de calibração utilizada para a quantificação da aflatoxina AFB1 ($\mu\text{g mL}^{-1}$). Os pontos considerados na curva de calibração são os pontos os cheios, em cor preta.

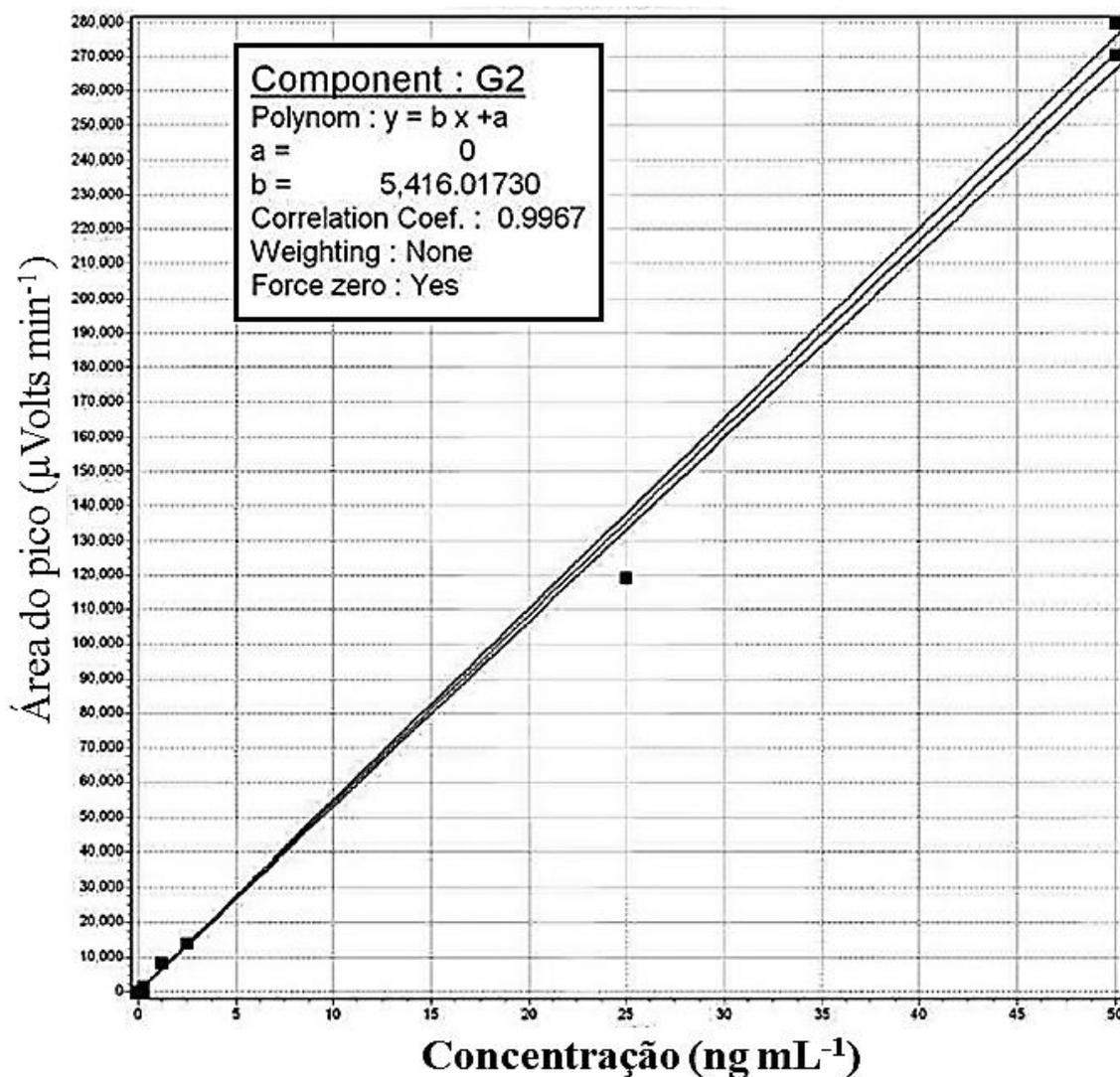


Figura A.7 - Curva de calibração utilizada para a quantificação da aflatoxina AFG2 (ng mL^{-1}). Os pontos considerados na curva de calibração são os pontos os cheios, em cor preta.

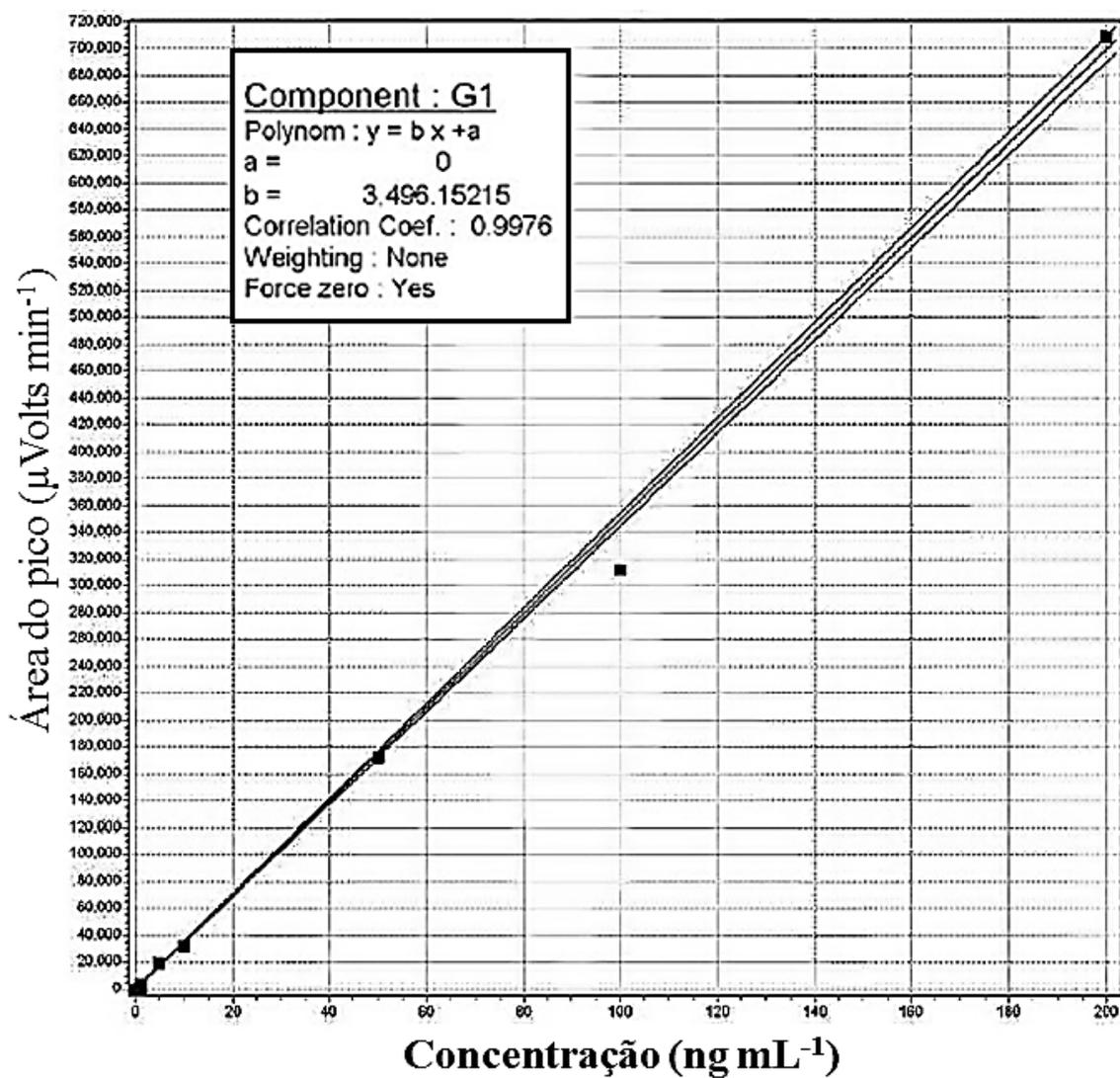


Figura A.8 - Curva de calibração utilizada para a quantificação da aflatoxina AFG1 (ng mL^{-1}). Os pontos considerados na curva de calibração são os pontos os cheios, em cor preta.

