



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
COLEGIADO DO CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



**Ciências
Biológicas**
UEL

TRABALHO DE CONCLUSÃO DO CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

GABRIELE RHANNA DAINEIS

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA BIOGÊNICAS CONTRA ISOLADOS CLÍNICOS DE *Candida parapsilosis*

Londrina – Paraná
2025

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DO CURSO DE GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

GABRIELE RHANNA DAINEIS

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE NANOPARTÍCULAS
DE PRATA BIOGÊNICAS CONTRA ISOLADOS
CLÍNICOS DE *Candida parapsilosis***

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina como um dos requisitos à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Márcia Cristina Furlaneto

**Londrina – Paraná
2025**

Daineis, Gabriele Rhanna.

Atividade antifúngica de nanopartículas de prata biogênicas contra isolados clínicos de *Candida parapsilosis* / Gabriele Rhanna Daineis. - Londrina, 2025. 41 f. : il.

Orientador: Márcia Cristina Furlaneto.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas, 2025.

Inclui bibliografia.

1. Nanotecnologia - TCC. 2. Candidemia - TCC. 3. Antimicrobianos - TCC. 4. Inovação - TCC. I. Furlaneto, Márcia Cristina. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

CDU 579

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Márcia Cristina Furlaneto (orientadora)

Prof.^a Dr.^a Maiara Voltarelli Providello

Prof.^a Dr.^a Luciana Furlaneto-Maia

Prof. Dr. Luciano Aparecido Panagio (suplente)

Londrina, 7 de fevereiro de 2025

EPÍGRAFE

"A pesquisa científica consiste em ver o que todo mundo viu e pensar o que ninguém pensou."

Albert Szent-Györgyi

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha profunda gratidão a todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

Primeiramente, agradeço a Deus pela saúde e força para concluir esta etapa. Aos meus pais Fernando e Michelli, à minha irmã Giovanna e aos meus avós Aparecida e Antônio, por todo apoio e carinho. Às minhas preciosas amigas Camila e Andressa que também fizeram parte do caminho até aqui. Sou imensamente grata a vocês

Agradeço também às minhas queridas amigas Eloiza, Nathália, Cássia, Thamires e Lorena por toda ajuda, paciência e toda experiência compartilhada, e minhas amigas e companheiras Kawane, Letícia e Nathália por todos os momentos e risadas. Vocês estão guardadas com muito carinho em meu coração.

Agradeço imensamente à minha orientadora, professora Márcia, pelas oportunidades e por todo conhecimento, compartilhado e construído, que me fez crescer e chegar até este momento. Também ao CNPQ pela bolsa de Iniciação Científica concedida ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

E, finalmente, a todos que, direta ou indiretamente participaram desta conquista, meu sincero agradecimento.

DAINEIS, Gabriele Rhanna. **Atividade antifúngica de nanopartículas de prata biogênicas contra isolados clínicos de *Candida parapsilosis***. 2025. 41 fls. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2025.

RESUMO

Candida parapsilosis é uma espécie causadora de importantes infecções relacionadas a assistência à saúde (IRAS) que possuem elevado tempo de internação e mortalidade, tem ganhado destaque por altas taxas de resistência a antimicrobianos, deixando o alerta da necessidade de novas alternativas terapêuticas, que para tal, tem sido estudado o uso de nanopartículas metálicas com atividade antimicrobiana. O objetivo do presente estudo foi produzir nanopartículas de prata biogênicas (Bio-AgNP) utilizando sobrenadante livre de células (CFS) que contém bacteriocinas (Ent-MF5) do cultivo de *Enterococcus durans*, bactéria ácido láctica (BAL) e testá-las em *C. parapsilosis*. A concentração inibitória mínima (CIM) das Bio-AgNP em isolados clínicos resistentes a fluconazol e linhagem padrão ATCC22019 foi determinada pela técnica de microdiluição em caldo. A viabilidade celular foi determinada pela contagem de unidades formadoras de colônias (UFC), com análise estatística *one-way* ANOVA ($p < 0,05$) e pós-teste de *Dunnnett*. Para os isolados clínicos 117.11, 185.11 e 390.11, o valor de CIM foi de 0,2 µg/mL. A linhagem ATCC22019 e os isolados 262.10 e 357.10 apresentaram valor 50% inferior (0,1 µg/mL). A Bio-AgNP só apresentou 99% de morte celular para todos os isolados, exceto o 185.11. Assim, as bactérias ácido-láticas emergem como um grupo promissor para produzir nanopartículas de prata biogênicas, com potencial de servir como alternativas terapêuticas eficazes contra *C. parapsilosis*. Este estudo sugere por meio de dados de microscopia de fluorescência, que as Bio-AgNPs possam atuar ao nível de membrana em *C. parapsilosis* e evidencia a necessidade de mais estudos que melhor explorem esses mecanismos.

Palavras-chave: Nanotecnologia, Antimicrobianos, Candidemia, Leveduras, Ácido-láticas, Bacteriocinas, Bio-AgNP, Síntese verde, Candidacida, Inovação.

DAINEIS, Gabriele Rhanna. **Antifungal activity of biogenic silver nanoparticles against clinical isolates of *Candida parapsilosis***. 2025. 41 pgs. Final Dissertation (Biological Sciences Undergraduation) – Londrina State University. Londrina. 2025.

ABSTRACT

Candida parapsilosis is a species that causes important healthcare-associated infections (HAIs) that have long hospitalization times and mortality, has gained prominence due to high rates of antimicrobial resistance, alerting the need for new therapeutic alternatives, for which the use of metal nanoparticles with antimicrobial activity has been studied. The objective of the present study was to produce biogenic silver nanoparticles (Bio-AgNP) using cell-free supernatant (CFS) containing bacteriocins (Ent-MF5) from the culture of *Enterococcus durans*, lactic acid bacteria (LAB) and test them in *C. parapsilosis*. The minimum inhibitory concentration (MIC) of Bio-AgNP in clinical isolates resistant to fluconazole and standard strain ATCC22019 was determined by the broth microdilution technique. Cell viability was determined by counting colony forming units (CFU), with one-way ANOVA ($p < 0.05$) and Dunnett's post-test. For clinical isolates 117.11, 185.11 and 390.11, the MIC value was 0.2 $\mu\text{g/mL}$. The ATCC22019 strain and isolates 262.10 and 357.10 presented a 50% lower value (0.1 $\mu\text{g/mL}$). Bio-AgNP only presented 99% cell death for all isolates except 185.11. Thus, lactic acid bacteria emerge as a promising group to produce biogenic silver nanoparticles, with the potential to serve as effective therapeutic alternatives against *C. parapsilosis*. This study suggests, through fluorescence microscopy data, that Bio-AgNPs may act at the membrane level in *C. parapsilosis* and highlights the need for further studies to better explore these mechanisms.

Keywords: Nanotechnology, Antimicrobial, Candidemia, Yeasts, Lactic acid, Bacteriocins, Bio-AgNP, Green synthesis, Candidacidal, Innovation.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1 O gênero <i>Candida</i>	11
2.2 <i>Candida parapsilosis</i>	12
2.2.1 Ação dos antifúngicos e resistência em <i>C. parapsilosis</i>	14
2.3 Nanopartículas metálicas biogênicas	17
2.5 Bacteriocinas	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 Microrganismos	21
3.2 Obtenção de nanopartículas de prata biogênicas	22
3.2.1 Obtenção de sobrenadante livre de células (CFS).....	22
3.2.2 Síntese de nanopartículas de prata biogênicas (Bio-AgNP)	22
3.3 Caracterização das AgNPs	23
3.3.1 Confirmação de síntese de AgNP por espectroscopia UV-visível	23
3.3.2 Quantificação de AgNPs	23
3.4 Avaliação da atividade antimicrobiana das Bio-AgNPs	23
3.4.1 Determinação da concentração inibitória mínima de Bio-AgNP	23
3.4.2 Determinação da concentração inibitória mínima de fluconazol	24
3.4.3 Determinação da Atividade Inibitória por UFC	25
3.4.4 Microscopia de Fluorescência	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5. CONCLUSÕES	35
REFERÊNCIAS	36

1. INTRODUÇÃO

As infecções fúngicas invasivas representam um significativo problema de saúde pública, especialmente em ambientes hospitalares. Segundo a Organização Mundial da Saúde entre os principais agentes causadores de infecções fúngicas invasivas, destacam-se as leveduras do gênero *Candida*, responsáveis por um expressivo número de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) (WHO, 2022).

Entre as espécies do gênero, *Candida parapsilosis* tem se mostrado uma ameaça notável, especialmente em pacientes imunossuprimidos, bebês prematuros e aqueles em unidades de terapia intensiva. Suas características de virulência, como a formação de biofilmes e a secreção de enzimas hidrolíticas, favorecem sua resistência aos tratamentos convencionais e a disseminação em ambientes hospitalares, frequentemente facilitada pelo contato humano e por equipamentos médicos, como uso de cateteres, bisturis e equipamentos de intubação por exemplo (Bohner; Gacser; Toth, 2021; Pappas *et al.*, 2018). A baixa quantidade de informações e estudos envolvendo esta espécie dificulta os trabalhos de controle evidencia a necessidade do desenvolvimento de mais pesquisas.

A resistência microbiana é outro desafio crítico no manejo de infecções fúngicas. *C. parapsilosis*, assim como outras espécies, têm desenvolvido mecanismos adaptativos sofisticados, incluindo mutações genéticas e produção de enzimas que inibem a ação de antifúngicos amplamente utilizados, como os azóis e as equinocandinas. Este cenário evidencia a necessidade de alternativas terapêuticas inovadoras que possam superar os obstáculos impostos pela resistência (Das *et al.*, 2020; Govrins; Lass-Flörl, 2024).

A crescente resistência a tratamentos convencionais e os elevados índices de morbidade associados a essas infecções tornam urgente a busca por abordagens terapêuticas mais eficazes (Liu; Dickter, 2020). Nesse contexto, o uso de nanopartículas metálicas (NPs) biogênicas tem emergido como uma promissora abordagem alternativa. Essas partículas, sintetizadas por método biogênico, ou seja, produzidas a partir do uso de compostos naturais, apresentam propriedades antimicrobianas robustas, atuando contra um amplo espectro de microrganismos. Em particular, as nanopartículas de prata (AgNPs) têm se destacado por sua eficácia e baixo custo, demonstrando potencial no combate às infecções por *Candida* spp. (Lee; Jun, 2019).

Além disso, a integração de tecnologias emergentes, como a biossíntese mediada por bacteriocinas, amplia as possibilidades de aplicação das nanopartículas metálicas (Darbandi *et al.*, 2022; Oladipo *et al.*, 2017). Esse método não apenas promove a sustentabilidade ambiental, mas também explora novos mecanismos de ação antimicrobiana, apontando para uma nova era de estratégias no enfrentamento de infecções fúngicas invasivas. Trabalhos recentes já exploram essa novidade, inclusive de nosso grupo (Paulo *et al.*, 2024).

