



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA



MARCUS VINICIUS MENDES VALE AMARAL

Produção de nanopartículas de prata (AgNPs) pelo fungo *Trichoderma reesei* e sua aplicação contra a COVID-19/SARS-CoV-2

RIBEIRÃO PRETO – SP

2022

MARCUS VINICIUS MENDES VALE AMARAL

Produção de nanopartículas de prata (AgNPs) pelo fungo *Trichoderma reesei* e sua aplicação contra a COVID-19/SARS-CoV-2

Versão corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Bioquímica

Orientador: Prof. Dr. Roberto do Nascimento Silva

RIBEIRÃO PRETO – SP

2022

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Amaral, Marcus Vinicius Mendes Vale

Produção de nanopartículas de prata (AgNPs) pelo fungo *Trichoderma reesei* e sua aplicação contra a COVID-19/SARS-CoV-2. Ribeirão Preto, 2022.

108 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Roberto do Nascimento Silva.

1. Nanopartículas de prata; 2. COVID-19; 3. SARS-CoV-2; 4. *Trichoderma reesei*; 5. Síntese biológica; 6. Potencial antiviral.

Amaral, M.V.M.V. **Produção de nanopartículas de prata (AgNPs) pelo fungo *Trichoderma reesei* e sua aplicação contra a COVID-19/SARS-CoV-2.** Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Aprovado em: ___ / ___ / ___

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família por todo apoio e suporte durante esse período de mestrado. Sem isso, nada disso seria possível.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Roberto do Nascimento Silva pela oportunidade de trabalhar junto ao seu time.

À Dra. Amanda Antoniêto por me ensinar as coisas desde o início, por ter tido paciência e persistência ao me inserir na rotina do laboratório, além de se tornar uma grande parceira. Muito obrigado!

À Dra. Thaís Fernanda Fraga por me acompanhar nos experimentos envolvendo células e vírus, e por me ensinar tantas técnicas, tendo paciência e sendo essa pessoa cativante.

Ao Dr. Rodrigo Abuna pela ajuda nos experimentos envolvendo animais, por me ensinar as técnicas e persistir junto a mim por bons resultados.

À Prof. Dra. Vânia Bonato e ao Prof. Dr. João Santana pelo apoio no desenvolvimento do projeto, ao fornecerem os espaços laboratoriais, animais para experimentos, células, e toda ajuda necessária.

À Prof. Priscyla Gaspari por toda ajuda envolvendo análises de nanopartículas, disponibilizando o espaço do laboratório, equipamentos e oferecendo o suporte necessário.

Ao time LBM: Alinne, Amanda, Cláudia, David, Hermano, Iasmin, Karol, Letícia, Luiz, Vanessa e Wellington. Agradeço por me acolherem tão bem, por serem solícitos e me ajudarem sempre que precisei, por serem gentis e termos compartilhado bons momentos juntos! Por toda troca de conhecimentos, pelo compartilhamento de vitórias, conquistas, mas também angústias e incertezas de nossa vida como pesquisadores. Por todos os bolos, saídas e confraternizações! O trabalho se tornou mais leve na companhia de vocês!

À Ana e Wellington, meu muito obrigado por toda ajuda com proteômica.

Obrigado também às técnicas do Departamento de Bioquímica Zuleica, Silvia, Vera, Odete, Cacilda, por serem sempre gentis, atenciosas e super dispostas a ajudar no que era preciso.

Ao Dr. Jhonatan Maraschin um agradecimento especial por toda ajuda com cultura de células, pelos finais de semana no laboratório, sempre me ouvindo e aconselhando. Por ser essa pessoa que sempre trouxe alegria aos nossos dias.

À Cláudia, um agradecimento especial pelas análises computacionais, por compartilhar das mesmas fraquezas, vibrarmos as nossas vitórias, pela ajuda com o inglês, por nos entendermos tão bem!

Aos meus grandes amigos David, Lucas e Luiz. Por sempre me ouvirem, aconselharem, compartilharem as forças e fraquezas, por todas as nossas conversas diárias. Obrigado pelas comemorações, festas, risadas e ótimos momentos que vivemos juntos. Um agradecimento especial ao Luiz, por ter sido meu primeiro amigo, por confiar em mim, por me perturbar muitas vezes, mas sempre deixando os dias mais fáceis de serem encarados. Vocês são especiais!

Aos meus amigos Levy e Pedro, por serem a melhor herança que Alfenas me proporcionou! Por trazerem alegrias aos meus dias. Por compartilharmos e comemarmos vitórias, mas também nos apoiarmos nas fraquezas! Nossas conversas diárias, nossos dramas, nossas risadas. Vocês fazem os dias melhores! Muito obrigado!

