



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

EDMILSON DOS SANTOS MORAIS

NANOPARTÍCULAS METÁLICAS BIOSSINTETIZADAS POR FUNGOS
ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE AMÊNDOAS DE *Bertholletia excelsa*
DUCKE

Macapá
2019

EDMILSON DOS SANTOS MORAIS

**NANOPARTÍCULAS METÁLICAS BIOSSINTETIZADAS POR FUNGOS
ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE AMÊNDOAS DE *Bertholletia excelsa*
DUCKE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amapá para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Drº Irlon Maciel Ferreira
Co-orientador: Prof. Drº Adilson Lopes Lima

**Macapá
2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal do Amapá
Elaborado por Cristina Fernandes – CRB-2/1569

Morais, Edmilson dos Santos.

Nanopartículas metálicas biossintetizadas por fungos endofíticos isolados de amêndoas de *Bertholletia excelsa* ducque / Edmilson dos Santos Moraes; Orientador, Irlon Maciel Ferreira; Coorientador, Adilson Lopes Lima. – Macapá, 2019.

114 f.

Dissertação (Mestrado) – Fundação Universidade Federal do Amapá, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Fungos endofíticos. 2. Nanopartículas metálicas. 3. Nanopartículas de prata. 4. Nanopartículas de cobre. 5. Castanha do Brasil. 6. Biocatálise I. Ferreira, Irlon Maciel, orientador. II. Lima, Adilson Lopes, coorientador. III. Fundação Universidade Federal do Amapá. IV. Título.

579.1 M828n

CDD. 22 ed.

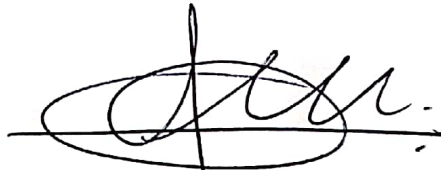
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
da Universidade Federal do Amapá

BANCA EXAMINADORA

Aluno: Edmilson dos Santos Moraes

Orientador: Prof. Drº Irlon Maciel Ferreira

Co-Orientador: Prof. Drº Adilson Lopes Lima



Drº Irlon Maciel Ferreira
Presidente

Professor Efetivo do Curso de Química da Universidade Federal do Amapá, UNIFAP.



Drª Brenda Lorena Sánchez Ortiz
Membro Titular

Doutorado em Ciências Químicas pela Universidade Nacional Autónoma de México, UNAM

David Esteban Quintero Jimenez

Drº David Esteban Quintero Jimenez
Membro Titular

Professor Efetivo do Curso de Química da Universidade Federal do Amapá, UNIFAP.

Data: 16/05/2019

***Dedico esse trabalho a aqueles
que me deram a vida e me
ensinaram a vivê-la. A minha
mãe M^a do Socorro Souza dos
Santos e meu pai Eloi Xavier de
Morais.***

***“Os melhores frutos veem das
sementes sem nenhum valor
aparente”***

(Edmilson dos Santos Moraes)

AGRADECIMENTOS

À Deus, pois sem ele nada poderia ter ocorrido;

Ao Prof. Dr^o. Irlon Maciel Ferreira, pela orientação, paciência, oportunidade de aprendizado e confiança depositada em mim para a realização deste trabalho;

À minha mãe M^a do Socorro Souza dos Santos e ao meu pai Eloi Xavier de Moraes, pelo amor, carinho e compreensão durante o tempo em que estive ausente.

Aos amigos do Laboratório de Biocatalise e Síntese Orgânica aplicada (BIORG): Iracirema Sena (Mara), Victor Hugo, Sônia do Socorro, Fernando Neves, Inana Fauro pela disponibilidade em ajudar sempre que precisei.

Aos meus amigos da turma de 2017 do programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas PPGCF/UNIFAP; em especial ao Fabricio Holanda, Ana Paula, Everton Vale, Letícia Mehl, Lethicia Brandão e Anne do Socorro pelo companheirismo, auxílio, conselhos e apoio desde o início desta jornada;

Aos meus amigos Jessyca Mourão, Bruno Alves, Lizandra Mayara, Aldina Lobato, Sâmia Barros, Orimax Monteiro, Daniele Farias, Greycy Anne Sena, Raylene Gabrielle, Linikek Lima pelo apoio e companheirismo;

À Adriana Maciel pelo auxílio e por esta sempre disponível;

Ao meu co-orientador Dr^o Adilson Lopes Lima da EMBRAPA-AP pela ajuda e disponibilidade;

A Dr^a Silvia Maria Fautino pelas contribuições e auxílio;

A Dr^a Raquel Rodrigues do Amaral pela ajuda;

Ao laboratório de pesquisa em Fármacos, em especial ao seu coordenador Dr^o Prof^o Titular José Carlos Tavares pela cooperação e disponibilização de seu laboratório de pesquisa;

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas PPGCF/UNIFAP e aos professores do programa.

A FAPEAP e CAPES pela bolsa de estudo.

E por fim, a todos que participaram de forma direta ou indireta da realização deste trabalho.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	NANOPARTÍCULAS DE PRATA E COBRE.....	15
1.2	PROCESSO DE OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS.....	15
1.3	OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS POR MICRORGANISMOS.....	17
1.4	SINTESE DE NANOPARTICULAS METÁLICAS POR FUNGOS ENDOFITICOS DA AMAZÔNIA.....	19
1.5	APLICAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS.....	22
1.5.1	Aplicação antimicrobiana de nanoparticulas metálicas.....	22
1.5.2	Aplicação antiviral de nanoparticulas metálicas.....	25
1.5.3	Radioterapia por nanoparticulas metálicas.....	27
2	OBJETIVOS.....	28
2.1	OBJETIVO GERAL.....	28
2.2	OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	28
3	ARTIGO 1- Biosynthesis of silver nanoparticles by endophytic fungi isolated from <i>Bertholletia excelsa</i> Ducke (Brazil nut) for antimicrobial evaluation and environmental toxicity.....	29
4	ARTIGO 2 - Nanopartículas de cobre biossintetizadas por fungo endofítico <i>Phaeoacremonium</i> sp. isolado de amendoas de <i>Bertholletia excelsa</i> Ducke.....	56
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	72
	REFERÊNCIAS.....	74
	ANEXOS – Normas de publicação dos respectivos periódicos.....	84

Figura 1-	Síntese para obtenção de nanopartículas metálicas	16
Figura 2-	Síntese de nanopartículas metálicas por microrganismos	17
Figura 3-	Classificação e existência dos fungos endofíticos na célula vegetal	20
Figura 4-	Ação antimicrobiana de nanopartículas metálicas	23
Figura 5-	Atividade antiviral das nanopartículas metálicas	26
Figura 6-	Radioterapia com nanopartículas metálicas	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Síntese de nanopartículas metálicas por microrganismos	18
------------------	--	----

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

Ag	Prata
AgNPs	Nanopartículas de prata
BDA	Ágar batata dextrose
BOD	Demanda bioquímica de oxigênio, do inglês <i>Biochemical oxygen demand</i>
Cu	Cobre
CuNPS	Nanopartículas Metálicas de Cobre
D.nm	Diâmetro por Nanometro
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho com Transformador Fourier
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
mg	Miligrama
mL	Mililitro
NpBP	Fosfato
NpEtOH	Etanol
NpGli	Glicose
NpASC	Ácido ascórbico
Nm	Nanômetro
NPs	Nanopartículas
pH	Potencial hidrogeniônico
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta-Visível
µL	Microlitro

NANOPARTÍCULAS METÁLICAS BIOSINTETIZADAS POR FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE AMÊNDOAS DE *Bertholletia excelsa* DUCKE

RESUMO

INTRODUÇÃO: A busca por métodos biológicos para obtenção de nanopartículas metálicas possui destaque devido as diversas aplicações biotecnológicas, estes procedimentos surgem como alternativa frente aos métodos tradicionais, físicos e químicos.

OBJETIVO: Biossintetizar nanopartículas metálicas de prata (AgNP) e cobre (CuNP) por fungos endofíticos isolados de amêndoas de *Bertholletia excelsa* (Castanha do Brasil) provenientes da Amazônia. **METODOLOGIA:** Realizou-se uma triagem inicial com seis fungos endofíticos: *Aspergillus* sp. (Biorg 5), *Trichoderma* sp. (Biorg 7), *Phaeoacremonium* sp. (Biorg 15), *Rhizopus* sp. (Biorg 16), *Aspergillus* sp. (Biorg 22) e *Clamidosporium* sp. (Biorg 36), logo após, um delineamento experimental foi utilizado para obtenção das melhores condições de biossíntese de AgNps para o fungo que produziu as Nps em menor tamanho. Para as CuNPs, utilizou-se diferentes co-substratos: NpBP, NpEtOH, NpGly e NpAsc, seguido de caracterização por infravermelho com transformada fourier, além de avaliar os efeitos do cobre no crescimento e morfologia de *Phaeoacremonium* sp.

RESULTADOS E DISCUSSÕES: após triagem com os fungos endofíticos, o *Phaeoacremonium* sp. (Biorg 15) produziu AgNPs com tamanho até 44,06 nm. A caracterização das AgNPs por FTIR sugerem interações entre o cofator fosfato e componentes miceliais do fungo *Phaeoacremonium* sp. com as AgNPs. As NPs de prata apresentaram atividade antibacteriana contra as cepas: *Staphylococcus aureus* (ATCC33591), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC12228), *Proteus mirabilis* (ATCC 15290) e *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 4352) e os testes de ecotoxicidade em microalgas *Chlorella vulgaris* mostraram alta toxicidade nas concentrações (10 mmol e 0.001 mmol). Em relação às CuNPs, os resultados mostraram que o co-adjuvante fosfato produziu CuNPs de 66,84 nm com -34 mV de potencial zeta. A análise por FTIR corrobora com a formação de CuNPs. Em tratando-se da análise de crescimento do halo em meio sólido na presença do metal, ocorreu leve deformação no crescimento de *Phaeoacremonium* sp. Enquanto que na ausência do metal, não observou-se qualquer efeito morfológico. **CONCLUSÕES:** Os fungos endofíticos isolados das amendoas de *Bertholletia excelsa* foram capazes de produzir AgNPs a CuNPs em tamanhos que variaram de 50-300 nm, como alternativa viável, de baixo custo, sem adição de agentes tóxicos e condições brandas, além de demonstrarem potencial biocidas contra bactérias e toxicidade em microalgas *C. vulgaris*. Enquanto que para a obtenção das CuNPs os agentes redutores exerceram papel de capeadores e protetores.

Palavras-Chave: Fungos endofíticos; Nanopartículas metálicas; Nanopartículas de prata; Nanopartículas de cobre; Castanha do Brasil; Biocatálise.

Agradecimentos: FAPEAP, CAPES, CNPq.

METAL NANOPARTICULES BIOSYNTHESIZED BY ENDOPHYTIC FUNGI ISOLATED OF ALMONDS OF *Bertholletia excelsa* DUCKE.

ABSTRACT

INTRODUCTION: The search for biological methods to obtain metallic nanoparticles is highlighted due to the diverse biotechnological applications, these procedures appear as alternative to traditional, physical and chemical methods. **OBJECTIVE:** Biosynthesis of silver metallic nanoparticles (AgNP) and copper (CuNP) by endophytic fungi isolated from *Bertholletia excelsa* (Brazil nut) almonds from Amazonia. **METHODOLOGY:** An initial screening with six endophytic fungi was carried out: *Aspergillus* sp. (Biorg 5), *Trichoderma* sp. (Biorg 7), *Phaeoacremonium* sp. (Biorg 15), *Rhizopus* sp. (Biorg 16), *Aspergillus* sp. (Biorg 22) and *Cladosporium* sp. (Biorg 36), an experimental design was used to obtain the best AgNPs biosynthesis conditions for the fungus that produced Nps in smaller size. For the CuNPs, different co-substrates were used: NpBP, NpEtOH, NpGly and NpAsc, followed by infrared characterization with fourier transform, besides evaluating the effects of copper on the growth and morphology of *Phaeoacremonium* sp. **RESULTS AND DISCUSSION:** after screening with endophytic fungi, *Phaeoacremonium* sp. (Biorg 15) produced AgNPs up to 44.06 nm in size. The characterization of AgNPs by FTIR suggests interactions between the phosphate cofactor and mycelial components of the fungus *Phaeoacremonium* sp. with AgNPs. The silver NPs showed antibacterial activity against the strains *Staphylococcus aureus* (ATCC33591), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC12228), *Proteus mirabilis* (ATCC 15290) and *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 4352) and the ecotoxicity tests on microalgae *Chlorella vulgaris* showed high toxicity in concentrations (10 mmol and 0.001 mmol). Regarding the CuNPs, the results showed that the co-adjuvant phosphate produced CuNPs of 66.84 nm with -34 mV zeta potential. The FTIR analysis corroborates the formation of CuNPs. In the case of growth analysis of halo in solid medium in the presence of the metal, there was slight deformation in the growth of *Phaeoacremonium* sp. While in the absence of the metal, no morphological effect was observed. **CONCLUSIONS:** The endophytic fungi isolated from *Bertholletia excelsa* were able to produce AgNPs at CuNPs in sizes ranging from 50-300 nm as a viable alternative, low cost, no addition of toxic agents and mild conditions, and demonstrate potential biocides against bacteria and toxicity in microalgae *C. vulgaris*. While to obtain the CuNPs the reducing agents played the role of cappers and protectors.

Keywords: Endophytic fungi; Metal nanoparticles; Silver nanoparticles; Copper nanoparticles; Brazil nuts; Biocatalysis.

Acknowledgements: FAPEAP, CAPES, CNPq.

A nanotecnologia é um ramo da tecnologia que influencia outras áreas, tais como a medicina através de cicatrização de feridas, dispositivos médicos e larvicidas, na química através da síntese orgânica ou biocatálise, na agronomia através de correção do solo ou microbicitas, na farmácia através do uso combinado de liberação de drogas (BAINBRIDGE et al., 2016). Esse uso abrangente é possível através das diferentes características tais como, boa condutibilidade elétricas e magnéticas, estabilidade de tamanho, forma, propriedades ópticas. (BAGHERZAD et al., 2017).

O termo "nano" vem da palavra grega "*nanos*", que significa anão e denota uma medida na escala de um bilionésimo (10^9) de um metro de tamanho (BOHOLM et al., 2016), quando comparada a um fio de DNA que possui 2,5 nm de diâmetro, um vírus é de cerca de 100 nm de largura e uma bactéria é de 1-3 μ m de largura (DOUTRE et al., 2014). Já as nanopartículas são definidas como dispersões particuladas sólidas com pelo menos em uma faixa de tamanho de 1-1000 nm (PANTIDOS et al., 2014).

A nanotecnologia representa um grande avanço científico com amplo alcance de funcionalidade e potencial de aplicação (MUKHERJEE et al., 2014). Nessa perspectiva destacam-se as aplicabilidades das nanopartículas de prata (NPs-Ag) e cobre (NPs-Cu), aplicadas diretamente em diferentes áreas, tais como, médicas e alimentícias, a fim de garantir o controle de microrganismos patogênicos a níveis de segurança pública (MARTINS et al., 2016).

Também é interessante relatar que existem uma variedade de procedimentos químicos e físicos que podem ser utilizados para a síntese de NPs metálicas (SILVA et al., 2014), entretanto, estes métodos possuem vários inconvenientes, incluindo a utilização de solventes tóxicos, caros e geração de subprodutos, inviabilizando a obtenção ou utilização das NPs em alguns casos (NARAYANAN E SAKTHIVEL, 2010).

Dentre os métodos utilizados, os métodos físicos possuem maior destaque e também são conhecidos como *top down*, no qual o material é manipulado em escala macro, ocorrendo a quebra das partículas para que as mesmas fiquem em escala nanométrica (GEONMONOND et al., 2018). Já os métodos químicos são baseados na redução de íons metálicos seguido da agregação de tais átomos de forma controlada (ZHU et al., 2016).

A força do agente redutor influencia na obtenção das NPs, bem como o pH do meio reacional, sendo que quanto mais forte o agente redutor em meio ácido, maior a tendência

a formar aglomerados, consequentemente partículas maiores, enquanto em meio mais alcalino tende a formação de partículas menores (SHARMA et al., 2009; ALBERNAZ, 2014).

1.1 NANOPARTICULAS DE PRATA E COBRE

A síntese de NPs consiste em reduzir um íon metálico de um substrato, seja este de natureza química ou biológica (SHABESTARIAN et al., 2016).

De acordo com ABDI (2013) o tipo de material mais presente nos produtos contendo nanotecnologia, são as nanopartículas de prata consideradas como aglomerados de íons com tamanho de até 100 nm, podendo apresentar morfologia diversificada como esfera, cubo, bastão ou multifacetadas.

SIDDIQUE et al., (2014) relataram que o tamanho de nanopartículas de prata geralmente são descritas com diâmetro de partículas esféricas em fase sólida, em pó ou encapsulada em meio sólido que podem ser medidas através da difração em laser e a difração por raios X, no entanto, a microscopia eletrônica de transmissão é mais utilizada para tal finalidade. Já para medir o tamanho de nanopartícula suspensa em fase líquida utiliza-se a dispersão de luz dinâmica (DE KANTER et al., 2016).

A forma e tamanho das nanopartículas metálicas tem grande influência no seu tamanho e consequentemente no efeito como material antimicrobiano e a presença de cargas na superfície das mesmas facilita a ligação com a superfície das bactérias, e pode resultar em melhor efeito bactericida (DIZAJ et al. 2014). Todavia, a sua distribuição e a absorção em sistemas biológicos dependem do seu tamanho e as interações preferenciais com as moléculas orgânicas presentes no microrganismo (ANANTH et al., 2014).

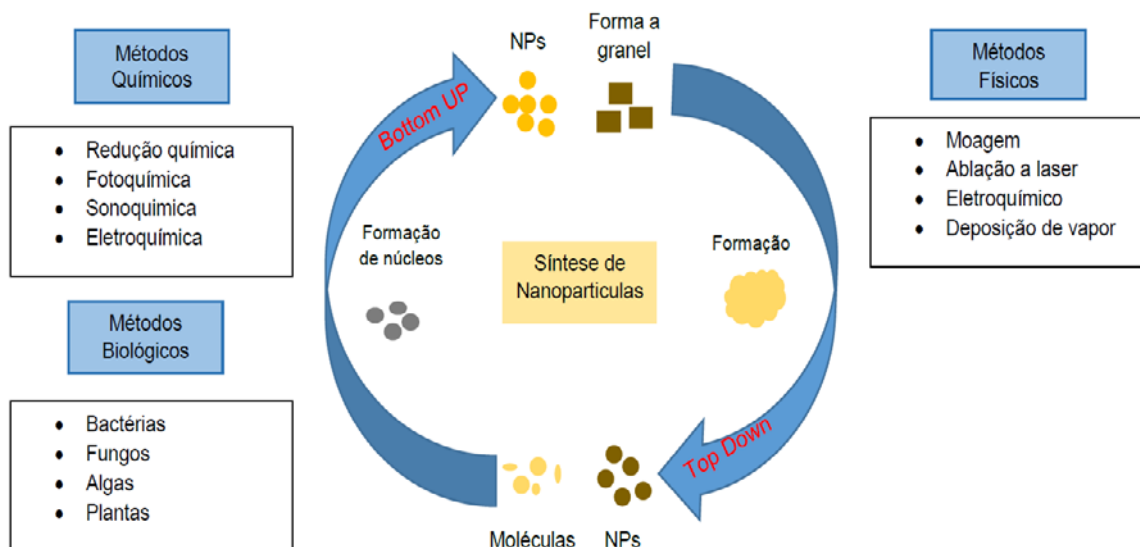
Já as nanopartículas de cobre podem ser mais facilmente obtidas com baixo custo, quando comparadas NP de outros metais, , além de ser consideradas um alternativa para nanopartículas de ouro e prata (MOSES, 2014). Entre muitos metais, o cobre é o composto base de muitos materiais, chamando atenção e tornando-o atraente, devido a suas propriedades catalíticas, ópticas e elétricas (TRAN et al., 2014).

1.2 PROCESSOS DE OBTENÇÃO DE NANOPARTICULAS METÁLICAS

A síntese de nanopartículas metálicas pode ocorrer de duas formas: “*Top Down*” ou “*Bottom Up*” (**Figura 1**). No processo “*Top Down*”, as NPs são produzidas por redução de sua forma a granel, por métodos físicos (KHAN et al., 2017). Já em “*Bottom Up*”, ocorre a

partir de átomos ou moléculas, onde a principal reação é de redução ou oxidação por métodos químicos ou biológicos (BORGSCULTE et al., 2017). Os métodos biológicos são chamados de síntese verde, as NPs são obtidas com ação de compostos advindos de células ou extratos enzimáticos de microrganismos ou plantas (HUSSAIN et al., 2016).

Figura 1 - Síntese para obtenção de nanopartículas metálicas



Fonte: adaptado de MUKHERJI et al., (2018)

GALAN et al., (2015) relatam que existem diferentes metodologias para obtenção de nanopartículas de cobre, destacando-se tratamento térmico, co-precipitação, redução de íons com agentes redutores químicos. Porém, tais métodos apresentam elevado custo e envolvem produtos químicos poluentes (CHIBUIKE et al., 2014). Enquanto, que no método de síntese verde a redução química de um sal metálico ocorre na presença de um agente redutor não tóxico e tão pouco prejudicial ao manipulado e ao meio ambiente, que também atua como agente estabilizante na síntese, revestindo as nanopartículas metálicas (DAS et al., 2017). Logo este método minimiza os impactos ambientais surgindo como uma forma alternativa para diminuir os danos causados por agentes tóxicos (SILVA et al., 2017).

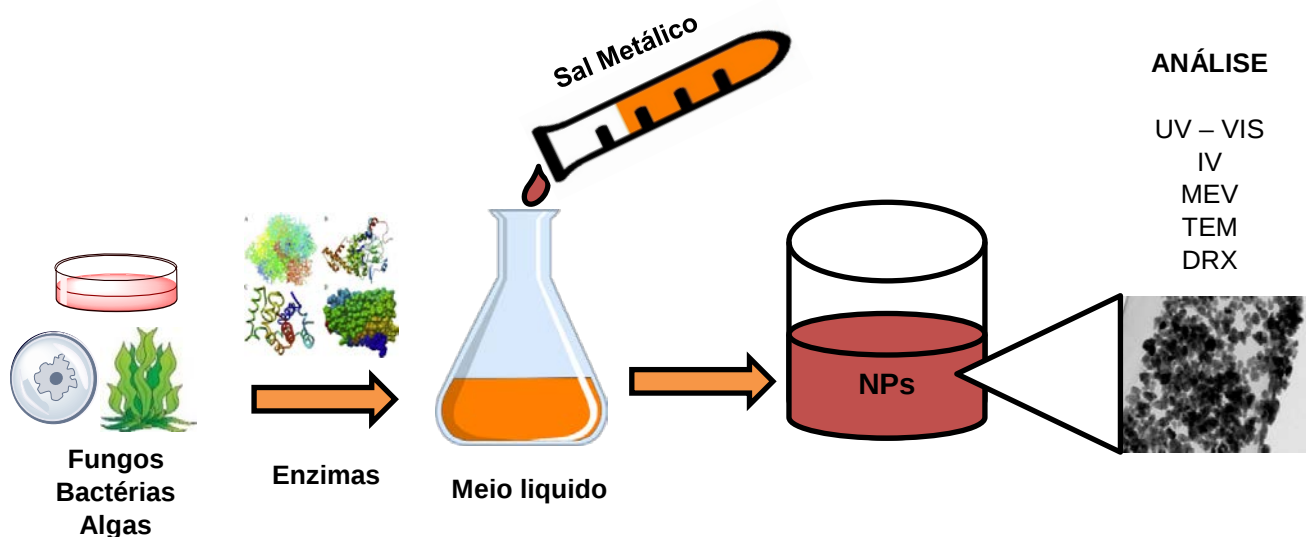
Um estudo realizado por RAJESHKUMAR et al., (2018), relatou a biossíntese de nanopartículas de cobre usando extrato de sementes de *Persea americana*. As nanopartículas foram caracterizadas por espectroscopia UV-Vis, XRD, FT-IR, SEM e TEM, observando-se sua forma esférica e de natureza cristalina, a faixa de tamanho dessas partículas foram de 42 a 90 nm, As nanopartículas de cobre apresentaram boa atividade antifúngica em *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigates* e *Fusarium oxysporum* e antibacteriana em *Escherichia coli*, *Streptococcus* sp, *Klebsiella* sp e *Rhizobacterium*.

1.3 OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS POR MICRORGANISMOS

Nos últimos anos, o número de trabalhos, envolvendo células de microrganismos como fungos, bactérias e algas, empregados para obtenção de nanopartículas metálicas, esta aumentando gradativamente, devido à sua facilidade de manuseio, baixo custo de manutenção, baixa geração de resíduo, eficiência no processo e não requerem agentes estabilizadores (BOROUMAND MOGHADDAM et al., 2015; CHAN et al., 2013; FERNÁNDEZ et al., 2016). Neste processo são utilizadas enzimas advindas dos microrganismos que atuam como redutores do sal metálico para nanopartículas.

A habilidade da obtenção de nanopartículas metálicas por microrganismos deve-se pela participação das enzimas do tipo redutase, polissacarídeos, polipetídeos, proteínas, açúcares ou co-fatores orgânicos, produzidos por processos metabólicos que convertem os metais tóxicos (sal metálico) em íons metálicos de nanopartículas menos tóxicas, podendo ocorrer de forma intracelular ou extracelular (THAPA et al., 2017; KATAS et al., 2018). Quando o microrganismo está sob condição de estresse, como a alta concentração de metais, eles realizam para sua sobrevivência vários mecanismos de eliminação dos metais tóxicos, tais como, acúmulo de íons metálicos dentro das células, fluxo ativo dos íons metálicos através da membrana celular e redução química dos íons (HULKOTI et al., 2014), (Figura 2).

Figura 2 – Síntese de nanopartículas metálicas por microorganismos



Fonte: Adaptado de Boroumand Moghaddam et al., (2015); Chan et al., (2013); Fernández et al., (2016).

Pode-se citar alguns exemplos de nanopartículas metálicas obtidas a partir de sais de prata, ouro, chumbo e cobre pelo processo de transformação microbiana (**Tabela 1**). Os microrganismos apresentam vantagens em relação a outros métodos, pois no geral apresentam maior tolerância aos metais, possuem maior capacidade de bioacumulação e maior facilidade no controle do tamanho das nanopartículas, pois impedem a agregação das NPs, proporcionando maior estabilidade ao longo do tempo (MENON et al., 2017).

Tabela 1. Síntese de nanopartículas metálicas obtidas por microrganismos

Microorganismos	Sal metálico	Tamanho de nanopartículas (nm)	Referência
<i>Pseudomonas deceptionensis</i>	Prata	10-30	Zahir, et al., Antimicrob. Agents Chemother., 59 (2015), pp. 4782-4799
<i>Candida utilis</i> NCIM 3469	Prata	20-80	Waghmare, et al., 3 Biotech, 5 (2015), pp. 33-38
<i>Neurospora crassa</i>	Ouro	>100	Castro-Longoria, et al., Colloids Surf. B Biointerfaces, 83 (2011), pp. 42-48
<i>Fusarium sp.</i>	Cobre	20-50	Viet, et al., Journal of Nanomaterials, (2016), pp. 1-7.

Estudos desenvolvidos por LARA et al., (2010) sugerem que o modo de ação das AgNPs é semelhante ao modo de ação dos íons de prata, que interagem por meio de afinidade com os átomos de enxofre, oxigênio ou nitrogênio, que estão presentes em aminoácido e ácidos nucleicos, assim como os grupos tiols ou fosfatos.

Apesar das vantagens do uso de microrganismos na transformação de nanopartículas metálicas, o grande desafio, é a diminuição do tempo de reação, a garantia da padronização do tamanho e carga das partículas, pois tais microrganismos estão sujeitos a altas influências de pH, temperatura, luminosidade concentração dos sais, podendo afetar o rendimento e a forma das nanopartículas (POURI et al., 2018).

PALI et al., (2018) realizaram um levantamento bibliográfico do uso de nanopartículas metálicas utilizando microrganismos marinhos, destacando-se às suas extensas aplicações nas ciências biomédicas. O uso de micróbios marinhos para a síntese de nanopartículas metálicas apresentou algumas vantagens frente aos micróbios terrestres, como, redução do tempo de reação. Recentemente, microrganismos marinhos, como:

bactérias, cianobactérias, actinobactérias, leveduras e fungos foram reconhecidos como potenciais para a síntese de NPs (MANIVASAGAN et al., 2016).

1.4 SINTESE DE NANOPARTICULAS METÁLICAS POR FUNGOS ENDOFITICOS DA AMAZÔNIA

Estima-se que podem existir mais de 1 milhão de espécies em todo o mundo. Supõe-se que as regiões tropicais sejam os locais com o maior potencial para descoberta de novas espécies, em especial a Amazônia, considerada o paraíso dos fungos por ter umidade e temperatura elevada (SOTÃO et al., 2004a).