Portanto, o objetivo do presente trabalho foi produzir Bio-AgNPs segundo a metodologia de Paulo *et al.* (2024) a partir do cultivo de *Enterococcus durans* produtor de bacteriocina e avaliar seu potencial antimicrobiano frente a isolados de *C. parapsilosis* resistentes ao fluconazol, através do método de determinação da concentração inibitória mínima (CIM), viabilidade celular após exposição por meio de contagem de unidade formadora de colônias (UFC) e avaliação da atividade de AgNPs na desestabilização de membrana (possível alvo) por meio de microscopia de fluorescência.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O gênero *Candida*

Algumas leveduras do gênero *Candida* são patógenos de grande importância clínica, responsáveis por infecções fúngicas sistêmicas que fazem parte das infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS). Essas infecções têm um impacto significativo na saúde devido às altas taxas de morbidade e mortalidade, além do tempo prolongado de internação e dos riscos de novas infecções (Liu; Dickter, 2020).

Embora o gênero *Candida* compreenda cerca de 200 espécies, apenas um número reduzido é causador de infecções sistêmicas. Esses microrganismos comensais estão presentes na microbiota humana em equilíbrio, mas podem se tornar prejudiciais quando há uma colonização elevada, especialmente devido ao declínio da imunidade do hospedeiro ou intervenções cirúrgicas invasivas (Bohner; Gacser; Toth, 2021; Pappas *et al.*, 2018).

As principais espécies do gênero *Candida* de interesse clínico são classificadas em dois grupos: *Candida albicans*, que é a principal espécie comumente isolada de pacientes com infecções fúngicas invasivas (candidemias), e as espécies não-*Candida albicans* (CNCA), que incluem *Candida auris*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* e *Candida glabrata*, sendo as três últimas as mais comuns (Bohner; Gacser; Toth, 2021; Bongomin *et al.*, 2017).

O gênero *Candida* é apontado como a terceira maior causa de sepse, inflamação generalizada causada por infecção no sangue, no mundo (Pappas *et al.*, 2018), a segunda maior causa de infecções da corrente sanguínea associadas a assistência à saúde nos Estados Unidos (Bays *et al.*, 2024), e são prevalentes em sepse

de início tardio em 1,9% na Europa, 5,1% nos Estados Unidos, 6,3% na Argentina e 11% no Brasil (Fonseca, 2024).

Estudos apresentam que a incidência de *C. albicans* em algumas regiões geográficas tem diminuído em relação as CNCA. No entanto, a distribuição destas espécies depende de vários fatores como a localização geográfica, condições socioeconômicas, idade da população afetada e a utilização de medicamentos antimicrobianos (Tóth *et al.*, 2019).

A espécie de *Candida* mais frequente em geral ainda é *C. albicans*, com frequência de 35,3% no Brasil à 50,4% na Coreia. Em segundo e terceiro lugar a frequência é variada, porém, as principais espécies são *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, sendo que *C. glabrata* prevalece nos Estados Unidos (24%), China (27,7%) e Coreia (22,7%), *C. parapsilosis* na Itália (28-35%) e *C. tropicalis* no Brasil (27,4%) (Chen; Xie; Jian, 2024; Franconi *et al.*, 2023; Medeiros *et al.*, 2019; Mesini *et al.*, 2020; Ricotta *et al.*, 2021; Won; Sung; Kim, 2024).

2.2 *Candida parapsilosis*

C. parapsilosis é um complexo que inclui três espécies: *Candida parapsilosis sensu stricto*, *Candida orthopsilosis* e *Candida metapsilosis*, destas, *C. parapsilosis sensu stricto* é a espécie mais frequente do grupo. (Brilhante *et al.*, 2018).

Uma pesquisa de prevalência de espécies CNCA realizada entre 1971 e 2018 em diversos países revelou que *C. parapsilosis* é a espécie mais comum na América do Sul e *C. glabrata* na Europa e na América do Norte (Giacobbe *et al.*, 2020).

No Brasil, *C. parapsilosis* ocupou o terceiro lugar entre as CNCA isoladas de candidemias até 2017, com uma frequência de 14-21,6% em casos clínicos (Canela *et al.*, 2018; Medeiros *et al.*, 2019). E segundo estudo de Leite-Jr, *et*

al. (2023), ocupa o segundo lugar entre as *Candida* spp. mais frequentes no mundo (20-30%).

Esta espécie se destaca clinicamente pela sua capacidade de causar candidemias em pacientes hospitalizados, especialmente naqueles com cateteres centrais de longa permanência. Além da mortalidade significativa associada a essas infecções, entre 14,5 e 46,8% dos casos, juntamente com os fatores de virulência e mecanismos de resistência que tem deixado profissionais da saúde e pesquisadores em alerta (Asogan *et al.*, 2024; WHO, 2022).

Pacientes em unidades de terapia intensiva, imunossuprimidos e bebês prematuros são os principais alvos de infecções por *C. parapsilosis*. Segundo Peixoto *et al.*(2023), a prevalência de infecções por *C. parapsilosis* também foi maior em pacientes da oncologia (68,26%). Essas infecções podem ser transmitida pelas mãos de profissionais de saúde durante tratamentos e intervenções. Além disso, o uso de cateteres e o tempo prolongado de internação estão diretamente associados ao estabelecimento da infecção, pois facilitam a colonização do patógeno (Da Silva *et al.*, 2021).

Os diversos mecanismos de virulência de *C. parapsilosis* a tornam uma grave ameaça à saúde, pois facilitam sua adesão e penetração no hospedeiro, promovendo sua propagação (Govrins; Lass-Flörl, 2024). Um dos principais mecanismos é a presença e produção de adesinas, que facilitam sua instalação nos tecidos do paciente e em equipamentos médicos, especialmente cateteres, além de seu transporte por meio dos profissionais de saúde (Branco; Miranda; Rodrigues, 2023; Pappas *et al.*, 2018).

O biofilme é um mecanismo de virulência e resistência particularmente preocupante, pois o aglomerado de células recobertos por

polissacarídeos, junto com fosfolipases e proteases aspárticas segregadas (SAPs) produzidas por *C. parapsilosis*, tornam a resposta imune do hospedeiro ineficaz e dificultam a ação de antimicrobianos, impedindo que estes compostos e os agentes imunológicos entrem em contato direto com as células patogênicas. Além disso, a secreção de enzimas hidrolíticas destrói, altera ou danifica a integridade da membrana das células do hospedeiro (Rocha *et al.*, 2021; Tóth *et al.*, 2019).

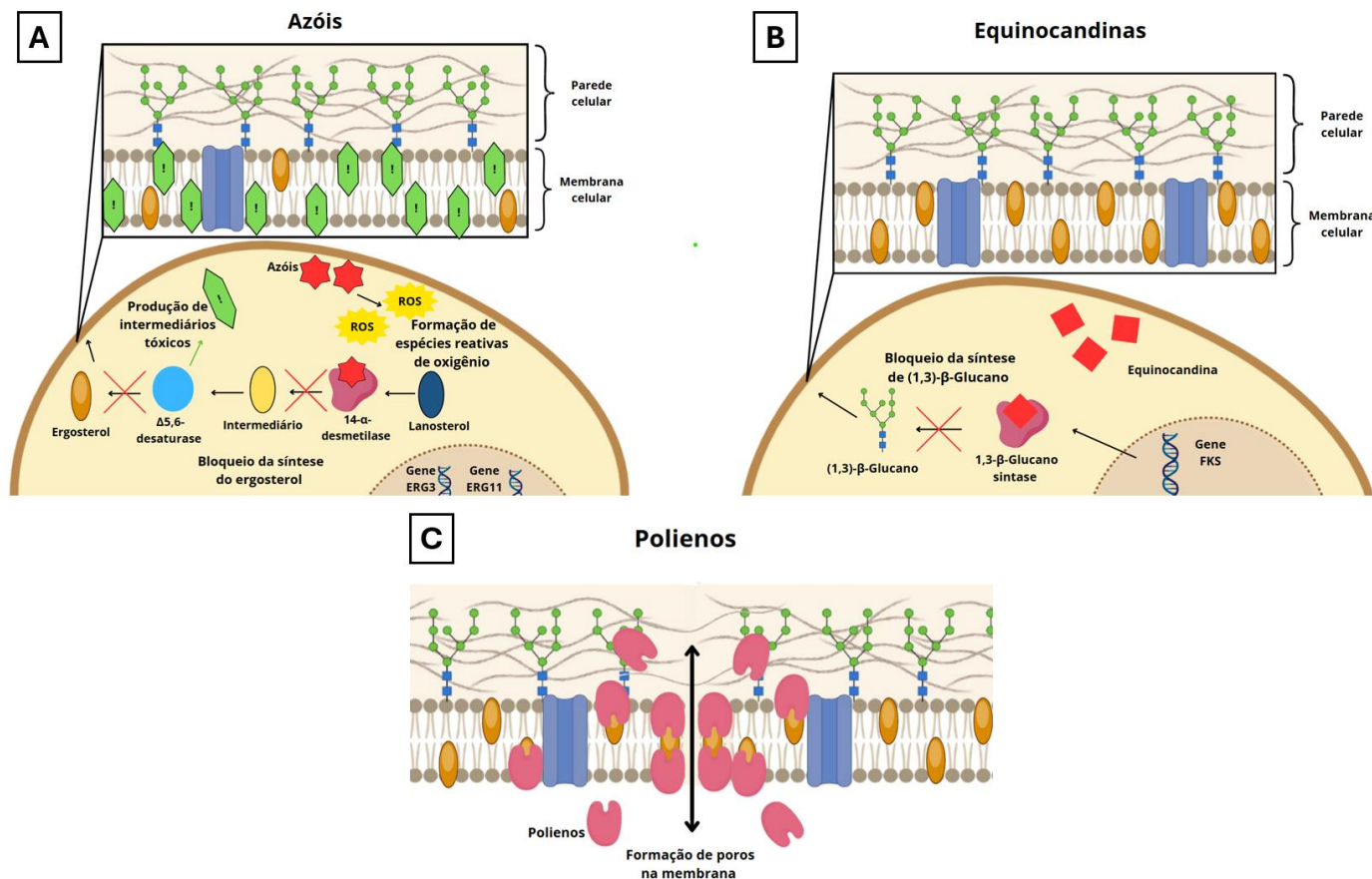
2.2.1 Ação dos antifúngicos e resistência em *C. parapsilosis*

Os fármacos disponíveis para o tratamento de infecções fúngicas são limitados. Entre os principais estão os azóis, os polienos como a anfotericina B e as equinocandinas, utilizados como primeira linha de tratamento atualmente (Nivoix; Ledoux; Herbrecht, 2020).

O fluconazol é especialmente eficaz no controle de infecções causadas por patógenos do gênero *Candida* devido ao seu mecanismo de ação, que bloqueia a síntese de ergosterol, um componente essencial da membrana celular da levedura (figura 1A). Isso fragiliza a célula invasora no corpo do hospedeiro, sem afetar as células do hospedeiro devido às diferenças na composição entre elas e o alvo.

As equinocandinas também são amplamente utilizadas por seu mecanismo de ação distinto dos demais fármacos antimicrobianos, atuando diretamente na parede celular fúngica bloqueando a síntese de (1,3)- β -D-glucano (figura 1B). Enquanto os polienos se destacam pois ligam-se ao ergosterol formando poros na membrana celular (figura 1C) (Pristov; Ghannoum, 2019).