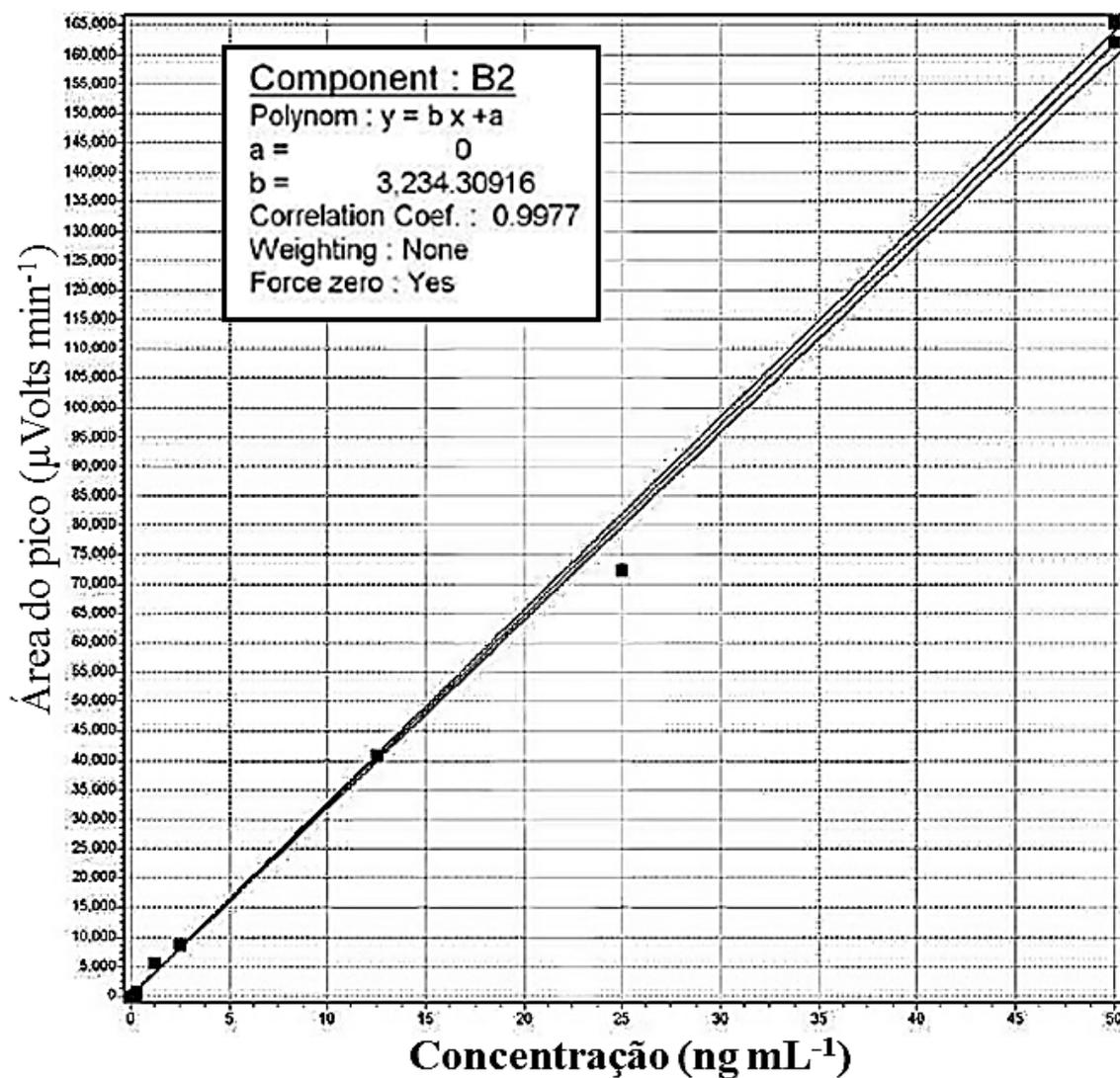


Figura A.9 - Curva de calibração utilizada para a quantificação da aflatoxina AFB2 (ng mL^{-1}). Os pontos considerados na curva de calibração são os pontos os cheios, em cor preta.

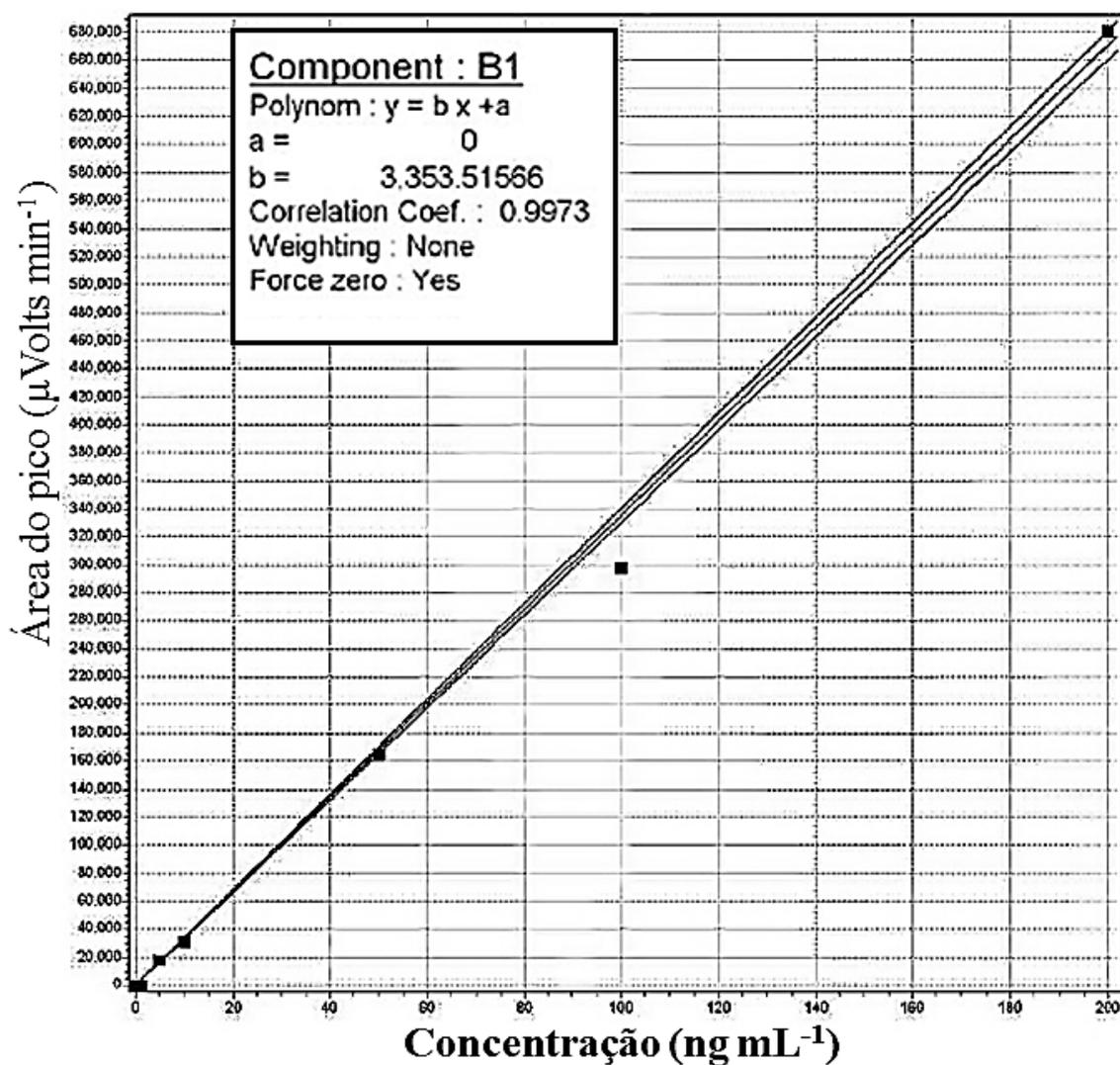


Figura A.10 - Curva de calibração utilizada para a quantificação da aflatoxina AFB1 (ng mL^{-1}). Os pontos considerados na curva de calibração são os pontos os cheios, em cor preta.