Pouco se conhece sobre os fungos do bioma amazônico, não existe uma descrição com citação de todas as espécies já isoladas, o que impossibilita a informação de dados quantitativos, referentes à diversidade desse grupo na região (FRACETTO et al., 2013). Os estudos mais significantes envolvendo fungos isolados do Bioma Amazônico foram realizados e descritos por Paul Hennings, no período de 1900 a 1908. Os pesquisadores que mais colaboraram para esse trabalho foram C. Baker, E. Ule e J. Huber. No conjunto, essas coleções são consideradas como um marco para o levantamento da Micota Amazônica (MAIA et al., 2015). Vários outros naturalistas e micólogos, como Chaves Batista, visitaram a região e contribuíram para o conhecimento dos fungos isolados desta região. No Herbário João Murça Pires, do Museu Goeldi (MG), estão depositadas importantes coleções históricas e as resultantes de levantamentos mais recentes (SOTÃO et al., 2004b)

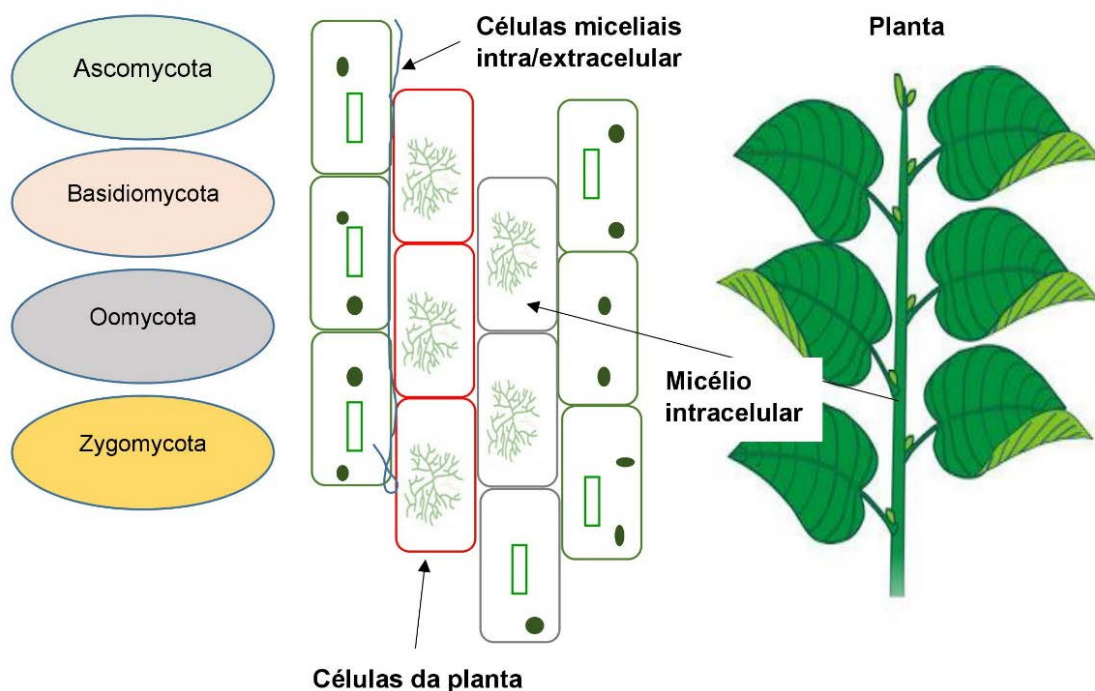
Dentro desta rica biodiversidade tem-se os fungos endofíticos definidos como organismos que vivem em todos os tecidos vegetais saudáveis, sem sinais de doença ou alterações morfológicas em parte ou todo o ciclo de vida da planta (DUTTA et al., 2014). A existência de fungos no interior das plantas é conhecida desde o final do século XIX, e o termo "endófito" foi cunhado pela primeira vez em 1866 por de Bary (KRINGS et al., 2007). Tais fungos estão associados as plantas há mais de 400 milhões de anos e podem viver na forma micelial em associação biológica com a planta viva (MARINS et al., 2017) e são encontrados em todos os tipos de plantas: árvores, gramíneas, plantas herbáceas e têm sido freqüentemente usados para descrever a micota interna de plantas, sendo considerados como um componente importante da biodiversidade (MCNEISH et al., 2016).

Diversos estudos demonstraram que várias interações endofíticas variam de mutualistas a antagônicas, dependendo do genótipo do hospedeiro e do endofítico, e das condições ambientais (KHARE et al., 2018).

RODRIGUES (2010), relata que a biodiversidade de fungos endofíticos é composta por representantes dos filos *Ascomycota*, *Zygomycota*, *Basidiomycota*, *Gloerulomycota* e *Dothideomycete* e diversos fungos dos gêneros: *Curvakaria*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Epicoccum*, dentre outros. Algumas espécies de fungos como: *Epicoccum nigrum* e *Neotyphodium* sp. Podem ser utilizados no controle biológico contra patógenos de plantas. Outro exemplo é do efeito repelente de metabolitos produzidos por fungos endofíticos da família *xylariaceae*, contra as larvas dos besouros vetores de doenças em plantas do gênero *Fagus*.

TAYLOR et al., (2016) estimaram que mais de um milhão de fúngos endofíticos existam na natureza (com alguma taxa dos fungos endofíticos *Basidiomycota*, *Zygomycota* e *Oomycota*, classificação e existência de acordo com sua existência na célula vegetal (**Figura 3**). Mas também existem maneiras diferentes de agrupa fungos endofíticos, por exemplo, pelo modo de transmissão em particular, e distinção entre os endofíticos das *Clavicipitaceae* (endofíticos clavicipitáceos) e o resto (endofíticos não-clavicipitáceos) (GOUDA et al., 2016). Essas classificações são importantes em virtude de cada grupo apresentar características peculiares, diferindo-se entre si, tendo diferentes pontenciais e aplicações específicas.

Figura 3 - Classificação e existência dos fungos endofíticos na célula vegetal



Fonte: Adaptado de Rajamanikyam et. al., (2017)

RANI et al., (2017), obtiveram nanopartículas de prata utilizando fungos endofíticos *Aspergillus terreus* isolados de *Calotropis procera* e posteriormente avaliaram a atividade antibacteriana contra cepas bacterianas. As AgNPs sintetizadas mostraram atividade antibacteriana significativa contra *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. A concentração inibitória mínima foi na faixa de 11,43 µg/ml e 308 µg/ml.

ALMEIDA (2019) realizou a síntese de nanopartículas de prata por fungos endofíticos obtidos de guaranazeiro. Os isolados 3013 R1, 3016 R3, 301 R1 e 365 R2 da espécie *Fusarium concolor* apresentam potencial para a produção de AgNPs e avaliaram a atividade antifúngica no controle *in vitro* dos fitopatógenos *Colletotrichum guaranicola*, *Colletotrichum* spp. e *Corynespora cassiicola*.

HEMATH et al., (2010), sustentam que a utilização de fungos para biossíntese de NP é excelente devido a sua capacidade de suportar a toxicidade do metal e possuir maior tolerância, dando suporte a afirmativa de BOWMAN & FREE (2011), sobre a descrição da parede celular fúngica que possui estrutura dinâmica conferindo resistência mecânica para suportar alterações na pressão osmótica e ao estresse ambiental.

PIROTA et al., (2015), realizaram o isolamento de fungos da região Amazônica que se destacaram quanto à produção e produtividade enzimática em termos de endoglucanase ($351,79\text{Ug}^{-1}$ em 120 h) e β -glicosidase ($62,31\text{Ug}^{-1}$ em 72 h) foram o (P47C3) *Aspergillus niger*, enquanto que, para a xilanase ($1076,94\text{Ug}^{-1}$ em 72 h) e FPase ($2,46\text{Ug}^{-1}$ em 120 h) foram o *Aspergillus oryzae* (P6B2), respectivamente. Os resultados obtidos demonstraram o enorme potencial de aplicação das enzimas produzidas pelos fungos isolados da região Amazônica, contribuindo, assim, para gerar os avanços tecnológicos necessários para o aumento de sua eficiência.

Outra excelente pesquisa foi conduzida por CELESTINO e colaboradores (2014), onde os fungos filamentosos foram isolados de solo da Amazônia brasileira por método de diluição seriada para posterior produção de pigmentos. Estes fungos foram identificados como *Penicillium sclerotiorum* 2AV2, *Penicillium sclerotiorum* 2AV6, *Aspergillus calidoustus* 4BV13, *Penicillium citrinum* 2AV18 e *Penicillium purpurogenum* 2BV41, *Sclerotinia sclerotiorum* 2AV2 e produziram pigmentos intensamente coloridos e foram, portanto, selecionados para caracterização química. A análise por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear, identificou o pigmento como esclerotiorina. Observou-se neste trabalho, a influência de nutrientes no rendimento de esclerotiorina também foi estudada e verificou-se também que ramnose e peptona aumentaram a produção quando utilizadas separadamente. Estes resultados indicaram que é viável a busca por novas fontes microbianas presentes no bioma Amazônico para o uso na biotecnologia ou farmácia.

PINHEIRO et al., (2017), buscaram novos agentes antimicrobianos por meio da bioprospecção de extratos de fungos endofíticos de *Bauhinia guianensis*, uma planta típica da Amazônia usada no combate a infecções. Durante esta pesquisa, dezessete (17) fungos foram isolados e como resultado o extrato metanólico *Exserohilum rostratum* mostrou boa atividade contra as bactérias testadas. A monocerina policetídica foi isolada pela técnica cromatográfica, identificada por RMN, mostrando amplo espectro antimicrobiano.

SUDHA et al., (2016), descreveram atividades a partir de derivados de fungos endofíticos produtores de enzimas usadas para várias aplicações como degradação, biotransformação de compostos orgânicos, anticancerígena, antimicrobiana, inseticida, proteção de culturas, estimulantes de crescimento vegetal, fitorremediação que exercem papel importante na vida humana, principalmente na questão farmacêutica, sendo fonte promissora para originar novos fármacos de origem natural.

SEETHARAMAN et al., (2018), realizaram avaliação da atividade antimicrobiana e larvicida de nanopartículas de prata a partir de fungos endofíticos *Phomopsis liquidambaris*. Suas análises mostraram que o método utilizado foi viável para o desenvolvimento de nanopartículas, reagindo com o meio extracelular de *P. liquidambaris* como agente redutor e estabilizante, apresentando boa atividade inibitória contra os patógenos testados. Além disso, interromperam o crescimento das larvas no instar II e IV de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* em um método dose-dependente. Finalmente, as nanopartículas exibiram atividade hemolítica muito baixa; sugerindo a biocompatibilidade e viabilidade de tais nanopartículas como agente terapêutico.

1.5 APLICAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

1.5.1 Ação antimicrobiana das nanopartículas

O mundo microbiano está evoluindo continuamente, culminando no aparecimento de microorganismos com uma ampla diversificação genética, sendo estes capazes de provocar diversas doenças (MICHAEL et al., 2016).

Em termos de saúde pública, a resistência bacteriana representa um risco à qualidade de vida humana conquistada ao longo dos anos com o avanço da microbiologia, das engenharias, da farmácia e da medicina, comprometendo o orçamento dos sistemas de saúde, sejam eles públicos ou privados, além de intensificar outro problema de saúde pública de grande relevância: as infecções hospitalares (DA COSTA et al., 2018).

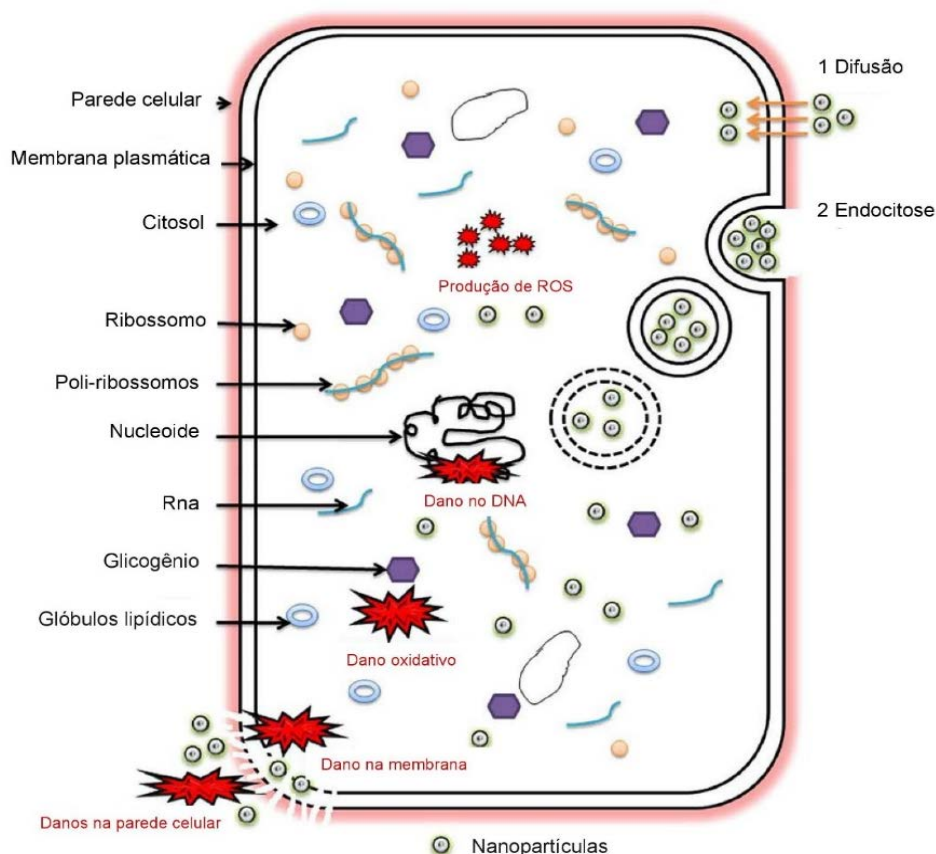
O aumento de focos de infecções patogênicas, resistência bacteriana a antibióticos, mutações bacterianas, falta de vacinas adequadas principalmente em países

subdesenvolvidos e infecções hospitalares representam perigo para a saúde humana global (SIRELKHATIM et al., 2015).

Frente a esses entraves, surgem métodos alternativos relacionados a síntese verde na qual nanopartículas metálicas são utilizadas como antimicrobianos (FREIRE et al., 2018).

HUSSAIN et al., (2016) descreveram o modo de ação das nanopartículas metálicas sobre os microrganismos, podendo adentrá-los de duas formas: **Difusão**, processo passivo com gasto de energia e por **Endocitose**, processo ativo de englobamento do material, já no meio intracelular, ocorre a liberação sustentada de Ag^+ , formando radicais livres e induzindo ao estresse oxidativo, e posteriormente dano na membrana e parede celular, levando-o a morte (**Figura 4**).

Figura 4 - Ação antimicrobiana de nanopartículas metálicas.



Fonte: adaptado de Hussain et al., (2016).

Reforçando ainda mais, WONG et al., (2010) relataram como as nanopartículas de prata agem na eliminação de microrganismos em escala nanométrica, a prata possui melhor interação com microrganismos devido a sua elevada área superficial, atacando também a superfície celular penetrando no interior desses organismos. Já as membranas

celulares possuem proteínas cujas estruturas contêm enxofre e fósforo que interagem com os íons de prata, podendo ainda inibir as funções do DNA ao liga-se com esses grupos (RODRIGUEZ et al., 2018).

CARRERA et al., (2009), investigaram a eficácia de nanopartículas de prata sobre esporos, leveduras e bactérias em limas endodônticas, expostas à solução por 5, 10, 15 e 30 minutos. Observou-se, redução significativa da percentagem de todos os microorganismos testados. Assim, houve redução de 100% das cepas de *Cândida albicans*, 99,9% de *Staphylococcus aureus*, 99,7% de *Streptococcus mutans*, 93,7% de *Enterococcus faecalis* e 77,6% de *Escherichia coli*. Apenas a forma esporulada do microorganismo *Bacillus atrophaeus* demonstrou-se mais resistente que na forma vegetativa, por sofrer modificações na sua estrutura frente às condições de adversidade.

Outra nanopartícula metálica de grande interesse é a de cobre que na atualidade vem sendo muito utilizada em nanoestruturas de materiais e nas mais diversas áreas (MULLER et al., 2017). Esse tipo de nanopartícula tem sua importância não somente no campo científico, mas também na indústria devido a sua aplicação em dispositivos eletrônicos, tais como: placas de circuito impressos e condensadores multicamadas de cerâmica (SAITO et al., 2011).

Quando utilizada para avaliação da atividade antimicrobiana, o principal mecanismo de toxicidade do cobre no microorganismo é por meio da interrupção das membranas celulares e organelas, resultando em perda de integridade da membrana e comprometimento de sua função (NICOLSON et al., 2017). Este efeito é atribuído à natureza de redução ativa de cobre e sua capacidade de gerar radicais livres que promovem lipídios peroxidados (AZEVEDO et al., 2007).

Em um estudo realizado por REN et al., (2009), as nanopartículas de cobre foram testadas como bactericidas contra microorganismos resistentes a antibióticos, como *S. aureus*, mostrando bom resultado, esse contato bacteriano com as nanopartículas de cobre causou toxicidade no microorganismo, estando relacionado ao tamanho e revestimentos de superfície das NPs.

AZAM et al., (2012) pesquisaram como nanopartículas de Cobre em torno de 20 nm têm atividades antibacterianas significativamente mais fortes contra *Bacillus subtilis* (Gram-positivo), *Staphylococcus aureus* (Gram-positivo), e contra *Escherichia coli* (Gram-negativa) e *Pseudomonas aeruginosa*. Por outro lado, GILBERTSON et al., (2016) descobriram que nanopartículas de Cobre com tamanho de 15 nm têm melhor atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli*.

De acordo com DEPNER et al., (2015), a atividade antimicrobiana do cobre e de suas ligas aumenta à medida que a temperatura passa da refrigeração para a temperatura ambiente e a medida que o teor de cobre das ligas aumenta, ocorre maior resistência a corrosão levando a menor disponibilidade de íons cúpricos (Cu^{+2}) e consequentemente menor atividade antimicrobiana.

Os estudos das propriedades antimicrobianas das superfícies metálicas de cobre são relativamente recentes e ganharam destaque quando o órgão norte-americano *Enviroment protection agency* (EPA) registrou quase 300 superfícies distintas de cobre como antimicrobiano em 2008.

1.5.2 Aplicação antiviral de nanopartículas metálicas

Estudos envolvendo a busca de drogas resistentes de baixa toxicidade celular e boa aderência para o tratamento ao longo da vida de um indivíduo infectado com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) são desafiadores (JAYANT et al., 2018). No entanto, o emergente campo da nanotecnologia pode desempenhar um papel importante na abordagem desses desafios trazendo soluções farmacológicas provenientes de nanopartículas metálicas a níveis nanotecnológicos (BAPTISTA et al., 2018). Nessas dimensões, as suas propriedades físico-químicas são distintas daqueles de materiais a granel ou moléculas ou átomos singulares, trazendo excelentes resultados (PARBOOSING et al., 2012).

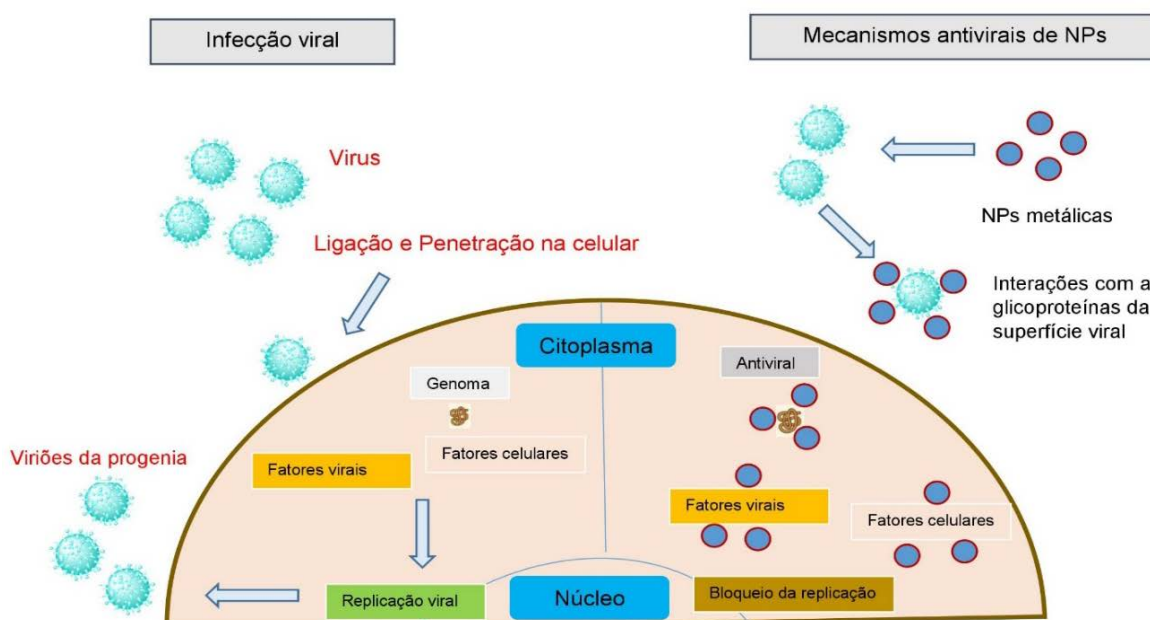
CLARKE et al., (2000) relatam a principal dificuldade no tratamento dos indivíduos com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), se passa pela capacidade de estabelecer reservatórios dentro de tecidos inacessíveis a níveis ideais de drogas antivirais (reservatórios anatômicos), ou dentro das células onde o HIV está latente, escapam da ação de antivirais (reservatórios celulares) um grande número de virions extracelulares, que ficam aprisionados na superfície das células dendríticas foliculares de tecido linfóide, células TCD4 em repouso infectadas, havendo persistência mesmo na presença da Terapia Antirretroviral Altamente Ativa (HAART) porque não está replicando, o vírus pode, no entanto, ser resgatado após a ativação da célula.

LARA et al., (2010) exploraram como ocorre a ação seletiva de AgNPs contra o HIV, observando que as nanopartículas podem exercer atividade anti-HIV em estágio inicial de replicação viral, agindo como agente virucida ou um inibidor da entrada viral, sendo sua inibição resultado da interação entre a glicoproteína gp120 e os receptores da membrana celular, no caso a célula alvo. As AgNPs agem bloqueando a ligação entre a gp120 e virion

de CD4, atuando como virucida (MALIK et al., 2017). As propriedades das AgNPs tem efeito antiviral de amplo espectro não predisposto a induzir resistência, podendo prevenir contra uma ampla variedade de HIV circulantes (CHEN et al., 2013).

De acordo com a (**Figura 5**) o tamanho das NPs tem efeito substancial sobre a atividade antiviral, desde a interação direta com as proteínas da superfície viral até o genoma do vírus. Quanto menores as nanopartículas metálicas, maior sua interação com as moléculas virais e maior grau de inibição. As NPs menores desempenham papel fundamental, pois entram na célula hospedeira e genoma viral onde bloqueiam os fatores celulares e/ou fatores que auxiliam na replicação viral (MÜLLER et al., 2019).

Figura 5 – Atividade antiviral das nanopartículas metálicas



Fonte: Adaptado de Brandelli et al., (2017).

Tais drogas podem, por exemplo, ser usadas para otimizar as características farmacológicas antirretrovirais conhecidas, administração de ácidos nucleicos anti-HIV nas células infectadas ou entrega direcionada de antivirais para o sistema imunológico, cérebro ou reservatórios latentes (GILSON & GLENNERSTER, 2012). Além disso, os próprios nanofármacos podem possuir atividade anti-HIV (ROY et al., 2015). No entanto, vários obstáculos permanecem, tais como a alta toxicidade, interações biológicas indesejadas (ROSENBLUM et al., 2018).

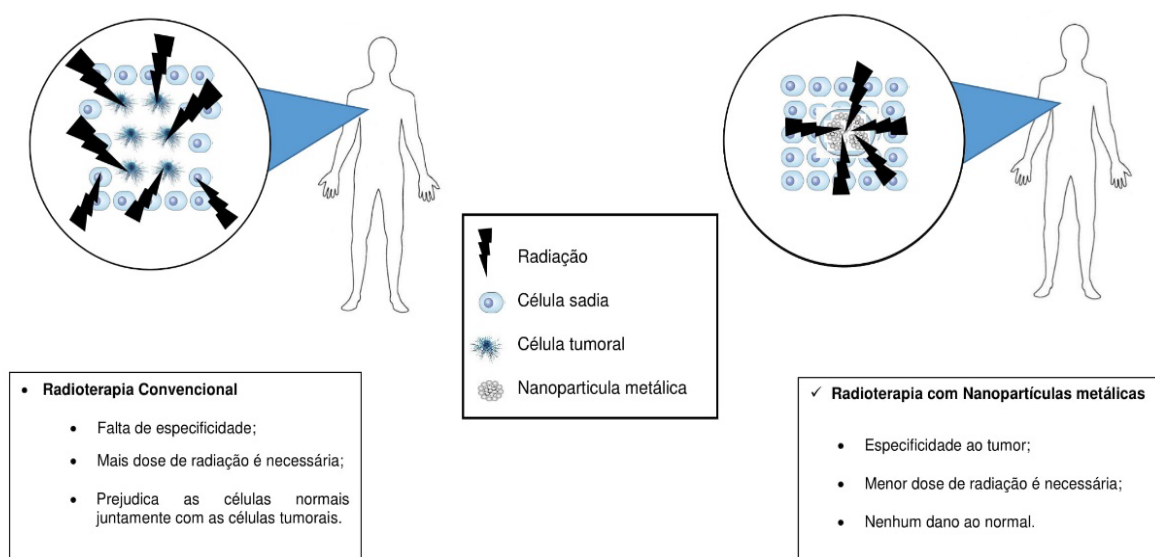
1.5.3 Radioterapia por nanopartículas metálicas

As nanopartículas metálicas podem ter o potencial de superar problemas relacionados a quimioterapia, exercendo papel benéfico e poderoso na terapia contra o câncer fornecendo melhor direcionamento, silenciamento de genes e entrega de medicamentos (VIEIRA et al., 2016). A funcionalização de nanopartículas como ligantes direcionados oferecem um melhor controle da deposição de energia nos tumores (DIN et al., 2017). Além dos benefícios terapêuticos, as NPs também são usadas como uma ferramenta de diagnóstico para imagiologia de células cancerígenas (YI et al., 2018).

Sistemas terapêuticos baseados em nanopartículas não só fornecem diagnósticos e terapias simultâneos, mas também permitem liberação controlada e direcionada ajudando a revolucionar o tratamento e o controle do câncer (SHARMA et al., 2018).

SHARMA et al., (2018) representaram claramente a diferença entre radioterapia convencional e a com nanopartículas metálicas. O UV ou o NIR (raio infravermelho próximo) são aplicados a uma parte específica ou a todo o corpo, dependendo do tipo de câncer. Enquanto as nanopartículas atingem especificamente o local do tumor e absorvem as radiações, portanto, diminuem o efeito tóxico para as células normais, diminuindo a dose de radiação (**Figura 6**).

Figura 6 – Radioterapia com nanopartículas metálicas



Fonte: Adaptado de Sharma et al., (2018).

2.1 OBJETIVO GERAL

Biossintetizar nanopartículas metálicas de prata e cobre por fungos endofíticos isolados de amêndoas de *Bertholletia excelsa* Ducke (Castanha do Brasil) coletadas na região Amazônica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Verificar a capacidade de transformação de nanopartículas de prata e cobre a partir dos fungos endofíticos amazônicos isolados de amêndoas de *Bertholletia excelsa* Ducke (castanha do Brasil);
- b) Caracterizar as nanopartículas obtidas através Espectroscopia de Infravermelho (IV) e Potencial Zeta;
- c) Avaliar o potencial bacteriostático das nanopartículas de prata;
- d) Realizar ensaio de ecotoxicologia das nanopartículas de prata em microalgas *Chlorella vulgaris*;
- e) Bio-obter nanopartículas de cobre pelo método de fermentação do fungo *Phaeoacremonium* sp. (BIORG 15).
- f) Avaliar o efeito de co-substratos na obtenção de nanopartículas de cobre;
- g) Analisar os efeitos das nanopartículas de cobre sobre a morfologia do fungo *Phaeoacremonium* sp. (BIORG 15).

Physics Letters + OA Mirror
for Chemical

Elsevier Editorial System (tm)

Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Biosynthesis of silver nanoparticles by endophytic fungi isolated from *Bertholletia excelsa* (Brazil nut) for antimicrobial evaluation and environmental toxicity

Article Type: Research paper

Section/Category: Nanostructures and Materials

Corresponding Author: Professor Irlon M. Ferreira, Dr.

Corresponding Author's Institution: Unifap

First Author: Edmilson S Morais

Order of Authors: Edmilson S Morais; Fabrício H Holanda; Iracirema S Sena; Adriana M Ferreira; Victor H Marinho; Jhone M Curti; Silvia M M Faustino; Raquel R Amaral; José C Tavares; Irlon M. Ferreira, Dr.

Abstract: This work show biosynthesize silver metallic nanoparticles (AgNP) from endophytic fungi isolated from *Bertholletia excelsa*. A preliminary screening was carried out with six filamentous fungi. After an experimental design was used to obtain the best Biosynthesis conditions via mycelium from *Phaeoacremonium* sp. (Biorg 15). The AgNP was of 44.06 nm with a zeta potential of -10.2 mV. The AgNP showed antibacterial effects and the environmental toxicology assay in the microalgae *Chlorella vulgaris*. This green synthesis procedure is efficient and used the endophytic fungus *Phaeoacremonium* sp. isolated from *B. excelsa*.