Meu muito obrigado à minha família de Ribeirão: Amanda, Hariff, Levy, Nathália, Raísa, Tárik, Tiago, Vini, por todo o suporte, dramas compartilhados, vitórias comemoradas! Por todo o vôlei, baralho, filmes, almoços e rolezinhos de leve. Por sermos uma família em tempos de pandemia e que perdurará! Amo muito vocês! Agradeço também aos que vieram depois só para agregar: Miah, Jéssica, Rodolfo, Plínio, Lorena, obrigado por trazerem ainda mais alegria a nossa casa!

Ao meu grande amigo, confidente, Djúlio, por ter me apresentado todo esse mundo USPiano. Por ser minha base em momentos de fraqueza, por vibrar os momentos de vitória. Por nossas conversas diárias, sem hesitações, chamando a atenção um do outro se necessário! Por todos os dramas vividos juntos e alegrias compartilhadas. Por ser essa pessoa especial que me acompanha desde Alfenas! Meu muito obrigado por ser mais que amigo, ser meu irmão!

Agradeço aos meus familiares Hélder, Marta, Hélder Filho, por todo suporte financeiro em momentos de dificuldade.

Meu agradecimento especial às minhas irmãs: Elma, Flaviana, Maryane e Viviane. Vocês são minha base e o motivo de eu ter forças para continuar lutando todos os dias! Obrigado por estarem ao meu lado. Obrigado por serem minha alegria, obrigado por me fazerem amar!

Obrigado à minha vó Elma. Por ser quem mais me apoiou, acreditou e incentivou! Meu obrigado especial por ser essa pessoa que ilumina meus dias e me faz ter motivos para lutar. Obrigado por estar presente em todos os momentos, por se orgulhar de minhas vitórias e dar suporte para com minhas fraquezas! Agradeço profundamente por tudo, e a ti dedico todo esse trabalho! Nada disso seria possível sem ti!

Um agradecimento especial às agências de fomento CAPES, CNPQ e FAPESP pelo apoio financeiro.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

A todos que de alguma forma contribuíram diretamente ou indiretamente para realização desse trabalho, muito obrigado!

**Muitas vezes definimos nosso ponto de chegada sem nem ao menos
ter dado a largada por completo. Sem conhecer as curvas,
sem nos darmos a chance de escolher o melhor caminho.
Idealizamos o ápice, sem ter domínio das ferramentas disponíveis.
Daí a vida surpreende. Tira da zona de conforto e te leva
a caminhos que nunca foram imaginados.
E então nos adaptamos, sofremos, choramos.
Mas sempre, nesses imprevistos da vida,
as vitórias, as alegrias, as partilhas,
nos mostram que tudo vale a pena!
A vida não segue um roteiro, mas nos ensina
a sermos bons protagonistas.**

Marcus Amaral

**Where there is a will, there is a way
Provérbio inglês**

RESUMO

AMARAL, M. V. M. V. **Produção de nanopartículas de prata (AgNPs) pelo fungo *Trichoderma reesei* e sua aplicação contra a COVID-19/SARS-CoV-2.** 2022. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

A doença COVID-19 desde sua declaração pandêmica, em março de 2020, gerou inúmeras preocupações das pessoas e países devido à sua facilidade de transmissão, sintomas característicos de gravidade e a falta de conhecimentos sobre métodos eficazes de combatê-la. Esforços mundiais foram feitos em busca do entendimento da doença e de agentes eficazes em seu combate. A longa data, a prata tem sido utilizada como agente antimicrobiano, e seu uso na forma de nanopartículas tem ganhado destaque visto as inúmeras aplicações e avanços na área de nanotecnologia. A síntese verde por meios biológicos representa um desses avanços, visto que utiliza de meios sustentáveis e não tóxicos para o ambiente, além de dar características específicas e vantajosas à essas partículas produzidas por esse meio. O uso de *Trichoderma reesei* como agente biológico produtor de nanopartículas de prata se mostrou eficaz, ao produzir nanopartículas estáveis, de tamanho que proporcionasse efeito biológico, formato esférico e características próprias do *capping* proteico envolto à essas nanopartículas. Análises *in vitro* demonstraram o potencial efeito antiviral das AgNPs produzidas frente às infecções com SARS-CoV-2, oferecendo uma proteção profilática e pós-exposição a nível celular. Além disso, dado o fato de a doença ser extremamente inflamatória, as nanopartículas demonstraram grande efeito em evitar a inflamação e danos celulares. Dentre as vantagens do uso de AgNPs produzidas pela síntese biológica, está a menor citotoxicidade, além de um efeito antiviral também oferecido pelo *capping* proteico. As análises *in vivo* requerem melhor estratégia de avaliação dos efeitos das AgNPs. Contudo, evidências literárias e observadas neste trabalho, indicam potencial efeito inibitório das AgNPs produzidas por *Trichoderma reesei* frente a doença pandêmica COVID-19.