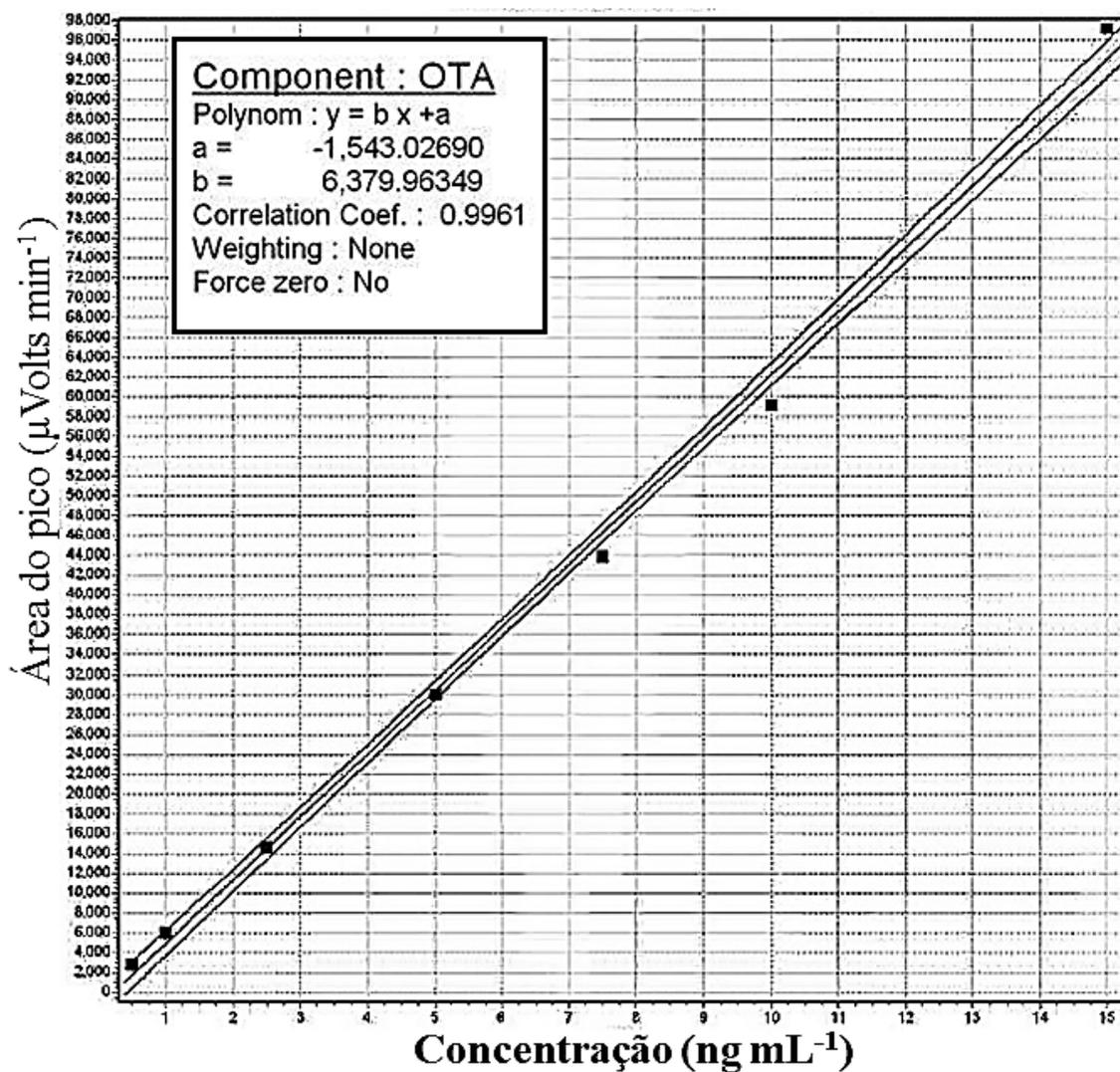


Figura A.11 - Curva de calibração utilizada para a quantificação da ocratoxina A (OTA) (ng mL⁻¹). Os pontos considerados na curva de calibração são os pontos os cheios, em cor preta.

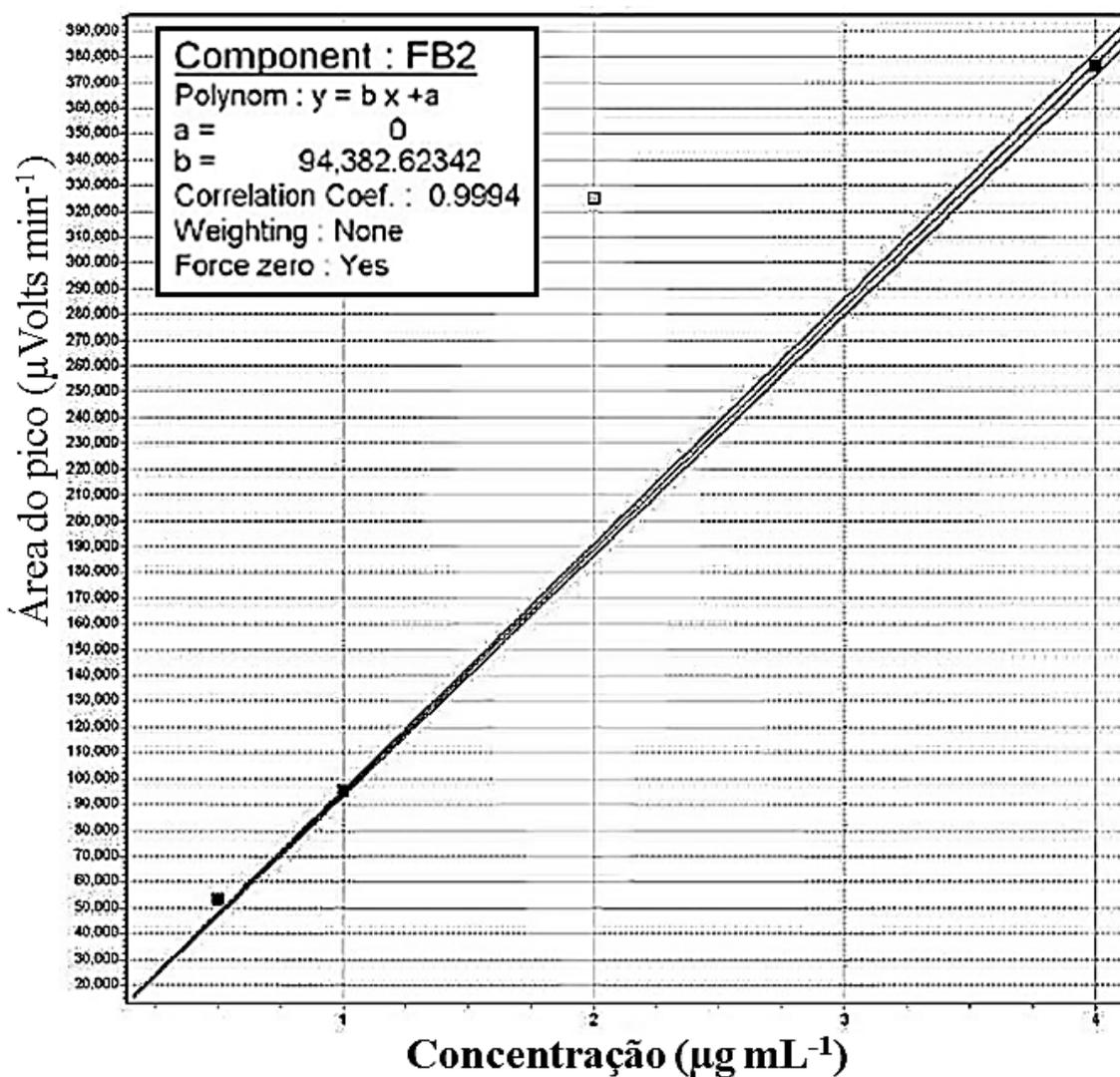


Figura A.12 - Curva de calibração utilizada para a quantificação da fumonisina B2 (FB2) ($\mu\text{g mL}^{-1}$). Os pontos considerados na curva de calibração são os pontos os cheios, em cor preta.