Suggested Reviewers: Marcelo Franco UESC

marcelofranco@pq.cnpq.br

Enzymes and microbiology

Maria da Conceição F Oliveira UFC

mcfo@ufc.br

Biocatalysis Fungi

István Lagzi

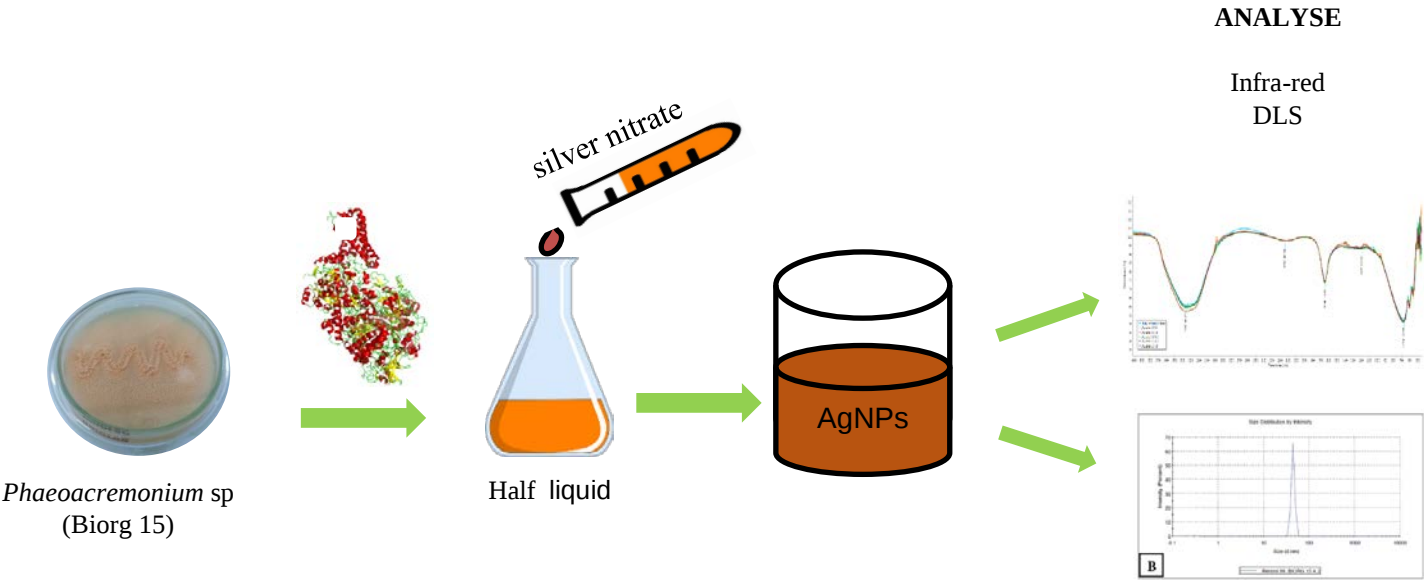
University of Technology and Economics

lagzi@vuk.chem.elte.hu nanoparticles

Highlights

- Endophytic fungi strains isolated from *Bertholletia excelsa* collected in the Brazilian Amazonia;
- The AgNP was of 44.06 nm with a zeta potential of -10.2 mV;
- The AgNP showed antibacterial effects and the environmental toxicology assay in the microalgae *Chlorella vulgaris*.

Graphical Abstract



Biosynthesis of silver nanoparticles by endophytic fungi isolated from *Bertholletia excelsa* (Brazil nut) for antimicrobial evaluation and environmental toxicity

Edmilson dos S. Morais^a, Fabrício H. Holanda^a, Iracirema S. Sena^a, Adriana M. Ferreira^{a,b}, Victor H. de Souza Marinho^a, Jhone M. Curti^b, Silvia M. Mathes Faustino^c, Raquel R. do Amaral^b, Anderson M. de Arandas^d, Jose C. Tavares Carvalho^b, Adilson L. Lima^e and Irlon M. Ferreira^{a,*}

^a*Grupo de Biocatálise e Síntese Orgânica Aplicada, Departamento de Ciências Exatas, Universidade Federal do Amapá, Rod. JK, KM 02, 68902-280, Macapá, Amapá, Brazil.*

^b*Laboratório de Pesquisa Farmacêutica, Departamento de Ciências Biológicas e Saúde, Colegiada de Farmácia, Universidade Federal do Amapá, Macapá, Brasil.*

^c*Laboratório de Cultivo de Algas, Curso de Farmácia, Universidade Federal do Amapá, Campus Universitário Marco Zero do Equador, Rodovia Juscelino Kubitschek de Oliveira, KM-02 Bairro Zerão, Macapá, AP CEP 68902-280 Brazil.*

^d*Curso de Engenharia Agrônoma, Instituto Federal do Amapá, Campus Porto Grande, Rodovia Br 2010, Km 103, Zona Rural.*

^e*Laboratório de Controle Biológico - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Rod. JK, KM 02, 68902-280, Macapá, Amapá, Brazil.*

* Corresponding author. E-mail.: irlon.ferreira@gmail.com

ABSTRACT

This work show biosynthesize silver metallic nanoparticles (AgNP) from endophytic fungi isolated from *Bertholletia excelsa*. A preliminary screening was carried out with six filamentous fungi. After an experimental design was used to obtain the best biosynthesis conditions via mycelium from *Phaeoacremonium* sp. (Biorg 15). The AgNP was of 44.06 nm with a zeta potential of -10.2 mV. The AgNP showed antibacterial effects and the environmental toxicology assay in the microalgae *Chlorella vulgaris*. This green synthesis procedure is efficient and used the endophytic fungus *Phaeoacremonium* sp. isolated from *B. excelsa*.

Keywords: Endophytic Fungus; silver nanoparticles; metallic nanoparticles; Brazil nut.

1. Introduction

Nanoparticles (NP) are natural, incidental or manufactured material particles containing material particles in a state not bound aggregate or as an agglomerate, to 50% or more of particles in the size distribution of number, one or more external dimensions are in 1 nm size range to 100nm (Soares et. al., 2018). They are not a bound aggregate or an agglomerate. The number size distribution should contain 50% of the population with external dimensions of 1 nm to 100 nm (Soares et al., 2018). Metallic nanoparticles are useful for electronic devices, food additives, antibacterial products, and biomedical engineering (Singh et al., 2017). Their physical, chemical and biological characteristics change with size and potential. They have catalytic properties with value in biomedical sciences, pharmaceuticals, medicine, bio-imaging, and optical sensing (Akter et al., 2018).

Silver nanoparticles (AgNP) are among the most common artificial nanomaterials incorporated into consumer products and used up as a biocide (Schneider, 2017). AgNP applications include medicines and in biosynthesis. This makes them important to study (Mcgillicuddy et al., 2017). AgNPs are also used in conductive inks (Burduşel et al., 2019). An increasingly common application is the use of AgNPs in antimicrobial coatings. Many tissues, keyboards, dressings, and biomedical devices now contain silver nanoparticles. They controllably release traces low levels of antimicrobial silver ions (Steven et al., 2019).

Sandhu et al., (2017) reported physical and chemical methods to obtain metallic nanoparticles: laser abrasion, ion spray (Aliofkhazraei, 2016), thermal synthesis (Majidi et al., 2014), chemical reduction (Nyamukamba et al., 2018), and sol-gel methods (Ghoshal et al., 2009). However, these methods have high costs and involve the use of dangerous chemicals (Köroglu et al., 2016). To overcome such problems, biosynthesis by microorganisms (fungi and bacteria) is an alternative method. These biological approaches are simple, fast, low cost, and biocompatible (Barabadi et al., 2014). The raw material here are plant extracts, bacteria, yeasts, and fungi (Hoseinpour et al, 2018).

Devi et al., (2014) used endophytic fungi isolates of *Potentilla fulgens* L. in the biosynthesis of AgNP, they prepared 5 to 20 nm particles with high antimicrobial effects against *Streptococcus*

pyogenes, *Enterococcus faecalis*, *E. coli*, and the *C. albicans* fungal strain. The use of endophytic fungi is beneficial because it can produce antibiotics and other secondary metabolites of pharmacological interest. It offers biological control of pests and diseases, mycoherbicides, bioremediation of soil contaminated with pollutants, and serves as a vector for introducing genes into host plants (Amatuzzi et al., 2017). It offers rapid growth, easy cultivation and maintenance, and large amounts of enzymes and proteins. These fungi increase productivity and prepare coating proteins and stability. They precisely prevent agglomeration of metal nanoparticles (Netala et al., 2016). We report the use of endophytic fungi isolated from the seed of *Bertholletia excelsa* for biosynthesis of AgNPs. We then studied their antimicrobial potential and environmental toxicity in *C. vulgaris* microalgae.

2 Materials and Methods

2.1 Reagents and solvents

To prepare a solid, a liquid medium was used for malt extract 2% (w/v). This was obtained from HiMedia RM004B with bacteriological agar-7178A Acumedia mark. The AgNO₃ (99%) was obtained by adjusting the pH with NaOH (99%) and HCl (Alphatec).

2.2. Collection of *Bertholletia excelsa*

The endophytic fungi were obtained from *Bertholletia excelsa* (Brazil nut) assigned by Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuária (EMBRAPA/AP). These were collected in two areas of the Extractive Reserve Cajari (RESEX Cajari), following coordinate area 1 (W 52°18'20,976'' and S 0°33'44, 44'') area 2 (W 51°57'53,338'' and S 0°25'21, 39'') located in Amapá State (Paiva, 2009).

2.3 Isolation and identification of endophytic fungi

All manipulations involving the fungi isolated from *Bertholletia excelsa* almond were performed under sterile conditions in a laminar flow booth (Veco). The process of cleaning, disinfecting, and storing *Bertholletia excelsa* kernels was based as described by Pepper et al., (2012) with some modifications. The strains of isolated endophytic fungi were grown for seven days under

greenhouse BOD incubation at 28 °C. Subsequently, there was morphological identification of microorganisms based on individual readings via a stereoscopic microscope (binocular - TIM 2B - Anatomic) and biological optical (Infinite, up to 40x magnification 1000X, and aims Planacromática LED lighting 3W). The endophytic fungi was identified, and their descriptions are summarized in Figure 1.

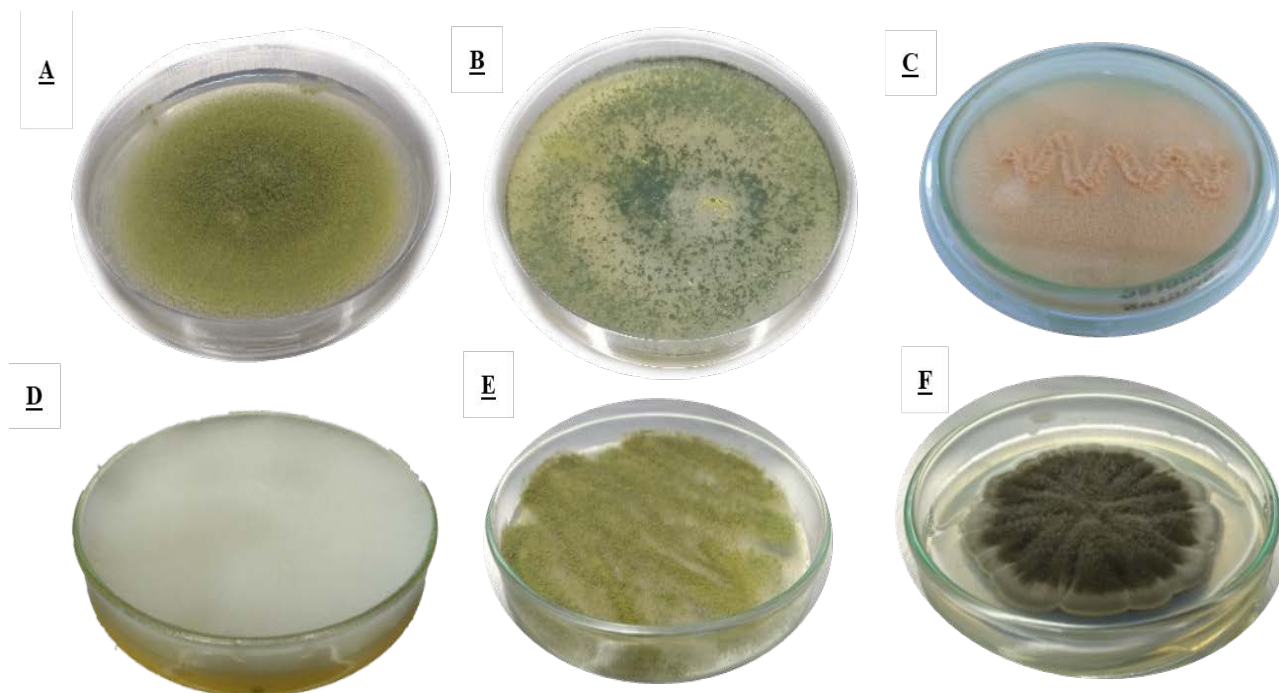


Figure 1. Fungi isolated from Brazil nuts. A- *Aspergillus* sp. (Biorg 5); B- *Trichoderma* sp. (Biorg 7); C- *Phaeoacremonium* sp. (Biorg 15); D - *Rhizopus* sp. (Biorg 16); E - *Aspergillus* sp. (Biorg 22) and F - *Clamidosporium* sp. (Biorg 36).

2.4 Growing of microorganisms on solid medium

All fungal strains had been previously grown on a solid medium containing malt extract (2%), agar (2%), and distilled water (pH 7). They were inoculated via insertion point in a broad 90 mm Petri dish. The pH was adjusted to 7.0 with HCl (10%) or NaOH (10%). All materials and culture media were autoclaved for 20 minutes at 121 °C. After preparation, the samples were incubated in an environmental chamber for 7 days at 28 °C for growth fungal (Alipour et al., 2017).

2.5 Biosynthesis of AgNPs by endophytic fungi (initial screening)

All work was conducted in the dark to avoid compromising the biosynthesis process of AgNPs. One screening was performed with strains of endophytes *Aspergillus* sp. (Biorg-05), *Trichoderma* sp. (Biorg-07), *Phaeoacremonium* sp. (Biorg-15), *Rhizopodus* sp. (Biorg-16), *Aspergillus* sp. (Biorg-22), and *Clamidosporium* sp. (Biorg 36). All fungi used in this study were grown in solid medium as described in section 2.3.

In Erlenmeyer flasks (250 mL) containing 100 mL of medium malt 2% (pH 7), previously sterilized (20 minutes at 121 °C) Was transferred seven fragments (5 mm diameter) of each strain previously cultured on solid medium. The reaction flask was incubated in a shaker (Lucca-222) for 150 rpm (7 days at 30 °C) for fungal growth. After the incubation period, 10 mL of AgNO₃ 0.001 M was added and remaining in agitation for another 7 days for the formation of nanoparticles. All experiments were performed in triplicate.

Subsequently, the samples were filtered under vacuum with Buchner filter paper (9 cm and 8 µm). To retain the mycelia, the filtrate was then transferred to a 50 ml Falcon tubes and vortexed for 10 minutes for better homogenization. The final product was stored at 4 ° C in the dark for further characterization and applications.

2.6 Characterization of metal nanoparticles

2.6.1 Determination of Zeta potential of the metal nanoparticles

The analysis of particle size and polydispersity used photon correlation spectroscopy on a Zetasizer 5000 (Malvern Instruments, Malvern, UK). Each sample was diluted using a syringe of ultrapure water (2:1) filtered through a syringe filter (0.22 µm). The particle size was expressed as the average diameter in triplicate. Data were analyzed with a Zetasizer 6.20® software.

2.6.2 Infrared Spectroscopy (IR)

Infrared spectra (IR) were collected in a spectrometer (FTIR; Shimadzu IR-ffinity) operating with Fourier Transform. The spectra were collected from 4000-400 cm⁻¹.

2.7 Factorial design and optimization of the conditions for nanoparticle biosynthesis.

Initial screening of AgNP biosynthesis used all endophytic fungi (Figure 1). *Phaeoacremonium* sp. (Biorç 15) had the best size results and was used for a factorial design study with three levels (time, pH, and concentration of AgNO₃) and three variables (time (6 h, 12 h, 18 h); pH (5, 7, 9); and concentration (0.1, 1.0, and 10 mmol) of AgNO₃. Box-Behnken analysis was used to determine the best combination for obtaining the AgNPs (Table 1) in relation to the particle size. Crossing of the levels and factors were tested in 15 experiments, and the independent variables were designated as x1, x2, and x3. The values are shown in the following table. The polynomial equation used for the three variables is provided below:

$$Y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_3 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_{22}x_2^2 + \beta_{33}x_3^2 + \beta_{12}x_1x_2 + \beta_{13}x_1x_3 + \beta_{23}x_2x_3 + \beta_{123}x_1x_2x_3$$

Statistical analysis used Statistic software (version 10, Statesoft - Inc., Tulsa, USA, trial version, 2011).

Table 1. Independent variables used in the factorial design.

Factor	Name	Levels		
		-1	0	+1
X1	Time (days)	6	12	18
X2	pH	5	7	9
X3	Concentration (mM)	0.1	1	10

2.8 Evaluation of antibacterial activity

The reference strains used here were *Staphylococcus aureus* (ATCC33591), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC12228), *Proteus mirabilis* (ATCC 15290), and *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 4352). The microorganisms were obtained by the Reference Materials Laboratory of the National Institute for Quality Control in Health (Oswaldo Cruz Foundation - FIOCRUZ, Rio de Janeiro - RJ, Brazil) and reactivated similar to the same laboratory protocol. Each strain used test tubes (16x160

mm) containing 10 mL Mueller-Hinton broth. These were inoculated with incubation at 37°C for 24 hours. After incubation, the bacterial suspension was adjusted with saline (0.9% NaCl) to obtain a standard 0.5 McFarland turbidity.

For the broth microdilution tests, we used sterile acrylic 96-well plates with 200 µL volume capacity. Each experiment was performed in triplicate. The first well had 100 µL of a 10 mmol suspension followed by serial dilutions of 100 µL in 7 consecutive wells. The last wells were used for positive and negative controls. Next, 10 µL of the bacterial suspension previously prepared was added to each well, and the plate was incubated at 37°C for 24 h (Ramchuran et. al., 2018). After this period, 10 µL was added to a saline solution (0.9% NaCl) of 2 mg/mL. The triphenyl tetrazolium chloride was added and incubated for 30 min to detect bacterial growth (Araujo et al., 2018).

The MIC was the lowest sample concentration that could inhibit bacterial growth. This was monitored by a formazan assay and absorbance (Root et al., 2018). The positive control used a culture medium with a bacterial suspension of 0.5 McFarland and distilled water as a control. The negative controls were added to the culture medium of norfloxacin solution with dimethyl sulfoxide (DMSO) and bacterial suspension; the culture medium was inoculated with bacteria (Araujo et al., 2018).

The data was entered into Excel 2013 spreadsheet program with appropriate formulas to determine the values inherent concentrations of dilutions, and reproduced in Table 1.

The units were compared statistically to identify a MIC. The data were tabulated in GraphPad Prism 6.01 (GraphPad program for Windows, San Diego, CA - USA). Statistical analysis used a Two Way ANOVA and Tukey post-test ($p < 0.05$) with a 95% significance level. The methodology was verified by the absence of microbial growth for the sterility control and positive control (norfloxacin 1 mg/mL). The presence of microbial growth was seen in the control.

2.9 Environmental Ecotoxicology

The environmental toxicity test was conducted according Oliveira et al., (2017). The green microalgae *Chlorella vulgaris* were isolated from pond water obtained from the Lagoa dos Índios localized in Macapá (latitude and longitude 51.102559 0.031368). The collected material was serially diluted to isolate the colony, and the cells were seeded in NPK media. The algae count was performed using a Neubauer chamber. We aliquoted 10 mL of *C. vulgaris* grown in nitrogen/phosphorous/potassium (NPK 08:08:08) aqueous solution. The initial cell density was 1×10^6 cells/ml for all groups tested.

The nanoparticles were tested at 10 and 0.1 mg/L. The negative control group was composed of *C. vulgaris* and distilled water (1×10^6 cells/mL). The positive control aqueous solution was AgNO₃ (0.001 mmol). The cell count was performed after 24 h, 48 h, 72 h, 5 days, 10 days, 15 days, 20 days, and 30 days. The percentage of viable cells (CV%) was in accordance with the following formula:

$$CV\% = (D / D_0) \times 100$$

Where: D is the cell density before adding the nanoparticles, and cell density D₀ is specified after each day.

3 RESULTS AND DISCUSSION

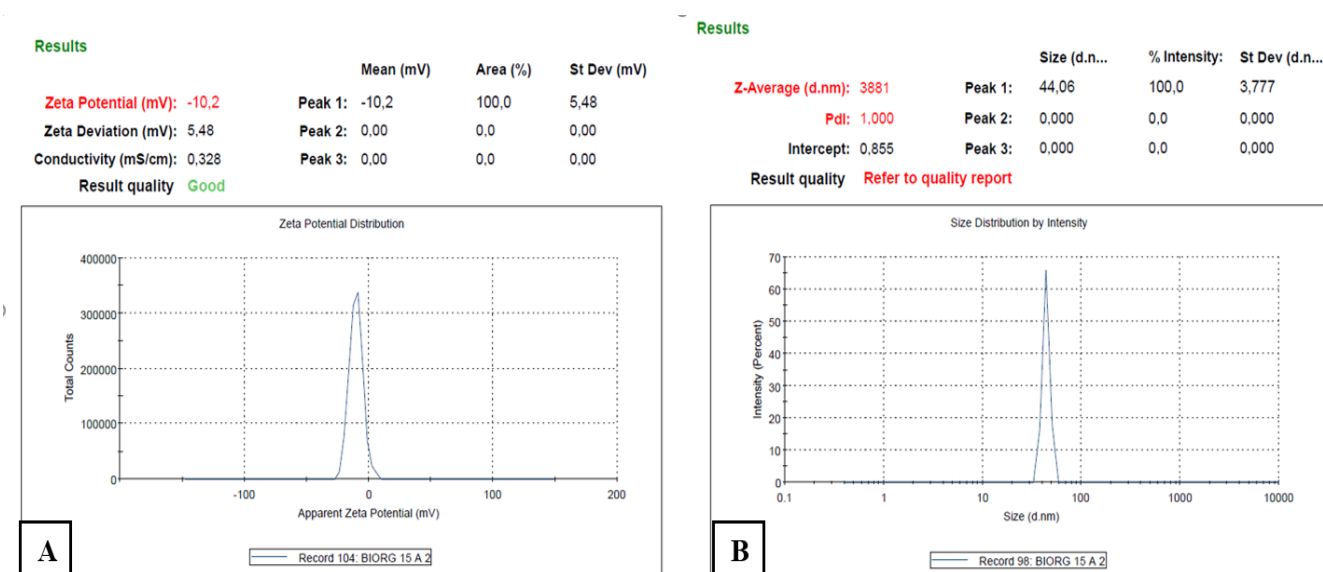
3.1 Initial screening with endophytic fungi biosynthesis nanoparticles

The results obtained by the bioontenção AgNP's by endophytes of almond *Bertholletia excelsa* is summarized in Table 2. Among the endophytic fungi used in the initial screening for the biosynthesis of AgNP's is *Phaeoacremonium* sp. (Biorg 15) which has resulted in smaller particles 44.06 nm (Figure 2A) with a zeta potential of -10.2 mV (Figure 2B). The polydispersity was 1.0. Other strains yielded AgNPs with values ranging from 100 to 300 nm. (*Aspergillus* sp. (Biorg-05), *Trichoderma* sp. (Biorg-07), *Rhizopodus* sp. (Biorg-16), *Aspergillus* sp. (Biorg-22) and *Clamidosporium* sp. (Biorg-36)] yielded the AgNP's with values ranging from 100 to 300 nm.

Table 2. Screening of fungi isolated Chestnut Almond Brazil (*Bertholletia excelsa*).

Fungi ^a	SIZE	ZP (MV)	PDI
<i>Aspergillus</i> sp. (Biorg 5)	303	-7.04	1.0
<i>Trichoderma</i> sp. (Biorg 7)	166.2	-35.4	1.0
<i>Phaeoacremonium</i> sp. (Biorg 15)	44.06	-10.2	1.0
<i>Rhizopus</i> sp. (Biorg 16)	100.2	-21.6	1.0
<i>Aspergillus</i> sp. (Biorg 22)	119.6	-20.1	1.0
<i>Clamidosporium</i> sp. (Biorg 36)	158.5	-24.5	1.0

^aThe reactions were performed in the pH 7.0 at 25 °C for 7 days (150 rpm).

**Figure 2.** Nanoparticles' average hydrodynamic size (A) and zeta potential (B) performed in the pH 7.0 at 25 °C for 7 days by *Phaeoacremonium* sp. (Biorg 15)

Skwarek et al., (2016) reported that the zeta potential reflects the surface potential of the nanoparticles, which is influenced by changes in the interface with the dispersing medium due to the dissociation of functional groups on the particle surface or adsorption of ionic species present in the aqueous dispersion medium. A higher zeta potential leads to a greater tendency of the suspension stability because the charged particles forcefully repel and overcome the natural tendency of aggregation (Mendez et al., 2018). This is mainly influenced by the electrolyte concentration and the pH of the colloidal suspension (Ravaro et al., 2011).

To determine the limits to the reaction as AgNP size and zeta potential was held experimental design with different values of the independent variables [pH, time (days) and concentration (mM)]

of AgNO₃] was studied for their impact on AgNP size and zeta potential (Figure 3, 4 and 5). Table 3 shows the analysis of variance (ANOVA), and the coefficient of determination (R-squared) was 0.52. The coefficient of determination (R squared) defines the percentage of the total range of values of the sampling data about its arithmetic mean. This originates as the difference analyzed by regression equation, i.e., the coefficient of determination is the square of the correlation coefficient a better coefficient analysis gives a higher number (Biasi, 2018).

Table 3. Model analysis of variance (ANOVA) for obtaining AgNP.

Sources	SS	df	MS	F-value	F0:05
Nanoparticles					
X ₁	15400.1	1	15400.12	1.3150	0.28461
X ₂	4.5	1	4:50	0.0003	0.98484
X ₃	33150.1	1	33150.12	2.8310	0.13095
X ₁ ²	9062.3	1	9062.31	0.7738	0.40467
X ₂ ²	29055.4	1	29055.39	2.4811	0.15386
X ₃ ²	10983.9	1	10983.85	0.9379	0.36116
Pure error	93683.7	8	11710.46		
Total	195371.7	14			
R-squared 0:52					

SS: *sum of squares*, Df: *degrees of freedom*, MS: *mean square*

The impact and interaction of the two independent variables were studied for their impact on the formation of metallic nanoparticles via 3D graphics and a 2D contour plot (Figure 3, 4 and 5). The interactions between the pH of the medium (x₂) and time (x₁) show that the reaction time (6, 12, and 18 days) had no effect on the particle size when the pH was 7.0.

We studied the interaction between the variable time (x₁) and concentration (x₃). A lower concentration of substrate (AgNO₃) led to a smaller AgNP via *Phaeoacremonium* sp. (Biorg 15). This was particularly true when increasing the time (12 to 18 days). This might positively influence the formation of AgNP. Thus, the smallest nanoparticle (28.42 nm) was obtained with a concentration of 0.1 mmol and 18 days of incubation at pH 7.

Ahmed et al., (2003) reported that *Phaeoacremonium* sp. can reduce silver ions to extracellular levels to produce nanoparticles. Duran et al., (2005) found that this reduction process occurs via the action of quinone reductase and transport electrons. The nanoparticles produced via a biological method, i.e., microorganisms, are more heterogenous than chemical methods. This confers

good stability of NPs the synthesis of proteins (Ishida et al., 2013). The size of AgNP produced by *Phaeoacremonium* sp. (Biorg 15) were 28.42 nm and 32.67 nm, Table 2; experiments 10 and 4, respectively, by DLS, both at pH 9.0 with concentrations of 0.1 mmol and 1.0 mmol, respectively. Therefore, at pH 9, higher concentrations are less favored for the enzymatic action of fungi and thus the formation of nanoparticles. Longer reaction times led to the best formation of nanoparticles (12 and 18 days). Another significant result was obtained at pH 7.0 and with higher concentrations and longer reactions times. This made 41.23 nm AgNP. Table 4 details the experimental design matrix and responses in obtaining the nanoparticles. The results show the encoded data and the values used in the experiments.