Palavras-chave: 1. Nanopartículas de prata; 2. COVID-19; 3. SARS-CoV-2; 4. *Trichoderma reesei*; 5. Síntese biológica; 6. Potencial antiviral.

ABSTRACT

AMARAL, M. V. M. V. **Production of silver nanoparticles (AgNPs) by the fungus *Trichoderma reesei* and its application against COVID-19/SARS-CoV-2.** 2022. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

The COVID-19 disease, since its pandemic declaration in March 2020 has generated numerous concerns from people and countries due to its ease of transmission, characteristic symptoms of severity and the lack of knowledge about effective methods of combating it. Worldwide efforts were made in search of alternatives that would help to better understand the disease, and that would be effective in its fight. For a long time, silver has been used as an antimicrobial agent, and its use in the form of nanoparticles has gained prominence given the numerous applications and advances in the area of nanotechnology. Green synthesis by biological means represents one of these advances, since it uses sustainable and non-toxic means for the environment, in addition to giving specific and advantageous characteristics to these particles produced by this means. The use of *Trichoderma reesei* as a biological agent that produces silver nanoparticles was shown to be effective, by producing stable nanoparticles of size that would provide a biological effect, spherical shape and personal characteristics of the protein capping wrapped around these nanoparticles. In vitro analyzes demonstrated the potential antiviral effect of AgNPs produced against SARS-CoV-2 infections, offering prophylactic and post-exposure protection at the cellular level. Furthermore, given the fact that the disease is extremely inflammatory, nanoparticles have shown great effect in preventing inflammation and cellular damage. Among the advantages of using AgNPs produced by biological synthesis, they presented less cytotoxicity in addition to an antiviral effect also offered by protein capping. In vivo analyzes require a better strategy for evaluating the effects of AgNPs. However, literary evidences and showed in this work, indicate a potential inhibitory effect of AgNPs produced by *Trichoderma reesei* against the COVID-19 pandemic disease.

Keywords: 1. Silver nanoparticles; 2. COVID-19; 3. SARS-CoV-2; 4. *Trichoderma reesei*; 5. Biological synthesis; 6. Antiviral potential.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Estrutura SARS-CoV-2. O vírus SARS-CoV-2 apresenta quatro principais proteínas que auxiliam na sua infecção, e que envolvem seu genoma RNA viral. FONTE: Adaptado de LI G., et. al.,2020.39

FIGURA 2. Interações intermoleculares putativas entre a proteína Spike do coronavírus SARS 2 (SARS-CoV-2) e sua enzima conversora de angiotensina 2 do receptor celular (ACE2). A ligação eficaz depende da ativação da proteína Spike pela Serina Protease 2 transmembrana (TMPRSS2) e Furina. FONTE: Adaptado de LIPPI, G., et. al., 2020.....30

FIGURA 3. Interação de AgNPs com a célula. Ao chegar na membrana plasmática, as nanopartículas podem penetrar o interior da célula por difusão simples ou por endocitose, isso permite o transporte das NPs do meio extra para o intracelular. Uma vez no meio intracelular, a tendência é que as NPs se decomponham em Ag^+ , que são muito mais tóxicos para a célula. Atuam reduzindo o teor de ATP das células, causando danos na mitocôndria e aumento das espécies reativas de oxigênio (ROS). No núcleo, as nanopartículas podem provocar danos no DNA, como aberrações cromossômicas. Além de interferir no ciclo celular, possivelmente devido ao reparo do DNA modificado, ou de forma irreversível, o que leva à apoptose. FONTE: ASHARANI *et.al.* 2008 apud SOUSA, E., 2018.35

FIGURA 4. Mecanismo da biossíntese de nanopartículas de prata por intermédio de nitrato redutase e cadeia transportadora de elétrons. FONTE: Adaptado de DURÁN *et al.*, 2005.39

FIGURA 5. Mecanismo que mostra o papel das proteínas extracelulares na síntese de nanopartículas de prata. FONTE: Adaptado de JAIN et al. (2010).40

FIGURA 6. Esquema representativo do potencial de ação das AgNPs frente a partículas virais. FONTE: MISIRLI *et al.*, 2022.43

FIGURA 7. Reação de redução do MTT (um sal de coloração amarela e solúvel em água) a formazan (sal de coloração arroxeada e insolúvel em água). FONTE: MAGALHÃES; THÁ; LEME, 2018.52

FIGURA 8. Delineamento experimental do ensaio de citotoxicidade em Calu-3. FONTE: autor.53

FIGURA 9. Esquema representativo do ensaio de infecção das células Calu-3 por SARS-CoV-2 e uso de AgNPs. FONTE: autor.54

FIGURA 10. Esquema representativo do teste *in vivo* de infecção viral com SARS-CoV-2 e tratamento com AgNPs. FONTE: autor.58