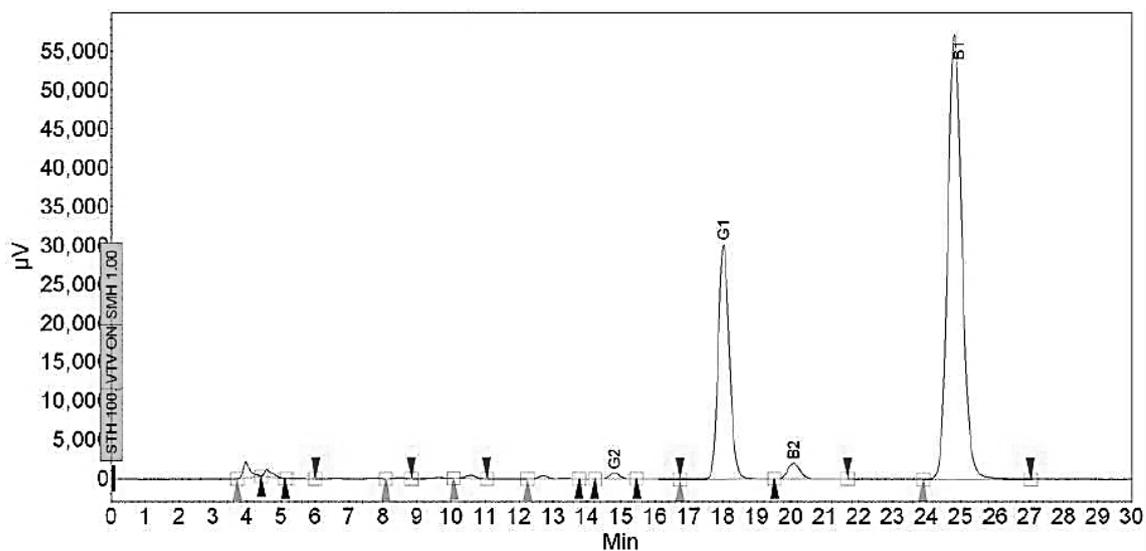


Figura A.13 - Cromatograma da produção de aflatoxinas (AFG2, AFB2, AFG1 e AFB1) produzida por *Aspergillus parasiticus* MUM 92.02 quando crescido em PDA no tratamento controle H_2O .

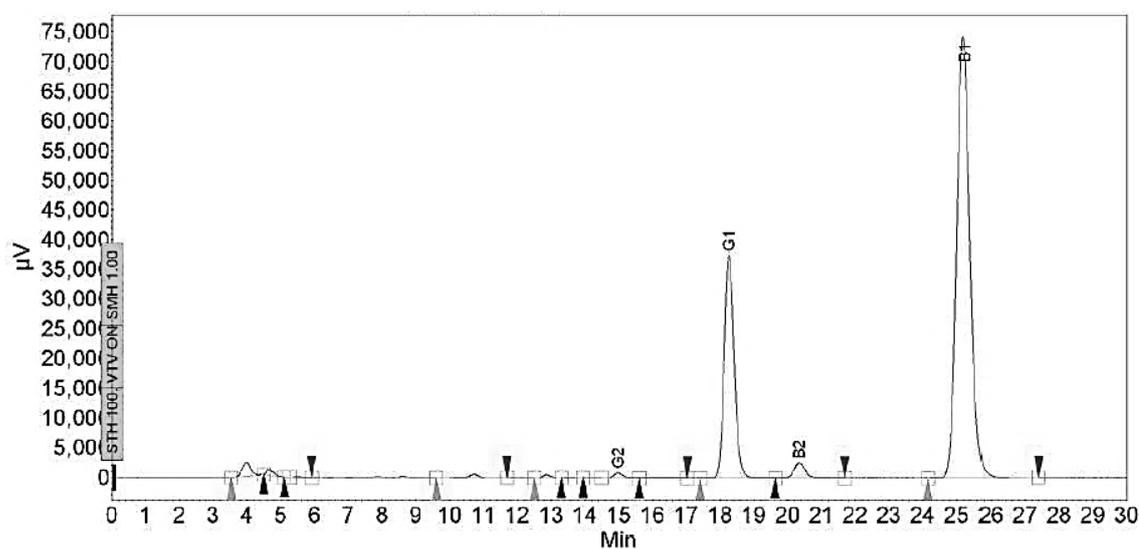


Figura A.14 - Cromatograma da produção de aflatoxinas (AFG2, AFB2, AFG1 e AFB1) por *Aspergillus parasiticus* MUM 92.02 quando crescido em PDA no tratamento controle negativo ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ + NH_3 $1,4 \text{ mol L}^{-1}$).

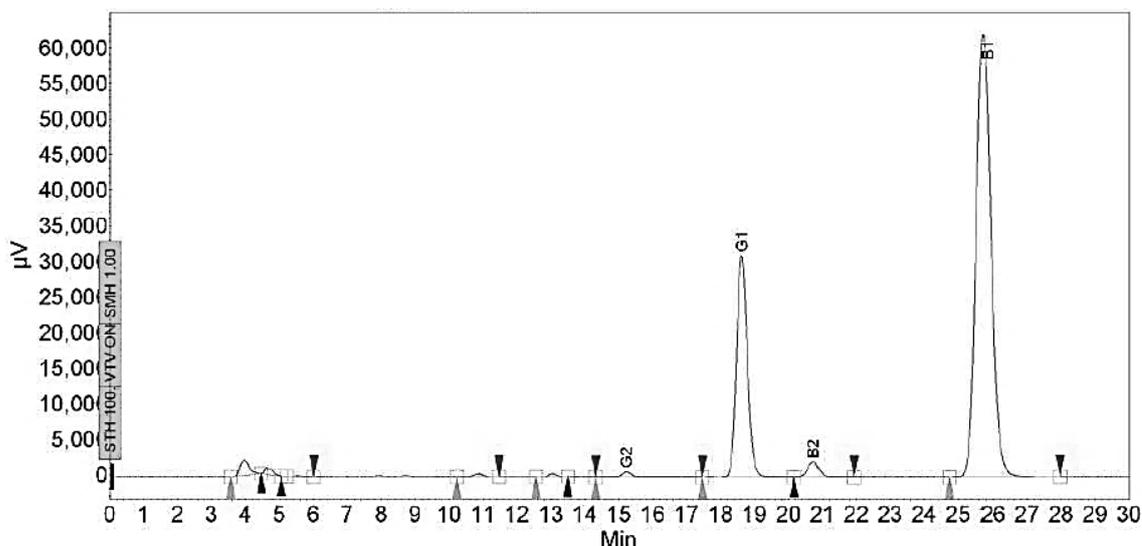


Figura A.15 - Cromatograma da produção de aflatoxinas (AFG2, AFB2, AFG1 e AFB1) por *Aspergillus parasiticus* MUM 92.02 quando crescido em PDA no tratamento controle positivo (fungicida anfotericina B $1 \mu\text{g mL}^{-1}$).