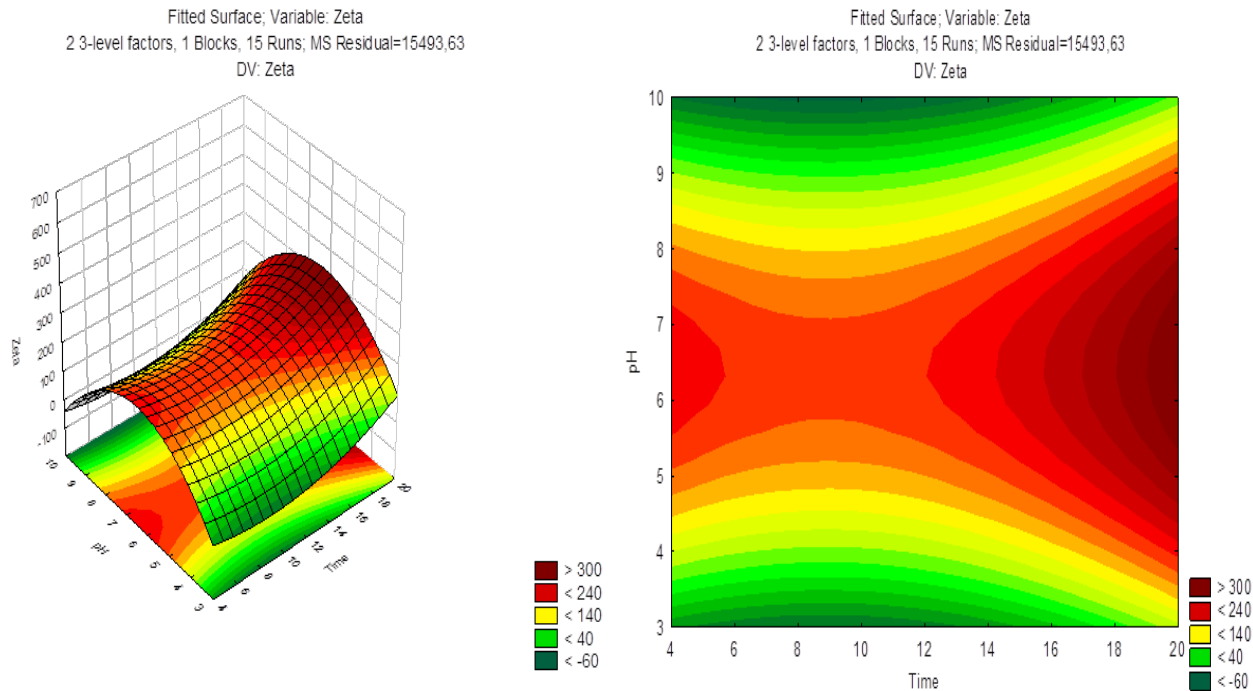


Figure 3. Response surface and contour plot function of nanoparticle formation content Contact Time Graph (x1) and the pH of the medium (x2).

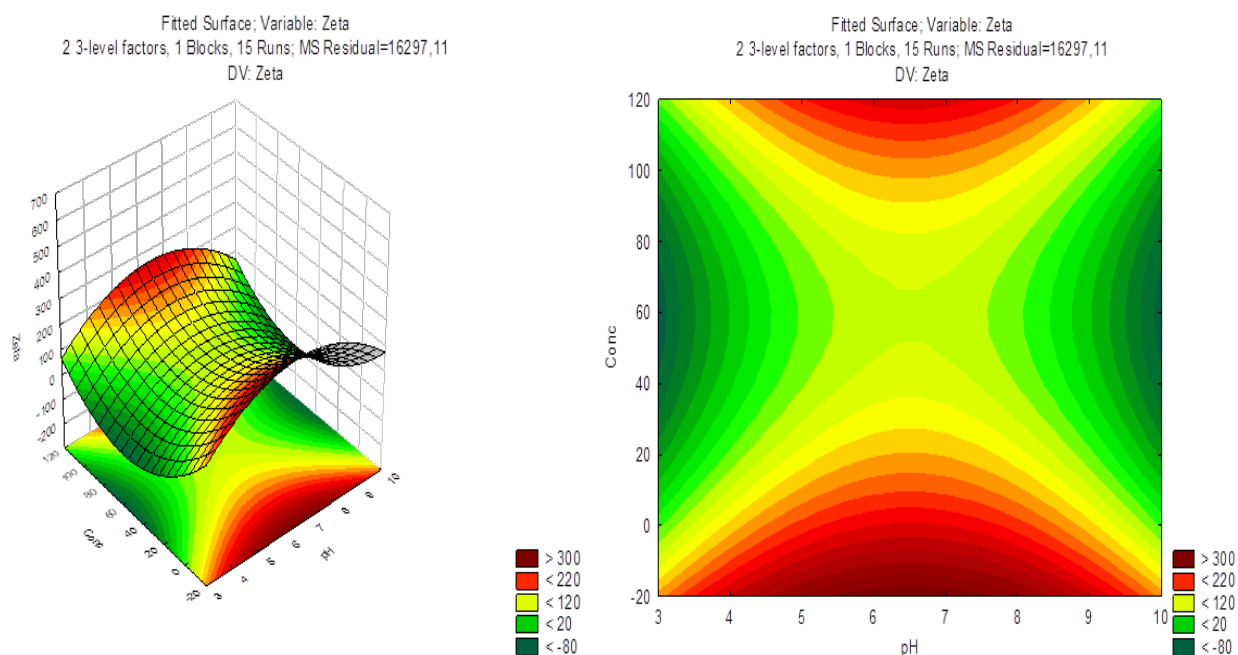


Figure 4. Response surface graph and formation of nanoparticles content contour plot as a function of pH (x2) and concentration (x3).

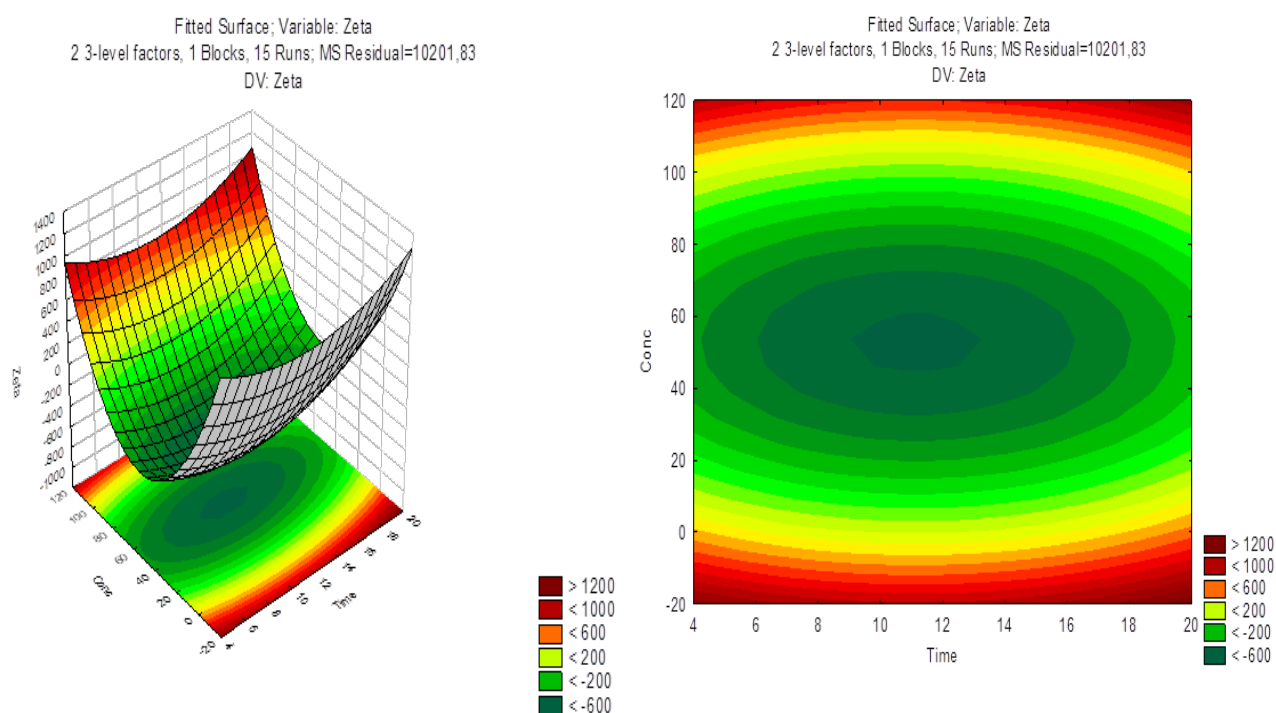


Figure 5. Response surface contour plot graph and the formation of nanoparticles contents in function of time (x1) and concentration (x3).

To determine the limits to the reaction as AgNP size and zeta potential was held experimental design with different values of the independent variables (pH, time and concentration of AgNO_3).

The Table 03 shows the analysis of variance (ANOVA) with the value of the coefficient of

determination (R-squared) was equal to 0.52. The coefficient of determination (R squared) defines the percentage of the total range of values of the sampling data about its arithmetic mean originated the differences analyzed by regression equation, namely, the coefficient of determination is the square of the correlation coefficient the higher the better coefficient analysis (Pate, 2018).

The formation of metallic nanoparticles was analyzed in response surface with 3D graphics and a 2D (Figure 3, 4 and 5) contour plot applying the interaction between two independent variables. The interactions between the pH of the medium (x2) and time (x1) show that the reaction time (6, 12 or 18 days) had no effect on production of the particle size when the pH of the reaction was 7.0.

Table 4. Matrix Experimental variables and responses to levels

Run	Uncoded and coded variables levels						Responses (Size)
	x1		x2		x3		
1	6	-1	5	-1	1	0	69.40
2	18	1	5	-1	1	0	132.7
3	6	-1	9	1	1	0	84.41
4	18	1	9	1	1	0	32.67
5	6	-1	7	0	0.1	-1	214
6	18	1	7	0	0.1	-1	585
7	6	-1	7	0	10	1	151
8	18	1	7	0	10	1	41.23
9	12	0	5	-1	0.1	-1	105.7
10	12	0	9	1	0.1	-1	28.42
11	12	0	5	-1	10	1	121.7
12	12	0	9	1	10	1	41.65
13	12	0	7	0	1	0	158.6
14	12	0	7	0	1	0	124.1
15	12	0	7	0	1	0	228

3.2 Characterization of the metal nanoparticles

Figure 5 shows the FTIR spectra of the AgNP characterized by FTIR. The studies confirmed the interaction between the fungus *Phaeoacremonium* sp. and metal nanoparticles from silver nitrate on different days, pH values, and concentrations. This identified the possible biomolecules

responsible for the reduction of Ag^+ ions in the filtered mycelial cells. Generally, the metals have absorption bands below 1000 cm^{-1} due to inter-atomic vibrations (Chaudhari, et al., 2017).

The peak at 3356 cm^{-1} was attributed to stretching of the OH bond due to water adsorption on the metal surface. The peaks at 1638 and 671 cm^{-1} correspond to the metal-oxygen bond (Ag-O) stretching and deformation vibrations, respectively. This refers to binding of amide I and II proteins. These bands indicate the presence of CN stretching by aromatic and aliphatic amines (Bath, 2000).

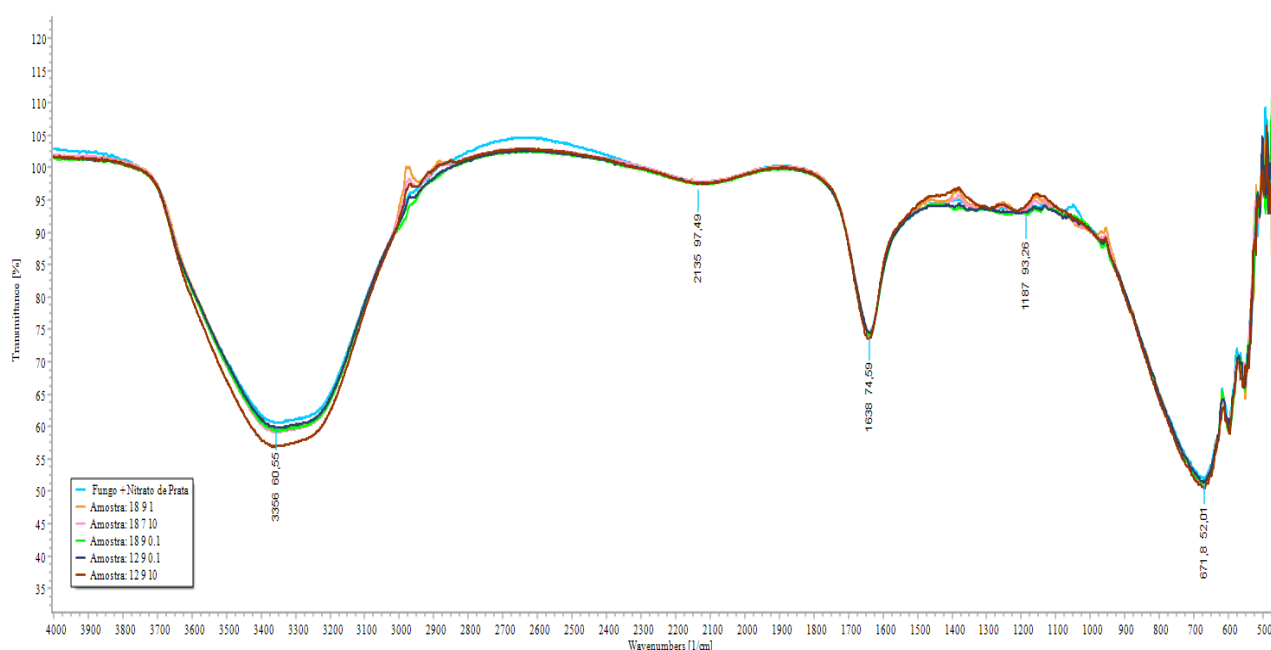


Figure 5. Analysis of AgNP obtained in dferentes days pHs and concentrations.

3.3 Evaluation of antibacterial activity

Table 6 details the products evaluated for antibacterial activity (AgNP at 10 mmol/mL). The results showed activity against strains of *Staphylococcus aureus* ATCC 33591 at 4.545 mmol/mL . *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 had a MIC of 0.568 mmol/mL and *Proteus mirabilis* ATCC 15290 had a MIC of 0.284 mmol/mL . *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352 had a MIC of 0.284 mmol/mL . Activity was seen against all strains at 0.071 mmol/mL ; however, the AgNP from 0.1 mmol/mL showed no activity at the concentrations studied here.

Table 6. Values of minimum inhibitory concentration of the nanoparticles samples

SAMPLES	BACTERIAL STRAINS			
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC33591	<i>S. epidermidis</i> ATCC12228	<i>P. mirabilis</i> ATCC 15290	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 4352
AgNO ₃ (0.001 mmol)	0.071	0.071	0.071	0.071
AgNP (10 mmol)	0.071	0.568	0.284	0.284
AgNP (1 mmol)	*	*	*	*

* All concentrations studied no antibacterial activity of the test substance.

Hamad (2018) reported the bactericidal activity of AgNP obtained via the filamentous fungi *Penicillium citreonigrum* and *Scopulariopsis brumptii salvanet-duval* isolated from the Burullus River in Egypt. The products were studied against *E. coli*, *Staphylococcus* sp., and *Pseudomonas* sp. The results showed excellent antibacterial activity in Gram-positive and Gram-negative bacteria.

Anbazhagan et al., (2017) previously tested the effect of the AgNP bactericide synthesized by *C. echinulata* soil isolates collected from the Indian Institute of Technology Madras, Chennai. The strains were *B. subtilis* ATCC 55614, *S. aureus* ATCC 29736, *Escherichia coli* ATCC 8739, and *K. pneumoniae* ATCC 13884. These were obtained American Type Culture Collection (ATCC). These results suggested that there was antibacterial activity against selected human pathogenic bacteria.

Morones-Ramirez et al., (2005) studied the mechanisms of action of AgNP in bacteria, suggesting that silver ions strongly interact with thiol groups of vital enzymes, that process takes DNA loses its ability to replicate (Kim et al., 2012) and also occur structural changes in the cell membrane that make the most permeable bacteria (Francisco et al., 2015), besides the formation of small dense granules of electrons (Dakhil, 2017), This causes the ions silver have bactericidal action and greater efficacy, highly influenced by the size, shape and concentration of nanoparticles (Rolim et al., 2012)

Lazar et al., (2011) studied *E. coli* and found that AgNP accumulation in the cell membrane creates gaps in the bilayer. This leads to increased permeability and cell death. This accumulation in

the bacterial cell wall is linked to the size of AgNP: A smaller particle offers greater bactericidal activity (Tamayo et al., 2014).

Another important factor concerns the zeta potential, nanoparticles with a negative potential tend to interact with bacteria via their surface charge. This further promotes penetration of nanoparticles into the bacterial membranes (Honary and Zahir, 2013). The zeta potential and size can modulate antimicrobial activity (Maleki Dizaj et al., 2015).

3.3 Test of acute ecotoxicology

Figure 10 analyzes cell density. We performed a comparative analysis, and the results suggest that the AgNP (10 mmol) strongly affected cell maintenance in *C. vulgaris* on the fifth day. It substantially inhibited the growth and the overall mortality following a positive control solution of AgNO₃ (0.001 mmol). The AgNP in the lowest concentration (0.1 mmol) led to stable growth with a decline from the 15th day. The absorbance values declined with 0.1 mmol and two days of exposure; however, growth on the third day declined for *C. vulgaris*. This increased again on the tenth day probably due to the influence of time. A solution of 0.1 mmol (3) has pH 9.0 on the sixth day. A solution of the same concentration (4) was obtained in the twelfth day despite having the same pH. This showed that time impacts the growth of *C. vulgaris*.

Upon comparing solutions of 1 mmol (1) and (3), there were difference in growth rates for exposure of *C. vulgaris* due to time. Solution (1) had slower growth on the fifth day but remained stable until the thirtieth day. Solution (3) had stable growth, but this declined on the 20th day. Time interfered with the solutions: The two solutions have the same concentrations and pH but different times. Solution (1) was obtained on the 18th day, and solution (3) was from day 6.

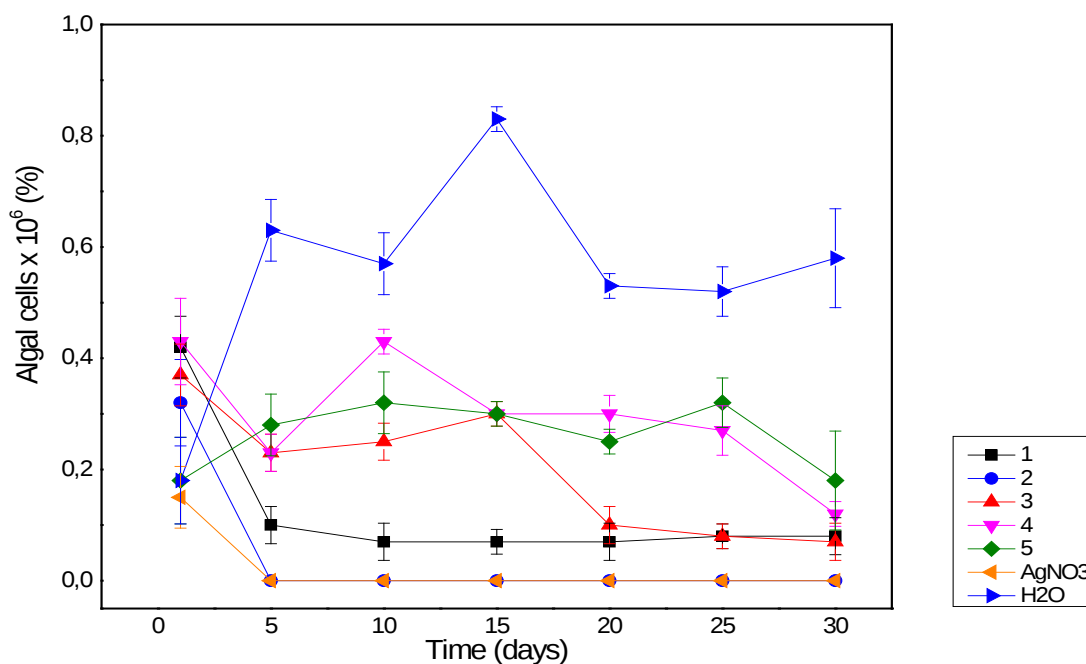


Figure 10. Evaluation of the toxic activity of AGNPS in *Chlorella vulgaris*.

We compared solutions (4) with a concentration of 0.1 mmol and pH 9.0 on day 12 as well as samples (5) with a concentration of 0.1 and pH of 7.0 on day 18. Time showed a decline in the growth rate on the 15th day. All solutions (5) remained stable over longer times. This suggests that time interfered with the solutions. The control solution (distilled water/*C. Vulgaris*) showed peak growth on the fifth and 15th day. They decline on day 20 and grow after day 30.

Yoo et al. (2015) examined the effects of toxicity in AgNP *Chlorella* sp., *Moina macrocopa*, *Gonionotus Barbonymus*, and *Chironomus* spp. The results showed that the order of the four organisms' toxicity was free Ag^+ > AgNP. The results indicate that bioaccumulation of the higher bioaccumulation factor (BAF) + Ag was 101.84 g L^{-1} in *Chlorella* sp. and the lowest AgNP BAF was 1.89 g L^{-1} in *B. gonionotus*. The transfer of AgNPs in the food chain occurred only from *Chlorella* sp. *M. macrocopa*, and there was no evidence of biomagnification of food sources for consumers in a single tropical food chain. Oukarroum et al., (2012) used fresh water microalgae *Chlorella vulgaris* and marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* to investigate the toxic effects induced by 50-nm

AgNPs. To induce the AgNP effect, we exposed *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta* to AgNPs for 24 h at 0-10 mg/L. The AgNP could directly interact with the cell surface of *Chlorella vulgaris*, and large aggregates were observed.

This research is novel because the nanoparticle morphology can be tuned via concentration, pH, and time. The product is produced in Amazon endophytic fungi. The 10 mmol samples (B) shows strong toxic activity against *C. vulgaris*. However, the lowest concentration of 0.1 mmol (D) was stable at the end of the experiment. It was influenced by the time.

4 Conclusion

This work describes the novel use of endophytic fungi isolated from *Bertholletia excelsa* to obtain AgNP. The filamentous fungus *Phaeoacremonium* sp. (Biorg 15) can produce AgNPs with a size from to 44.06 nm. The best condition for the formation of AgNP from mycelium *Phaeoacremonium* sp. was 0.1 mmol of AgNO₃, pH 9.0, and 12 days of reaction. Characterization by FTIR verified the interaction between cofactors contained in *Fusarium* sp. and nanoparticles of silver nitrate. There were functional groups prepared via bioreduction, and the stability of the metal nanoparticles confirms that nitrate reductase is involved in the biotransformation of silver ions to nanoparticles.

The antibacterial activity of AgNP confirmed its effectiveness as a biocide. Nanoparticles at 10 mmol had activity against all bacterial strains. Having increased the activity versus the positive control, the AgNO₃ solution could more easily penetrate the membrane of the bacterial cell wall because of the size of the nanoparticle. Finally, studies on the ecotoxicity of AgNP against *C. vulgaris* showed toxicity in all samples. The 10 mmol concentration is most toxic of all. This demonstrates that the AgNP inhibits the growth of algae on the second day of the experiment; there was complete mortality on day 5. This evaluation underscores the toxicity of AgNP. These materials are also a pollutant and can lead to direct or indirect deposition of chemicals in the environment.

Acknowledgments

The authors are grateful for the financial support from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Amapá (FAPEAP).

Reference

- ALIOFKHAZRAEI, M. (Ed.). (2016). *Manual de Nanopartículas*. doi: 10.1007 / 978-3-319-15338-4.
- ALIPOUR, A., BAHRAMI, A. E SAEBNOORI, E. (2017). Investigation in effect of different culture media on the anticorrosive performance of the bacterial biopolymer. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, 77, 64-72. doi: 10.1016 / j.jtice.2017.04.050.
- AMATUZZI, R. F., CARDOSO, N., POLTRONIERI, A. S., POITEVIN, C. G., DALZOTO, P., ZAWADENEAK, M. A., & PIMENTEL, I. C. (2017). Potential of endophytic fungi as biocontrol agents of *Duponchelia fovealis* (Zeller) (Lepidoptera: Crambidae). **Brazilian Journal of Biology**, 78(3), 429–435. doi:10.1590/1519-6984.166681.
- ANBAZHAGAN, S., AZEEZ, S., MORUKATTU, G., RAJAN, R., VENKATESAN, K., & THANGAVELU, K. P. (2017). Synthesis, characterization and biological applications of mycosynthesized silver nanoparticles. **3 Biotech**, 7(5), 333.
- ARAÚJO, P.H.F., BARATA, P.H.S., ARAÚJO, I.F. ET AL. (2018) Direct and Solvent-Free Aminolysis of Triglyceride from *Oenocarpus bataua* (Patawa) Oil Catalyzed by Al₂O₃. **Catal Letters** 148: 843. <https://doi.org/10.1007/s10562-018-2306-7>.
- AHMAD A, MUKHERJEE P, SENAPATI S, MANDAL D, KHAN MI, KUMAR R, SASTRY M. (2003). Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium oxysporum*. **Colloids Surf, B** 28: 313-318.
- BAGHERZADE, G., TAVAKOLI, M. M., & NAMAIEI, M. H. (2017). Green synthesis of silver nanoparticles using aqueous extract of saffron (*Crocus sativus* L.) wastages and its antibacterial activity against six bacteria. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, 7(3), 227-233.
- BARABADI, H., HONARY, S., EBRAHIMI, P., MOHAMMADI, M. A., ALIZADEH, A., & NAGHIBI, F. (2014). Microbial mediated preparation, characterization and optimization of gold nanoparticles. **Brazilian Journal of Microbiology**, 45(4), 1493–1501. doi:10.1590/s1517-83822014000400046.
- BARTH, A. (2000). The infrared absorption of amino acid side chains. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, 74(3-5), 141–173. doi:10.1016/s0079-6107(00)00021-3.
- BOLLA, P. K., KALHAPURE, R. S., RODRIGUEZ, V. A., RAMOS, D. V., DAHL, A., & RENUKUNTLA, J. (2019). Preparation of solid lipid nanoparticles of furosemide-silver complex and evaluation of antibacterial activity. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, 49, 6-13.

BURDUŞEL, A.-C., GHERASIM, O., GRUMEZESCU, A. M., MOGOANTĂ, L., FICAI, A., & ANDRONESCU, E. (2018). Biomedical Applications of Silver Nanoparticles: An Up-to-Date Overview. **Nanomaterials**, 8(9), 681.doi:10.3390/nano8090681.

CHAUDHARI, P. L., & KALE, P. C. (2017) Synthesis and characterization of nano zinc peroxide photocatalyst for the removal of brilliant green dye from textile waste water. **International Journal of ChemTech Research**. 10. 477-486.

DAKHIL, A. S. (2017). Biosynthesis of silver nanoparticle (AgNPs) using *Lactobacillus* and their effects on oxidative stress biomarkers in rats. **Journal of King Saud University - Science**, 29(4), 462–467.doi:10.1016/j.jksus.2017.05.013.

DASH, A., SINGH, A.P., CHAUDHARY, B.R., SINGH, S.K., & DASH, D. (2012). Effect of silver nanoparticles on growth of eukaryotic green algae. **Nano-micro Letters** 4(3), 158- 165. <https://doi.org/10.1007/BF03353707>.

DE ARAÚJO, I. F., DE ARAÚJO, P. H. F., FERREIRA, R. M. A., SENA, I. D. S., LIMA, A. L., CARVALHO, J. C. T., ... & SOUTO, R. N. P. (2018). Larvicidal effect of hydroethanolic extract from the leaves of *Acmella oleracea* LRK Jansen in *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. **South African journal of botany**, 117, 134-140.

DEVI SL, DONALAD AB, JOSHI SR. (2014) Studies on biosynthesis of antimicrobial silver nanoparticles using endophytic fungi isolated from the ethno-medicinal plant *Gloriosa superba* L. **P Natl A Sci India B**. 2014;84:1091–1099.

DURÁN N, MARCATO PD, ALVES OL, DE SOUZA GIH, ESPOSITO E. (2005). Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains. **J Nanobiotechnology** 3: 1-8.

GHOSHAL, T., BISWAS, S., PAUL, M., & DE, S. K. (2009). Synthesis of ZnO Nanoparticles by Solvothermal Method and Their Ammonia Sensing Properties. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, 9(10), 5973–5980. doi:10.1166/jnn.2009.1290.

HAMAD, M. T. (2018). Biosynthesis of silver nanoparticles by fungi and their antibacterial activity. **International Journal of Environmental Science and Technology**. doi:10.1007/s13762-018-1814-8.

HE, D., DORANTES-ARANDA, J. J., & WAITE, T. D. (2012). Silver Nanoparticle—Algae Interactions: Oxidative Dissolution, Reactive Oxygen Species Generation and Synergistic Toxic Effects. **Environmental Science & Technology**, 46(16), 8731–8738.doi:10.1021/es300588a.

HOSEINPOUR, V., & GHAEMI, N. (2018). Green synthesis of manganese nanoparticles: Applications and future perspective—A review. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. Doi: 10.1016/j.jphotobiol.2018.10.022.

ISHIDA, K., CIPRIANO, T. F., ROCHA, G. M., WEISSMÜLLER, G., GOMES, F., MIRANDA, K., & ROZENTAL, S. (2013). Silver nanoparticle production by the fungus *Fusarium oxysporum*: nanoparticle characterisation and analysis of antifungal activity against pathogenic yeasts. **Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz**, 109(2), 220–228. doi:10.1590/0074-0276130269.