FIGURA 11. Gráfico de concentração de prata em função da absorbância no comprimento de onda 395 nm.60

FIGURA 12. Mudança de coloração representando o 1º dia (coloração clara) de contato do filtrado fúngico de *T.reesei* com AgNO₃ e o 10º dia após a formação das nanopartículas (coloração amarronzada).61

FIGURA 13. Gráfico representativo do perfil de absorbância da produção de AgNPs de alíquotas recolhidas a cada 2 dias durante o processo de produção das AgNPs.62

FIGURA 14. Esquema representativo de partículas em solução, mostrando as medidas de diâmetro hidrodinâmico e potencial Zeta obtidas através da técnica de espalhamento de luz dinâmica (DLS). FONTE: Adaptado de ALBERNAZ, V., 2014.64

FIGURA 15. Microscopia eletrônica de transmissão (MET) mostrando a distribuição heterogênea dos tamanhos das AgNPs.66

FIGURA 16. MEV mostrando a interação da superfície de células Vero E-6 sem vírus, apenas em contato com o vírus e infectado com o vírus e tratado com AgNPs.66

FIGURA 17. MEV mostrando o mecanismo de ação contra SARS-CoV-2 das AgNPs em células Vero-E6.67

FIGURA 18. (a) RMSDs (Å) obtidos a partir da sobreposição dos complexos docados (RBD x ACE-2) adquiridos pela análise de docagem no software Hex e os complexos obtidos a partir do banco de dados PDB; (b) Sobreposições dos complexos obtidos no banco de dados PDB (azul) e seus respectivos complexos re-docados (magenta); (c) Correlação entre os valores de energia livre de Gibbs (ΔG) obtidos a partir da re-docagem no software Hex e os valores calculados pelo web-servidor PRODIGY para os mesmos complexos ($r = 0,8449$, $p = 0,0167$); (d) Variação média dos valores de energia livre de Gibbs (ΔG) adquiridos através das análises de docagem dos RBDs de cada uma das variantes de SARS-CoV-2 interagindo com o receptor humano ACE-2. (WT: wild-type).69

FIGURA 19. (a) Variação da energia livre de Gibbs (ΔG) para as interações entre a nanopartícula de prata e cada um dos diferentes RBD virais; (b) Ilustração 3-D da interação entre o RBD da linhagem parental de SARS-CoV-2 e a AgNP; (c) Representações 3-D das interações entre a nanopartícula de prata e os RBDs de cada variante de SARS-CoV-2. Os RBDs estão representados em verde, com seus resíduos de aminoácidos coloridos em alaranjado e as mutações pontuais participantes dessa interação para cada uma das variantes de SARS-CoV-2 realçados em azul escuro. A nanopartícula está representada por um espectro de pontos cinzas.70

FIGURA 20. Análise de citotoxicidade das AgNPs em células Calu-3 usando concentrações variando de 0,5 a 100 $\mu\text{g/ml}$ (A). Para avaliar a concentração necessária para inibir 50% das células vivas, foi encontrado o IC50 (B).72

FIGURA 21. Ensaio de viabilidade celular em Calu-3 infectada com SARS-CoV-2 e ação das AgNPs.

CNTRL+ representa células Calu-3 apenas infectada com o vírus; A representa tratamento com AgNPs 1 hr antes da infecção; B representa aplicação simultânea do vírus e AgNPs; C representa infecção viral 1 hr antes do tratamento com AgNPs. ** $p < 0,0015$; *** $p < 0,007$74

FIGURA 22. Quantificação da carga viral de SARS-CoV-2 em Calu-3 por meio de 3 sistemas de infecção. A representa tratamento com AgNPs 1 hr antes da infecção; B representa aplicação simultânea do vírus e AgNPs; C representa infecção viral 1 hr antes do tratamento com AgNPs. * $p < 0,0155$77

FIGURA 23. Análise da carga viral em Vero-E6. Cntrl+ representando as células infectadas apenas com SARS-CoV-2; A representando tratamento das células com AgNPs no tempo 0; B representando o tratamento das células apenas com o sobrenadante fúngico. * $p < 0,0088$77

FIGURA 24. Dosagem de Caspase-1 (A); IL-1 β (B); LDH (C) em monócitos humanos infectados com SARS-CoV-2 e tratados com AgNPs conforme: A representa tratamento com AgNPs 1 hr antes da infecção; B representa aplicação simultânea do vírus e AgNPs; C representa infecção viral 1 hr antes do tratamento com AgNPs. (A) * $p < 0,0001$; (B) * $p < 0,0397$; (C) * $p < 0,01$80

FIGURA 25. Ensaio de toxicidade de AgNPs in vivo usando concentrações de 25 μ g e 5mg/kg em animais Wild-type C57BL/6.82