Figura 1: Principais mecanismos de ação de (A) azóis, (B) equinocandinas e (C) polienos, que atuam principalmente em membrana e parede celular. Siglas: ROS: (reactive oxygen species) espécies reativas de oxigênio. Gene ERG3: codificador da enzima $\Delta 5,6$ -desaturase. Gene ERG11: codificador da enzima lanosterol 14- α -desmetilase. Gene FKS: codificador da enzima 1,3- β -glucano sintase.

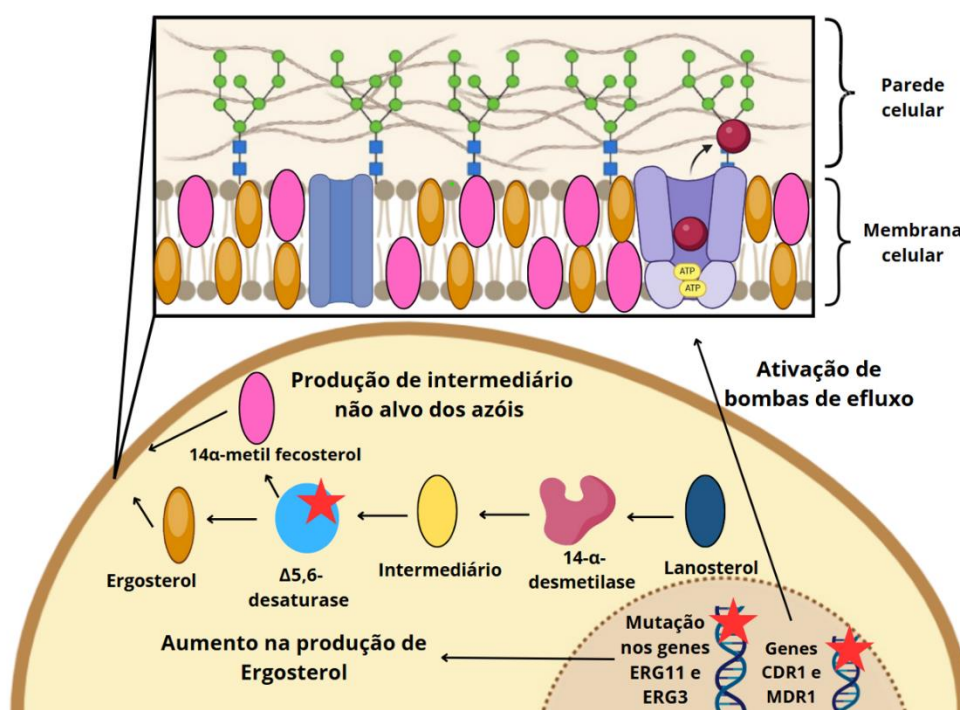


Fonte: Próprio autor. Criado em BioRender.com.

A resistência ao fluconazol em *Candida* spp. pode ser causada por mecanismos moleculares que estão relacionadas aos pontos alvo da ação dos fármacos, como a regulação positiva do gene codificador da enzima lanosterol 14- α -desmetilase (ERG11) e $\Delta 5,6$ -desaturase (ERG3), fundamentais na via de síntese do ergosterol. Também mutações pontuais no gene ERG3 que levam à perda de ergosterol e ao acúmulo de 14 α -metil fecosterol, impedindo que a parede celular seja atacada pelo fármaco. Além disso, a resistência também está correlacionada com a superexpressão de bombas de efluxo através dos genes CDR1 (proteína de transporte de membrana ABC) e MDR1 (proteína transportadora do tipo p-

glicoproteína) que conferem resistência a múltiplos fármacos, bem como duplicações de genes, especialmente no gene ERG11 (Castanheira *et al.*, 2020; Corzo-Leon *et al.*, 2021) (Figura 2).

Figura 2: Principais mecanismos de resistência apresentados por *Candida parapsilosis* contra os fármacos azóis. Siglas: Gene ERG3: codificador da enzima $\Delta 5,6$ -desaturase. Gene ERG11: codificador da enzima lanosterol 14- α -desmetilase. Gene CDR1: codificador da proteína de transporte de membrana do tipo ABC. Gene MDR1: codificador da proteína transportadora do tipo p-glicoproteína. ATP: molécula de adenosina trifosfato.



Fonte: Próprio autor. Criado em BioRender.com.

Contra as equinocandinas, a resistência pode ocorrer por meio de mecanismos adaptativos ao estresse, aumentando os níveis de quitina na parede celular, o que impede a ação do composto, além de mutações nos genes responsáveis pela produção de β -glucanos. E no caso dos polienos, como a anfotericina B, a resistência é considerada rara, no entanto, foi identificado que *C. parapsilosis* possui mecanismos de modulação na síntese de ergosterol e de defesa contra espécies reativas de oxigênio (Branco; Miranda; Rodrigues, 2023; Franconi *et al.*, 2023;

Govrins; Lass-Flörl, 2024). Isto posto, a resistência que vem sendo adquirida ao longo dos anos se torna um alerta em busca de novos compostos para o combate de infecções com tal risco.

2.3 Nanopartículas metálicas biogênicas

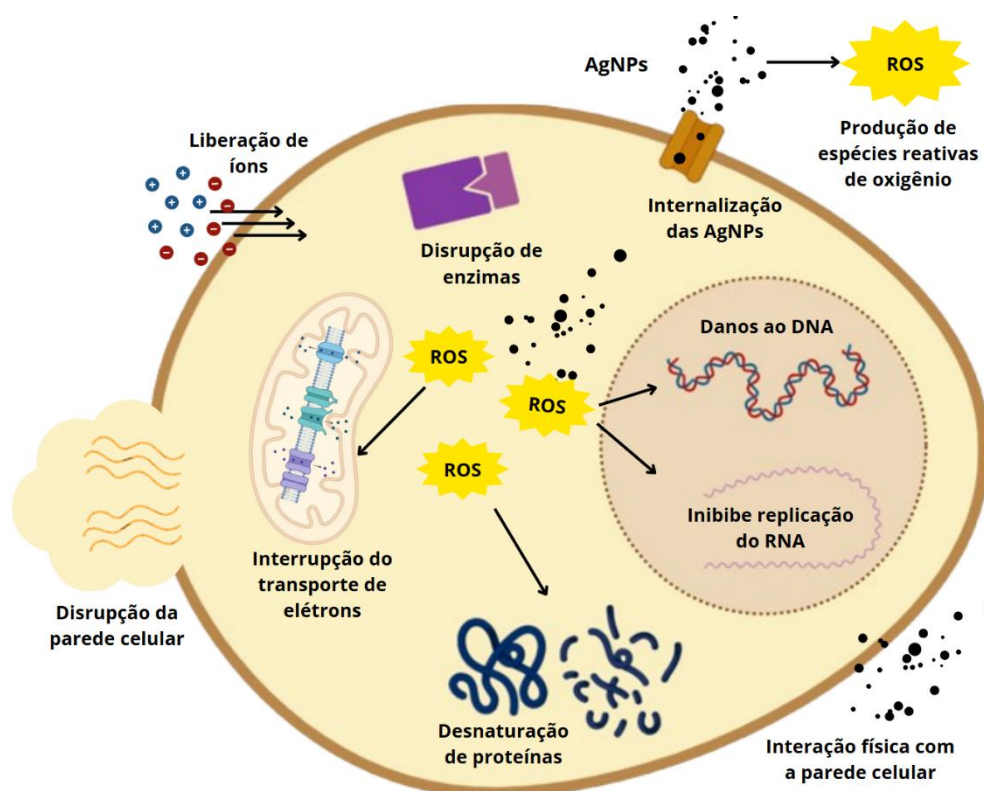
As nanopartículas (NPs) metálicas tem sido utilizadas de diversas formas principalmente na indústria de forma geral, mas suas aplicações na saúde também tem sido o foco de muitos estudos, podendo ser utilizadas como agentes contrastantes para imagens médicas, ajudando com diagnósticos, fazendo entrega direcionada de medicamentos a células e tecidos específicos por meio da presença de ligantes ou anticorpos, além de suas propriedades antimicrobiana, anticancerígena e antivirais (Abbas *et al.*, 2024; Burlec *et al.*, 2023; Jangid *et al.*, 2024).

Diversos metais podem ser utilizado como precursor das NPs, a prata, o ouro, zinco e ferro são os metais mais utilizados e protagonizam vários estudos que visam a aplicação da nanotecnologia em situações do cotidiano (Madkhali, 2023). Além disso, a síntese dessas NPs pode ocorrer por diferentes abordagens, a *top-down*, através da quebra de materiais maiores a partículas nanométricas utilizando métodos físicos, e a *bottom-up*, que ocorre da união de moléculas menores por meio de redução química. No entanto, a maioria dessas abordagens são tecnicamente complexas, dispendiosas e podem ter impactos ambientais negativos (Bharti *et al.*, 2024).

Em contraste, a síntese biogênica de NPs é uma abordagem mais sustentável e bem estabelecida. Também chamada de síntese verde, a síntese biogênica é um método *bottom-up*, que envolve a redução ou oxirredução dos íons metálicos por enzimas presentes em compostos naturais, resultando em

nanopartículas metálicas. (Singh *et al.*, 2018). Essas NPs utilizam vários mecanismos de ação contra células bacterianas e fúngicas, ilustrados na figura 3. Entre eles, destacam-se a inibição da replicação do DNA, a modificação dos níveis intracelulares de adenosina-5'-trifosfato (ATP), a degradação de membranas por contato direto, a interferência na cadeia respiratória interrompendo o transporte de elétrons, a desnaturação de proteínas e os danos ao DNA (Madkhali, 2023; Sheng; Liu, 2017). Além disso, estudos indicam que as AgNPs promovem a formação de espécies reativas de oxigênio, contribuindo como um mecanismo de ação contra microrganismos patogênicos (Mulani *et al.*, 2019; Swolana; Wojtyczka, 2022).

Figura 3: Ilustração dos mecanismos antimicrobianos das nanopartículas metálicas, entre elas a de prata (AgNP). Siglas: ROS: (reactive oxygen species) espécies reativas de oxigênio. AgNPs: nanopartículas de prata. DNA: ácido desoxirribonucleico. RNA: ácido ribonucleico.



Fonte: Adaptado de Madkhali (2023). Criado em BioRender.com

As nanopartículas de prata (AgNPs) biogênicas em particular, podem ser obtidas a partir de diversos precursores naturais e têm sido reconhecidas por sua eficácia antimicrobiana contra bactérias, fungos e vírus, além de oferecerem baixo custo, facilidade de produção e baixa toxicidade para os pacientes (Malik *et al.*, 2023; Pandit; Rai; Santos, 2017; Singh *et al.*, 2018; Vijayaram *et al.*, 2024). Extratos vegetais e cultivos de fungos e bactérias estão ganhando destaque para produção deste tipo de NPs e demonstrando resultados promissores, a exemplo trabalhos da tabela 1, selecionados com base em síntese biogênica de nanopartículas de prata e determinado a concentração inibitória mínima (CIM) em *Candida* spp. empregando o ensaio de microdiluição em caldo.