- KIM, S. W., JUNG, J. H., LAMSAL, K., KIM, Y. S., MIN, J. S., & LEE, Y. S. (2012). Antifungal Effects of Silver Nanoparticles (AgNPs) against Various Plant Pathogenic Fungi. **Mycobiology**, 40(1), 53–58.doi:10.5941/myco.2012.40.1.053.
- KÖROĞLU, A., ŞAHİN, O., KÜRKÇÜOĞLU, I., DEDE, D. Ö., ÖZDEMİR, T. (2016). Silver nanoparticle incorporation effect on mechanical and thermal properties of denture base acrylic resins. **Journal of Applied Oral Science**, 24(6), 590–596.doi:10.1590/1678-775720160185.
- MAJIDI, S., ZEINALI SEHRIG, F., FARKHANI, S. M., SOLEYMANI GOLOUJEH, M., & AKBARZADEH, A. (2014). Current methods for synthesis of magnetic nanoparticles. Artificial Cells, **Nanomedicine, and Biotechnology**, 44 (2), 722–734.doi:10.3109/21691401.2014.982802.
- MALEKI DIZAJ, S., MENNATI, A., JAFARI, S., KHEZRI, K., & ADIBKIA, K. (2015). Antimicrobial activity of carbon-based nanoparticles. **Advanced pharmaceutical bulletin**, 5(1), 19-23.
- MAZIERO, J.S., ROGERO, S.O., ALEMANY, A., (2016) Ecotoxicological study of silver nanoparticle on *Daphnia similis*, **J Health Sci Inst.**, 34, 133-139.
- MCGILLICUDDY, E., MURRAY, I., KAVANAGH, S., MORRISON, L., FOGARTY, A., CORMICAN, M., & MORRIS, D. (2017) Silver nanoparticles in the environment: Sources, detection and ecotoxicology. **Science of the Total Environment**, 575, 231-246.
- MÉNDEZ, J. P., GARCÍA, F. P., GONZÁLEZ, N. T., SANTILLÁN, Y. M., & SANDOVAL, O. A. A. (2018). Zeta potential and electrophoretic mobility for the recovery of a saline soil with organic amendments. **Ciência e Agrotecnologia**, 42(4), 420-430.
- MODRZEJEWSKA, Z., MANIUKIEWICZ, W., & WOJTASZ-PAJAŁ, A. (2006). Determination of Hydrogel Chitosan Membrane Structure. **Lodz, Poland: Polish Chitin Society**; 2011. p 49–60.
- NETALA, V. R., BETHU, M. S., PUSHPALATHA, B., BAKI, V. B., AISHWARYA, S., RAO, J. V., & TARTTE, V. (2016) Biogenesis of silver nanoparticles using endophytic fungus *Pestalotiopsis microspora* and evaluation of their antioxidant and anticancer activities. **International journal of nanomedicine**, 11, 5683-5696. doi:10.2147/IJN.S112857, 2016.
- NYAMUKAMBA, P., OKOH, O., MUNGONDORI, H., TAZIWA, R., & ZINYA, S. (2018). Synthetic Methods for Titanium Dioxide Nanoparticles: A Review. Titanium Dioxide - **Material for a Sustainable Environment**.doi:10.5772/intechopen.75425.
- OLIVEIRA, A. E., DUARTE, J. L., CRUZ, R. A., SOUTO, R. N., FERREIRA, R. M., PENICHE, T., & CARVALHO, J. C. (2017). *Pterodon emarginatus* oleoresin-based nanoemulsion as a promising tool for *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) control. **Journal of nanobiotechnology**, v. 15, n. 1, p. 2.
- OUKARROUM, A., BRAS, S., PERREAULT, F., POPOVIC, R. (2012). Inhibitory effects of silver nanoparticles in two green algae, *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta*. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 78, 80–85.
- PANTIDOS, N., & HORSFALL, L. E. (2014). Biological synthesis of metallic nanoparticles by bacteria, fungi and plants. **Journal of Nanomedicine & Nanotechnology**, 5(5), 1.

- PATE, R. S., TINGNE, C. V., & DIXIT, P. G. (2018). Age determination by spheno-occipital synchondrosis fusion in Central Indian population. **Journal of Forensic and Legal Medicine**, 54, 39–43. doi: 10.1016/j.jflm.2017.12.013.
- PINTO, E. P., TAVARES, W. D. S., MATOS, R. S., FERREIRA, A. M., MENEZES, R. P., DA COSTA, M. E. H., ... & ZAMORA, R. R. M. (2018). Influence of low and high glycerol concentrations on wettability and flexibility of chitosan biofilms. **Química Nova**, 41(10), 1109-1116.
- RAMCHURAN, E. J., SOMBORO, A. M., MONAIM, S. A. A., AMOAKO, D. G., PARBOOSING, R., KUMALO, H. M., ... & BESTER, L. A. (2018). In vitro antibacterial activity of *Teixobactin* derivatives on clinically relevant bacterial isolates. **Frontiers in microbiology**, 9.
- RAVARO, L. P., & SCALVI, L. V. D. A. (2011). Influence of pH of colloidal suspension on the electrical conductivity of S_nO_2 thin films deposited via Sol-Gel-Dip-Coating. **Materials Research**, 14(1), 113-117.
- RIAZ, M., ZIA, R., IJAZ, A., HUSSAIN, T., MOHSIN, M., & MALIK, A. (2018) Synthesis of monophasic Ag doped hydroxyapatite and evaluation of antibacterial activity. **Materials Science and Engineering: C**, 90, 308-313.
- ROLIM, J.P.; DE-MELO, M.A.; GUEDES, S.F.; ALBUQUERQUE-FILHO, F.B.; DE SOUZA, J.R.; NOGUEIRA, N.A.; ZANIN, I.C.; RODRIGUES, L.K. (2012) The antimicrobial activity of photodynamic therapy against *Streptococcus mutans* using different photosensitizers. **J. Photochem. Photobiol.** 106, 40–46.
- SÁMANO-VALÊNCIA, C., MARTÍNEZ-CASTAÑÓN, GA, MARTÍNEZ-GUTIÉRREZ, F., RUIZ, F., TORO-VÁZQUEZ, JF, MORALES-RUEDA, JA, NIÑO MARTÍNEZ, N. (2014). Caracterização e biocompatibilidade de géis de quitosana com nanopartículas de prata e ouro. **Journal of Nanomaterials**, 2014, 1-11. doi: 10.1155 / 2014/543419.
- SANDHU, K. V., SHERWIN, E., SCHELLEKENS, H., STANTON, C., DINAN, T. G., & CRYAN, J. F. (2017). Feeding the microbiota-gut-brain axis: diet, microbiome, and neuropsychiatry. **Translational Research**, 179, 223-244.
- SHEORAN, N., & KAUR, P. (2018). Biosynthesis of nanoparticles using eco-friendly factories and their role in plant pathogenicity: a review. **Biotechnology Research and Innovation**. Doi: 10.1016/j.biori.2018.09.003.
- SCHNEIDER, G. (2017). Antimicrobial silver nanoparticles – regulatory situation in the European Union. **Materials Today: Proceedings**, 4, S200–S207. doi: 10.1016/j.matpr.2017.09.187.
- SIKDER, M. T., RAHMAN, M. M., ULLAH, A. A., HOSSAIN, K. F. B., BANIK, S., ... & KURASAKI, M. (2018). A systematic review on silver nanoparticles-induced cytotoxicity: Physicochemical properties and perspectives. **Journal of advanced research**, 9, 1-16.
- SINGH, T., SHUKLA, S., KUMAR, P., WAHLA, V., & BAJPAI, V. K. (2017). Application of Nanotechnology in Food Science: Perception and Overview. **Frontiers in microbiology**, 8, 1501. doi:10.3389/fmicb.2017.01501.
- STEVEN J. OLDENBURG, PH.D. (2019) Silver Nanoparticles: Properties and Applications. **President-nanoComposix**, Inc. posted at Sigma-Aldrich.

- SOARES S, SOUSA J, PAIS A, VITORINO C V. (2018) Nanomedicine: Principles, properties and regulatory issues. **Frontiers in chemistry**, 6, 360.
- SKWAREK, E., BOLBUKH, Y., TERTYKH, V.A., & JANUSZ, W. (2016). Electrokinetic Properties of the Pristine and Oxidized MWCNT Depending on the Electrolyte Type and Concentration. **Nanoscale research letters**, 11(1).
- TAMAYO, L.A.; ZAPATA, P.A.; VEJAR, N.D.; AZOCAR, M.I.; GULPPI, M.A.; ZHOU, X.; THOMPSON, G.E.; RABAGLIATI, F.M.; PAEZ, M.A. (2014) Release of silver and copper nanoparticles from polyethylene nanocomposites and their penetration into *Listeria monocytogenes*. **Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.** 40, 24–31.
- TRIPATHI, S., MEHROTRA, G. K., & DUTTA, P. K. (2011). Chitosan–silver oxide nanocomposite film: Preparation and antimicrobial activity. **Bulletin of Materials Science**, 34(1), 29–35.doi:10.1007/s12034-011-0032-5.
- ZIKALALA, N., MATSHETSHE, K., PARANI, S., & OLUWAFEMI, O. S. (2018) Biosynthesis protocols for colloidal metal oxide nanoparticles. **Nano-Structures & Nano-Objects**, 16, 288-299.
- ZHANG, X. (2017). Ecotoxicological Effects of Silver Nanoparticles: The Relevance of Test Species and Test Conditions (**Doctoral dissertation, Universität Bremen**).
- YOO-IAM, M., CHAICHANA, R., & SATAPANAJARU, T. (2014). Toxicity, bioaccumulation and biomagnification of silver nanoparticles in green algae (*Chlorella* sp.), water flea (*Moina macrocopa*), blood worm (*Chironomus* spp.) and silver barb (*Barbonymus gonionotus*). **Chemical Speciation & Bioavailability**, 26(4), 257–265.doi:10.3184/0954.

Este artigo será submetido na revista Brazilian Journal of Microbiology, editada pela Sociedade Brasileira de Microbiologia.

Nanopartículas de cobre biossintetizadas por fungo endofítico *Phaeoacremonium* sp. isolado de amêndoas de *Bertholletia excelsa* Ducke.

Edmilson dos S. Moraes^{a,b}, Fabrício H. Holanda^{a,b}, Iracirema S. Sena^{a,c}, Adriana M. Ferreira^{a,c}, Adilson L. Lima^d, Victor H. de Souza Marinho^{a,c}, Jose C. Tavares Carvalho^{ab} and Irlon M. Ferreira^{a,b,c*}

^a*Grupo de Biocatálise e Síntese Orgânica Aplicada, Departamento de Ciências Exatas, Universidade Federal do Amapá, Rod. JK, KM 02, 68902-280, Macapá, Amapá, Brazil.*

^b*Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amapá, Rod. JK, KM 02, 68902-280, Macapá, Amapá, Brazil.*

^c*Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia – Rede Bionorte, Universidade Federal do Amapá, Rod. JK, KM 02, 68902-280, Macapá, Amapá, Brazil.*

^d*Laboratório de Controle Biológico, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Macapá, Amapá, Brazil.*

* Corresponding author. E-mail.: irlon.ferreira@gmail.com

Resumo

A biossíntese de nanopartículas surge como alternativa viável, rápida, de baixo custo frente aos métodos que causam danos ambientais. Nesta pesquisa objetivou-se a biossíntese do cobre por fungo endofítico *Phaeoacremonium* sp. isolado de *Bertholletia excelsa* da Amazônia brasileira. O fungo cresceu em meio líquido malte para a síntese com diferentes

co-adjuvantes: NpBP, NpEtOH, NpGli e NpAsc na busca pelo melhor redutor e realizar caracterização por infravermelho. Avaliou-se os efeitos do cobre no crescimento e morfologia de *Phaeoacremonium* sp. por medição do halo da colônia, em milímetros, a cada vinte e quatro horas de incubação. As placas controle e expostas ao metal foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV). Os resultados mostraram valores menores e mais estáveis do tamanho de partículas para o co-adjuvante NpBP de 66.84 nm e potencial zeta de -34 mV. O FTIR constatou a presença das nanopartículas de cobre e a presença de grupos funcionais responsáveis pela oxiredução e estabilidade das NPs. A análise do crescimento em meio sólido contendo cobre, mostrou leve deformação no crescimento do *Phaeoacremonium* sp. e inibição até o quarto dia, no entanto, o mesmo adaptou-se ao estresse causado pelo metal e a partir do quinto dia de cultivo, mostrou crescimento exponencial.

Palavras Chaves: Fungos endofíticos; Nanopartículas de cobre; nanopartículas metálicas; Castanha do Brasil, biocatálise.

1. Introdução

As nanopartículas metálicas (NPs) são utilizadas como uma alternativa aos antibióticos existentes, devido a resistentes de muitas bactérias ao mesmo, na maioria das vezes devido ao uso irracional de forma descontrolada (Neethu et al., 2018). Neste cenário, as nanopartículas de cobre surgem devido a sua excelente atividade antimicrobiana, atuando na membrana e parede celular do microorganismo, causando danos ao DNA (Hassan et al., 2018).

A síntese biológica envolve a utilização de microorganismos como: bactérias, leveduras e fungos. No caso do uso de fungos, a maior vantagem está na facilidade de seu isolamento e cultivo, capacidade de adaptação a meios contendo metais pesados, bioacumulação de íons, dentre outros (Vijayanandan e Balakrishnan 2018). Outro fator interessante é a participação de enzimas: polipeptídeos, proteínas, açúcares ou cofatores

do tipo redutase orgânica, produzidos por processos metabólicos que agem sobre o sal metálico reduzindo-o a nanopartículas metálicas, tal processo pode ocorrer de duas formas: intracelular, quando o fungo engloba o sal metálico para ação de suas enzimas sobre tal metálico, enquanto na extracelular, ocorre a ação dos metabólitos sobre o sal metálico (Nayak, Nanda e Prabhakar 2018, Nanda, Nayak e Krishnamoorthy 2018, Hassan et al., 2018).

Dentre os fungos utilizados para síntese verde de metais, os endofíticos possuem destaque, principalmente porque não são patogênicos, e podem viver por todo ou parte do seu ciclo de vida em associação com plantas, sem causar danos ou doenças (Yang et al. 2018, Kusari, Pandey & Spiteller 2013).

Assim, os fungos endofíticos são recursos potentes para a síntese de nanopartículas metálicas, quando comparados com plantas, bactérias, leveduras e até mesmo com outros métodos químicos e físicos, pois apresentam vantagens como: rapidez no seu processo, adaptabilidade, bom rendimento, temperaturas brandas e o não uso de substâncias tóxicas (Seetharaman et al. 2018).

O presente estudo teve como objetivo a biossíntese de nanopartículas metálicas de cobre por fungo endofítico *Phaeoacremonium* sp. Isolado de amêndoa de castanha do Brasil (*Bertolletia excelsa* Ducke) e caracterização da morfologia fúngica quando tratado com cobre.

2. Experimental

2.1 Reagentes químicos, solventes e meios de cultura

O sal de Cu (NO₃)₂ utilizado foi comprado da Synth, já os tampões fosfatos foram da Vetec. O meio de cultura utilizado foi o extrato de Malte (2%) obtido da HiMedia RM004B, o Etanol (99%), D-glucose (≥ 99,5) e ascorbato de sódio, foram adquiridos da Sigma-Adrich e a água para seringas da Farmace®.

2.2 Isolamento de fungos endofíticos *Phaeoacremonium* sp. de *Bertholletia excelsa*

O isolamento do fungo endofítico foi realizado pelo método descrito por Yang et al., (2018) e armazenado de acordo (Kelly et al., 2017) no Laboratório de Biocatálise e Síntese Orgânica Aplicada da Universidade Federal do Amapá (Unifap). As sementes de *Bertholletia excelsa* (castanha do Brasil) foram cedidas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Amapá, Brasil, em duas áreas: 1 - W 52 ° 18'20,976 "e S 0 ° 33'44,44" e 2 - W 51 ° 57'53,338 "e S 0 ° 25'21,39" (Ao sul do Estado do Amapá, no município de Iaranjal do Jari). Após a coleta, retirou-se as amêndoas e realizou-se o processo de assépsia com hiporclorito de sódio, álcool 70% e água destilada, seguindo o método descrito por Barnett (1998). Após tal etapa, as amêndoas foram transferidas para placas de Petri contendo papel filtro umedecido com água destilada estéril e incubadas em B.O.D a uma temperatura de 28° C por 7 dias. As placas foram, avaliadas diariamente até o desenvolvimento de colônias fúngicas.

2.1. Identificação dos fungos endofíticos de *Bertholletia excelsa* Ducke

Morfologia fúngica do *Phaeoacremonium* sp. (**Figura 1**), foi investigada por observação direta através de um microscópio óptico (OLYMPUS® BX41). As identificações iniciais foram baseadas nessas observações e critérios morfológicos (Visagie et al., 2014).



Figura. 1. Fungo *Phaeoacremonium* sp.

2.7 Crescimento do fungo *Phaeoacremonium* sp. em um meio sólido

O *Phaeoacremonium* sp. foi cultivado em placas de Petri contendo o extrato de malte (20,0 g L⁻¹), ágar (20,0 g L⁻¹) e água destilada estéril. O Ph foi ajustado para 5, com uma solução de KOH (0,1 mol L⁻¹) ou HCl (0,1 mol L⁻¹). A solução contendo o meio sólido foi esterilizada em autoclave (AV-50, Phoenix, Brasil) por 15 min a 121° C para posteriormente realizar a inoculação do fungo endofítico.

2.8. Biossíntese de nanopartículas de cobre de *Phaeoacremonium* sp.

Foram inoculados 4 discos de 5 mm do fungo *Phaeoacremonium* sp. em meio líquido (100 mL, extrato de malte a 2% em pH 5) em Erlenmeyer de 250 mL. Os micélios foram incubados a 28° C e 150 rpm por 5 dias em agitador shaker (LUCADEMA 222; Brasil), após foram filtrados em funil de Buchner com papel filtro estéril e resuspenso em quatro diferentes agentes redutores: etanol, fosfato, ascorbato de sódio e glicose. A biossíntese das nanopartículas foi realizadas da seguinte forma: Experimento A (NpCu): 1,5 g (peso úmido) de micélio de *Phaeoacremonium* sp. e 10 mL (0.001 mmol) de solução de cobre; Experimento B (NpCu + água destilada): 1,5 g (peso úmido) de micélio de *Phaeoacremonium* sp., 10 mL (0.001 mmol) 100 mg de ascorbato de sódio diluído em água destilada; Experimento C (NpCu + Glicose): 1,5 g (peso úmido) de micélio de *Phaeoacremonium* sp. e 10 mL de nitrato de cobre (0.001 mmol), 100 mg de glicose; Experimento D (NpCu + Etanol): 1,5 g (peso umido) de micélio de *Phaeoacremonium* sp., 10 mL de nitrato de cobre (0.001 mmol), 10 mL de Etanol. Todos os experimentos foram incubados durante 5 dias a 28° e 150 rpm. Após esse período (5 dias), filtrou-se e analisou-se em equipamento zetasizer e infravermelho.

2.9 Análise do tamanho de partícula

A análise do tamanho de partícula e a polidispersidade foram determinadas com espectroscopia de correlação de fótons utilizando um Zetasizer 5000 (Malvern Instruments, Malvern, UK). Cada amostra foi diluída utilizando água de seringa ultrapura (2: 1) e filtrada em filtro de seringa (0,2 µm) as medições foram realizadas em triplicata. O tamanho médio das partículas foi expresso como o diâmetro médio. Os dados foram tratados com o software Zetasizer 6.20®.

2.10 Caracterização do agente redutor Fosfato por espectroscopia no infravermelho

Os espectros no Infravermelho (IV) foram analisados em espectrômetro de marca SHIMADZU IR Afinity, operando com Transformada de Fourier nas regiões de 4.000 a 400 cm⁻¹ (KAMNEV et al., 2018).

2.11 Determinação do crescimento radial e caracterização morfológica

Discos com 3 cm de diâmetros de *Phaeoacremonium* sp. foram inoculados em placa de petrí com meio malte, contendo nitrato de cobre (água destilada na concentração 0.001 Mmol em Ph 5.0) e incubados a 28°C durante 168 h. As amostras controle cresceram em meio citados acima sem a presença da solução do metal. O crescimento foi avaliado através de medição do halo radial, por diâmetro da colônia, em milímetros, a cada vinte e quatro horas de incubação. Todos os resultados foram expressos em média aritmética de triplicata (Alzahrani, 2016).

Para avaliação morfológica dos efeitos do nitrato de cobre sobre os aspectos microscópicos do *Phaeoacremonium* sp., placas de culturas controle e expostas ao metal foram analisadas em microscopia eletrônica de varredura (MEV).

3 Resultados e discussão

3.1 Biossíntese de nanopartículas de cobre por fungo *Phaeoacremonium* sp.

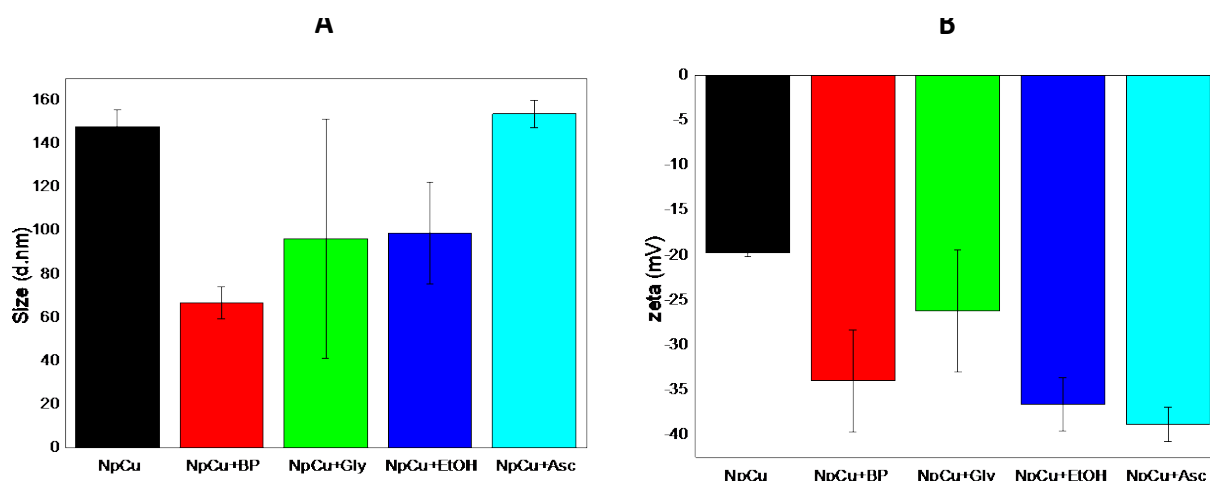
Para a obtenção de NpCu alguns processos químicos utilizam agentes redutores eficientes, tais como álcool isopropílico, brometo de cetiltrimetil amônio ou borohidreto de sódio em temperaturas altas que podem chegar a 75 °C (Gawande et al., 2016). Baseado nisso, na tentativa de inovar e obter NpCu valores menores e mais estáveis, os experimentos foram conduzidos com células do fungo endofítico *Phaeoacremonium* sp. (pH 5) na presença dos co-adjuvantes: NpBP, NpEtOH, NpGly e NpAsc, sendo observado uma diminuição no tamanho médio das NpCu determinado por DLS, com 66.84 nm, 98.72 nm, 96.26 nm e 153.6 nm, respectivamente (**Figura 2 A**).

O primeiro co-adjuvante usado foi a solução de glicose adicionada ao meio celular microbiano contendo a solução de CuNO_3 , tal objetivo seria para estimular enzimas do tipo glicose oxidase da classe das oxidases (Yoshida et al. 2015) presentes nas células do fungo endofítico *Phaeoacremonium* sp. No entanto, o valor da nanopartícula determinado por DLS para esta condição foi de 96.26 nm, valor maior que o determinado pelas células microbianas somente em meio tamponado. Tal resultado indica que o meio rico em glicose não é favorável para a síntese de NpCu pelo fungo endofítico *Phaeoacremonium* sp.

Para a NpAsc obtidas a partir das células microbianas do fungo *Phaeoacremonium* sp. foi observado um alto valor no tamanho da partícula, 153.6 nm, e o potencial zeta determinado foi de -36.6mV (**Figura 2 B**), este alto potencial negativo para esta amostra pode indicar a presença do ácido ascórbico aderida na superfície da NpCu, que devido ao efeito de desprotonação do grupo carboxila derivado do ácido (Jiang et al., 2018). Foi

escolhido o etanol na reação de bioobtenção pois além de apresentar baixa toxicidade ambiental, é relativamente barato e pode ser consumido como co-fator pelas células dos fungos filamentosos *Phaeoacremonium* sp. (Schrewe et al., 2013) e paralelamente pode ser usado para purificar e fracionar seletivamente o tamanho modificado hidrofobicamente das nanopartículas (De Waele et al. 2018). O alto valor de potencial negativo -34 mV (**Figura 2 B**), também foi observado para a NpEtOH, onde o etanol ou na forma de íon etóxi, que é mais reativa como espécie redutora, no entanto favorável a pH alcalino (Li et al., 2017), pode ser oxidado a acetaldeído, que também pode ter seu grupo carboxila desprotonado e agregado a NpCu.

Figura 2: Em (A) distribuição do tamanho das nanopartículas biossintetizadas; (B) potencial zeta em diferentes agentes redutores.

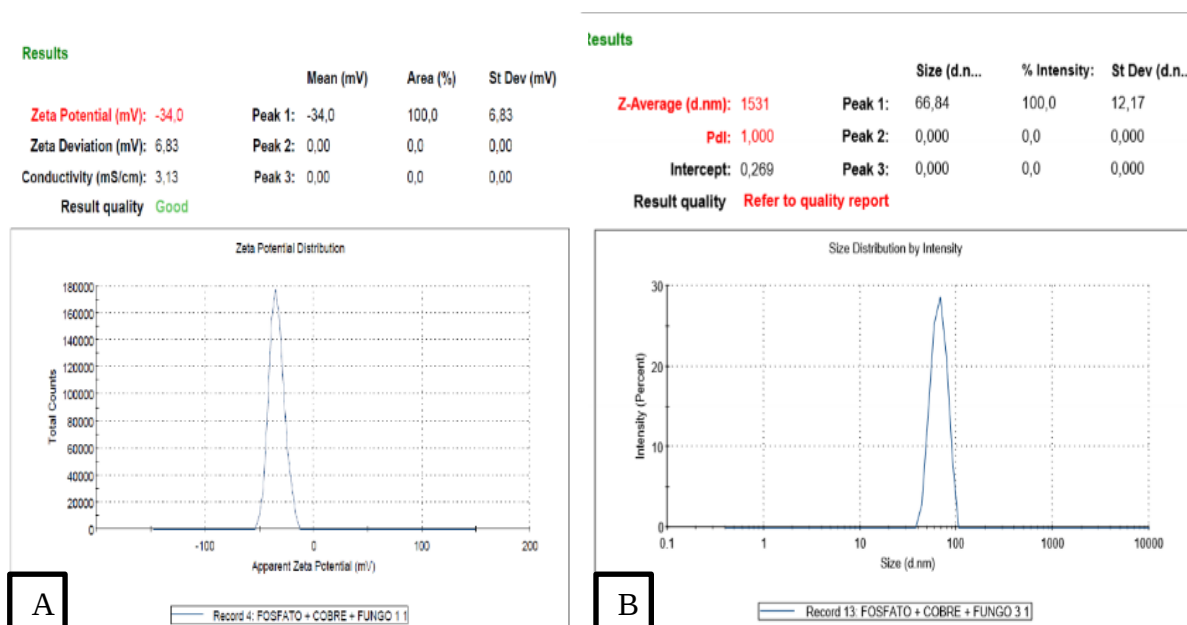


O melhor resultado para o tamanho de partícula obtidos a partir dos micélios do fungo *Phaeoacremonium* sp. foi em tampão fosfato (pH 5), Experimento B. A distribuição média de tamanho determinada pelas análises de DLS foi de 66.84 nm (**Figura 3**), um excelente resultado quando comparado ao tamanho de partícula de NpCu produzidas nas demais condições deste estudo (**Figura 2 A**). Já o potencial zeta das NpCu (Experimento B) foi determinado como -35 mV (**Figura 2 B**), revelando que as superfícies das NpCu estavam carregadas negativamente, indicando baixa aglomeração. Geralmente nanopartículas metálicas que apresentam potenciais zeta maiores que + 20 mV e menores que -20 mV

são consideradas de alta estabilidade, pois a alta carga dificulta a aglomeração entre as partículas (Vijayanandan and Balakrishnan 2018).

As proteínas extracelulares presentes no filtrado fúngico juntamente com o fosfato são responsáveis pela redução de íons de cobre, Cu^+ em nanopartículas de nitrato de cobre, Cu^0 (Siddiqi et al., 2018). Estas proteínas têm forte capacidade de se ligar as CuNPs, atuando como agentes capeadores, proporcionaram a estabilidade (Reverberi et al., 2016).

Figura 3: Análise de zetasizer, mostrando (A) potencial zeta; (B) tamanho de nanopartículas de nitrato de cobre apartir do agente fosfato



Para todos os agentes testados, o fungo filamentoso *Phaeoacremonium* sp. isolado das amêndoas de *Bertholetia excelsa*, foi capaz de produzir NpCu em tamanhos <200 nm.