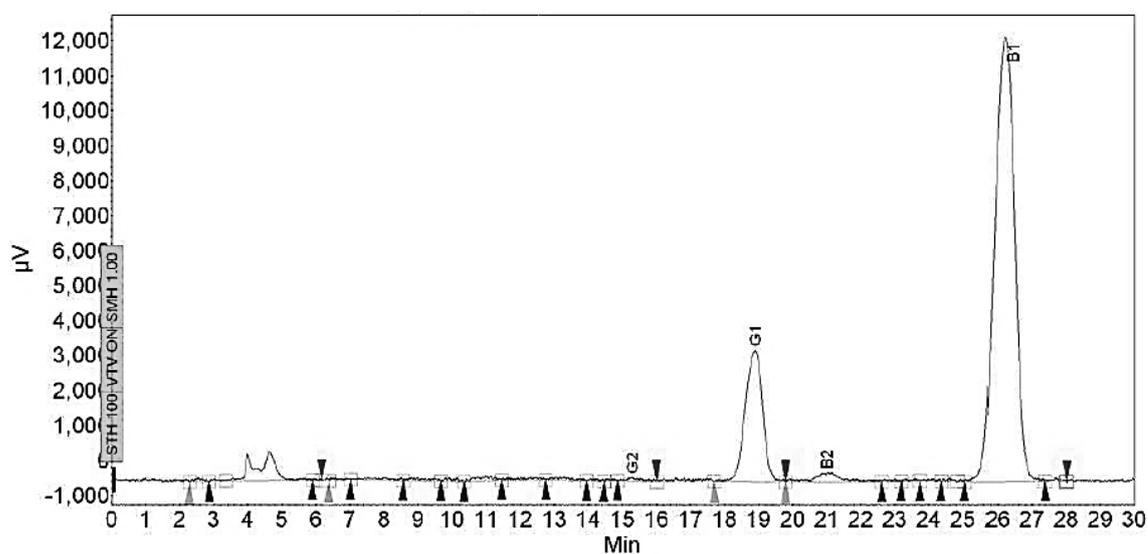


Figura A.16 - Cromatograma da produção de aflatoxinas (AFG2, AFB2, AFG1 e AFB1) por *Aspergillus parasiticus* MUM 92.02 quando crescido em PDA na concentração $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de nanopartículas de prata.

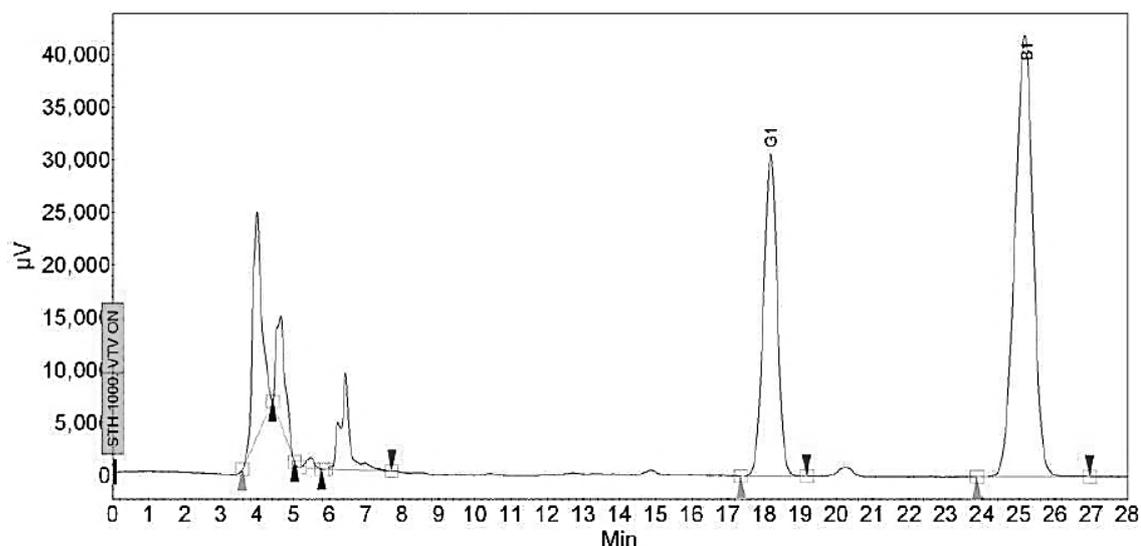


Figura A . 17 - Cromatograma da produção de aflatoxinas (AFG1 e AFB1) por *Aspergillus flavus* 08MAsp567 quando crescido em PDA no tratamento controle H_2O .

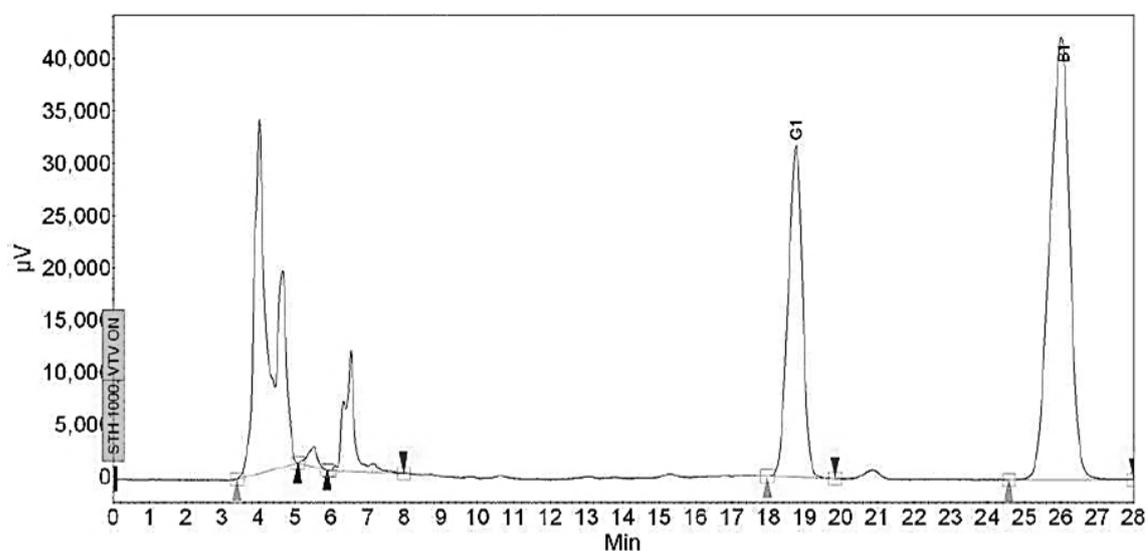


Figura A.18 - Cromatograma da produção de aflatoxinas (AFG1 e AFB1) por *Aspergillus flavus* 08MAsp567 quando crescido em PDA no tratamento controle negativo ($Na_3C_6H_5O_7$ $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ + NH_3 $1,4 \text{ mol L}^{-1}$).

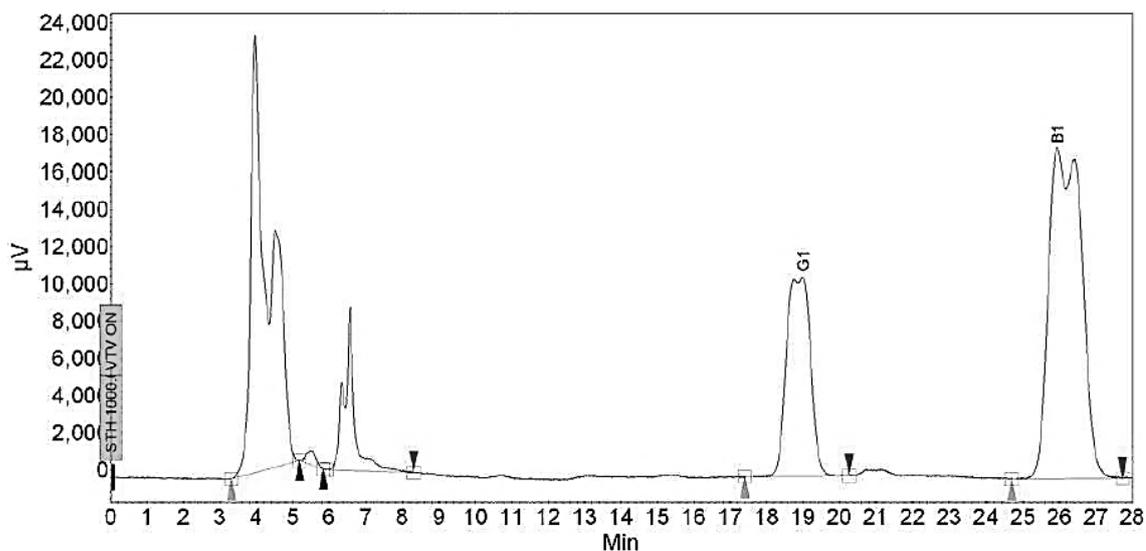


Figura A.19 - Cromatograma da produção de aflatoxinas (AFG1 e AFB1) por *Aspergillus flavus* 08MAsp567 quando crescido em PDA no tratamento controle positivo (fungicida anfotericina B $1 \mu\text{g mL}^{-1}$).