Tabela1: Dados de atividade antifúngica de AgNPs, obtidas por via biogênica, contra *Candida* spp., referentes a trabalhos publicados nos últimos quatro anos. Siglas: µg/mL: microgramas por mililitros. mg/mL: miligramas por mililitros. µM: micromolar.

Precursor para síntese de AgNP	<i>Candida</i> spp. testadas	Valor de CIM obtido	Referência
Solução Aquosa de Mel	<i>C. albicans</i> <i>C. parapsilosis</i>	0,5 – 2 µg/mL 0,5 – 1 µg/mL	(Czernel <i>et al.</i> , 2021)
Extrato de Casca de Faia	<i>C. albicans</i> <i>C. parapsilosis</i> <i>C. Krusei</i> <i>C. auris</i> <i>C. guilliermondii</i>	1.08 mg/mL > 1,08 mg/mL 0,06 mg/mL > 1,08 mg/mL > 1,08 mg/mL	(Mare <i>et al.</i> , 2021a)
Casca de Abeto	<i>C. albicans</i> <i>C. parapsilosis</i> <i>C. Krusei</i> <i>C. auris</i> <i>C. guilliermondii</i>	0,64 mg/mL 0,32 mg/mL 0,02 mg/mL 0,16 mg/mL 0,08 mg/mL	(Mare <i>et al.</i> , 2021b)
<i>Penicillium chrysogenum</i>	<i>C. albicans</i> <i>C. tropicalis</i> <i>C. Krusei</i> <i>C. parapsilosis</i> <i>C. glabrata</i>	≤ 31.5/≥ 125 µg/mL ≤ 62.5/≥ 250 µg/mL ≤ 62.5/≥ 250 µg/mL ≤ 31.5/≥ 125 µg/mL ≤ 62.5/≥ 125 µg/mL	(Soliman <i>et al.</i> , 2021)

<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>C. albicans</i>	7,8 µg/mL	(Fonseca <i>et al.</i> , 2022)
	<i>C. glabrata</i>	7,8 µg/mL	
	<i>C. dubliniensis</i>	15,6 µg/mL	
	<i>C. tropicalis</i>	3,9 µg/mL	
	<i>C. parapsilosis</i>	7,8 µg/mL	
<i>Aspergillus spp.</i> <i>Cladosporium piniponderosae</i> , <i>Fusarium proliferatum</i> , <i>Epicoccum nigrum</i> , <i>Aspergillus tubingensis</i> , <i>Bionectria ochroleuca</i>	<i>C. albicans</i>	2,5 - > 40 µM	(Ribeiro <i>et al.</i> , 2023)
	<i>C. glabrata</i>	1,25 - > 40 µM	
	<i>C. krusei</i>	1,25 - 5 µM	
	<i>C. guilliermondii</i>	1,25 - 2,5 µM	
	<i>C. parapsilosis</i>	2,5 - >40 µM	
	<i>C. tropicalis</i>	5 - >40 µM	
<i>Enterococcus durans</i>	<i>C. tropicalis</i>	0,251 – 2,01 µg/mL	(Paulo <i>et al.</i> , 2024)

Fonte: próprio autor.

2.5 Bacteriocinas

As bactérias ácido-lácticas (BALs) são amplamente encontradas na natureza e possuem aplicações comerciais significativas como bioconservantes de alimentos e probióticos, distintas pela sua capacidade de produzir compostos peptídicos conhecidos como bacteriocinas, que também apresentam atividade antimicrobiana, aumentando a possibilidade de aplicações destes compostos (Mokoena, 2017; Ramalho *et al.*, 2023). Recentemente, algumas espécies de BALs também têm sido utilizadas na biossíntese de nanopartículas metálicas. Nesse processo, as bacteriocinas desempenham um papel fundamental ao se ligar às moléculas de prata e recobrir as nanopartículas formadas (Darbandi *et al.*, 2022; Paulo *et al.*, 2024; Sidhu; Nehra, 2020).

Diversos autores confirmaram a ação antimicrobiana de bacteriocinas contra isolados fúngicos e vários isolados bacterianos, sendo estes clínicos e patógenos alimentares, principalmente gram-negativos (Gao *et al.*, 2024; Prosekov *et al.*, 2017; Sidhu; Nehra, 2020; Sonbol *et al.*, 2020; Tosoni *et al.*, 2019). A maioria das bacteriocinas não são tóxicas para os seres humanos, pois são sensíveis às proteases

presentes no intestino, além disso, são estáveis a temperatura elevada e baixos valores de pH, podendo ser utilizadas seguramente como conservante de alimentos (Ramalho *et al.*, 2023; Sidhu; Nehra, 2020).

As bacteriocinas provenientes do cultivo de *Enterococcus* spp. são denominadas enterocinas, que pertencem as classes I, IIa, IIc e III de bacteriocinas (Darbandi *et al.*, 2022; Masias *et al.*, 2017). Essas enterocinas apresentam potencial no uso como conservantes de alimentos, pois foi considerado de uso seguro após testes avaliando mecanismos de patogenicidade da espécie (Souza *et al.*, 2024). Através de extração e amplificação genômica de DNA por PCR, já foi reconhecido a presença de pelo menos oito genes codificadores de enterocinas. Estes genes estão relacionados ao potencial antimicrobiano e de estabilidade destes compostos (Bússolo *et al.*, 2022; Furlaneto-Maia *et al.*, 2020; Sonbol *et al.*, 2020), o que torna esse microrganismos uma opção viável para produção de AgNPs. No entanto, essa aplicação ainda é pouco explorada e apresenta oportunidades interessantes para futuras pesquisas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Microrganismos

Neste estudo o isolado de bactérias ácido lácticas (BAL) empregada na obtenção de nanopartículas de prata foi *Enterococcus durans* (MF5). Nos ensaios de suscetibilidade a nanopartículas de prata biogênicas, foram empregados isolados sanguíneos de *C. parapsilosis* (262.10, 357.10, 117.11, 185.11 e 390.11), resistentes ao fluconazol (Da Costa *et al.*, 2014), e linhagem ATCC22019. Os isolados estão depositados em estoques congelados em meio *Yest Peptone D-glucose* (YPD)

acrescido de 20% glicerol, no banco de microrganismos do Lab. de Fisiologia e Biologia Molecular de Fungos da UEL.

3.2 Obtenção de nanopartículas de prata biogênicas

3.2.1 Obtenção de sobrenadante livre de células (CFS)

Para a obtenção do sobrenadante livre de células (*cell-free supernatant* - CFS), o isolado *E. durans* (MF5) foi inoculado em caldo *Man Rogosa Sharpe* (MRS) (Acumedia) e incubado por 18 h, a 37 °C sob agitação de 180 rpm. Após este período, o cultivo foi inoculado (1% v/v) em meio MRS caldo, e incubado a uma temperatura de 37 °C por 18 h sob agitação de 180 rpm. O cultivo foi centrifugado durante 15 min a 5.000 rpm (Jouan MR1822), para sedimentação das células e o CFS filtrado (0,22 µm, Millipore, Merck) (Ogaki *et al.*, 2016).

3.2.2 Síntese de nanopartículas de prata biogênicas (Bio-AgNP)

A síntese de AgNP biogênicas foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Paulo *et al.* (2024) com modificações. Para tal, foi empregado o CFS do isolado MF5, obtidos conforme descrito no item 3.2.1. Para a síntese de AgNP foi realizada uma mistura de 3 mL de nitrato de prata (0,1M) e 3 mL de CFS (ambos correspondente a 10% do volume final da reação) em 30 mL de água ultrapura, seguido de exposição à luz solar indireta, em um ambiente claro, mas sem contato direto com os raios solares, por um período de 4 h. A recuperação das nanopartículas foi realizada através de três lavagens por centrifugação a 10.000 rpm por 40 min, e ao final as Bio-AgNPs foram ressuspensas em 1 mL de água ultrapura para uso ou armazenamento em congelador.

3.3 Caracterização das AgNPs

3.3.1 Confirmação de síntese de AgNP por espectroscopia UV-visível

A síntese de AgNP foi confirmada por meio da análise de UV-visível com espectros registrados na escala de 200 a 800 nm (espectrofotômetro UV-2600, Shimadzu) da solução resultado do item 3.2.2, e amostra controle foi a água utilizada para lavagens e ressuspensão das AgNP.

3.3.2 Quantificação de AgNPs

A quantificação da prata foi determinada por espectrometria de absorção atômica de chama (Phuc; Thien; Van Dong, 2023). As leituras foram realizadas no espectrofotômetro de absorção atômica com chama *Varian AA140* (Varian, CA, EUA). Uma curva de calibração foi realizada com diluições de uma solução de prata pura (Merck, Darmstadt, Alemanha). O comprimento de onda utilizado foi 328,1 nm, que corresponde ao comprimento de onda da absorção da radiação pela prata.

3.4 Avaliação da atividade antimicrobiana das Bio-AgNPs

3.4.1 Determinação da concentração inibitória mínima de Bio-AgNP

Para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de AgNP-Bio contra isolados clínicos de *C. parapsilosis*, foi empregada a metodologia de microdiluição em caldo, recomendada pelo *European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing* (EUCAST) de acordo com o documento E. Def. 7.3.2. O preparo das diluições seriadas foi feito com meio *Roswell Park Memorial Institute 1640* (RPMI 1640) contendo L-glutamina, bicarbonato de sódio, tamponado com ácido 3-N-morfolino propanosulfônico (MOPS – Sigma, MO, EUA) em pH 7,0 e suplementado

com 2% de glicose, em microplacas de 96 poços. Os inóculos foram preparados em concentrações duas vezes superiores as de uso na metodologia. As suspensões celulares foram ajustadas na densidade celular de 1×10^5 leveduras/mL em meio RPMI 1640. Posteriormente, 50 μ L da suspensão celular foi inoculada na placa de microtitulação juntamente com 50 μ L de meio e 50 μ L de Bio-AgNP a partir da diluição 1:4 na concentração de 6,4 μ g/mL. Os ensaios permaneceram incubados a 37 °C, por 24 h a 100 rpm, e para obtenção do valor da CIM a densidade óptica foi mensurada visualmente por método indicador redox utilizando o corante resazurina (0,5 mg/mL) de coloração azul, que na presença de atividade mitocondrial (somente em células viáveis) é convertida irreversivelmente em resorufina, apresentando coloração rosa que pode ser podendo determinar assim visualmente ou espectrofotometricamente. Após a incubação da placa foi aplicada 10 μ L de resazurina por poço e incubada por 1 h, onde o valor de CIM é a última diluição na qual os poços não apresentam atividade celular visível.

3.4.2 Determinação da concentração inibitória mínima de fluconazol

Também foi realizado o método de concentração inibitória mínima (CIM) para a confirmação de resistência dos isolados de *C. parapsilosis* ao antimicrobiano fluconazol. Segundo EUCAST (2020), os valores de CIM para fluconazol em *C. parapsilosis* é de $\leq 2,0$ μ g/mL para isolados sensíveis e $\geq 4,0$ μ g/mL para isolados resistentes. A partir desta informação, 50 μ L da suspensão celular ajustada a 1×10^5 leveduras/mL foi inoculada na placa de microtitulação juntamente com 50 μ L de meio e 50 μ L fluconazol, nas concentrações pré-definidas de 2,0 μ g/mL e 4,0 μ g/mL, a placa foi incubada a 37 °C, por 24 h a 100 rpm, seguido da aplicação

de 10 µL do corante resazurina e incubação por mais 1 h. O resultado foi determinado visualmente pela coloração resultante, assim como descrito no tópico anterior.