FIGURA 26. Animais Wild-type (A) C57BL/6 e animais K18-hAc (B) infectados com SARS-CoV-2, tratados com 25 μ g de AgNPs e não tratados. Dia 4 representa o dia da infecção com SARS-CoV-2.84

FIGURA 27. Animais Wild-type C57BL (A) e animais K18-hAce2 (B) infectados com SARS-CoV-2, tratados com 5 mg/kg de AgNPs e não tratados.85

FIGURA 28. Quantificação da carga viral em tecidos animal, tratados com AgNPs pré e pós-infecção, com dose de 5 mg/kg de peso animal.....86

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Caracterização físico-química das AgNPs pelo diâmetro hidrodinâmico (Z-Average), índice de polidispersão (PDI), Potencial Zeta.63

TABELA 2. Potencial de ação de diferentes tipos de AgNPs em modelo animal.82

LISTA DE SIGLAS

ACE2: enzima conversora de angiotensina 2

Ag⁺: íon prata

AgNO₃: Nitrato de prata

AgNPs: nanopartículas de prata

BSL-2: laboratório com nível de biossegurança 2

BSL-3: laboratório com nível de biossegurança 3

CoV: coronavírus

DAMPs: Padrões Moleculares Associados a Danos)

DEMEM: do inglês *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DLS: do inglês *Dinamic Light Scattering*

DLS: espalhamento de luz dinâmico

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

ESPII: Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional

FBS: soro fetal bovino

FDA: do inglês *Food and Drug Administration*

H1N1, H3N2: vírus influenza

HIV-1: vírus da imunodeficiência humana tipo 1

HSV-1: vírus Herpes simplex tipo 1

IFN: genes estimuladores de interferon (IFN)

IL6, IL8: citocinas pró-inflamatórias interleucinas

LBM: Laboratório de Biotecnologia Molecular

LDH: Lactato desidrogenase

MERS: Síndrome Respiratória do Oriente Médio

MET: microscopia eletrônica de transmissão

MEV: microscopia eletrônica de varredura

MEX: maltose-dextrose ágar

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NLRs: receptores Nod-like (NLRs)

NPs: nanopartículas

OMS: Organização Mundial da Saúde

PAMPs: Padrões Moleculares Associados a Patógenos

PBMCs: células mononucleares do sangue periférico humano

PBS: tampão fosfato salino

PdI: índice de polidispersividade

PEDV: vírus da diarreia epidêmica suína

pH: potencial hidrogeniônico

PIF: Peritonite Infecciosa Felina

RBD: domínio de ligação ao receptor

RMSD: do inglês root-mean-square deviation

RNA: Ácido Ribonucleico

ROS: espécies reativas de oxigênio

SARS: Síndrome Respiratória Aguda Grave

TCRV: vírus Tacaribe

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
2. REFERENCIAL TEÓRICO	25
2.1. Coronavírus.....	25
2.1.1. COVID-19: epidemiologia e sintomas da doença	26
2.1.2. Estrutura do vírus	28
2.1.3. Mecanismo de infecção	29
2.2. Mecanismos antivirais.....	31
2.3. Nanopartículas metálicas	32
2.4. Nanopartículas de prata	33
2.4.1. Rotas de síntese	35
2.4.2. Síntese verde de nanopartículas de prata.....	37
2.4.3. Biossíntese de nanopartículas de prata por fungos.....	38
2.4.4. <i>Trichoderma reesei</i> na produção de nanopartículas.....	40
2.4.5. Mecanismo antiviral das nanopartículas de prata	41
3. OBJETIVOS.....	45
3.1. OBJETIVO GERAL	45
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	45
4. MATERIAIS E MÉTODOS	47
4.1. Organismos e linhagens celulares utilizados	47
4.2. Meios de cultura utilizados	47
4.3. Produção de bio-nanopartículas de prata (AgNPs).....	49
4.3.1. Crescimento e manutenção do fungo	49
4.3.2. Cultivo do fungo em condições limitantes para estimular a produção de proteínas	49
4.3.3. Produção de nanopartículas de prata usando sal nitrato de prata (AgNO ₃) ..	49
4.3.4. Caracterização das nanopartículas de prata produzidas	50
4.4. Cultura de células de adenocarcinoma de pulmão Calu-3	51
4.4.1. Ensaio de citotoxicidade	52
4.4.2. Ensaio de infecção de células Calu-3 com o vírus SARS-CoV-2, e tratamento com AgNPs	53
4.5. Análise in silico da interação entre o RBD da proteína S viral e as nanopartículas de prata.....	55
4.6. Infecção de monócitos humanos com SARS-CoV-2 e tratamento com AgNPs	55
4.7. Quantificação da carga viral de SARS-CoV-2 em células Vero	56