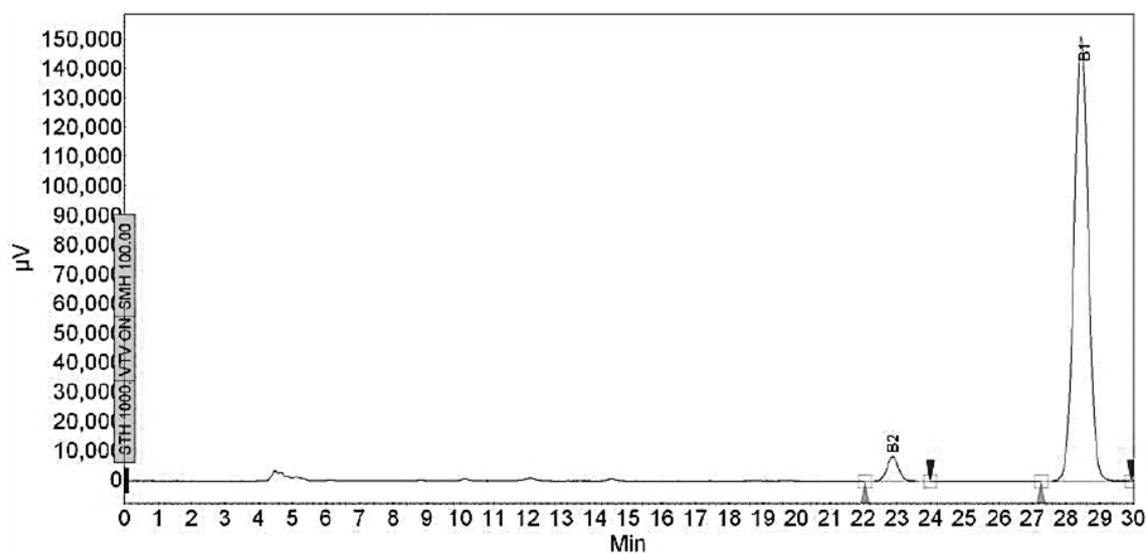


Figura A.20 - Cromatograma da produção de aflatoxinas (AFB2 e AFB1) por *Aspergillus flavus* 08Masp201 quando crescido em PDA no tratamento controle H_2O .

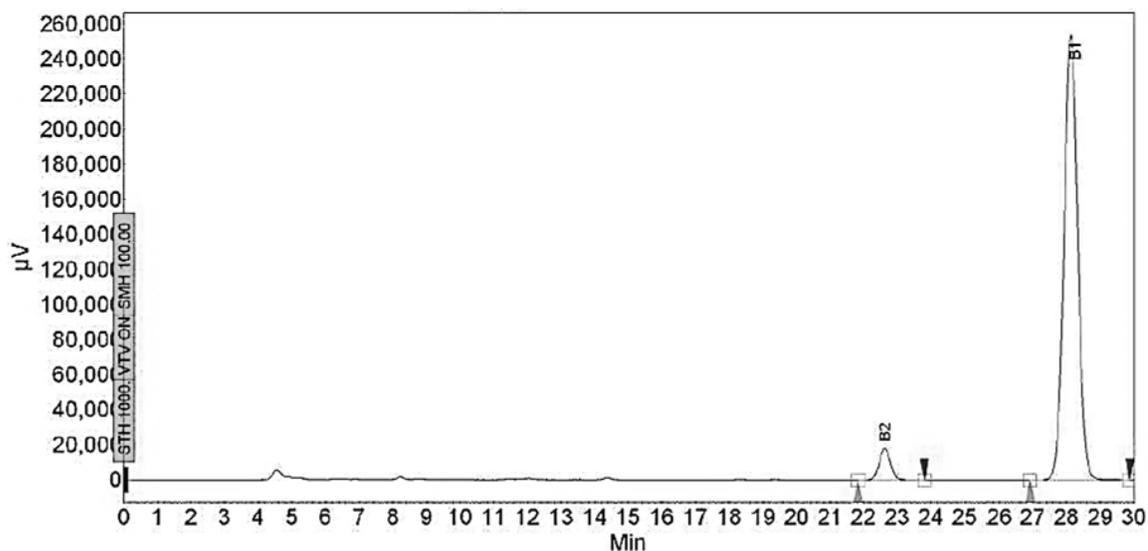


Figura A.21 - Cromatograma da produção de aflatoxinas (AFB2 e AFB1) por *Aspergillus flavus* 08Masp201 quando crescido em PDA no tratamento controle negativo ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ + NH_3 $1,4 \text{ mol L}^{-1}$).

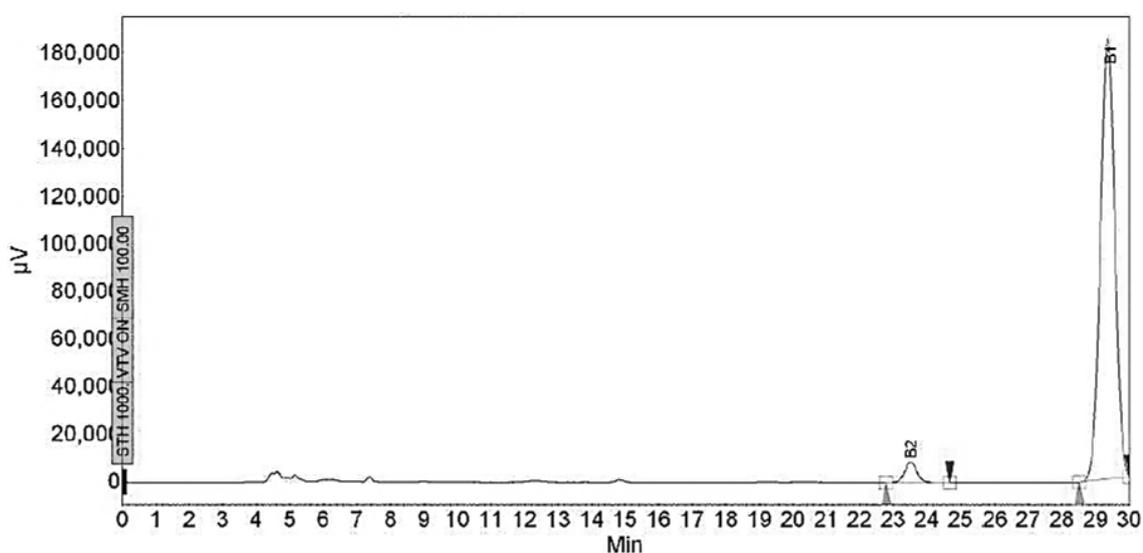


Figura A.22 - Cromatograma da produção de aflatoxinas (AFB2 e AFB1) por *Aspergillus flavus* 08Masp201 quando crescido em PDA no tratamento controle positivo (fungicida anfotericina B $1 \mu\text{g mL}^{-1}$).