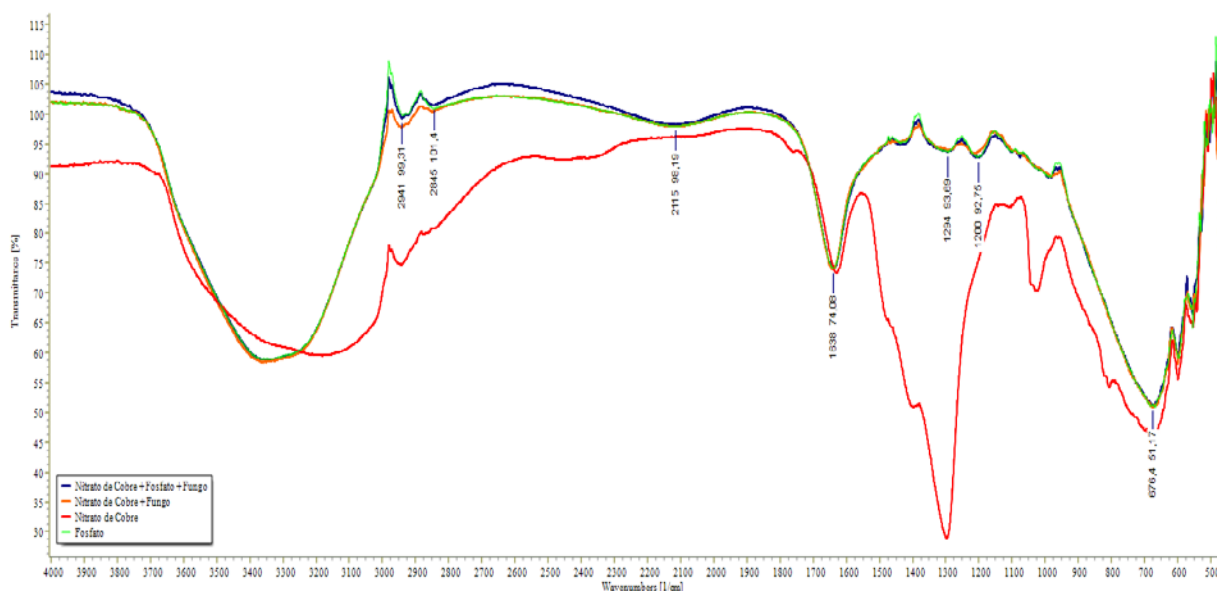
3.2 Caracterização por infravermelho com agente redutor Fosfato

As amostras foram caracterizadas por espectroscopia no infravermelho com transformador Fourier, para saber as possíveis interações entre o fosfato e CuNPs

sintetizado por *Phaeoacremonium* sp. (**Figura 4**), comprando os grupos funcionais presentes nas amostras.

Observa-se uma banda vibracional típica do estiramento de OH em aproximadamente 3350 cm^{-1} , indicando a presença de grupos hidroxila. O espectro de infravermelho apresentado na região de 1294 cm^{-1} mostra um estiramento P=O (Denny et al., 2018). O pico a $1638,74\text{ cm}^{-1}$ é o modo de flexão de Grupo hidroxila. O pico em 676.4 cm^{-1} representa o pico de absorção das nanopartículas de Cu (Hassanie et al., 2018). As proteínas extracelulares presentes no filtrado fúngico juntamente com o fosfato são responsáveis pela redução de íons de cobre, Cu^+ em nanopartículas de nitrato de cobre, Cu^0 (Jia et al., 2012). Estas proteínas têm forte capacidade de se ligar as CuNPs, atuando como agentes capeadores, proporcionaram a estabilidade (Duan et al., 2015). Ressaltando que as NPs metálicas exibem uma ampla absorção de 550 a 700 nm.

Figura 4: FTIR spectrum of CuNPs, Cu, PO_4^{3-}



3. 3 Efeitos do nitrato de cobre sobre o crescimento e morfologia de *Phaeoacremonium* sp.

Ao analisar o crescimento radial das colônias (**Tabela 1**), nos experimentos com o grupo controle houve um aumento progressivo no diâmetro médio das cepas, com exceção

do último dia de análise. Enquanto que no grupo tratado com nitrato de cobre, observou-se uma inibição perceptível sobre o crescimento do fungo no quarto dia de experimento. A partir do quinto dia, é possível observar que o crescimento médio das colônias foi maior em comparação ao grupo controle. Provavelmente esse crescimento deve-se a resistência do fungo na presença do cobre, sugerindo o fenômeno da bioacumulação de íons metálicos nas células (ANAND et al., 2006).

Tabela 1: médias do crescimento radial em milímetros em função do tempo, em um período de 168h de cultivo

Crescimento radial fúngico (mm)							
Meio de cultura	Dias						
	1	2	3	4	5	6	7
Malte 2%	0.1	0.52	0.80	0.81	0.81	0.85	0.75
Malte 2% + Cobre	0.1	0.18	0.47	0.64	0.85	1.12	1.35

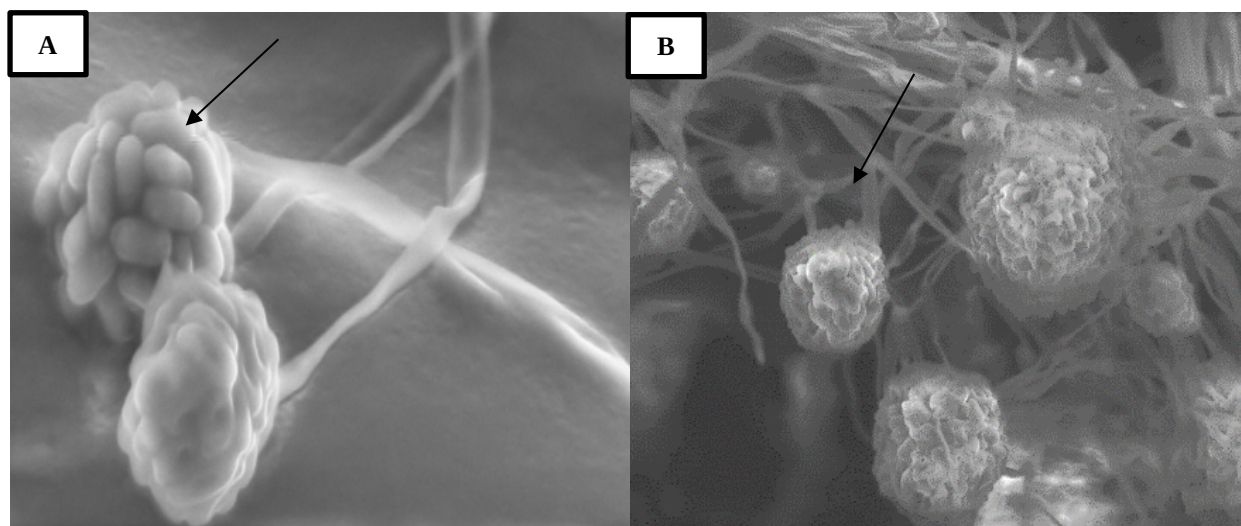
Para o metal pesado cobre, os fungos apresentam mecanismos para o transporte dentro de suas células, utilizando uma série de compostos como ácidos orgânicos simples, álcoois, macromoléculas, polissacarídeos e ácido fúlvico, mucopolissacarídeos e proteínas para sua própria proteção diminuindo os efeitos tóxicos do metal, ligando-o a enzimas específicas (TURPEINEN, 2003). Pode-se citar como exemplo a pesquisa realizada por SILVA et al., 2007, com fungos ectomicorrízicos tolerantes a cobre, quando colocados em meio com adição deles, apresentaram melhor desenvolvimento. Conforme houve aumento da dose do cobre, maior foi seu crescimento vegetativo.

Outro estudo de grande relevância foi realizado por GAAD (2000) relatando que os fungos apresentam grande capacidade de adaptação à presença de metais pesados, sendo este mecanismo explicado por mutações genéticas e adaptações fisiológicas dos fungos em contato com o metal, pois a capacidade de um organismo sobreviver em condições adversas depende da rapidez de suas respostas fisiológicas as condições ambientais.

3. 4 Caracterização morfológica do *Phaeoacremonium* sp. por MEV

A **Figura 5 A** mostra os aspectos morfológicos do fungo *Phaeoacremonium* sp. em MEV na ausência do nitrato de cobre no meio de cultivo malte (2%), sendo possível observar as estruturas normais sem alterações dos conídios onde encontram os conidiosporos e nas células das hifas de onde ramificam-se os conidioforos. Entretanto, na **Figura 5 B**, as características morfológicas mostraram-se alteradas devido a concentração do metal, afetando de forma discreta os conídios e sua estrutura, além de intensa ramificação.

Figura 5: Aspectos morfológicos do fungo *Phaeoacremonium* sp. **A:** Conídios com ausência de nitrato de cobre; **B:** Conídios na presença do metal.



Alananbeh et al., (2017) descreveu explicação para o modo de ação do CuNPs, por depleção do metal, um dos modos de ação de CuNPs que forma buracos irregulares na membrana externa e altera a permeabilidade da membrana, que é causada pela liberação progressiva de moléculas de lipopolissacarídeos e proteínas de membrana (Amro et al., 2000). Embora sua inferência envolva algum tipo de mecanismo de ligação que envolva interação entre nanopartículas de Cu e componente (s) da membrana externa, ainda não está claro, sendo necessario estudos mais aprofundados (Dakal et al., 2016).

Turpeinen (2002) pesquisou os fungos filamentosos e constatou maior resistência deles a metais pesados, o que proporciona seu crescimento e desenvolvimento em meios que contêm altas concentrações desses poluentes e detectou que determinadas proteínas protegem o organismo dos efeitos tóxicos do metal, ligando-o a enzimas específicas, podendo ocorrer o transporte do metal através de gradiente quimiosmótico pela membrana citoplasmática, diminuindo seu potencial tóxico (Fromm & Hargrove, 2011).

Neste estudo, o *Phaeoacremonium* sp. mostrou-se capaz de adapta-se ao meio contendo cobre, mesmo sofrendo alterações morfológicas, seu ciclo de vida não foi afetado (Villamizar-Gallardo et al., 2016). Segundo Gadd and Raven (2010), relataram que metabolicamente, ocorre redução celular para que os gastos energéticos sejam controlados, o que ativa processos direcionados a sobrevivência do fungo em um ambiente com condições diferenciadas, quanto a exposição a metais pesados. O cobre, por exemplo, pode causar alterações estruturais nas hifas, deformações da parede celular, danos na membrana e alterações significativas na forma e germinação de esporos em fungos, dependendo da concentração (Lamsal et al., 2011).

4 CONCLUSÃO

Com os *co-adjuvantes* utilizados para a biossíntese de nanopartículas de cobre mediadas por *Phaeoacremonium* sp. isolado da Amazônia brasileira, todos exibiram faixa de tamanho <200 d.nm, com destaque para o agente redutor Fosfato com tamanho de aproximadamente de 66.84 d.nm, apresentando baixa agregação e boa dispersibilidade.

Os agentes redutores foram usados como capeadores e protetores para a redução de cobre, mostrando-se como alternativa viável, de baixo custo, fácil reprodutibilidade, sem adição de agentes tóxicos, temperaturas brandas, em comparação aos produtos e técnicas prejudiciais ainda utilizadas para obtenção de nanopartículas metálicas.

A caracterização por FTIR constatou a presença de grupos funcionais responsáveis pela oxiredução e estabilidade das nanopartículas metálicas de cobre. A análise morfológica do *Phaeoacremonium* sp. sobre o crescimento em meio sólido na presença do cobre, demonstrou alterações morfológicas perceptíveis nas cepas, destacando também a capacidade de adaptação do fungo, revelando a possibilidade de aplicação do *Phaeoacremonium* sp. como indicativo de poluição ambiental.

5 REFERÊNCIAS

- Amro, N. A., Kotra, L. P., Wadu-Mesthrige, K., Bulychev, A., Mobashery, S; Liu, G. (2000). High-Resolution Atomic Force Microscopy Studies of the *Escherichia coli* Outer Membrane: Structural Basis for Permeability. *Langmuir*, 16(6), 2789–2796. doi:10.1021/la991013x.
- Anand, p., isar, j., saran, s; saxena, r. (2006). Bioaccumulation of copper by *Trichoderma viride*. *Bioresource Technology*, 97 (8), 1018-1025. doi: 10.1016 / j.biortech.2005.04.046.
- Barnet, M.-C. (1998). La femme cent sexes, ou, Les genres communicants : Deharme, Mansour, Prassinos. Bern: Lang.
- Dakal, T. C., Kumar, A., Majumdar, R. S; Yadav, V. (2016). Mechanistic Basis of Antimicrobial Actions of Silver Nanoparticles. *Frontiers in microbiology*, 7, 1831. doi:10.3389/fmicb.2016.01831.
- Dellai, A., Silva, R, F., Andreazza, R. (2018). Ectomycorhyza on the growth of *eucalyptus saligna* in soil contaminated with copper. *Ciência Florestal*, v. 28, n. 2, p. 624-631. doi: DOI: <http://dx.doi.org/10.5902/1980509832052>
- Denny, M. S., Kalaj, M., Bentz, K. C; Cohen, S. M. (2018). Multicomponent metal-organic framework membranes for advanced functional composites. *Chemical Science*. doi:10.1039/c8sc02356e.
- De Waele, J., V. V. Galvita, H. Poelman, C. Detavernier; J. W. Thybaut (2018) PdZn nanoparticle catalyst formation for ethanol dehydrogenation: Active metal impregnation vs incorporation. *Applied Catalysis A: General*, 555, 12-19. doi: 10.1016/j.apcata.2018.02.005
- Duan, H., Wang, D; Li, Y. (2015). Green chemistry for nanoparticle synthesis. *Chemical Society Reviews*, 44(16), 5778–5792. doi:10.1039/c4cs00363b.
- Fromm, H. J; Hargrove, M. S. (2011). Electron Transport and Oxidative Phosphorylation. *Essentials of Biochemistry*, 223–238. doi:10.1007/978-3-642-19624-9_10.
- Gaad, G. M. (2000). Bioremedial potential of microbial mechanism of metal mobilization and immobilization. *Current Opinion in Biotechnology*. v. 11, p.271-279. doi:10.1016/s0958-1669(00)00095-1
- Gadd, G. M; Raven, J. A. (2010). Geomicrobiology of Eukaryotic Microorganisms. *Geomicrobiology Journal*, 27(6-7), 491–519. doi:10.1080/01490451003703006.

Gawande, MB, Goswami, A., Felpin, F.-X., Asefa, T., Huang, X., Silva, R.,... Varma, RS (2016). Nanopartículas à base de Cu e Cu: Síntese e Aplicações em Catálise. *Chemical Reviews*, 116 (6), 3722-3811. doi: 10.1021 / acs.chemrev.5b00482 .

Hassan, S. E. L. D., S. S. Salem, A. Fouda, M. A. Awad, M. S. El-Gamal; A. M. Abdo (2018) New approach for antimicrobial activity and bio-control of various pathogens by biosynthesized copper nanoparticles using endophytic actinomycetes. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 11, 262-270.

Jia, B., Mei, Y., Cheng, L., Zhou, J; Zhang, L. (2012). Preparation of copper nanoparticles coated cellulose films with antibacterial properties through one-step reduction. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 4(6), 2897–2902. doi:10.1021/am3007609.

Jiang, M., L. Kou, L. Zhang, G. Li, Q. Yao, L. Shang; Y. Chen (2018) Ascorbate-conjugated nanoparticles for promoted oral delivery of therapeutic drugs via sodium-dependent vitamin C transporter 1 (SVCT1) AU - Luo, Qihua. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 46, 198-208.

Kamnev, A. A., Tugarova, A. V., Dyatlova, Y. A., Tarantilis, P. A., Grigoryeva, O. P., Fainleib, A. M; DE Luca, S. Methodological effects in Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy: Implications for structural analyses of biomacromolecular samples. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 193, 558-564, 2018.

Kelly, T. J., I. T. Lawson, K. H. Roucoux, T. R. Baker, T. D. Jones; N. K. Sanderson (2017) The vegetation history of an Amazonian domed peatland. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 468, 129-141.doi:10.1016/j.palaeo.2016.11.039.

Kusari, S., S. P. Pandey; M. Spiteller (2013) Untapped mutualistic paradigms linking host plant and endophytic fungal production of similar bioactive secondary metabolites. *Phytochemistry*, 91, 81-87.doi:10.1016/j.phytochem.2012.07.021.

Li, F., H. Weng, Y. Shang, Z. Ding, Z. Yang, S. Cheng; M. Lin (2017) Environmentally friendly and facile synthesis of Rh nanoparticles at room temperature by alkaline ethanol solution and their application for ethanol electrooxidation. *RSC Advances*, 7, 3161-3169.

Lamsal, K., Kim, S. W., Jung, J. H., Kim, Y. S., Kim, K. S; Lee, Y. S. (2011). Application of Silver Nanoparticles for the Control of Colletotrichum Species In Vitro and Pepper Anthracnose Disease in Field. *Mycobiology*, 39(3), 194–199.doi:10.5941/myco.2011.39.3.194.

Nagar, N; V. Devra (2018) Green synthesis and characterization of copper nanoparticles using Azadirachta indica leaves. *Materials Chemistry and Physics*, 213, 44-51.doi:10.1016/j.matchemphys.2018.04.007.

Nanda, A., B. K. Nayak; M. Krishnamoorthy (2018) Antimicrobial properties of biogenic silver nanoparticles synthesized from phylloplane fungus, Aspergillus tamarii. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 16, 225-228.doi:10.1016/j.bcab.2018.08.002

Nayak, B. K., A. Nanda; V. Prabhakar (2018) Biogenic synthesis of silver nanoparticle from wasp nest soil fungus, Penicillium italicum and its analysis against multi drug resistance pathogens. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 16, 412-418.doi: 10.1016/j.bcab.2018.09.014.

Neethu, S., S. J. Midhun, E. K. Radhakrishnan; M. Jyothis (2018) Green synthesized silver nanoparticles by marine endophytic fungus *Penicillium polonicum* and its antibacterial efficacy against biofilm forming, multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Microbial Pathogenesis*, 116, 263-272. doi:10.1016/j.micpath.2018.01.033.

Reverberi, A., Salerno, M., Lauciello, S. e Fabiano, B. (2016). Síntese de Nanopartículas de Cobre em Etilenoglicol por Redução Química com Sais de Vanádio (+2). *Materiais*, 9 (10), 809. doi: 10.3390 / ma9100809.

Schrewe, M., M. K. Julsing, B. Bühler; A. Schmid (2013) Whole-cell biocatalysis for selective and productive C–O functional group introduction and modification. *Chemical Society Reviews*, 42, 6346-6377. doi:10.1039/c3cs60011d.

Seetharaman, P. K., R. Chandrasekaran, S. Gnanasekar, G. Chandrakasan, M. Gupta, D. B. Manikandan; S. Sivaperumal (2018) Antimicrobial and larvicidal activity of eco-friendly silver nanoparticles synthesized from endophytic fungi *Phomopsis liquidambaris*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 16, 22-30. doi:10.1016/j.bcab.2018.07.006.

Siddiqi, K. S., Husen, A; Rao, R. A. K. (2018). A review on biosynthesis of silver nanoparticles and their biocidal properties. *Journal of Nanobiotechnology*, 16(1).doi:10.1186/s12951-018-0334-5

Turpeinen, R.; Virta, M.; Häggblom, M.M. Analysis of arsenic bioavailability in contaminated soils. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v.22, n.1, p.1-6, 2003. doi: 10.1002/etc.5620220101 .

Turpein, R. 2002. Interaction between metals, microbes and plants - Bioremediation of arsenic and lead contaminated soils, PhD, University of Helsinki, Helsinki, Finland.

Vijayanandan, A. S; R. M. Balakrishnan (2018) Biosynthesis of cobalt oxide nanoparticles using endophytic fungus *Aspergillus nidulans*. *Journal of Environmental Management*, 218, 442-450. doi: 10.1016/j.jenvman.2018.04.032.

Villamizar-Gallardo, R., Cruz, J. F. O; Ortiz-Rodriguez, O. O. (2016). *Fungicidal effect of silver nanoparticles on toxigenic fungi in cocoa*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 51(12), 1929–1936. doi:10.1590/s0100-204x2016001200003.

Visagie, C. M., J. Houbraken, J. C. Frisvad, S. B. Hong, C. H. W. Klaassen, G. Perrone, K. A. Seifert, J. Varga, T. Yaguchi; R. A. Samson (2014) Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in Mycology*, 78, 343-371. doi: 10.1016/j.simyco.2014.09.001.

Yang, G., P. Li, L. Meng, K. Xv, F. Dong, Y. Qiu, L. He; L. Lin (2018) Diversity and communities of culturable endophytic fungi from different tree peonies (geophytes and non-geophytes), and their biosynthetic potential analysis. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49, 47-58. doi: 10.1016/j.bjm.2018.06.006.

Yoshida, H., G. Sakai, K. Mori, K. Kojima, S. Kamitori; K. Sode (2015) Structural analysis of fungus-derived FAD glucose dehydrogenase. *Scientific Reports*, 5, 13498. doi: 10.1038/srep13498.

Diante dos resultados obtidos:

- Este trabalho foi pioneiro na descrição do uso de fungos endofíticos isolados de *Bertholletia excelsa* na obtenção de nanopartículas metálicas de Prata e Cobre.
- O fungo filamentoso *Phaeoacremonium* sp. (Biorg 15) foi capaz de produzir AgNPs com um tamanho de até 44,06 nm. A melhor condição para a formação de AgNP a partir dos micélios de *Phaeoacremonium* sp. (BIORG 15) foi 0,1 nmol de AgNO₃.
- A caracterização por FTIR verificou a interação entre cofatores contidos em *Phaeoacremonium* sp. e nanopartículas de nitrato de prata. Houve grupos funcionais preparados via biorredução, e a estabilidade das nanopartículas metálicas confirma que a redutase do nitrato está envolvida na biotransformação de íons de prata em nanopartículas.
- A atividade antibacteriana das AgNPs confirmou sua eficácia como biocida. As Nanopartículas obtidas a partir da concentração de 10 mmol de AgNO₃ mostraram atividade contra todas as cepas bacterianas. Finalmente, o estudo sobre a ecotoxicidade das AgNPs contra *C. vulgaris* mostraram alta toxicidade para todas as amostras testadas, com destaque para a amostra de 10 mmol que apresentou maior toxicidade. Isso demonstra que as AgNPs inibem o crescimento de algas no segundo dia do experimento; houve mortalidade completa no 5 dia. Essa avaliação ressalta a toxicidade das AgNPs para este ambiente. Esses materiais também são poluentes e podem levar à deposição direta ou indireta de produtos químicos no meio ambiente.
- Para as nanopartículas de cobre biossintetizadas com diferentes co-adjuvantes mediadas por *Phaeoacremonium* sp. (BIORG15), isolado da Amazônia brasileira, todos exibiram faixa de tamanho ≤ 200 d.nm, com destaque para o agente redutor fosfato (solução aquosa de Fosfato de Sódio Monobásico P.A + Fosfato de Sódio

Dibásico Anidro P.A, Ph 5.0) com tamanho de aproximadamente de 66.84 d.nm, apresentando baixa agregação e boa dispersibilidade.

- Os agentes redutores foram usados como capeadores e protetores para a redução de cobre, mostrando-se como alternativa viável, de baixo custo, fácil reprodutibilidade, sem adição de agentes tóxicos, temperaturas brandas, em comparação aos produtos e técnicas prejudiciais ainda utilizadas para obtenção de nanopartículas metálicas.
- A caracterização por FTIR constatou a presença de grupos funcionais responsáveis pela oxiredução e estabilidade das nanopartículas metálicas de cobre.
- A análise morfológica do *Phaeoacremonium* sp. (BIORG 15) sobre o crescimento em meio sólido na presença do cobre, demonstrou alterações morfológicas perceptíveis nas cepas, destacando também a capacidade de adaptação do fungo, revelando a possibilidade de aplicação do *Phaeoacremonium* sp. como indicativo de poluição ambiental.

ABNT - Associação Brasileira de Normas técnicas. Ecotoxicologia aquática -Toxicidade aguda -Método de ensaio com *Daphnia spp.* (Crustacea, Cladocera,). Rio de Janeiro: **ABNT**, 2009. (NBR – 12713).

ALMEIDA, A. S. F. D. Síntese de nanopartículas de prata por fungos endofíticos isolados de guaranazeiro e seu efeito contra fitopatógenos. Tese (Doutorado em Agronomia Tropical) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2019.

ANANTH, A., DHARANEEDHARAN, S., HEO, M.-S., & MOK, Y. S. Copper oxide nanomaterials: Synthesis, characterization and structure-specific antibacterial performance. **Chemical Engineering Journal**, 262, 179 188.doi:10.1016/j.cej.2014.09.083, 2015.

ARAÚJO, P. H. F., BARATA, P. H. DA S., ARAÚJO, I. F., CURTI, J. M., AMARAL, R. R., BERAU, D. FERREIRA, I. M. Direct and Solvent-Free Aminolysis of Triglyceride from *Oenocarpus bataua* (Patawa) Oil Catalyzed by Al₂O₃. **Catalysis Letters**, 148(3), 843–851. Doi:10.1007/s10562-018-2306-7, 2018.

AZAM, A.; AHMED, A.S.; OVES, M.; KHAN, M.; MEMIC, A. Size-dependent antimicrobial properties of CuO nanoparticles against Gram-positive and-negative bacterial strains. **Int. J. Nanomed.**, v. 7, 2012.

AZEVEDO, M. M., CARVALHO, A., PASCOAL, C., CÁSSIO, F. Responses of antioxidant defenses to Cu and Zn stress in two aquatic fungi. **Science of the total environment**, 377(2), 233-243. 2007.

BERTÉ, R. Síntese e caracterização de nanoparticulas de prata conjugadas com peptídeos antimicrobianos. **Dissertação** (Mestrado – Programa de Pós-graduação em Física Aplica), Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2013.

BAINBRIDGE, W. S., & ROCO, M. C. Science and technology convergence: with emphasis for nanotechnology-inspired convergence. **Journal of Nanoparticle Research**, 18(7). Doi:10.1007/s11051-016-3520-0, 2016.

BAPTISTA, P. V., MCCUSKER, M. P., CARVALHO, A., FERREIRA, D. A., MOHAN, N. M., MARTINS, M., & FERNANDES, A. R. Nano-Strategies to Fight Multidrug Resistant Bacteria—“A Battle of the Titans. ” **Frontiers in Microbiology**, 9.doi:10.3389/fmicb.2018.01441, 2018.

BERRIDGE, MICHAEL & HERST, PATRIES & TAN, AN. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. **Biotechnology annual review**. 11. 127-52. 10.1016/S1387-2656(05)11004-7, 2005.

- BOHOLM, M. (2016). *The use and meaning of nano in American English: Towards a systematic description*. **Ampersand**, 3, 163–173.doi:10.1016/j. amper.2016.10.001, 2016.
- BOROUMAND MOGHADDAM, A., NAMVAR, F., MONIRI, M., MD. TAHIR, P., AZIZI, S., & MOHAMAD, R. Nanoparticles Biosynthesized by Fungi and Yeast: A Review of Their Preparation, Properties, and Medical Applications. **Molecules**, 20(9), 16540–16565.doi:10.3390/molecules200916540, 2015.
- BORGSCHULTE, A., SAMBALOVA, O., DELMELLE, R., JENATSCH, S., HANY, R., & NÜESCH, F. Hydrogen reduction of molybdenum oxide at room temperature. **Scientific Reports**, 7(1). Doi:10.1038/srep40761, 2017.
- BOUSSET, L., ERMEL, M., SOGLONOU, B. E HUSSON, O. A method to measure redox potential (Eh) and pH in agar media and plants shows that fungal growth is affected by and affects pH and Eh . **Biologia Fúngica**. 2018.
- BOWMAN, S.M.; FREE, J.F. The structure and synthesis of the fungal cell-wall. **BioEssays**, v. 28, p. 799-808, 2011.
- BRANDELLI, A., RITTER, A. C., & VERAS, F. F. Antimicrobial Activities of Metal Nanoparticles. In Metal Nanoparticles in Pharma (pp. 337-363). **Springer, Cham**.2017.
- CARRERA, C. M.; PEREIRA, C. A.; BOMBANA, A. C.; JORGE, A. O. C. Eficácia antimicrobiana das nanopartículas de prata sobre esporos, leveduras e bactérias. **Anais do XIII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e IX Encontro Latino Americano de Pós-Graduação – Universidade do Vale da Paraíba**. 1-6p, 2009.
- CASTRO-LONGORIA, E., VILCHIS-NESTOR, A. R; AVALOS-BORJA, M. Biosynthesis of silver, gold and bimetallic nanoparticles using the filamentous fungus *Neurospora crassa*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 83, p. 42-48, 2011.
- CAVALCANTE, B. N. Atividade antibacteriana e antifúngica de nanopartículas de prata produzidas por *Curvularia inaequalis* (Shear) Boedijn. **Dissertação** (Mestrado em Recursos Naturais do Semiárido) - Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus Centro, Petrolina - PE, 2014.
- CELESTINO, J. R.; LORETTA, E. C.; LIMA, M. P.; LIMA, A. M.; OGUSKU, M. M.; SOUZA, J. V. B. Bioprospecting of Amazon soil fungi with the potential for pigment production, **Process Biochemistry**, Volume 49, Issue 4, 2014.
- CHAN, S. Y; DON, M. M.; Biosynthesis and structural characterization of Ag nanoparticles from white rot fungi. **Materials Science and Engineering: C**, v. 33, n. 1, p. 282-288, 2013.
- CHEN, N., ZHENG, Y., YIN, J., LI, X., & ZHENG, C. Inhibitory effects of silver nanoparticles against adenovirus type 3 in vitro. **Journal of Virological Methods**, 193(2), 470–477.doi:10.1016/j. jviromet.2013.07.020, 2013.

CHIBUIKE, G. U., & Obiora, S. C. (2014). *Heavy Metal Polluted Soils: Effect on Plants and Bioremediation Methods*. **Applied and Environmental Soil Science**, 2014, 1–12. doi:10.1155/2014/752708, 2014.