4.8. Ensaio de toxicidade das nanopartículas de prata <i>in vivo</i>	57
4.9. Ensaio <i>in vivo</i> de infecção viral usando SARS-CoV-2 e tratamento com AgNPs.....	57
4.10. Análises estatísticas	58
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	60
5.1. <i>T. reesei</i> se mostrou um bom produtor de AgNPs.....	60
5.2. Análises <i>in silico</i>	67
5.3. Ensaio de citotoxicidade	71
5.4. Infecção de células Calu-3 com o vírus SARS-CoV-2, e o uso de AgNPs	74
5.5. Quantificação da carga viral	76
5.6. Efeitos das AgNPs no inflamassoma de monócitos humanos	78
5.7. Análises <i>in vivo</i>	82
6. CONCLUSÕES.....	89
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91

1. INTRODUÇÃO

Os coronavírus são uma classe de vírus conhecida por infectar muitas espécies de animais, humanos e estão descritos há mais de 50 anos, com o isolamento do protótipo da cepa de coronavírus murino, por exemplo, relatado em 1949 (BAILEY *et al.*, 1949; CHEEVER *et al.*, 1949). Os mecanismos moleculares de replicação, bem como a patogênese de vários coronavírus, têm sido ativamente estudados desde a década de 1970. Eles são vírus de RNA com envelopes, capazes de causar doenças respiratórias entéricas ou sistêmicas em uma variedade de hospedeiros, que variam em gravidade clínica, subclínica e fatal. Recentes infecções virais humanas, incluindo síndrome respiratória aguda grave (SARS), síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS) e, mais recentemente, COVID-19 (SARS-CoV-2), todos considerados originados de coronavírus, demonstram o potencial zoonótico dos coronavírus e seu potencial de devastação (WEISS; NAVAS-MARTIN, 2005; RAMADAN; SHAIB, 2019).

Em dezembro de 2019, o planeta foi surpreendido com uma doença causada pelo coronavírus denominado SARS-CoV-2, que foi identificado pela primeira vez na China, a COVID-19. Em 30 de janeiro de 2020, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou que a epidemia da COVID-19 constituía uma Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional (ESPII), e, em 11 de março de 2020, uma pandemia. Desde a sua identificação, o vírus já infectou mais de 554 milhões de pessoas em todo o mundo, sendo 32 milhões no Brasil, causando mais de 6 milhões de mortes no mundo e mais de 600 mil no país, de acordo com dados da OMS (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2022).

As infecções respiratórias agudas representam um enorme fardo para a sociedade em termos de incapacidade, mortalidade e custos dos serviços de saúde (prescrições de medicamentos) além dos relacionados à produção perdida. Com isso, a prevenção de infecções respiratórias é um objetivo importante para as intervenções de saúde pública.

A nanotecnologia tem se mostrado promissora no combate a vírus, estando as nanopartículas como foco de estudo devido às suas propriedades únicas, como tamanho, alta solubilidade, adaptabilidade de superfície e multifuncionalidade, o que pode levar ao desenvolvimento de medicamentos melhores e mais seguros, tratamentos direcionados a tecidos, nanomedicamentos personalizados, diagnóstico precoce e prevenção de doenças (SOARES *et al.*, 2018).

Inúmeras nanopartículas e as diferentes formas de usá-las têm sido estudadas nos últimos anos quanto à sua eficácia contra certos vírus que causam grandes doenças respiratórias (ZHANG *et al.*, 2015). Entre os diferentes tipos de nanopartículas metálicas, a atividade antiviral de nanopartículas de prata (AgNPs) foi demonstrada com seu potencial efeito contra SARS-CoV-2 (JEREMIAH *et al.*, 2020).

Devido à natureza grave das doenças respiratórias, em especial a COVID-19, esforços mundiais estão sendo feitos para auxiliar no combate à doença. Dado o fato de as AgNPs serem conhecidas por sua alta atividade antimicrobiana, biocompatibilidade e baixa toxicidade em células eucarióticas, o seu uso como agente antiviral tem ganhado destaque.

Diversos métodos de obtenção das nanopartículas são utilizados, contudo, o método biológico, ao utilizar de sistemas vivos capazes de produzir nanopartículas metálicas de forma limpa, produz nanopartículas de forma não tóxica e sustentável, sendo uma vantagem em relação aos outros métodos de síntese (MOHANPURIA; RANA; YADAV, 2008).

O fungo *Trichoderma reesei* é amplamente utilizado na indústria biotecnológica devido ao fato de sua grande produção de proteínas e metabólitos, fácil manipulação e não patogenicidade. Ele foi escolhido como agente biológico para a síntese de AgNPs, visto as vantagens da síntese biológica e a necessidade e importância de esforços na busca de medidas que ajudem no combate a uma doença pandêmica.