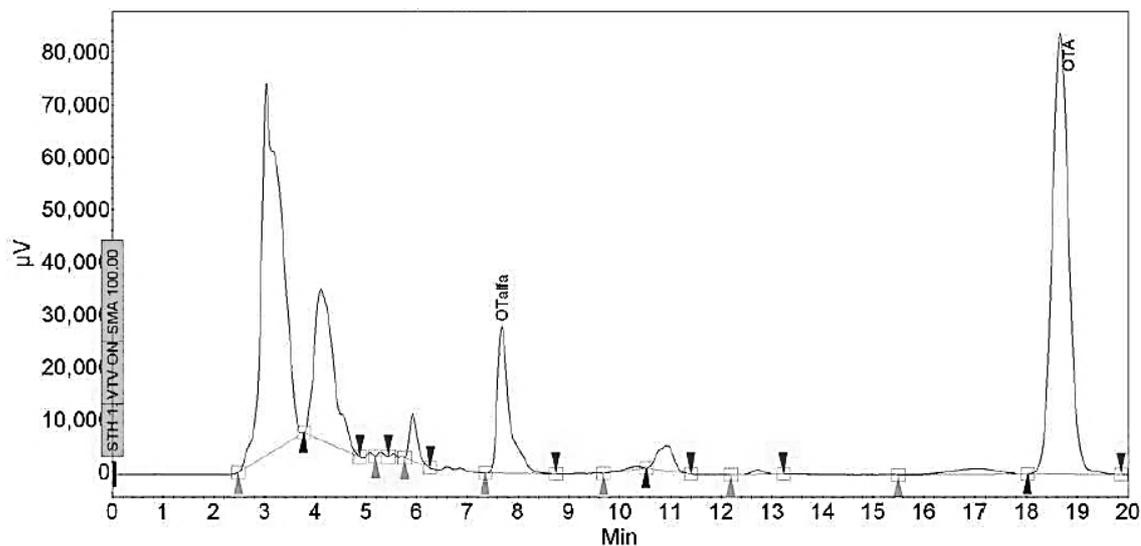


Figura A.23 - Cromatograma da produção de ocratoxina A (OTA) por *Aspergillus carbonarius* 01UAs293 quando crescido em MEA no tratamento controle H_2O .

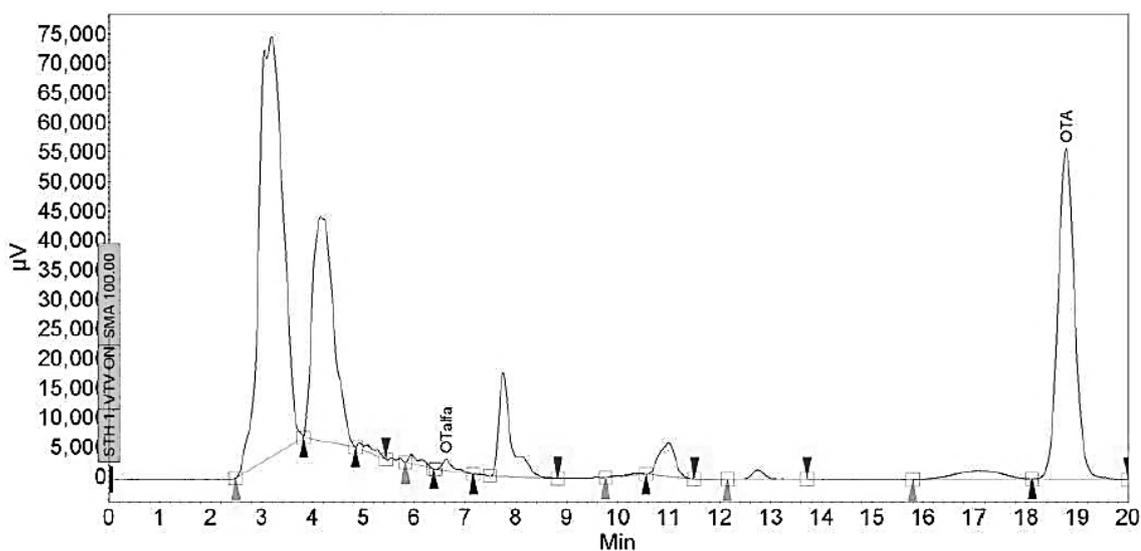


Figura A.24 - Cromatograma da produção de ocratoxina A (OTA) por *Aspergillus carbonarius* 01UAs293 quando crescido em MEA no tratamento controle negativo ($Na_3C_6H_5O_7$ $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ + NH_3 $1,4 \text{ mol L}^{-1}$).

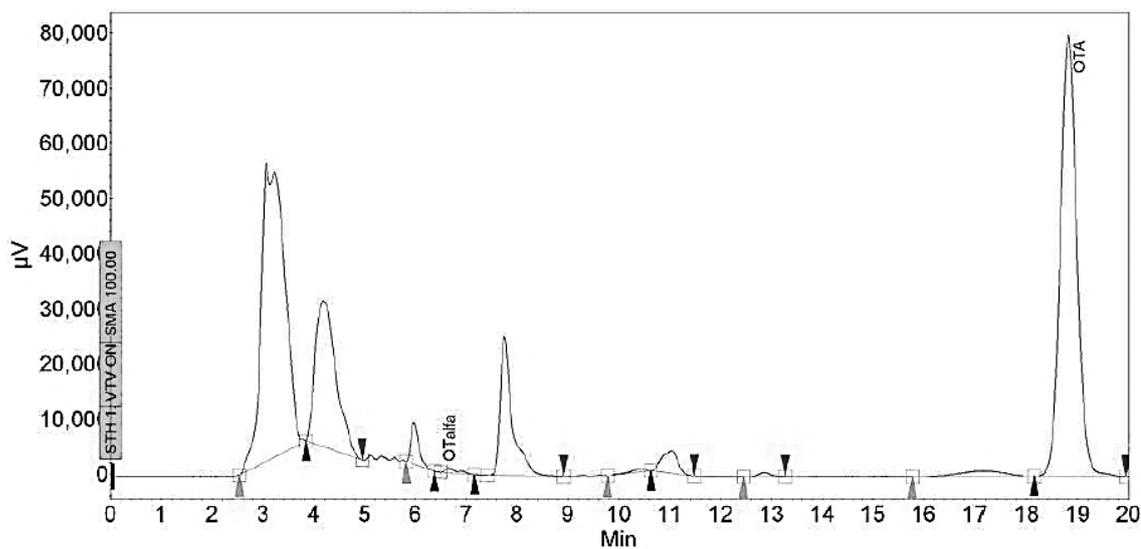


Figura A.25 - Cromatograma da produção de ocratoxina A (OTA) por *Aspergillus carbonarius* 01UAs293 quando crescido em MEA no tratamento controle positivo (fungicida anfotericina B $1 \mu\text{g mL}^{-1}$).

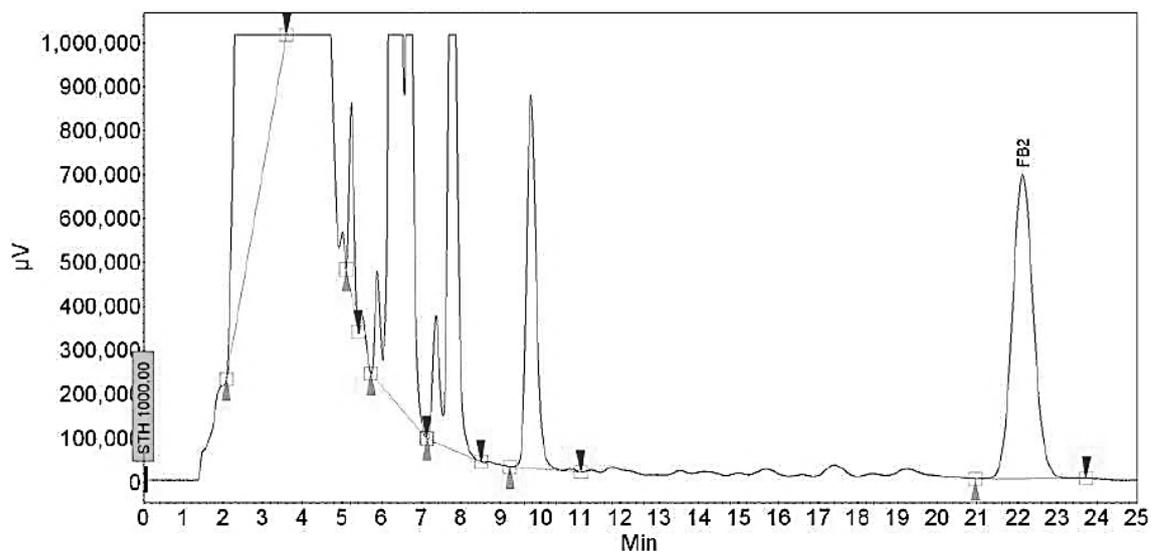


Figura A.26 - Cromatograma da produção de fumonisina B2 (FB2) produzida por *Aspergillus niger* 01UAs248 quando crescido em PDA no tratamento controle H₂O.