3.4.3 Determinação da Atividade Inibitória por UFC

Para avaliar a atividade Candidada das Bio-AgNPs foram determinadas as Unidades Formadoras de Colônias (UFC). Para tal, uma alíquota de 10 µL foi retirada das diluições do ensaio de microdiluição (diluição correspondente ao CIM, duas diluições anteriores ao CIM, uma diluição posterior ao CIM e o controle positivo). As alíquotas foram adicionadas em um microtubo com 90 µL de tampão *Phosphate buffered saline* (PBS) e deste foram realizadas diluições seriadas de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} , que foram inoculadas em gotas de 10 µL em placas contendo meio YPD, e foram incubadas a 37 °C por 24 h. Quando houve crescimento, foi realizada a contagem de UFC. O ensaio foi realizado em duplicata e os dados foram analisados estatisticamente pelo teste *one-way* ANOVA ($p < 0,05$) e pós teste de Dunnett por meio de *software* Excel e GraphPad Prism 8.0.1.

3.4.4 Microscopia de Fluorescência

A análise de microscopia de fluorescência foi feita com um corante fluorescente impermeável à membrana, iodeto de propídio (PI) (Sigma-Aldrich, Alemanha), que só é permeável a células com membrana danificada. Células de *C. parapsilosis* (1×10^6 leveduras/mL) foram expostas a Bio-AgNP na concentração do CIM por 48h em uma placa de 24 poços contendo uma lamínula redonda e após esse período, as amostras foram lavadas uma vez com PBS e incubadas por 15 min em temperatura ambiente no escuro com 10 µL de PI a 100 µg/mL (Johnson; Criss, 2013). Após a isso a lamínula pode ser observada utilizando um microscópio de

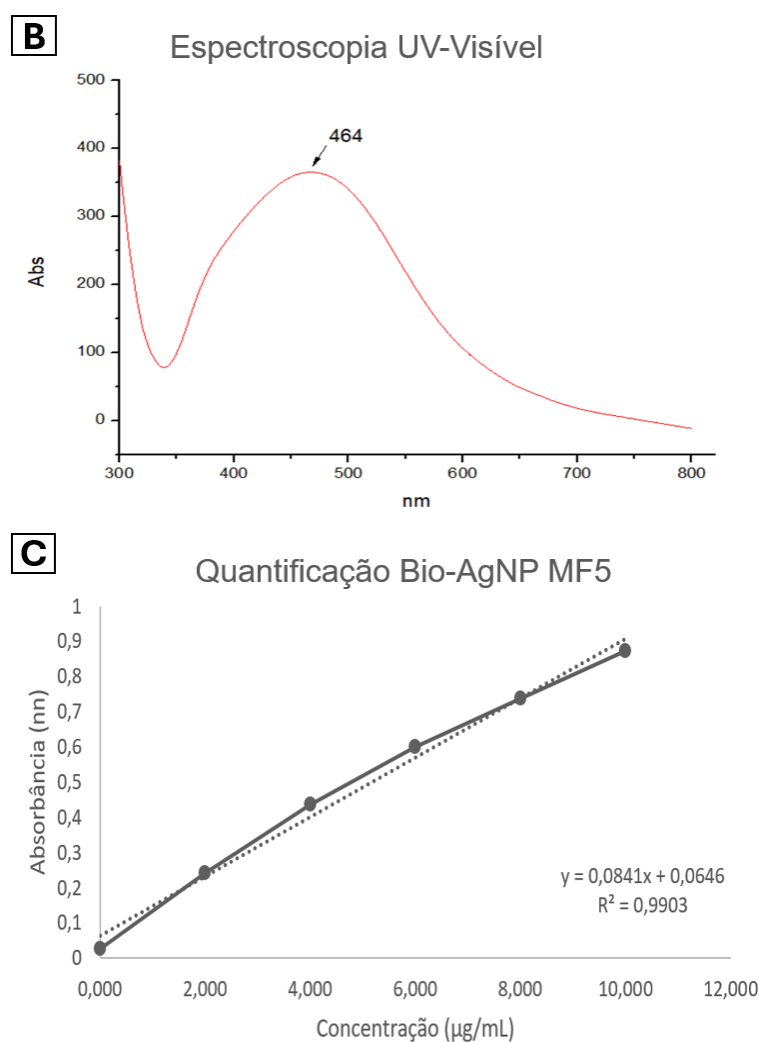
epifluorescência (Zeiss, Alemanha) com filtros específicos para excitação (535 nm) e emissão (617 nm) do PI. As células com coloração avermelhada foram consideradas inviáveis.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A produção de Bio-AgNPs pode ser observada pela alteração na coloração da reação, após o período de exposição a luz indireta, devido à redução de íons prata e formação das NPs, a alteração de cor de amarelo para marrom é indicativo de formação de AgNPs, conforme apresentado na figura 4A. A absorção plasmônica foi observada em 464 nm na região visível do espectro de UV-visível (Figura 4B). A quantificação por espectrometria de absorção atômica de chama indicou 25,63 µg/mL de Bio-AgNP recuperadas ao final da produção (figura 4C).

Figura 4. (A) Sobrenadante livre de células (CFS) de *Enterococcus durans* MF5 com solução de AgNO₃ (0,1M) antes e após o período de exposição à luz solar indireta promovendo mudanças de cor e indicando a biossíntese de AgNPs, (B) Espectro de absorção UV-Vis de Bio-AgNPs. (C) Quantificação das Bio-AgNPs por espectrometria de absorção atômica de chama resultando em 25,63 µg/mL. Siglas: UV: ultravioleta. nm: nanômetros. Abs: absorbância. Bio-AgNP: nanopartícula de prata biogênica. µg/mL: microgramas por mililitros.





Fonte: Próprio autor.

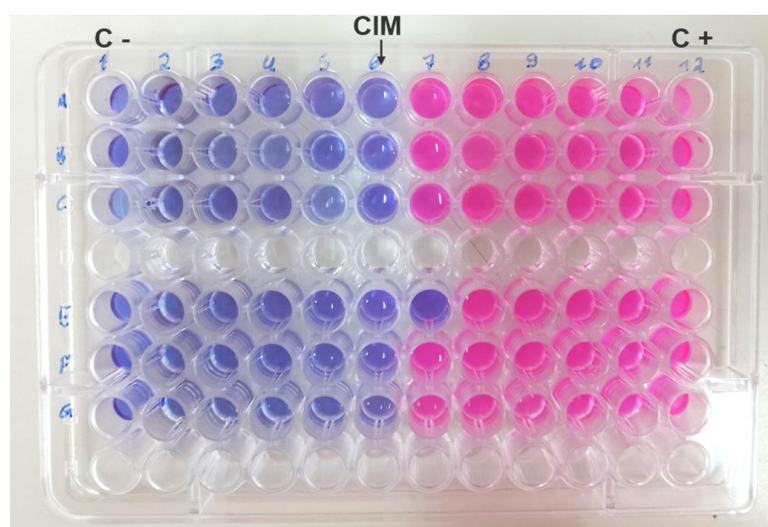
Neste estudo, a biossíntese de Bio-AgNPs ocorreu pelo emprego de sobrenadante livre de cultivo (CFS) da bactéria ácido láctica *E. durans* produtora de enterocinas MF5 (Ent-MF5) (de Souza, 2024), como descrito por Paulo *et al.*, (2024). Segundo estes autores, foi observada a presença da enterocina recobrindo as Bio-AgNPs através dos espectros de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).

Shu *et al.*, (2020) descreveram a biossíntese de nanoconjugados de nanopartículas de prata revestidas de bacteriocina (Bac-NPs) usando duas bacteriocinas, Bac4463 e Bac22, obtidas de *Lactobacillus brevis* e *Lactobacillus herbarum*. Segundo estes autores, as Bac-NPs apresentaram ação inibitória efetiva contra bactérias patogênicas veiculadas por alimentos. Outros autores também tiveram

sucesso na obtenção de NPs empregando a bacteriocina nisina (Pandit; Rai; Santos, 2017). A atividade antimicrobiana aumentada do nanoconjugados de AgNPs com bacteriocinas e efeitos positivos na preservação de alimentos e na extensão da vida útil têm sido descritos (Pineda *et al.*, 2024). A presença de moléculas de origem biológica, por exemplo Ent-MF5, pode atribuir vantagens às nanopartículas metálicas, podendo promover melhor desempenho em possíveis alvos no patógeno (Paulo *et al.*, 2024).

Como descrito anteriormente, a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi avaliada pelo método de microdiluição em caldo (item 3.4.1). A concentração de Bio-AgNPs capaz de inibir o crescimento dos isolados de *C. parapsilosis* foi observada visualmente por meio do reagente resazurina (fenoxazin-3-ona) que, quando adicionado ao ensaio é reduzido por produtos da respiração celular microbiana a resorufina, com alteração de cor azul para cor de rosa (Roca *et al.*, 2019), como demonstrado pela figura 5.

Figura 5. Ensaio de determinação de concentração inibitória mínima (CIM) de Bio-AgNPs contra *Candida parapsilosis*, colorido pelo reagente indicador resazurina. A seta indica o valor de CIM, **C-** representa o controle negativo (somente meio de cultivo) e **C+** representa o controle positivo (meio de cultivo e inóculo).



Fonte: Próprio autor.

As Bio-AgNPs produzidas foram eficazes contra os isolados de *C. parapsilosis* resistentes ao fluconazol testados, com valores de CIM de 0,2 µg/mL para os isolados clínicos 117.11, 185.11 e 390.11, como mostrado na tabela 2. Os isolados 262.10 e 357.10, assim como a linhagem ATCC22019, apresentaram valor de CIM 50% inferior à dos demais (0,1 µg/mL), sendo estes mais sensível às Bio-AgNPs. A resistência ao fluconazol destes isolados foi confirmada por meio do ensaio de microdiluição utilizando os parâmetros determinados por EUCAST (2020), onde CIM ≤ 2 µL representa sensibilidade e CIM ≥ 4 µL representa resistência.

Tabela 2. Concentração Inibitória Mínima (CIM) de fluconazol e Bio-AgNPs contra isolados de *Candida parapsilosis* e viabilidade celular determinada por Unidades Formadoras de Colônias (UFC) após exposição às Bio-AgNPs com seus valores de inibição em relação a amostra controle em porcentagem. Siglas: µL: microlitros. µg/mL: microgramas por mililitros. UFC/mL: unidades formadoras de colônias por mililitros.

Isolados de <i>Candida parapsilosis</i>	CIM Fluconazol (µL)	CIM Bio-AgNP (µg/mL)	Viabilidade após Bio-AgNP (UFC/mL)	Inibição em relação ao controle (%)
ATCC22019	≥ 4,0	0,1	19,5	99,64
262.10	≥ 4,0	0,1	33	99,77
357.10	≥ 4,0	0,1	27,75	99,82
117.11	≥ 4,0	0,2	55	99,31
185.11	≥ 4,0	0,2	353,25	96,89
390.11	≥ 4,0	0,2	7,25	99,95

Fonte: Próprio autor.