Referencial teórico

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Coronavírus

Os coronavírus (CoVs) são vírus envelopados com um genoma de RNA grande, capeado e poliadenilado, com aproximadamente 24.500-31.800 nucleotídeos, pertencentes ao gênero *Coronavirus*. São causadores de doenças respiratórias, entéricas, no sistema nervoso central (SNC), agudas e crônicas em muitas espécies de animais, incluindo humanos (ZHOU; QIU; GE *et.al.*, 2021).

A primeira doença relacionada ao coronavírus registrada acredita-se ter origem em um caso de Peritonite Infecciosa Felina (PIF), descoberto em 1912. No entanto, o primeiro coronavírus humano não foi identificado até o final da década de 1960, o qual foi responsável por causar um resfriado comum (MASTERS, 2006)

Um novo coronavírus humano, SARS-CoV, surgiu no final de 2002 no sul da China e espalhou-se rapidamente, com mais de 8.000 casos e cerca de 800 mortes relatadas em 29 países. O surto global de SARS-CoV terminou em julho de 2003 (SCHNEIDER, 2012), entretanto, epidemia global de SARS-CoV trouxe os coronavírus à atenção de autoridades de saúde pública e virologistas acadêmicos. Em 2012, um novo coronavírus zoonótico, MERS-CoV, foi identificado infectando humanos. A doença era transferida para humanos a partir de camelos dromedários infectados, na qual aproximadamente 35% dos pacientes infectados por MERS-CoV morreram da doença, embora não haja evidência de transmissão de humano para humano. Estes surtos só foram identificados na Arábia Saudita, Emirados Árabes Unidos e Coreia (RAMADAN; SHAIB, 2019).

Os coronavírus infectam principalmente aves e mamíferos, e causam uma variedade de doenças letais que afetam particularmente a indústria agrícola. Alguns CoVs foram primeiramente encontrados como infecções zoonóticas, limitadas apenas ao seu hospedeiro animal, mas cruzaram a barreira das espécies animal-humana e progrediu para estabelecer doenças em humanos (LEE C., 2015; PRADESH; UPADHAYAY; VIGYAN, 2014)

Estudos sugerem que o SARS-CoV originou de morcegos, visto que muitos Morcegos-ferradura chineses apresenta sequências de SARS relacionadas a CoVs e mostram evidências sorológicas de exposição anterior a um CoV relacionado (LAU *et*

al., 2005; LI, W. *et al.*, 2005). Dois novos SARS relacionados a CoVs foram encontrados em morcegos, sendo ainda mais semelhante ao SARS-CoV. Esses vírus também foram identificados por usar o mesmo receptor que o vírus humano, a enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2), fornecendo ainda mais evidências de que o SARS-CoV se originou em morcegos (GE, X.Y. *et al.*, 2013)

O sequenciamento da geração SARS-CoV-2, mostra 88% de homologia com dois coronavírus derivados de morcegos, bat-SL-CoVZC45 e bat-SL-CoVZXC21. Dados epidemiológicos também sugerem a possibilidade de um hospedeiro intermediário que facilitou o contato do vírus com humanos e sua contaminação. Isso foi mostrado em gatos civeta (*Civettictis civetta*), que atuam como hospedeiros intermediários para SARS-CoVs e camelos dromedários para MERS-CoV. A análise estrutural sugere que o SARS-CoV-2 tem uma estrutura de domínio de ligação ao receptor semelhante àquela do SARS-CoV, que é o ACE2 em humanos (ROUJIAN *et al.*, 2020).

No final de 2019, o mundo testemunhou uma pandemia da recém-descoberta doença de coronavírus 2019 (COVID-19). O agente causador é o SARS-CoV-2, sendo altamente semelhante ao SARS-CoV com uma identidade de sequência de aproximadamente 80% (WU *et al.*, 2020). O COVID-19 se espalhou para mais de 200 países em todo o mundo, com milhões de casos relatados e milhões de mortes cumulativas registradas.

2.1.1. COVID-19: epidemiologia e sintomas da doença

A doença COVID-19 é causada pelo vírus SARS-CoV-2 que, apesar da letalidade da doença ser mais baixa se comparada ao SARS-CoV e o MERS-CoV, vetores de epidemias passadas, possui alta transmissibilidade e tem ocasionado um maior número de mortes do que a combinação das epidemias produzidas por outros coronavírus (MAHASE, 2020). A transmissão do SARS-CoV-2 se dá, predominantemente, por meio de gotículas contaminadas de secreções da orofaringe de uma pessoa infectada para uma pessoa livre da infecção, contribuindo para um crescimento exponencial de casos (ONG *et al.*, 2020).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), os sintomas iniciais da COVID-19 lembram um quadro gripal comum, que variam de pessoa para pessoa, podendo se manifestar de forma branda, forma de pneumonia, pneumonia grave e

síndrome respiratória aguda grave. A maior parte das pessoas infectadas apresenta a forma leve da doença, com alguns sintomas como fadiga, tosse seca, febre, sendo que algumas também podem apresentar dor de garganta, dispneia leve, dor no corpo, dor de cabeça, congestão nasal, náusea, vômito, diarreia, perda de olfato e paladar. Idosos, imunossuprimidos e indivíduos com comorbidades preexistentes, podem ter uma apresentação atípica, estando mais pré-dispostos a terem a doença com agravamento rápido, o que pode causar a morte. Entretanto, com a evolução da doença e mutações do vírus, o agravamento da doença também já é visto em indivíduos jovens e previamente saudáveis (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2019).