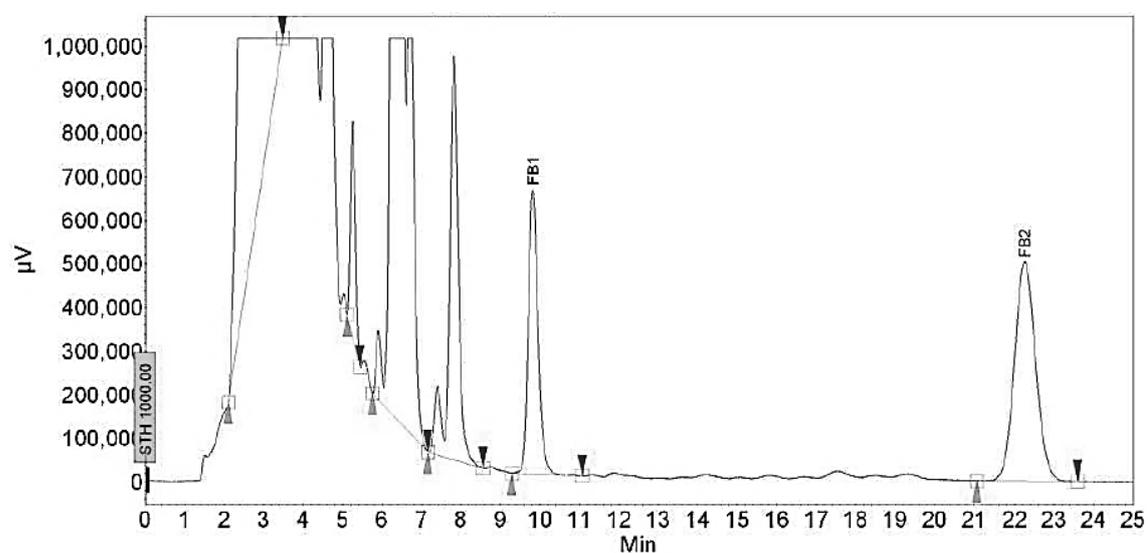


Figura A.27 - Cromatograma da produção de fumonisina B2 (FB2) produzida por *Aspergillus niger* 01UAs248 quando crescido em PDA no tratamento controle negativo ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ 0,3 mol L⁻¹ + NH_3 1,4 mol L⁻¹).

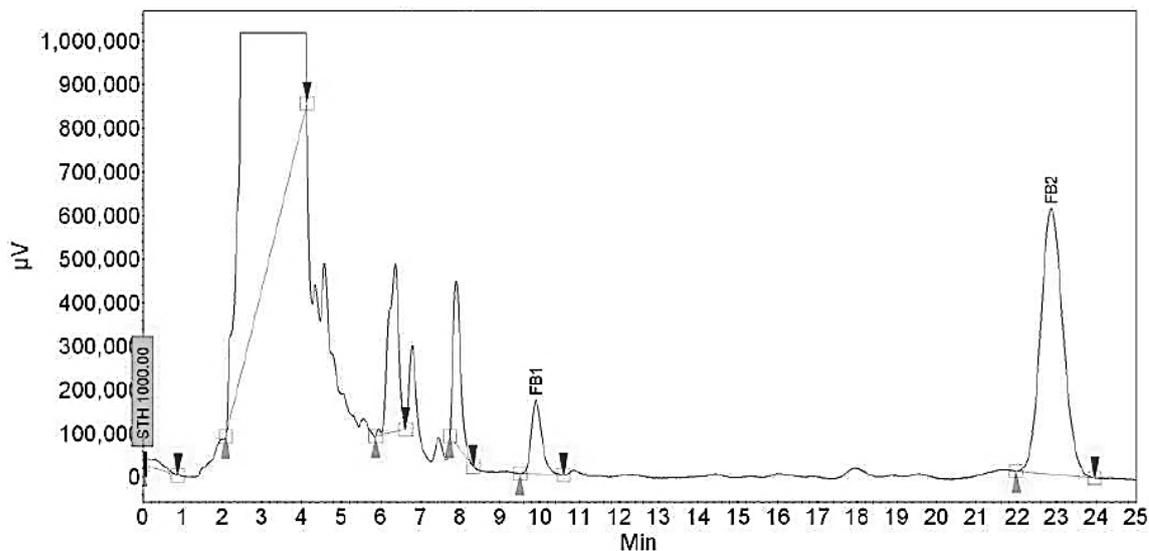


Figura A.28 - Cromatograma da produção de fumonisina B2 (FB2) produzida por *Aspergillus niger* 01UAs248 quando crescido em PDA no tratamento controle positivo (fungicida anfotericina B $1 \mu\text{g mL}^{-1}$).

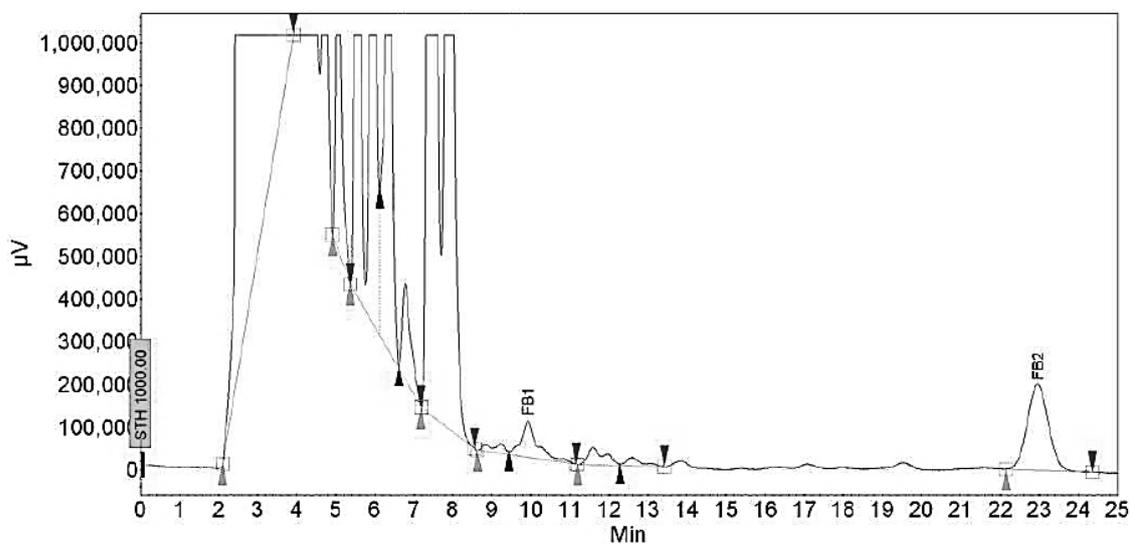


Figura A.29 - Cromatograma da produção de fumonisina B2 (FB2) produzida por *Aspergillus niger* 01UAs248 quando crescido em PDA na concentração $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de nanopartículas de prata.