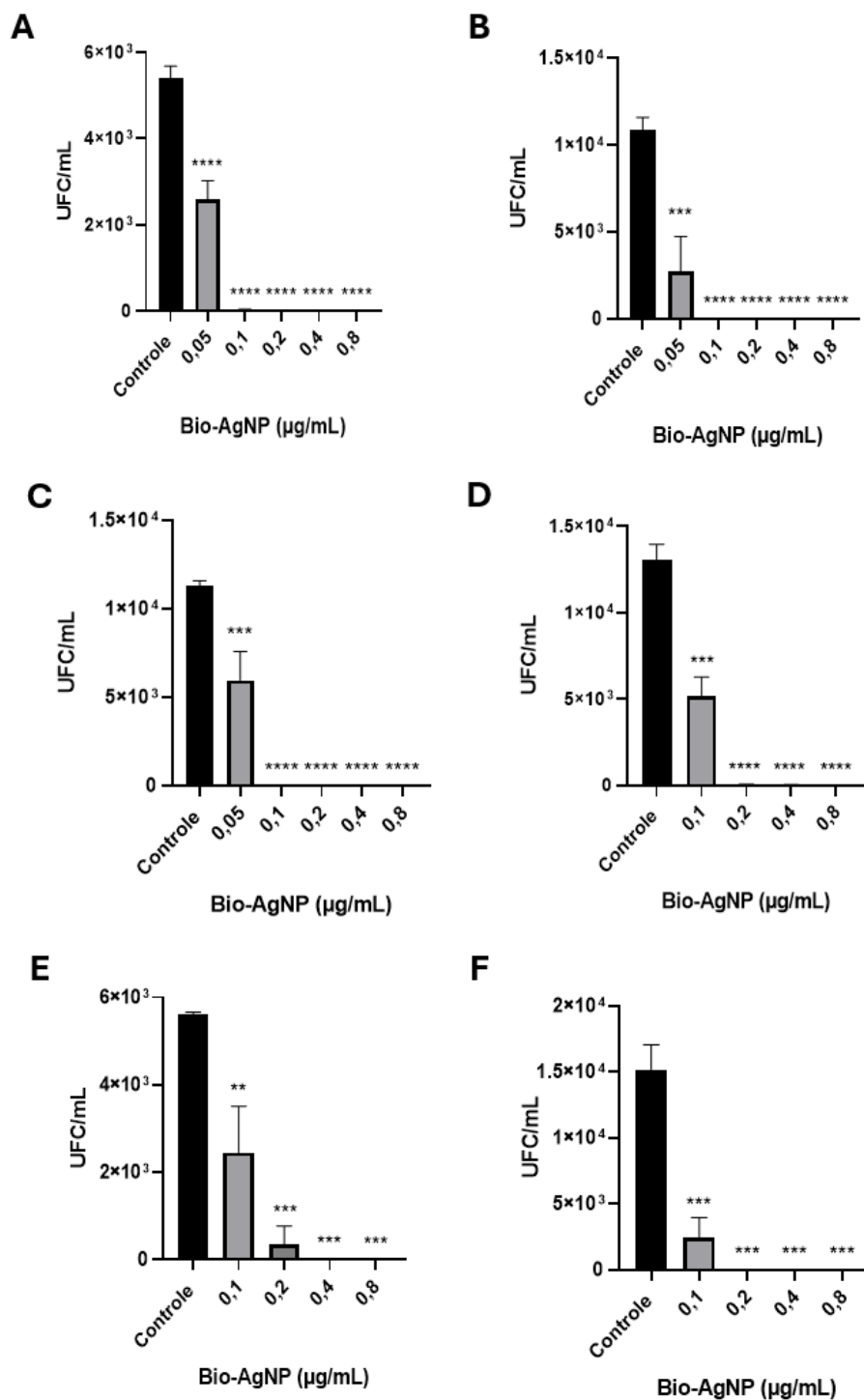
De acordo com a literatura, a determinação da concentração fungicida/Candidacida mínima de compostos antifúngicos, como nanopartículas de prata (AgNPs), varia amplamente devido a fatores relacionados a características

únicas como mecanismos de ação e composição, diferentemente dos antimicrobianos convencionais que já possuem seus parâmetros e mecanismos descritos detalhadamente. Por estes fatores, a determinação de CIM requer testes específicos para cada situação, sendo assim, é comum pesquisadores determinarem os valores caso a caso.

Em condições semelhantes, autores como Capoci *et al.*, (2019) definem a atividade fungicida mínima como aquela que resulta em 99,9% de morte celular, enquanto Ribeiro *et al.*, (2023) consideram que um percentual acima de 90% de morte celular já caracteriza a atividade fungicida correspondendo ao percentual utilizado no presente estudo.

No presente estudo, as Bio-AgNPs nas concentrações de CIM, mostraram efeito Candidacida com 99% de inibição para todos os isolados de *Candida parapsilosis*, exceto para o isolado 185.11, em que a ação das Bio-AgNPs foi de 96,89% de morte celular. Em concentrações de Bio-AgNPs correspondentes ao CIM (0,2 e 0,1 µg/mL) e 50% do valor de CIM (0,1 e 0,05 µg/mL) para todos os isolados clínicos e linhagem ATCC22019, a morte celular foi significativamente superior comparativamente ao controle (figura 6).

Figura 6. Viabilidade de isolados de *Candida parapsilosis* após exposição a diferentes concentrações de Bio-AgNPs, expressa por Unidade Formadora de Colônia (UFC)/mL. Sendo (A) *C. parapsilosis* ATCC22019, (B) *C. parapsilosis* 262.10, (C) *C. parapsilosis* 357.10, (D) *C. parapsilosis* 117.11, (E) *C. parapsilosis* 185.11 e (F) *C. parapsilosis* 390.11. Controle: amostra sem exposição a Bio-AgNPs. ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0005$, **** $p < 0,0001$. Siglas: UFC/mL: Unidades formadoras de colônias por mililitros. Bio-AgNP: nanopartícula de prata biogênica. $\mu\text{g/mL}$: microgramas por mililitros.



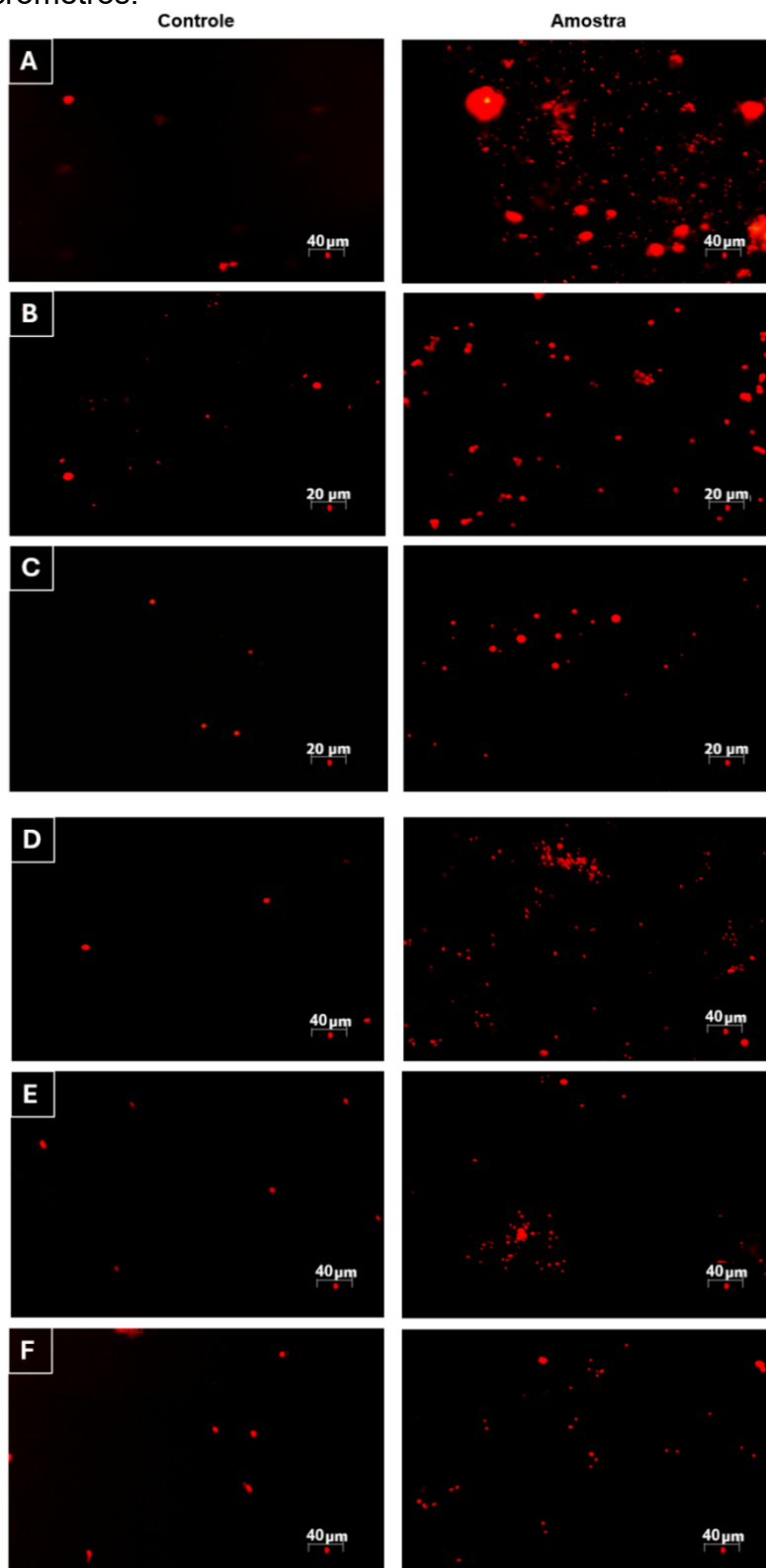
Segundo a literatura, AgNPs biogênicas obtidas empregando isolados fúngicos também tem sido testadas contra *C. parapsilosis* sendo uma prática amplamente explorada em diversos estudos (Fonseca *et al.*, 2022; Jalal *et al.*, 2018; Soliman *et al.*, 2021). Jalal *et al.* (2018) produziram AgNPs a partir de *C. glabrata*, e obteve valores de CIM e concentração fungicida mínima (CFM) de 250 µg/mL e 500 µg/mL, respectivamente. Em estudo de Soliman *et al.*, (2021), AgNPs produzidas pelo emprego de *Penicillium chrysogenum* apresentaram CIM de 31,5 µg/mL contra *C. parapsilosis*. Já Fonseca *et al.*, (2022) obtiveram AgNPs empregando *Fusarium oxysporum*, os valores de CIM e CFM contra *C. parapsilosis* foram 7,8 µg/mL e < 1000 µg/mL, respectivamente, onde as AgNPs causaram danos à superfície e ruptura celular. Segundo estes autores, *C. parapsilosis* foi menos suscetível às AgNPs comparativamente a outras espécies do gênero do *Candida*.