CORABI-ADELL, C. LUCON; C. M. M & KOIKE, C.M. Biodiversidade do gênero *Trichoderma* no estado de São Paulo – aspectos enzimáticos e potenciais biocontrolador. **Arquivos do Instituto Biológico** 69: 158 - 191, 2002.

CUILLEL, M. The dual personality of ionic copper in biology. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry** 65, 165e170, 2009.

DA COSTA, A. L. P., DO NASCIMENTO, J. F., & DA SILVA JÚNIOR, A. C. S. Perfil de resistência de *Staphylococcus aureus* isolados de pescada amarela (*Cynoscion acoupa*) comercializada em feira pública. **PubVet**, 12, 172, 2018.

DAS, R. K., PACHAPUR, V. L., LONAPPAN, L., NAGHDI, M., PULICHARLA, R., MAITI, S., BRAR, S. K. Biological synthesis of metallic nanoparticles: plants, animals and microbial aspects. **Nanotechnology for Environmental Engineering**, 2(1). Doi:10.1007/s41204-017-0029-4, 2017.

DE KANTER, M., MEYER-KIRSCHNER, J., VIELL, J., MITSOS, A., KATHER, M., PICH, A., & JANZEN, C. Enabling the measurement of particle sizes in stirred colloidal suspensions by embedding dynamic light scattering into an automated probe head. **Measurement**, 80, 92–98. doi:10.1016/j. measurement.2015.11.024, 2016.

DEPNER, R. F. R., DEPNER, R. A., LUCCA, V., & LOVATO, M. O cobre como superfície de contato antimicrobiana e sua potencial aplicação na medicina veterinária. **Veterinária e Zootecnia**, v. 22(4), p. 532-543, 2015.

DIN, F. UD, AMAN, W., ULLAH, I., QURESHI, O. S., MUSTAPHA, O., SHAFIQUE, S., & ZEB, A. Effective use of nanocarriers as drug delivery systems for the treatment of selected tumors. **International Journal of Nanomedicine**, Volume 12, 7291–7309. Doi:10.2147/ijn. S146315, 2017.

DIZAJ, S. M., LOTFIPOUR, F., BARZEGAR-JALALI, M.; Antimicrobial activity of the metals and metal oxide nanoparticles. **Materials Science and Engineering: C**, v. 44, p. 278-284, 2014.

DOUTRE, G., PHILIPPE, N., ABERGEL, C., & CLAVERIE, J.-M. Genome Analysis of the First Marseilleviridae Representative from Australia Indicates that Most of Its Genes Contribute to Virus Fitness. **Journal of Virology**, 88(24), 14340–14349. doi:10.1128/jvi.02414-14, 2014.

DUTTA, D., PUZARI, K. C., GOGOI, R., & DUTTA, P. Endophytes: exploitation as a tool in plant protection. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 57(5), 621–629. Doi:10.1590/s1516-8913201402043, 2014.

FERNÁNDEZ, J. G., FERNANDEZ-BALDO, M. A., BERNI, E.; Production of silver nanoparticles using yeasts and evaluation of their antifungal activity against phytopathogenic fungi. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 9, p. 1306-1313, 2016.

- FRACETTO, G. G. M., AZEVEDO, L. C. B., FRACETTO, F. J. C., ANDREOTE, F. D., LAMBAIS, M. R., & PFENNING, L. H. *Impact of Amazon land use on the community of soil fungi*. **Scientia Agricola**, 70(2), 59–67.doi:10.1590/s0103-90162013000200001, 2013.
- GALAN, C. R., SILVA, M. F., NISHI, L., BERGAMASCO, R., & VIEIRA, M. Síntese verde de nanopartículas de cobre impregnadas em carvão ativado para remoção de nitrato da água. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, 2(1), 811-817, 2015.
- GEONMONOND, R. S., SILVA, A. G. M. D., & CAMARGO, P. H. C. Controlled synthesis of noble metal nanomaterials: motivation, principles, and opportunities in nanocatalysis. **Anais Da Academia Brasileira de Ciências**, 90(1 suppl 1), 719–744.doi:10.1590/0001-3765201820170561, 2018.
- GILBERTSON, L.M.; ALBALGHITI, E.M.; FISHMAN, Z.S.; PERREAULT, F.; CORREDOR, C.; POSNER, J.D.; ELIMELECH, M.; PFEFFERLE, L.D.; ZIMMERMAN, J.B. Shape-dependent surface reactivity and antimicrobial activity of nano-cupric oxide. **Environ. Sci. Technol.**, 50, 3975–3984. 2016.
- GILSON, S; GLENNERSTER, A. High fidelity immersive virtual reality. In: **Virtual reality-human computer interaction**. IntechOpen, 2012.
- GOUDA, S., DAS, G., SEN, S. K., SHIN, H.-S., & PATRA, J. K. Endophytes: A Treasure House of Bioactive Compounds of Medicinal Importance. **Frontiers in Microbiology**, 7. Doi:10.3389/fmicb.2016.01538, 2016.
- GRASS, G., RENSING C, SOLIOZ M. Metallic copper as an antimicrobial surface. **Appl Environ Microbiol**. 77(5): 1541-7. 2011.
- HEMATH, N.K.S.; KUMAR, G.; KARTHIK, L.; BHASKARA, R.K.V. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the filamentous fungus *Penicillium* sp. **Archives of Applied Science Research**, v. 2, p. 161-167, 2010.
- KHARE, E., MISHRA, J., & ARORA, N. K. Multifaceted Interactions Between Endophytes and Plant: Developments and Prospects. **Frontiers in Microbiology**, 9. Doi:10.3389/fmicb.2018.02732, 2018.
- KISCHKEL, B., YAMANAKA, A. H. U., DEPIERI, N. B., & NEGRI, M. Nanopartículas de prata biossintetizadas por *Mikania glomerata* Sprengel inibem o crescimento de *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus*. **Ciências da Saúde**, 25(3), 46-52, 2018.
- KRINGS M, TAYLOR TN, HASS H, KERP H, DOTZLER N, HERMSEN EJ. Fungal endophytes in a 400-million-yr-old land plant: infection pathways, spatial distribution, and host responses. **New Phytol**. 174: 648-657, 2007.
- KRISHNA, G., VADAPALLY, P., CHARYA, M. A. S. Biogenic synthesis of silver nanoparticles from white rot fungi: Their characterization and antibacterial studies. **OpenNano**, 2017.
- HSUEH, Y. H., TSAI, P. H., LIN, K. S.; PH-Dependent Antimicrobial Properties of Copper Oxide Nanoparticles in *Staphylococcus aureus*. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 4, p. 793, 2017.

- HUSSAIN, I., SINGH, N. B., SINGH, A., SINGH, H., & SINGH, S. C. Green synthesis of nanoparticles and its potential application. **Biotechnology letters**, 38(4), 545-560, 2016.
- JAYANT, R. D., TIWARI, S., ATLURI, V., KAUSHIK, A., TOMITAKA, A., YNDART, A., NAIR, M. Multifunctional Nanotherapeutics for the Treatment of neuroAIDS in Drug Abusers. **Scientific Reports**, 8(1). Doi:10.1038/s41598-018-31285-w, 2018.
- KHAN, I., SAEED, K., & KHAN, I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. **Arabian Journal of Chemistry**.doi: 10.1016/j.arabjc.2017.05.011, 2017.
- KATAS, H., MODEN, N. Z., LIM, C. S., CELESISTINUS, T., CHAN, J. Y., GANASAN, P., & SULEMAN ISMAIL ABDALLA, S. Biosynthesis and Potential Applications of Silver and Gold Nanoparticles and Their Chitosan-Based Nanocomposites in Nanomedicine. **Journal of Nanotechnology**, 2018, 1–13. doi:10.1155/2018/4290705, 2018.
- KLASEN, H. J. A historical review of the use of silver in the treatment of burns. II. Renewed interest for silver. **Burns**, v. 26, n. 2, p. 131-138, 2000.
- KOBAYASHI, Y.; YASUDA, Y.; MORITA, T. Recent advances in the synthesis of copper-based nanoparticles for metal-metal bonding processes. **Journal of Science: Advanced Materials and Devices**, 2016.
- LARA, H. H.; AYALA-NUNEZ, N. V.; TURRENT, L. C. I.; PADILLA, C. R. Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria. **World journal of microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 615-21, 2010.
- MAIA, L. C., CARVALHO JÚNIOR, A. A. D., CAVALCANTI, L. D. H., GUGLIOTTA, A. D. M., DRECHSLER-SANTOS, E. R., SANTIAGO, A. L. D. A., & SOARES, A. M. D. S. Diversity of Brazilian fungi. **Rodriguésia**, 66(4), 1033-1045, 2015.
- MANIVASAGAN, P., NAM, S. Y., & OH, J. Marine microorganisms as potential biofactories for synthesis of metallic nanoparticles. **Critical Reviews in Microbiology**, 42(6), 1007–1019. doi:10.3109/1040841x.2015.1137860, 2016.
- MALIK, T., CHAUHAN, G., RATH, G., MURTHY, R. S. R., & GOYAL, A. K. “Fusion and binding inhibition” key target for HIV-1 treatment and pre-exposure prophylaxis: targets, drug delivery and nanotechnology approaches. **Drug Delivery**, 24(1), 608–621. doi:10.1080/10717544.2016.1228717, 2017.
- MARINS, J. F. DE, & CARRENHO, R. Arbuscular mycorrhizal fungi and dark septate fungi in plants associated with aquatic environments. **Acta Botanica Brasilica**, 31(2), 295–308. Doi:10.1590/0102-33062016abb0296, 2017.
- MARTINS, M. A. Os Nanomateriais e a Descoberta de Novos Mundos na Bancada dos Químicos. **Química Nova**, v. 35, n. 7, p. 1434 – 1446 2016.
- MCBRIDE, E. L., RAO, A., ZHANG, G., HOYNE, J. D., CALCO, G. N., KUO, B. C., ... & SOUSA, A. A. Comparison of 3D cellular imaging techniques based on scanned electron probes: Serial block face SEM vs. Axial bright-field STEM tomography. **Journal of structural biology**, 2018.

MCNEISH, R. E., & MCEWAN, R. W. A review on the invasion ecology of Amur honeysuckle (*Lonicera maackii*, Caprifoliaceae) a case study of ecological impacts at multiple scales. **The Journal of the Torrey Botanical Society**, 143(4), 367–385. Doi:10.3159/torrey-d-15-00049.1, 2016.

MENON, S., RAJESHKUMAR, S., KUMAR, V. S.; A review on biogenic synthesis of gold nanoparticles, characterization, and its applications. **Resource-Efficient Technologies**, 2017.

MICHAEL, C. A., Franks, A. E., & Labbate, M. The antimicrobial resistance crisis: management through gene monitoring. **Open Biology**, 6(11), 160236. Doi:10.1098/rsob.160236, 2016.

MOSES, V. Biological Synthesis of Copper Nanoparticles and its impact -a Review, *Int. J. Pharm. Sci. Invent.* ISSN (Online. 2319–6718. www.ijpsi.org, 2014.

MUKHERJI, S., BHARTI, S., SHUKLA, G. Síntese e caracterização de nanopartículas de prata controladas por tamanho e forma. **Physical Sciences Review**, 4 (1), pp. Doi: 10.1515 / psr-2017-0082, 2018.

MÜLLER, T., SAKIN, V., & MÜLLER, B. A. Spotlight on Viruses—Application of Click Chemistry to Visualize Virus-Cell Interactions. **Molecules**, 24(3), 481. doi:10.3390/molecules24030481, 2019.

MÜLLER, K., BUGNICOURT, E., LATORRE, M., JORDA, M., ECHEGOYEN SANZ, Y., LAGARON, J., SCHMID, M. Review on the Processing and Properties of Polymer Nanocomposites and Nanocoatings and Their Applications in the Packaging, Automotive and Solar Energy Fields. **Nanomaterials**, 7(4), 74. Doi:10.3390/nano7040074, 2017.

MUKHERJEE, B., DEY, N. S., MAJI, R., BHOWMIK, P., DAS, P. J., & PAUL, P. Current Status and Future Scope for Nanomaterials in Drug Delivery. **Application of Nanotechnology in Drug Delivery**. doi:10.5772/58450, 2014.

NARAYANAN, K. B., SAKTHIVEL, N., Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes. **Adv. Colloid Interface Sci.** 156, 1-13. 2010.

NICOLSON, G. L., & ASH, M. E. Membrane Lipid Replacement for chronic illnesses, aging and cancer using oral glycerolphospholipid formulations with fructooligosaccharides to restore phospholipid function in cellular membranes, organelles, cells and tissues. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, 1859(9), 1704–1724. doi:10.1016/j. bbamem.2017.04.013, 2017.

HULKOTI, N. L., TARANATH, T. C.; Biosynthesis of nanoparticles using microbes—a review. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 121, p. 474-483, 2014.

NISKA, C., ZIELINSKA, E., RADOMSKI, M. W.; Metal nanoparticles in dermatology and cosmetology: Interactions with human skin cells. **Chemico-Biological Interactions**, 2017.

PATIL, M.P E KIM, G.D. Microorganismos marinhos para síntese de nanopartículas metálicas e suas aplicações biomédicas. **Colóides e Superfícies B: Biointerfaces**. Doi: 10.1016 / j. colsurfb.2018.09.007, 2018.

- PANTIDOS, N., & HORSFALL, L. E. Biological synthesis of metallic nanoparticles by bacteria, fungi and plants. **Journal of Nanomedicine & Nanotechnology**, 2014.
- PARBOOSING, R.; MAGUIRE, G. E. M.; GOVENDER, P.; KRUGER, H. G. Nanotechnology and the Treatment of HIV Infection. **Viruses**, v. 4, n. 4, p. 488- 520, 2012.
- PINHEIRO, E.A.A.; PINA, J.R.S.; FEITOSA, A.O.; CARVALHO, J.M.; BORGES, F.C.; MARINHO, P.S.B E MARINHO, A.M.R. Bioprospecção da atividade antimicrobiana de extratos de fungos endofíticos de *Bauhinia guianensis*. **Revista Argentina de Microbiología**, 49 (1), 3–6. Doi: 10.1016 / j.ram.2016.08.005, 2017.
- PIROTA, R. D. P. B., TONELOTTO, M., DA SILVA DELABONA, P., TREMACOLDI, C. R., & FARINAS, C. S. Caracterização de fungos isolados da região Amazônica quanto ao potencial para produção das enzimas envolvidas na conversão da biomassa vegetal. **Ciência Rural**, 45(9), 1606-1612. 2015.
- POURI, S., MOTAMEDI, H., HONARY, S., & KAZEMINEZHAD, I. Biological Synthesis of Selenium Nanoparticles and Evaluation of their Bioavailability. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 60(0). Doi:10.1590/1678-4324-2017160452, 2018.
- RAJESHKUMAR, S., & RINITHA, G. Nanostructural characterization of antimicrobial and antioxidant copper nanoparticles synthesized using novel *Persea Americana* seeds. **OpenNano**, 3, 18-27, 2018.
- RAJAMANIKYAM, MAHESHWARI & VADLAPUDI, VARAHALARAO & AMANCHY, RAMARS & MURTY UPADHYAYULA, SURYANARAYANA. Endophytic Fungi as Novel Resources of natural Therapeutics. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. 60. 10.1590/1678-4324-2017160542, 2017.
- RANI, R.; SHARMA, D.; CHATURVEDI, M.; JP, YADAV. Green Synthesis, Characterization and Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles of Endophytic Fungi *Aspergillus terreus*. **Journal of Nanomedicine & Nanotechnology**, v. 8, n. 4, 2017.
- RIFAI, R.W. A revision of the genus *Trichoderma*. **C.M.I. - Mycological Papers**, v.116, p.1-56, 1969.
- REN, G., HU, D., CHENG, E. W., VARGAS-REUS, M. A., REIP, P., & ALLAKER, R. P. Characterisation of copper oxide nanoparticles for antimicrobial applications. **International journal of antimicrobial agents**, 33(6), 587-590. 2009.
- RODRÍGUEZ, J. A.; FERNÁNDEZ-GARCIA, M. Synthesis, properties, and applications of oxide nanomaterials. **New Jersey: John Wiley and Sons**, 2007.
- ROSENBLUM, D., JOSHI, N., TAO, W., KARP, J. M., & PEER, D. Progress and challenges towards targeted delivery of cancer therapeutics. **Nature Communications**, 9(1). Doi:10.1038/s41467-018-03705-y, 2018.
- ROY, U., DING, H., PILAKKA KANTHIKEEL, S., RAYMOND, A., ATLURI, V., YNDART-ARIAS, A., NAIR, M. Preparation and characterization of anti-HIV nanodrug targeted to microfold cell of gut-associated *lymphoid tissue*. **International Journal of Nanomedicine**, 5819.doi:10.2147/ijn. S 68348, 2015.

- SAITO, G., HOSOKAI, S., TSUBOTA, M., & AKIYAMA, T. Synthesis of copper/copper oxide nanoparticles by solution plasma. **Journal of applied physics**, Japão, p. 1-7. 2011.
- SANTOS, K. O. Nanopartículas de prata e prata-paládio estabilizadas pela polietilenoimina linear funcionalizada: formação, caracterização e aplicações catalíticas. **Tese (Doutorado)**, Florianópolis: Departamento de Química, Universidade Federal De Santa Catarina, 2012.
- SCHWAIGER, J., WANKE, R., ADAM, S., PAWERT, M., HONNEN, W., TRIEBSKORN, R. The use of histopatological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery**, 6: 75-86, 1997.
- SEETHARAMAN, P. K., CHANDRASEKARAN, R., GNANASEKAR, S., CHANDRAKASAN, G., GUPTA, M., MANIKANDAN, D. B., & SIVAPERUMAL, S. Antimicrobial and larvicidal activity of eco-friendly silver nanoparticles synthesized from endophytic fungi *Phomopsis liquidambaris*. **Biocatalysis and agricultural biotechnology**, 16, 22-30, 2018.
- SIRELKHATIM, A.; MAHMUD, S.; SEENI, A.; KAUS, N.H.M.; ANN, L.C.; BAKHORI, S.K.M.; HASAN, H.; MOHAMAD, D. Review on zinc oxide nanoparticles: antibacterial activity and toxicity mechanism. **Nano-Micro Lettes**, v. 7, nº 3, p. 219–242, 2015.
- SESHADRI, S., SARANYA, K., & KOWSHIK, M. Green synthesis of lead sulfide nanoparticles by the lead resistant marine yeast, *Rhodospiridium diobovatum*. **Biotechnology progress**, 27(5), 1464-1469, 2011.
- SHARMA, A., GOYAL, A. K., & RATH, G. Recent advances in metal nanoparticles in cancer therapy. **Journal of drug targeting**, 26(8), 617-632, 2018.
- SHARMA, V. K.; YNGARD, R. A.; LIN, Y. Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. **Advances in Colloid and Interface Science**. Vol. 145. P. 83-96, 2009.
- SHABESTARIAN, H., HOMAYOUNI-TABRIZI, M., SOLTANI, M., NAMVAR, F., AZIZI, S., MOHAMAD, R., & SHABESTARIAN, H. Green Synthesis of Gold Nanoparticles Using Sumac Aqueous Extract and Their Antioxidant Activity. **Materials Research**, 20(1), 264–270. Doi:10.1590/1980-5373-mr-2015-0694, 2016.
- SIDDIQI, K. S., HUSEN, A., & RAO, R. A. K. A review on biosynthesis of silver nanoparticles and their biocidal properties. **Journal of Nanobiotechnology**, 16(1).doi:10.1186/s12951-018-0334-5, 2018.
- SILVA, L. P; BONATTO, C. C; PEREIRA, F. D. E. S; SILVA, L. D; ALBERNAZ, V. L; POLEZ, V. L. Pe.; "Nanotecnologia verde para síntese de nanopartículas metálicas", p. 967-1012. In: **Biotecnologia Aplicada à Agro & Indústria - Vol. 4**. São Paulo: Blucher, 2017.
- SILVA, A. G. M. DA, RODRIGUES, T. S., MACEDO, A., SILVA, R. T. P. DA, & CAMARGO, P. H. C. An undergraduate level experiment on the synthesis of au nanoparticles and their size-dependent optical and catalytic properties. **Química Nova**. Doi:10.5935/0100-4042.20140235, 2014.

- SINGH, P., KIM, Y. J., ZHANG, D., YANG, D. C.; Biological synthesis of nanoparticles from plants and microorganisms. **Trends in biotechnology**, v. 34, n. 7, p. 588-599, 2016.
- SZYCHER, M. Antimicrobial Materials for Medical Devices. **Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology**, 1–32.doi:10.1002/0471238961.koe00009, 2015.
- SONDI, I.; SALOPEK-SONDI, B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. **Journal of Colloid and Interface Science**, p. 177-182, 2004.
- SOTÃO, H. M. O.; CAMPOS, E. L.; COSTA, S. P. S. Micologia Diversidade dos fungos na Amazônia. **Cadernos de Alfabetização Científica** / Waldinete C. do S. O. da Costa. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi, 2004.
- SUDHA, VENKATESAN, GOVINDARAJ, RAMAR, BASKAR, KATHIRVELU, AL-DHABI, NAIF ABDULLAH, & DURAIPANDIYAN, VEERAMUTHU. Biological properties of Endophytic Fungi. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 59, e16150436. <https://dx.doi.org/10.1590/1678-4324-2016150436>, 2016.
- TANG, H., LIU, Y., LUO, D., OGAWA, S., YIN, Y., LI, S., & LIU, X. The kiss/kissr systems are dispensable for zebrafish reproduction: evidence from gene knockout studies. **Endocrinology**, 156(2), 589-599, 2014.
- TAYLOR TN, KRINGS M, KERP H. *Hassella monospora* nov. gen. et sp., a microfungus from the 400 million year old Rhynie chert. **Mycological Research**, 110: 628–632., 2006.
- THAPA, R., BHAGAT, C., SHRESTHA, P., AWAL, S., & DUDHAGARA, P. Enzyme-mediated formulation of stable elliptical silver nanoparticles tested against clinical pathogens and MDR bacteria and development of antimicrobial surgical thread. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, 16(1). Doi:10.1186/s12941-017-0216-y, 2017.
- TRAN, T. H., & NGUYEN, V. T. Copper Oxide Nanomaterials Prepared by Solution Methods, Some Properties, and Potential Applications: A Brief Review. **International Scholarly Research Notices**, 2014, 1–14.doi:10.1155/2014/856592, 2014.
- VIEIRA, D. B., & GAMARRA, L. F. Advances in the use of nanocarriers for cancer diagnosis and treatment. **Einstein** (São Paulo), 14(1), 99–103.doi:10.1590/s1679-45082016rb3475, 2016.
- VIET, P. V., NGUYEN, H. T., CAO, T. M., & HIEU, L. V. Fusarium Antifungal Activities of Copper Nanoparticles Synthesized by a Chemical Reduction Method. **Journal of Nanomaterials**, 2016, 1–7. Doi:10.1155/2016/1957612, 2016.
- YI, G., HONG, S. H., SON, J., YOO, J., PARK, C., CHOI, Y., & KOO, H. Recent advances in nanoparticle carriers for photodynamic therapy. **Quantitative Imaging in Medicine and Surgery**, 8(4), 433–443.doi:10.21037/qims.2018.05.04, 2018.
- YRUELA, I. Copper in plants: acquisition, transport and interactions. **Functional Plant Biology**, 2009.

WAGHMARE, S. R., MULLA, M. N., MARATHE, S. R., & SONAWANE, K. D. Ecofriendly production of silver nanoparticles using *Candida utilis* and its mechanistic action against pathogenic microorganisms. **3 Biotech**, 5(1), 33-38, 2015.

WONG, K. K. Y.; LIU, X. Silver Nanoparticles – The Real “Silver Bullet” in Clinical medicine **Med. Chem. Commun**, v.1, p.125-131, 2010.

ZAHIR, A. A., CHAUHAN, I. S., BAGAVAN, A., KAMARAJ, C., ELANGO, G., SHANKAR, J., & SINGH, N. Green synthesis of silver and titanium dioxide nanoparticles using *Euphorbia prostrata* extract shows shift from apoptosis to G0/G1 arrest followed by necrotic cell death in *Leishmania donovani*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 59(8), 4782-4799, 2015.

ZHU, Q.-L., & XU, Q. Immobilization of Ultrafine Metal Nanoparticles to High-Surface-Area Materials and Their Catalytic Applications. **Chem**, 1(2), 220–245.doi:10.1016/j.chempr.2016.07.005, 2016.

CHEMICAL PHYSICS LETTERS



Frontier research in molecular sciences, materials and biological systems

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

•	Description	p.1
•	Audience	p.1
•	Impact Factor	p.1
•	Abstracting and Indexing	p.2
•	Editorial Board	p.2
•	Guide for Authors	p.4



ISSN: 0009-2614

DESCRIPTION

Chemical Physics Letters has an open access mirror journal, *Chemical Physics Letters: X*, sharing the same aims and scope, editorial team, submission system and rigorous peer review.

Chemical Physics Letters publishes brief reports on **molecules, interfaces, condensed phases, nanomaterials and nanostructures, polymers, biomolecular systems, and energy conversion and storage.**

Criteria for publication are quality, urgency and impact. Further, experimental results reported in the journal have direct relevance for theory, and theoretical developments or non-routine computations relate directly to experiment. Manuscripts must satisfy these criteria and should not be minor extensions of previous work.

Benefits to authors

We also provide many author benefits, such as free PDFs, a liberal copyright policy, special discounts on Elsevier publications and much more. Please click [here](#) for more information on our author services.

Please see our Guide for Authors for information on article submission. If you require any further information or help, please visit our Support Center

AUDIENCE

Chemical and Molecular Physicists, Physical Chemists.

2017: 1.686 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2018.