Considerando os dados do presente estudo, as Bio-AgNPs produzidas a partir de BALs foram eficazes contra *C. parapsilosis*, pois apresentaram valores de CIM (0,2 e 0,1 µg/mL) inferiores aos descritos na literatura, com inibição diretamente por morte celular (Candidacida), como confirmado pelo ensaio de UFC (figura 6). A grande variação na atividade inibitória de nanopartículas biogênicas está diretamente relacionado com as diferentes composições dos extratos utilizados para a síntese, onde componentes presentes nos extratos que passam a fazer o recobrimento da nanopartícula biossintetizadas. Neste trabalho foi utilizado para a biossíntese de AgNPs, sobrenadante de BALs que produzem enterocinas com atividade inibitória já confirmadas anteriormente por nosso grupo e em outros trabalhos, sendo o principal mecanismo de ação a abertura de poros na membrana com consequente morte celular (Ramalho *et al.*, 2023).

Paulo *et al.*, (2024) utilizaram a mesma metodologia de obtenção de Bio-AgNP e testou a ação das nanopartículas contra isolados clínicos de *C. tropicalis*. Segundo estes autores, a maioria (67%) dos isolados de *C. tropicalis* apresentaram interação sinérgica entre Bio-AgNPs e fluconazol, empregando o método de Índice de concentração inibitória fracionária. Além disso, o valor de CIM50 e CIM80, que inibem 50% e 80% do crescimento, respectivamente, foram em concentrações de 0,125 a 0,502 µg/mL e 0,251 a 2,01 µg/mL, respectivamente. Diferentemente, no presente estudo, foi observado CIM de 0,1 µg/mL para *C. parapsilosis* 262.10, 357.10 e ATCC22019, e 0,2 µg/mL para os demais isolados. Sendo assim Bio-AgNPs foi efetiva contra *C. parapsilosis*, sendo esta espécie mais suscetível a Bio-AgNPs comparativamente ao observado para *C. tropicalis*. Desta forma, testes de sinergismo entre estas nanopartículas e fármacos empregados na prática clínica, a exemplo de fluconazol e anfotericina B, poderão ser realizados futuramente, com o objetivo de demonstrar o potencial destas nanopartículas sintetizadas via síntese verde no controle de *C. parapsilosis*.

Neste estudo, foi realizada a análise do possível mecanismo de ação de Bio-AgNPs em células de *C. parapsilosis* por meio de microscopia de fluorescência, empregando o marcador iodeto de propídio (PI) que é usado para análise de integridade de membrana, pois é impermeável a membranas intactas, penetrando apenas células não íntegras. Embora a análise por microscopia de fluorescência seja qualitativa, ela confirma uma quantidade maior de células mortas após a exposição às Bio-AgNPs em comparação com a amostra controle (figura 7), que apresenta algumas células marcadas, porém em menor quantidade, devido à ocorrência de mortes naturais em populações sem tratamento (Arévalo-Jaimes; Torrents, 2024).

Figura 7: Análise de microscopia de fluorescência por iodeto de propídio (IP) de amostra e controle após exposição as nanopartículas de prata biossintetizadas (Bio-AgNP) em células de *Candida parapsilosis* dos isolados (A) ATCC22019, (B) 262.10, (C) 357.10, (D) 117.11, (E) 185.11 e (F) 390.11, onde células marcadas em vermelho não são viáveis. Aumento de 20 vezes em B e C e 40 vezes para os demais isolados. Siglas: μm : micrometros.



Fonte: Próprio autor.

O presente trabalho, identificou atividade antimicrobiana para cepas resistentes de *C. parapsilosis*, informação que pode corroborar resultados obtidos por outro pesquisador que estudou os efeitos da AgNP biossintetizadas a partir de extrato vegetal em *Candida spp.* (Jalal *et al.*, 2019). Segundo estes autores, foi observado que as AgNPs atuam inibindo a produção extracelular de fosfolipases em até 6,7 % em *C. parapsilosis*, sendo que estas estão associadas à adesão, indução de tubos germinativos, transição de levedura para formas hifas, penetração e lesão tecidual, que são importantes mecanismos de virulência dessa levedura.

Estudos como este são de grande importância a fim de colaborar com a busca de novas alternativas para os antimicrobianos atualmente usados para *C. parapsilosis*, de forma a reduzir a crescente de resistência microbiana com opções de menor custo e com menos efeitos colaterais, além de desenvolver novas pesquisas no ramo das nanopartículas. Entender o funcionamento e particularidades de cada composto é o ponto principal para aplicação futura, pelo mesmo motivo, estudos envolvendo os efeitos das AgNPs nos microrganismos também são valiosos, sendo de extrema importância para uma possível aplicação real destes compostos na área médica. O processo ainda é lento e faltam dados quanto ao assunto, isso afeta negativamente a capacidade de responder à demanda crescente de alternativas.

5. CONCLUSÕES

Neste estudo, a bactéria ácido-lática *E. durans* mostrou-se promissora na produção de Bio-AgNPs, potencialmente eficazes como alternativas terapêuticas contra *C. parapsilosis*. Essas nanopartículas apresentaram eficácia no controle de crescimento desta espécie fúngica de importância clínica crescente. Isto posto, testes de sinergismo entre as Bio-AgNPs e fármacos de uso clínico, bem como associação

com compostos naturais, além de avaliação de mecanismos de ação poderão ser realizados futuramente. Ensaios de toxicidade em linhagens celulares ampliarão o potencial de aplicabilidade destas nanopartículas.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, R. *et al.* Silver Nanoparticles: Synthesis, Structure, Properties and Applications. **Nanomaterials**, [s. l.], v. 14, n. 17, p. 1425, 2024.
- ARÉVALO-JAIMES, B. V.; TORRENTS, E. Died or Not Dyed: Assessment of Viability and Vitality Dyes on Planktonic Cells and Biofilms from *Candida parapsilosis*. **Journal of Fungi**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 209, 2024.
- ASOGAN, M. *et al.* *Candida parapsilosis*: A systematic review to inform the World Health Organization fungal priority pathogens list. **Medical Mycology**, [s. l.], v. 62, n. 6, p. myad131, 2024.
- BAYS, D. J. *et al.* Epidemiology of Invasive Candidiasis. **Clinical Epidemiology**, [s. l.], v. 16, p. 549–566, 2024.
- BHARTI, S. *et al.* Synthesis of bio-stabilized silver nanoparticles using *Roccella montagnei*, their antiCandidal capacities & potential to inhibit the virulence factors in fluconazole-resistant *Candida albicans*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 40, n. 5, p. 158, 2024.
- BOHNER, F.; GACSER, A.; TOTH, R. Epidemiological Attributes of *Candida* Species in Tropical Regions. **Current Tropical Medicine Reports**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. 59–68, 2021.
- BONGOMIN, F. *et al.* Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases—Estimate Precision. **Journal of Fungi**, [s. l.], v. 3, n. 4, p. 57, 2017.
- BRANCO, J. *et al.* The transcription factor Ndt80 is a repressor of *Candida parapsilosis* virulence attributes. **Virulence**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 601–614, 2021.
- BRANCO, J.; MIRANDA, I. M.; RODRIGUES, A. G. *Candida parapsilosis* Virulence and Antifungal Resistance Mechanisms: A Comprehensive Review of Key Determinants. **Journal of Fungi**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 80, 2023.
- BRILHANTE, R. S. N. *et al.* Antifungal susceptibility and virulence of *Candida parapsilosis* species complex: an overview of their pathogenic potential. **Journal of Medical Microbiology**, [s. l.], v. 67, n. 7, p. 903–914, 2018.
- BURLEC, A. F. *et al.* Current Overview of Metal Nanoparticles' Synthesis, Characterization, and Biomedical Applications, with a Focus on Silver and Gold Nanoparticles. **Pharmaceuticals**, [s. l.], v. 16, n. 10, p. 1410, 2023.

- BÚSSOLO, T. B. *et al.* Soybean flour as a substrate to obtain *Enterococcus durans* bacteriocins. **Ciência e Agrotecnologia**, [s. l.], v. 46, p. e008022, 2022.
- CANELA, H. M. S. *et al.* Prevalence, virulence factors and antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from bloodstream infections in a tertiary care hospital in Brazil. **Mycoses**, [s. l.], v. 61, n. 1, p. 11–21, 2018.
- CAPOCI, I. R. G. *et al.* Two New 1,3,4-Oxadiazoles With Effective Antifungal Activity Against *Candida albicans*. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 10, p. 2130, 2019.
- CASTANHEIRA, M. *et al.* Analysis of global antifungal surveillance results reveals predominance of Erg11 Y132F alteration among azole-resistant *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis* and country-specific isolate dissemination. **International Journal of Antimicrobial Agents**, [s. l.], v. 55, n. 1, p. 105799, 2020.
- CHEN, L.; XIE, Z.; JIAN, J. Epidemiology and Risk Factors of Candidemia a 8-Year Retrospective Study from a Teaching Hospital in China. **Infection and Drug Resistance**, [s. l.], v. 17, p. 3415–3423, 2024.
- CORZO-LEON, D. E. *et al.* General hospital outbreak of invasive candidiasis due to azole-resistant *Candida parapsilosis* associated with an Erg11 Y132F mutation. **Medical Mycology**, [s. l.], v. 59, n. 7, p. 664–671, 2021.
- CZERNEL, G. *et al.* Biodirected Synthesis of Silver Nanoparticles Using Aqueous Honey Solutions and Evaluation of Their Antifungal Activity against Pathogenic *Candida* Spp. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 22, n. 14, p. 7715, 2021.
- DA COSTA, V. G. *et al.* Nosocomial Bloodstream *Candida* Infections in a Tertiary-Care Hospital in South Brazil: A 4-Year Survey. **Mycopathologia**, [s. l.], v. 178, n. 3–4, p. 243–250, 2014.
- DA SILVA, E. M. *et al.* High colonization by *Candida parapsilosis sensu stricto* on hands and surfaces in an adult intensive care unit. **Journal of Medical Mycology**, [s. l.], v. 31, n. 2, p. 101110, 2021.
- DARBANDI, A. *et al.* Bacteriocins: Properties and potential use as antimicrobials. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, [s. l.], v. 36, n. 1, p. e24093, 2022.
- DAS, C. G. A. *et al.* Antibacterial activity of silver nanoparticles (biosynthesis): A short review on recent advances. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [s. l.], v. 27, p. 101593, 2020.
- EUCAST (2020). Antifungal MIC method for yeasts. Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts; (E.DEF 7.3.2); **EUCAST Development Laboratory for Fungi**: Copenhagen, Denmark, 2020.
- FONSECA, M. S. *et al.* Activity of *Fusarium oxysporum*-Based Silver Nanoparticles on *Candida* spp. Oral Isolates. **Nanomaterials**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 501, 2022.

FONSECA, S. N. S. Overview of invasive fungal infections in children in South America – the threat of resistant *Candida* species and the role of climate change in the new geographic distribution of endemic systemic mycosis. **Current Opinion in Pediatrics**, [s. l.], v. 36, n. 2, p. 136–143, 2024.

FRANCONI, I. *et al.* *Candida parapsilosis Sensu stricto* Antifungal Resistance Mechanisms and Associated Epidemiology. **Journal of Fungi**, [s. l.], v. 9, n. 8, p. 798, 2023.