ABSTRACTING AND INDEXING

Chemical Abstracts

Physics Abstracts

Physikalische Berichte

Current Contents/Physics, Chemical, & Earth Sciences

Nuclear Engineering Abstracts

Scopus

EDITORIAL BOARD

Editors:

D.C. Clary, University of Oxford, Oxford, UK

M. Okumura, California Institute of Technology, Pasadena, California, USA

B. Dietzek, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Jena, Germany

K-L. Han, Dalian Institute of Chemical Physics, Dalian, Liaoning, China

Honorary Advisory Editor:

A.H. Zewail †, Pasadena, California, USA

Advisory Editorial Board:

A. Alavi, University of Cambridge, Cambridge, England, UK

E. Alexov, Clemson University, Clemson, South Carolina, USA

H. Allen, The Ohio State University, Columbus, Ohio, USA

R. Arratia-Pérez, Universidad Nacional Andrés Bello, Santiago, Chile

M. Bonn, Max Planck Institute (MPI) for Polymer Research, Mainz, Germany

C. Bressler, European X-ray Free Electron Laser (XFEL), Hamburg, Germany

A.D. Buckingham, University of Cambridge, Cambridge, England, UK

S. Campagna, University of Messina, Messina, Italy

E. Campbell, University of Edinburgh, Edinburgh, Scotland, UK

P. Casavecchia, Università degli Studi di Perugia, Perugia, Italy

G. Chan, Princeton University, Princeton, New Jersey, USA

L. Chen, Argonne National Laboratory, Argonne, Illinois, USA

P. Chen, Cornell University, Ithaca, New York, USA

Q. Cui, University of Wisconsin at Madison, Madison, Wisconsin, USA

F.M.F. de Groot, Universiteit Utrecht, Utrecht, Netherlands **K. Domen**, The University of Tokyo, Tokyo, Japan

A. Douhal, Universidad de Castilla La Mancha, Toledo, Spain **T. Elsaesser**, Max-Born-Institut, Berlin, Germany

G. Engel, University of Chicago, Chicago, Illinois, USA

G. Ertl, Fritz Haber Institut der Max Planck Gesellschaft, Berlin, Germany **H. Fielding**, University College London (UCL), London, England, UK **C. Fittschen**, Université de Lille, Villeneuve d'Ascq, France

L. Gagliardi, University of Minnesota, Minneapolis, Minnesota, USA

A. Ganguli, Institute of Nanoscience & Technology, Mohali, India

Y. Gao, Peking University, Beijing, China

L. Gonzalez, University of Vienna, Wien, Austria

D.M. Guldi, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Erlangen, Germany

A. Hagfeldt, Ecole Polytechnique Federale de Lausanne, Lausanne, Switzerland

N.J. Halas, Rice University, Houston, Texas, USA

L. Halonen, University of Helsinki, Helsinki, Finland

P. Hamm, Universität Zürich, Zürich, Switzerland

L. Hammarström, Uppsala Universitet, Uppsala, Sweden

H. Hashimoto, Kwansei Gakuin University, Hyogo, Japan

J.L. Herek, University of Twente, Enschede, Netherlands

K. Hirao, RIKEN Advanced Science Institute, Saitama, Japan

S. Hirata, University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana, Illinois, USA

J. Hodges, National Institute of Standards and Technology (NIST), Gaithersburg, Maryland, USA

D. Jonas, University of Colorado Boulder, Boulder, Colorado, USA

A.M. Kelley, University of California at Merced, Merced, California, USA

K.S. Kim, Pohang University of Science and Technology, Pohang, The Republic of Korea

W.M. Klopper, Karlsruhe Institute of Technology (KIT), Karlsruhe, Germany

A. Kornyshev, Imperial College London, London, England, UK

J.E.I. Korppi-Tommola, University of Jyväskylä, Jyväskylä, Finland

G.J. Kroes, Universiteit Leiden, Leiden, Netherlands

K. Kuchitsu, Tokyo University of Agriculture and Technology, Tokyo, Japan
Y.T. Lee, Academia Sinica, Taipei, Taiwan
T. Lian, Emory University, Atlanta, Georgia, USA
W. Liang, Xiamen University, Xiamen, China
Z. Liu, Fudan University, Shanghai, China
R. Luo, University of California at Irvine, Irvine, California, USA
D. Markovitsi, Francis Perrin Laboratory, Gif-sur-Yvette, France

M. McCarthy, Harvard-Smithsonian Center for Astrophysics, Cambridge, Massachusetts, USA
B. Mennucci, Università di Pisa, Pisa, Italy

T. Miller, California Institute of Technology, Pasadena, California, USA
W.H. Miller, University of California at Berkeley, Berkeley, California, USA
G.A. Morris, University of Manchester, Manchester, England, UK

J. Moser, École Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL), Lausanne, Switzerland
P. O'Brien, University of Manchester, Manchester, England, UK

A. Orr-Ewing, University of Bristol, Bristol, England, UK **M. Orrit**, Universiteit Leiden, Leiden, Netherlands

D. Osborn, Sandia National Laboratories, Livermore, California, USA
A. Painelli, Università degli Studi di Parma, Parma, Italy

T. Polivka, University of South Bohemia, Ceske Budejovice, Czech Republic
M. Prato, Università di Trieste, Trieste, Italy

C.N.R. Rao, Jawaharlal Nehru Centre for Advanced Scientific Research, Bangalore, India
R.J. Saykally, University of California at Berkeley, Berkeley, California, USA

H.F. Schaefer, III, University of Georgia, Athens, Georgia, USA
G. Scholes, Princeton University, Princeton, New Jersey, USA
Z. Shuai, Tsinghua University, Beijing, China
R. Signorell, ETH Zürich, Zürich, Switzerland

A. Soper, Science & Technology Facilities Council (STFC), Oxfordshire, England, UK
J.F. Stanton, University of Florida, Gainesville, USA

A. Suits, University of Missouri, Columbia, Missouri, USA
D.J. Tozer, Durham University, Durham, England, UK

D.G. Truhlar, University of Minnesota, Minneapolis, Minnesota, USA
C. Vallance, University of Oxford, Oxford, England, UK

L.S. Wang, Brown University, Providence, Rhode Island, USA
G. Wei, Michigan State University, East Lansing, Michigan, USA

Y. Weng, Chinese Academy of Sciences (CAS), Beijing, China
S. Willitsch, Universität Basel, Basel, Switzerland
S. Wimperis, Lancaster University, Lancaster, England, UK
A. Wodtke, Max Planck Institut (MPI) für Biophysikalische Chemie, Göttingen, Germany
M. Wulff, European Synchrotron Radiation Facility (ESRF), Grenoble, France

K. Wüthrich, Eidgenössische Technische Hochschule (ETH) Zürich, Zürich, Switzerland
Y. Xia, Georgia Institute of Technology, Atlanta, Georgia, USA

K. Yamasaki, Hiroshima University, Higashi-Hiroshima, Japan
H. Yang, Princeton University, Princeton, New Jersey, USA
X. Yang, Chinese Academy of Sciences, Changchun, China

J. Ye, National Institute of Standards and Technology (NIST), Boulder, Colorado, USA
C-h Yu, National Tsing Hua University, Hsinchu, Taiwan
R.N. Zare, Stanford University, Stanford, California, USA
D.H. Zhang, Dalian Institute of Chemical Physics, Dalian, China
J. Zhang, University of California, Riverside, Riverside, California, USA
J. Zhang, New York University Shanghai, Shanghai, China **D. Zhong**, The Ohio State University, Columbus, Ohio, USA

GUIDE FOR AUTHORS

Your Paper Your Way

We now differentiate between the requirements for new and revised submissions. You may choose to submit your manuscript as a single Word or PDF file to be used in the refereeing process. Only when your paper is at the revision stage, will you be requested to put your paper in to a 'correct format' for acceptance and provide the items required for the publication of your article.

To find out more, please visit the Preparation section below.

INTRODUCTION

Criteria for Publication in Chemical Physics Letters

Chemical Physics Letters publishes brief reports of original research on the structures, properties and dynamics of molecules, solid surfaces, interfaces, condensed phases, polymers, nanostructures and biomolecular systems.

Criteria for publication are quality, urgency and impact. Further, experimental results reported in the journal have direct relevance for theory, and theoretical developments or non-routine computations relate directly to experiment.

Manuscripts must satisfy these criteria and should not be minor extensions of previous work or just descriptions of the synthesis of molecules or materials.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information pages on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication.

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/ registrations, and grants or other funding. Authors should complete the declaration of interest statement using this template and upload to the submission system at the Attach/Upload Files step. If there are no interests to declare, please choose: 'Declarations of interest: none' in the template. This statement will be published within the article if accepted. More information.

Comments section

The editors welcome Comments on Letters published in the Journal or elsewhere. They will be placed in a separate section. Comments will be refereed as usual and treated as normal contributions. All Comments should have an abstract.

Publication speed

The editors and publisher cooperate closely to ensure fast publication. If the manuscript submitted cannot be processed immediately following refereeing because scientific or stylistic revisions are required, this will be indicated by the addition of the date of receipt of the manuscript in final form. Proofs are e-mailed as portable document files (PDF) to the corresponding author to be checked within 48 hours of receipt.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see 'Multiple, redundant or concurrent publication' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by

the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service Crossref Similarity Check.

Preprints

Please note that preprints can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's sharing policy. Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see 'Multiple, redundant or concurrent publication' for more information).

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Articles should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader, should contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of race, sex, culture or any other characteristic, and should use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, for instance by using 'he or she', 'his/her' instead of 'he' or 'his', and by making use of job titles that are free of stereotyping (e.g. 'chairperson' instead of 'chairman' and 'flight attendant' instead of 'stewardess').

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see more information on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author (s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source (s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases.

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can share your research published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor (s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source (s) had no such involvement then this should be stated.

Correspondence

All correspondence with the editors or publisher should mention the first author, the editor's reference number, and the publisher's reference number if known. Otherwise, full details are needed, i.e., the names of all the authors, the full title, as well as the date of submission. After acceptance for publication, all further correspondence should be sent directly to the publisher at cplett@elsevier.com

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs.
- No open access publication fee payable by authors.
- The Author is entitled to post the accepted manuscript in their institution's repository and make this public after an embargo period (known as green Open Access). The published journal article cannot be shared publicly, for example on ResearchGate or Academia.edu, to ensure the sustainability of peer-reviewed research in journal publications. The embargo period for this journal can be found below.

Gold open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- A gold open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For gold open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author (s) and provided they do not alter or modify the article.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our open access page for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. Find out more.

This journal has an embargo period of 24 months.

Elsevier Researcher Academy

Researcher Academy is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop.

Referees

Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential referees. For more details, visit our Support site. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

PREPARATION

NEW SUBMISSIONS

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process.

As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or lay-out that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

Symbols

The use of SI units is strongly recommended. A useful guide is: Quantities, Units and Symbols in Physical Chemistry, 2nd edn. Prepared by I. Mills, T. Cvitas, K. Homann, N. Kallay and K. Kuchitsu, Blackwell/IUPAC, Oxford, 1993.

References

A maximum of 50 singles references is permitted; multiple references (referring to more than one article) are not permitted and neither are references to web sites.

Length

The manuscript text should not exceed 4,000 words (excluding tables and figure captions). In addition, a (combined) maximum of 8 normal-sized figures and/or tables is allowed. For multiple-panel figures each set of two panels equates to one figure.

Abstract

All manuscripts require an abstract not exceeding 100 words.

Please note that the instructions related to Graphical abstract still apply to all new submissions.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone

- Keywords
 - All figure captions
 - All tables (including title, description, footnotes)
- Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice-versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)

- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
 - If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes
-

For any further information please visit our customer support site at service.elsevier.com.

References

There are no strict requirements on reference formatting. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Author (s) name (s), journal title / book title, year of publication, volume & issue / book chapter and the pagination must be present. The reference style required by the journal will be applied to the published version by Elsevier.

Formatting requirements

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions.

If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in Your initial submission for peer review purposes.

Divide the article into clearly defined sections.

Peer review

This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. More information on types of peer review.

REVISED SUBMISSIONS

Figures

If, together with the accepted article, usable colour figures are submitted then Elsevier will ensure, at no extra charge, that these figures will appear in colour on the web (e.g., ScienceDirect

and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. For colour reproduction in print, the Author will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your article. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Equations

Displayed equations should be formatted with the journal text column width of 7.5 cm in mind. If necessary notation should be adapted by introduction of suitable abbreviations of component expressions. Special attention should be given to characters that can be confused, such as: l (ell), 1 (one); o (lower case), O (capital), 0 (zero), degree; etc.

Colour illustrations

Chemical Physics Letters publishes colour illustrations in the electronic version of Chemical Physics Letters without charges to the authors. When an author submits a colour figure, this will now be published online in colour by default. In the printed version of the published articles, the illustrations will be in black & white, unless the author has opted to pay for colour print reproduction. In case of black & white printing of online colour figures, authors are asked to submit a black & white version of the colour figures in question and to make sure the figure captions make sense for both colour and black & white.

For preparation of the colour figures, please ensure this is in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and at the correct resolution. Also make sure RGB colourspace is used. Further information on electronic artwork can be found at <https://www.elsevier.com/artworkinstructions> and is also accessible from our web-submission site.

Use of word processing software

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier). See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

LaTeX

You are recommended to use the Elsevier article class elsarticle.cls to prepare your manuscript and BibTeX to generate your bibliography.

Our LaTeX site has detailed submission instructions, templates and other information.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name (s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view example Highlights on our information site.

Graphical abstract

A graphical abstract is mandatory for this journal. It should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view Example Graphical Abstracts on our information site.

Authors can make use of Elsevier's Illustration Services to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements.

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.

- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
 - Number the illustrations according to their sequence in the text.
 - Use a logical naming convention for your artwork files.
 - Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
 - For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
-
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files. A detailed guide on electronic artwork is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here. *Formats*

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name (s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author (s) name(s), journal title/ book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Text: Indicate references by number (s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number (s) must always be given.

Example: '.... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result ...'

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, J. Sci. Commun. 163 (2010) 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

[2] Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2018. The art of writing a scientific article. Heliyon. 19, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

Reference to a book:

[3] W. Strunk Jr., E.B. White, The Elements of Style, fourth ed., Longman, New York, 2000. Reference to a chapter in an edited book:

[4] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), Introduction to the Electronic Age, E-Publishing Inc., New York, 2009, pp. 281–304. Reference to a website:

[5] Cancer Research UK, Cancer statistics reports for the UK.

<http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>, 2003 (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[Dataset] [6] M. Oguro, S. Imahiro, S. Saito, T. Nakashizuka, Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, Mendeley Data, v1, 2015. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions here to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the research data page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the database linking page.

For supported data repositories a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the Mendeley Data for journals page.

Data in Brief

You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into one or multiple data articles, a new kind of article that houses and describes your data. Data articles ensure that your data is actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and publicly available to all upon publication. You are encouraged to submit your article for *Data in Brief* as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed and published in the open access data journal, *Data in Brief*. Please note an open access fee of 500 USD is payable for publication in *Data in Brief*. Full

details can be found on the Data in Brief website. Please use this template to write your Data in Brief.

MethodsX

You have the option of converting relevant protocols and methods into one or multiple MethodsX articles, a new kind of article that describes the details of customized research methods. Many researchers spend a significant amount of time on developing methods to fit their specific needs or setting, but often without getting credit for this part of their work. MethodsX, an open access journal, now publishes this information in order to make it searchable, peer reviewed, citable and reproducible. Authors are encouraged to submit their MethodsX article as an additional item directly alongside the revised version of their manuscript. If your research article is accepted, your methods article will automatically be transferred over to MethodsX where it will be editorially reviewed. Please note an open access fee is payable for publication in MethodsX. Full details can be found on the MethodsX website. Please use this template to prepare your MethodsX article.

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the Data Statement page.

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized Share Link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's Webshop. Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the Elsevier Support Center to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also check the status of your submitted article or find out when your accepted article will be published.

© Copyright 2018 Elsevier | <https://www.elsevier.com>



ISSN 1517-8382 *versão impressa*
ISSN 1678-4405 *versão online*

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

- Escopo da revista
- Submissão de um artigo
- Publicação do artigo
- Preparo do artigo

Escopo da revista

A revista *Brazilian Journal of Microbiology*, editada pela Sociedade Brasileira de Microbiologia, publica artigos originais, notas prévias e trabalhos de revisão que cobrem todos os aspectos da Microbiologia. Não são cobradas taxas para publicação de artigos.

As seguintes categorias de artigos são aceitas para publicação no *Brazilian Journal of Microbiology*:

- **Artigos Originais:** reportam resultados científicos originais que ainda não tenham sido publicados em outro periódico;
- **Notas Prévias:** são textos concisos, relativos a novas metodologias e resultados parciais, cuja originalidade justifique a publicação rápida;
- **Artigos de Revisão:** abordam temas ligados à microbiologia em geral e de amplo interesse da área.

SEÇÕES

Microbiologia Industrial: Fermentação Bacteriana

- Biossíntese e bioconversão de produtos naturais, como: antibióticos; xenobióticos e macromoléculas produzidas por bactérias.
- Aspectos moleculares de biotecnologia bacteriana.

Microbiologia Industrial: Fermentação Fúngica

- Biossíntese e bioconversão de produtos naturais, como: antibióticos; xenobióticos e macromoléculas produzidas por fungos.
- Aspectos moleculares de biotecnologia fúngica.

Microbiologia de Alimentos: Tecnologia de Alimentos

- Aplicações de microrganismos (bactérias e fungos) na produção de alimentos.

Microbiologia de Alimentos: Segurança e Qualidade dos alimentos

- Doenças de origem alimentar.
- Deterioração de alimentos.
- Ecologia microbiana em alimentos.

Microbiologia Médica: Patogênese Bacteriana

- Bases genéticas, bioquímicas e estruturais da patogênese bacteriana.

Microbiologia Médica: Bacteriologia Clínica

- Estudos sobre bactérias de importância médica.

Microbiologia Médica: Patogenicidade de Fungos

- Bases genéticas, bioquímicas e estruturais da patogênese fúngica.

Microbiologia Médica: Micologia Clínica

- Estudos sobre fungos de importância médica.

Microbiologia Ambiental: Ecologia Microbiana

- Ecologia de grupos microbianos naturais; diversidade microbiana de ambientes naturais, como água, solo, sedimentos e organismos superiores.
- Interações microbianas.

Microbiologia Ambiental: Biotecnologia

- Aspectos ambientais de saúde pública.
- Biodegradação.
- Biorremediação.
- Considerações ambientais para microrganismos geneticamente modificados.

Fisiologia de Fungos

- Bioquímica de fungos, biofísica, metabolismo, estrutura celular, respostas a fatores de estresse, crescimento, diferenciação e outros processos relacionados.

Fisiologia de Bactérias

- Bioquímica de bactérias, biofísica, metabolismo, estrutura celular, respostas a fatores de estresse, crescimento, diferenciação e outros processos relacionados.

Genética e Biologia Molecular de Fungos

- Genética de fungos, biologia molecular, regulação gênica, replicação e reparo de DNA, proteomas e transcriptomas

Genética e Biologia Molecular de Bactérias

- Genética de bactérias, biologia molecular, regulação gênica, replicação e reparo de DNA, proteomas e transcriptomas

Genética e Biologia Molecular de Vírus

- Genética de vírus, biologia molecular, regulação gênica, replicação e reparo de DNA, proteomas e transcriptomas

Microbiologia Veterinária

- Doenças de animais
- Controle e/ou tratamento de animais
- Diagnostico de patógenos de animais
- Patógenos veterinarios ou zoonóticos

Ensino de Microbiologia

- Estratégias de ensino em microbiologia

- Novas ferramentas de ensino em microbiologia

Submissão de um artigo

Um artigo para ser submetido ao *Brazilian Journal of Microbiology* não deve ter sido previamente publicado (exceto na forma de resumo) nem ter sido submetido em qualquer outro periódico.

As instruções para submissão *online* estão disponíveis neste site.

Todos os autores serão informados por mensagem eletrônica a respeito da submissão eletrônica. A mensagem também questionará se todos os autores concordam com a submissão. Ausência de resposta será considerada como concordância à submissão.

A responsabilidade pela exatidão do conteúdo do manuscrito é de inteira responsabilidade dos autores.

Publicação do artigo

Os artigos são aceitos para publicação após terem sido revisados de forma crítica por pelo menos dois revisores, indicados pelos editores.

As sugestões e recomendações dos revisores e editores serão encaminhadas eletronicamente ao autor para correspondência, o qual deverá retornar o artigo revisado aos editores na data estipulada, pelo sistema *online*. O autor para correspondência deverá explicar ou comentar as alterações introduzidas no texto.

O autor para correspondência receberá uma mensagem eletrônica sempre que houver alteração do *status* do artigo.

Não é necessário ser associado da Sociedade Brasileira de Microbiologia para submeter artigo para publicação.

Todos os cientistas, brasileiros ou estrangeiros, são convidados a submeterem artigos para publicação.

ÉTICA

O(s) autor(es) devem informar, no texto do artigo, se o projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa de sua Instituição, em consoante à Declaração de Helsinki (<http://www.ufrgs.br/HCPA/gppg/helsin5.htm>). Nos trabalhos experimentais que envolvem animais, as normas estabelecidas no "*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*" (*Institute of Laboratory Animal Resources, National Academy of*

Sciences, Washington, D. C. 1996), e os "Princípios Éticos na Experimentação Animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA - <http://www.cobea.org.br/index.php?pg=Principios%20Eticos>) devem ser respeitados.

Preparo do artigo

O Artigo deverá ser submetido como **um único arquivo em WORD**. Este arquivo deve conter texto, figuras, tabelas, etc. Serão aceitas apenas submissões de artigos redigidos em inglês.

Para **artigos originais**, o arquivo em **WORD** deve conter:

- Título
- Autores e Afiliações
- Resumo (200 a 250 palavras)
- 3 a 5 palavras-chave
- Introdução
- Material e Métodos
- Resultados
- Discussões
- Agradecimentos (opcional)
- Referências

Para **notas prévias**, o arquivo em **WORD** deve conter:

- Título
- Resumo (até 50 palavras)
- 3 a 5 palavras-chave
- Texto não dividido em tópicos
- Agradecimentos (opcional)
- Referências

Para **artigos de revisão**, o arquivo em **WORD** deve conter:

- Título
- Resumo (200 a 250 palavras)
- 3 a 5 palavras-chave
- Texto
- Agradecimentos (opcional)
- Referências

Os artigos devem ser digitados com espaço duplo, margens de 3 cm e numerados sequencialmente. As linhas das páginas do artigo devem ser numeradas. Os editores recomendam que antes da submissão o artigo seja lido de forma crítica por alguém fluente em língua inglesa. Os artigos escritos com inglês de baixa qualidade não serão aceitos.

Artigos Originais e Artigos de revisão deverão conter até, no máximo, 20 páginas, incluindo referências, tabelas e figuras.

Notas prévias devem conter 10 páginas. Figuras e tabelas devem estar restritas a, no máximo, duas figuras ou duas tabelas ou uma figura e uma tabela.

Abreviaturas e símbolos devem seguir as recomendações da IUPAC-IUB *Commission (Commission on Biochemical Nomenclature, Amendments and Corrections)*. As unidades de medida devem seguir o Sistema Internacional de Unidades.

As referências no texto devem ser citadas pelos seus números. As citações de autores no texto devem ser feitas de acordo com o seguinte exemplo: Bergdoll (número) reported that..., Bailey and Cox (número) observed that..., ou Smith *et al.* (número) mentioned that... não use caixa alta para redigir o nome completo dos autores.

SUGESTÕES DE REVISORES

Os autores poderão enviar sugestões de revisores para avaliação dos artigos. Deverão constar as seguintes informações: nome; e-mail e Instituição de Origem.

USO DE EXTRATOS DE PLANTAS EM EXPERIMENTOS MICROBIOLÓGICOS

Artigos que apresentarem estudos com extratos de plantas, ou extratos de outras substâncias complexas, serão aceitos apenas após identificação dos compostos.

Os autores podem precisar, ou desejar, fazer uso de serviços de edição de línguas para melhorar a qualidade do inglês e, portanto, a qualidade final do texto. Este tipo de assistência é recomendado antes mesmo da submissão dos artigos ou, no caso de solicitação pelos revisores, antes do artigo ser definitivamente aceito para publicação. Autores que não são nativos de língua inglesa que desejem assistência na escrita em inglês podem considerar as seguintes sugestões:

- American Journal Experts: <http://www.JournalExperts.com?rcode=BSM1>
- Joanne Roberts: joroberts@uol.com.br
- ATO Traduções: www.atotraining.com.br

ORGANIZAÇÃO

O **Título** deve ser conciso, não conter abreviações e indicar claramente o tema do artigo.

Expressões como "Effects of", "Influence of", "Study on", etc, devem ser evitadas. Os cuidados na escolha das palavras do título são importantes, pois são usadas em sistemas eletrônicos de busca.

O **Resumo** deve resumir o conteúdo básico do artigo. Ele deve ser representativo do texto. Não deve conter referências, tabelas nem abreviações pouco usuais. São de grande importância, pois serão lidos por muitas pessoas que não têm acesso ao artigo completo.

A **Introdução** deve oferecer informações que possibilitem ao leitor avaliar adequadamente os resultados apresentados no artigo sem que obrigatoriamente tenha que recorrer à literatura corrente. No entanto, a introdução não deve ser uma extensa revisão de literatura. Deve informar claramente as justificativas e os objetivos do artigo.

Os **Materiais e Métodos** devem proporcionar informações suficientes para que outros pesquisadores possam reproduzir o trabalho. A repetição de detalhes de procedimentos que já tenham sido publicados em outros artigos deve ser evitada. Se um método publicado for modificado, tais modificações devem estar claras no artigo. Fontes de reagentes, meios de cultura e equipamentos (empresa, cidade, estado e País) devem ser mencionadas no texto. Nomes que são marcas registradas devem ser claramente indicados. Subtítulos podem deixar este tópico mais fácil de ler e entender.

Os **Resultados** devem, por meio de texto, tabela e/ou figuras dar os resultados dos experimentos. Se o item **Discussão** for incluído, evite interpretações extensas dos resultados, pois isto deverá ser feito na discussão. Se os **Resultados e Discussões** forem redigidos concomitantemente, então os resultados devem ser discutidos no local mais apropriado do texto. Tabelas e figuras devem ser numeradas em algarismos arábicos. Todas as tabelas e figuras devem ser mencionadas no texto.

O local aproximado das tabelas e figuras no texto deve ser indicado.

O item **Discussão** deve discutir os resultados em função da literatura citada.

As **Referências** devem ser numeradas sequencialmente em ordem alfabética, pelo último nome do primeiro autor. Todos os autores devem ser citados. As referências devem ser citadas no texto por seus números com um espaço entre o número das referências (3, 7, 22). Os nomes dos periódicos devem ser abreviados de acordo com o estilo do *BIOSIS*. Todas as referências listadas devem ser citadas no texto e todas as referências mencionadas no texto devem ser incluídas na lista final.

Exemplos:

a. Artigos de Periódicos

Brito, D.V.D.; Oliveira, E.J.; Darini, A.L.C.; Abdalla, V.O.S.; Gontijo Filho, P.P. (2006). Outbreaks associated to bloodstream infections with *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* spp in premature neonates in a university hospital from Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 37 (2), 101-107.

b. Artigos ou Capítulos de Livro

Franco, B.D.G.M.; Landgraf, M.; Destro, M.T.; Gelli, D.S. (2003). Foodborne diseases in Southern South America. In: Miliotis, M.D., Bier, J.W. (eds). *International Handbook of Foodborne Pathogens*. Marcel Dekker, New York, USA, p.733-743.

c. Livros

Montville, T.J.; Matthews, K.R. (2005). *Food Microbiology - an introduction*. ASM Press, Washington, D.C.

d. Patentes

Hussong, R.V.; Marth, E.H.; Vakaleris, D.G. January 1964. Manufacture of cottage cheese. U.S. Pat. 3, 117, 870.

e. Teses e Dissertações

Santos, M.V.B. (2005). *O papel dos anticorpos contra os componentes da parede celular de Paracoccidioides brasiliensis na evolução da doença experimental*. São Paulo, Brasil, 110p. (M.Sc. Dissertation. Instituto de Ciências Biomédicas. USP).

f. Comunicações em Eventos (Simpósios, Conferências, etc)

Silveira, T.S.; Martins, J.L.; Abreu, F.A.; Rosado, A.S.; Lins, U.G.C. (2005). Ecology of magnetotactic multicellular organisms in microcosms. XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, Santos, SP, p. 272.

g. Publicações na Web

Abdullah, M.A.F.; Valaitis, A.P.; Dean, D.H. (2006). Identification of a *Bacillus thuringiensis* Cry11 Ba toxin-binding aminopeptidase from the mosquito *Anopheles quadrimaculatus*. *BMC Biochemistry*. <http://www.biomedcentral.com/1471-2091/7/16>

h. Webpage

U.S. Food and Drug Administration. 2006. Enjoying Homemade Ice Cream without the Risk of *Salmonella* Infection.

Available at: <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/fs-eggs5.html>. Accessed 26 May 2006.

Referências como "personal communication" ou "unpublished data" devem ser evitadas, embora se reconheça que às vezes elas devam ser usadas. Nestes casos, elas devem ser citadas no texto e não na lista de referências. Referências consistem de artigos que são "aceitos para publicação" ou "no prelo". No entanto, referências de artigos que são "submetidos" ou "em preparo" não são aceitas.

AGRADECIMENTOS: Esta seção é opcional. Ela reconhece a assistência financeira e pessoal recebida para execução do trabalho.

TABELAS: devem ser inseridas no texto de acordo com que são citadas e numeradas sequencialmente por algarismos arábicos. O título deve ser colocado acima da tabela e deve ser curto, porém representativo, com descrição completa da informação contida na tabela. Cabeçalhos e rodapés devem ser concisos, com colunas e linhas cuidadosamente

centralizadas. Devem ter qualidade suficiente para garantir boa reprodução. Por favor, abra o link abaixo para ver os requisitos necessários para se obter a resolução adequada. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/image_quality_table.html)

FIGURAS: devem ser inseridas no texto de acordo com que são citadas e numeradas seqüencialmente por algarismos arábicos. Os dados que foram apresentados em tabelas não devem ser repetidos na forma de figuras. As legendas devem ser colocadas abaixo das figuras. Devem ter qualidade suficiente para garantir boa reprodução. Por favor, abra o link abaixo para ver os requisitos necessários para se obter a resolução adequada. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/image_quality_table.html)

FOTOGRAFIAS: Devem ter qualidade suficiente para garantir boa reprodução. Por favor, abra o link abaixo para ver os requisitos necessários para se obter a resolução adequada. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/image_quality_table.html)

Conflitos de Interesses

É política do periódico *Brazilian Journal of Microbiology* que qualquer pessoa envolvida no processo de publicação (autores, revisores, membros do corpo editorial e assistentes) deve estar isenta de conflitos de interesses que possam influenciar negativamente o parecer, a objetividade e a lealdade a seus autores. O BJM reconhece que qualquer conflito de interesse detectado deve ser prontamente comunicado e rapidamente resolvido. Conflitos de interesses em publicações podem ser definidos como condições nas quais um indivíduo possui conflito ou competição de interesses que podem resultar em decisões editoriais tendenciosos. Os conflitos de interesses podem ser potenciais, percebidos ou factuais. Considerações pessoais, políticas, financeiras, acadêmicas ou religiosas podem afetar a objetividade de diferentes formas.

DIREITOS AUTORAIS

Os autores dos manuscritos aprovados deverão encaminhar para *BJM* (Fax: 55 11-3037-7095; bjm@sbmicrobiologia.org.br), previamente à publicação, a declaração de transferência de direitos autorais, assinada por todos os co-autores (ver formulário abaixo) ou por pelo menos um dos autores que concorda em informar os outros autores.

Transferência de "Direitos Autorais"

"O (s) autor (es) abaixo assinado (s) afirmam que o artigo é original, que não infringe os direitos autorais ou qualquer outro direito de propriedade de terceiros, que não foi enviado para publicação em nenhuma outra revista e que não foi publicado anteriormente. O (s) autor (es) confirma (m) que a versão final do manuscrito foi revisada e aprovada por ele(s). Todos os manuscritos publicados tornam-se propriedade permanente do *Brazilian*

Journal of Microbiology e não podem ser publicados sem o consentimento por escrito de seus Editores."

Artigo nº. _____

Título _____ do _____ Artigo:

"

"

Nom e(s) do (s) Autor (es)

Assinatura (s)

Data: ____ / ____ / ____

[\[Home\]](#) [\[Sobre esta revista\]](#) [\[Corpo editorial\]](#) [\[Assinaturas\]](#)



Todo o conteúdo do periódico, exceto onde está identificado, está licenciado sob uma Licença Creative Commons

Sociedade Brasileira de Microbiologia
USP - ICB III - Dep. de Microbiologia
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415
Cidade Universitária
05508-900 São Paulo SP - Brasil
Tel: +55 11 3813-9647/3037-7095



bjm@sbmicrobiologia.org.br