FURLANETO-MAIA, L. *et al.* Antimicrobial activity of enterocins against *Listeria* sp. and other food spoilage bacteria. **Biotechnology Letters**, [s. l.], v. 42, n. 5, p. 797–806, 2020.

GAO, S. *et al.* Antifungal activity of nisin against clinical isolates of azole-resistant *Candida tropicalis*. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 15, p. 1383953, 2024.

GIACOBBE, D. R. *et al.* Changes in the relative prevalence of *Candidaemia* due to non- *albicans* *Candida* species in adult in-patients: A systematic review, meta-analysis and meta-regression. **Mycoses**, [s. l.], v. 63, n. 4, p. 334–342, 2020.

GOVRINS, M.; LASS-FLÖRL, C. *Candida parapsilosis* complex in the clinical setting. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 46–59, 2024.

JALAL, M. *et al.* Anti*Candidal* activity of biosynthesized silver nanoparticles: effect on growth, cell morphology, and key virulence attributes of *Candida* species. **International Journal of Nanomedicine**, [s. l.], v. Volume 14, p. 4667–4679, 2019.

JALAL, M. *et al.* Biosynthesis of Silver Nanoparticles from Oropharyngeal *Candida glabrata* Isolates and Their Antimicrobial Activity against Clinical Strains of Bacteria and Fungi. **Nanomaterials**, [s. l.], v. 8, n. 8, p. 586, 2018.

JANGID, H. *et al.* Advancing biomedical applications: an in-depth analysis of silver nanoparticles in antimicrobial, anticancer, and wound healing roles. **Frontiers in Pharmacology**, [s. l.], v. 15, 2024. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/pharmacology/articles/10.3389/fphar.2024.1438227/full>. Acesso em: 22 jan. 2025.

JOHNSON, M. B.; CRISS, A. K. Fluorescence Microscopy Methods for Determining the Viability of Bacteria in Association with Mammalian Cells. **Journal of Visualized Experiments (JoVE)**, [s. l.], n. 79, p. e50729, 2013.

LEE, S. H.; JUN, B.-H. Silver Nanoparticles: Synthesis and Application for Nanomedicine. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 20, n. 4, p. 865, 2019.

LEITE-JR, *et al.* The *Candida* Genus Complex: Biology, Evolution, Pathogenicity Virulence and One Health Aspects, Beyond the *Candida albicans* Paradigm. A Comprehensive Review. **Virology & Immunology Journal**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 1–38, 2023.

LIU, J.-Y.; DICKTER, J. K. Nosocomial Infections. **Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America**, [s. l.], v. 30, n. 4, p. 637–652, 2020.

MADKHALI, O. A. A comprehensive review on potential applications of metallic nanoparticles as antifungal therapies to combat human fungal diseases. **Saudi Pharmaceutical Journal**, [s. l.], v. 31, n. 9, p. 101733, 2023.

MALIK, A. Q. *et al.* A review on the green synthesis of nanoparticles, their biological applications, and photocatalytic efficiency against environmental toxins. **Environmental Science and Pollution Research**, [s. l.], v. 30, n. 27, p. 69796–69823, 2023.

MARE, A. D. *et al.* In Vitro Antifungal Activity of Silver Nanoparticles Biosynthesized with Beech Bark Extract. **Plants**, [s. l.], v. 10, n. 10, p. 2153, 2021a.

MARE, A. D. *et al.* Silver Nanoparticles Biosynthesized with Spruce Bark Extract—A Molecular Aggregate with Antifungal Activity against *Candida* Species. **Antibiotics**, [s. l.], v. 10, n. 10, p. 1261, 2021b.

MASIAS, E. *et al.* Impairment of the class IIa bacteriocin receptor function and membrane structural changes are associated to enterocin CRL35 high resistance in *Listeria monocytogenes*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, [s. l.], v. 1861, n. 7, p. 1770–1776, 2017.

MEDEIROS, M. A. P. D. *et al.* Epidemiology and prognostic factors of nosocomial candidemia in Northeast Brazil: A six-year retrospective study. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 14, n. 8, p. e0221033, 2019.

MESINI, A. *et al.* Changing epidemiology of *Candidaemia*: Increase in fluconazole-resistant *Candida parapsilosis*. **Mycoses**, [s. l.], v. 63, n. 4, p. 361–368, 2020.

MOKOENA, M. P. Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins: Classification, Biosynthesis and Applications against Uropathogens: A Mini-Review. **Molecules**, [s. l.], v. 22, n. 8, p. 1255, 2017.

MULANI, M. S. *et al.* Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 10, p. 539, 2019.

NIVOIX, Y.; LEDOUX, M.-P.; HERBRECHT, R. Antifungal Therapy: New and Evolving Therapies. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, [s. l.], v. 41, n. 01, p. 158–174, 2020.

OGAKI, M. B. *et al.* Screening of the Enterocin-Encoding Genes and Antimicrobial Activity in *Enterococcus* Species. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 26, n. 6, p. 1026–1034, 2016.

OLADIPO, I. C. *et al.* Enterococcus species for the one-pot biofabrication of gold nanoparticles: Characterization and nanobiotechnological applications. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, [s. l.], v. 173, p. 250–257, 2017.

PANDIT, R.; RAI, M.; SANTOS, C. A. Enhanced antimicrobial activity of the food-protecting nisin peptide by bioconjugation with silver nanoparticles. **Environmental Chemistry Letters**, [s. l.], v. 15, n. 3, p. 443–452, 2017.

- PAPPAS, P. G. *et al.* Invasive candidiasis. **Nature Reviews Disease Primers**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 18026, 2018.
- PAULO, E. A. *et al.* One-Pot and Environmentally Friendly Biosynthesis of Silver Nanoparticles from *Enterococcus durans*: Activity Against Fluconazole-Resistant Pathogenic *Candida tropicalis*. **BioNanoScience**, [s. l.], v. 14, n. 2, p. 892–902, 2024.
- PEIXOTO, P. H. *et al.* Clinical, Epidemiological and Laboratory Features of Invasive *Candida parapsilosis* Complex Infections in a Brazilian Pediatric Reference Hospital during the COVID-19 Pandemic. **Journal of Fungi**, [s. l.], v. 9, n. 8, p. 844, 2023.
- PHUC, L. D.; THIEN, V. H.; VAN DONG, N. Analysis of silver nanoparticles by flame atomic absorption spectrometry. **Vietnam Journal of Chemistry**, [s. l.], v. 61, n. S2, p. 109–117, 2023.
- PINEDA, M. E. B. *et al.* Nanocomposites: silver nanoparticles and bacteriocins obtained from lactic acid bacteria against multidrug-resistant *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 40, n. 11, p. 341, 2024.
- PRISTOV, K. E.; GHANNOUM, M. A. Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. **Clinical Microbiology and Infection**, [s. l.], v. 25, n. 7, p. 792–798, 2019.
- PROSEKOV, A. Y. *et al.* Antioxidant and antimicrobial activity of bacteriocin-producing strains of lactic acid bacteria isolated from the human gastrointestinal tract. **Progress in Nutrition**, [s. l.], v. 19, n. 1, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.23751/pn.v19i1.5147>. Acesso em: 17 jan. 2025.
- RAMALHO, R. *et al.* Antibacterial efficacy of *Enterococcus* microencapsulated bacteriocin on *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* and *Listeria ivanovi*. **Journal of Food Science and Technology**, [s. l.], v. 60, n. 1, p. 262–271, 2023.
- RIBEIRO, L. G. *et al.* Antifungal Activity of Mycogenic Silver Nanoparticles on Clinical Yeasts and Phytopathogens. **Antibiotics**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 91, 2023.
- RICOTTA, E. E. *et al.* Invasive Candidiasis Species Distribution and Trends, United States, 2009–2017. **The Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 223, n. 7, p. 1295–1302, 2021.
- ROCA, B. M. *et al.* Avaliação do uso da resazurina em teste de suscetibilidade in vitro frente a *Sporothrix brasiliensis*. **VITTALLE - Revista de Ciências da Saúde**, [s. l.], v. 31, n. 2, p. 32–37, 2019.
- ROCHA, W. R. V. D. *et al.* Gênero *Candida* - Fatores de virulência, Epidemiologia, Candidíase e Mecanismos de resistência. **Research, Society and Development**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. e43910414283, 2021.
- SARAVANA, K.P.; ANNALAKSHMI, A. Enhancing the antimicrobial activity of nisin by encapsulating on silver nanoparticle synthesized by *Bacillus* sp. **International Journal of Pharmaceutical and Biological Archive**. v. 3, 406-410, 12 set. 2012.

SHENG, Z.; LIU, Y. Potential impacts of silver nanoparticles on bacteria in the aquatic environment. **Journal of Environmental Management**, [s. l.], v. 191, p. 290–296, 2017.

SHU, M. *et al.* Biosynthesis and Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Using Yeast Extract as Reducing and Capping Agents. **Nanoscale Research Letters**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 14, 2020.

SIDHU, P. K.; NEHRA, K. Bacteriocin-capped silver nanoparticles for enhanced antimicrobial efficacy against food pathogens. **IET Nanobiotechnology**, [s. l.], v. 14, n. 3, p. 245–252, 2020.

SINGH, J. *et al.* 'Green' synthesis of metals and their oxide nanoparticles: applications for environmental remediation. **Journal of Nanobiotechnology**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 84, 2018.

SOLIMAN, A. M. *et al.* Green Approach to Overcome the Resistance Pattern of *Candida* spp. Using Biosynthesized Silver Nanoparticles Fabricated by *Penicillium chrysogenum* F9. **Biological Trace Element Research**, [s. l.], v. 199, n. 2, p. 800–811, 2021.

SONBOL, F. I. *et al.* Antimicrobial activity of bacteriocins produced by *Enterococcus* isolates recovered from Egyptian homemade dairy products against some foodborne pathogens. **International Microbiology**, [s. l.], v. 23, n. 4, p. 533–547, 2020.

SOUZA, N.A.A. *et al.* Potential of enterocin from *Enterococcus durans* MF5 in controlling *Listeria* species. **Journal of Dairy Research**. 2024 (aceito para publicação -prelo).

SWOLANA, D.; WOJTYCZKA, R. D. Activity of Silver Nanoparticles against *Staphylococcus* spp. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 23, n. 8, p. 4298, 2022.

TOSONI, N. F. *et al.* Antimicrobial activity of enterocin obtained from *Enterococcus durans* on Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli*. **Ciência Rural**, [s. l.], v. 49, p. e20190297, 2019.

TÓTH, R. *et al.* *Candida parapsilosis*: from Genes to the Bedside. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 32, n. 2, p. e00111-18, 2019.

VIJAYARAM, S. *et al.* Applications of Green Synthesized Metal Nanoparticles — a Review. **Biological Trace Element Research**, [s. l.], v. 202, n. 1, p. 360–386, 2024.

WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action. Geneva: **World Health Organization**; 2022.

WON, E. J.; SUNG, H.; KIM, M.-N. Changing Epidemiology of Clinical Isolates of *Candida* Species during the Coronavirus Disease 2019 Pandemic: Data Analysis from a Korean Tertiary Care Hospital for 6 Years (2017–2022). **Journal of Fungi**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 193, 2024.