A doença, indicada inicialmente como sendo uma doença respiratória aguda, apresenta caráter sistêmico, atingindo outros alvos como cérebro, coração, rins, entre outros. Além disso, um estudo realizado pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) constatou a manifestação de sintomas pós-infecção, caracterizada como uma Síndrome pós-COVID-19. No estudo, um grupo de 115 pessoas apresentaram, entre as sequelas mais frequentes, tosse persistente (34,0%), dificuldade para respirar (26,5%), perda do olfato ou paladar (20,1%) e dores de cabeça frequentes (17,3%). Além disso, também chamam a atenção os transtornos mentais, como insônia (8%), ansiedade (7,1%) e tontura (5,6%), sequelas essas que podem perdurar por mais de um ano (DE MIRANDA, 2022).

Após a chegada da COVID-19 no Brasil, diversas medidas de controle e prevenção da doença foram tomadas pelas autoridades sanitárias locais (governo federal, governos estaduais e municipais). Essas medidas se diferenciaram de uma região para outra do país, entretanto, a medida mais difundida pelas autoridades foi a prática do distanciamento social, com o fechamento de escolas e universidades, a proibição de eventos de massa e de aglomerações, a restrição de viagens e transportes públicos e a conscientização da população para que permaneça em casa. Além disso, medidas como o isolamento de casos, o incentivo à higienização das mãos, a adoção de etiqueta respiratória e o uso de máscaras faciais, também foram estratégias utilizadas no mundo todo para reduzir a transmissão do vírus (KUPFERSCHMIDT; COHEN, 2020).

O processo de isolamento social causa alguns impactos na vida das pessoas. No Brasil, país com dimensões continentais e realidades locais muito diversas, os desafios que se apresentam são imensos e agravados pela situação social, que impõe condições de vida e saúde precárias, especialmente à população residente nas periferias dos grandes centros urbanos, principalmente em função da necessidade de locomoção para o trabalho, uma vez que a população mais pobre está vinculada a atividades essenciais que não param

(MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020). Além disso, fatos como a alta demanda por vacinas, bem como o surgimento de novas variantes resistentes, faz-se necessário a adoção de medidas que contribuam para achatar a curva epidêmica da COVID-19.

2.1.2. Estrutura do vírus

O vírus CoV possui quatro principais proteínas estruturais: a spike (S), a envelope (E), a da membrana (M) e a do nucleocapsídeo (N), todas compõem uma partícula viral estruturalmente completa. Alguns CoVs não requerem o conjunto de todas as proteínas estruturais para formar um vírion infeccioso, sendo algumas destas proteínas dispensáveis ou que codificam proteínas com funções compensatórias. Cada proteína estrutural, individualmente, desempenha um papel específico na estrutura da partícula viral ou em aspectos do ciclo de replicação (DESFORGES *et al.*, 2014). A proteína S é uma proteína glicosilada transmembrana tipo 1, e é responsável por reconhecer o receptor celular, usada pelo vírus para infectar uma célula-alvo, estando associada à maioria dos efeitos citotóxicos os quais levam à degeneração das células infectadas. O receptor para essa glicoproteína S é uma enzima chamada de ACE2 (enzima conversora de angiotensina II), sendo encontrada em maior expressividade no pulmão, tal fato explica um dos principais sintomas das doenças causadas por coronavírus ser o respiratório (CHEN *et al.*, 2020).

Para adaptar ao hospedeiro humano foram necessárias algumas mutações no domínio de ligação ao receptor da Spike, que medeia a ligação do SARS-CoV à membrana celular, o que permitiu a entrada das partículas virais nas células do hospedeiro. A proteína E está ancorada ao envelope viral e tem um papel na morfogênese, no brotamento do vírion e no tráfego nas células infectadas, parecendo ser responsável pela curvatura do envelope viral. Durante a infecção, essa proteína pode induzir a resposta ao estresse celular e à apoptose, podendo estar associada à ruptura do epitélio pulmonar e participar da imunopatologia no trato respiratório (NIETO-TORRES *et al.*, 2014; RUCH; MACHAMER, 2012). A proteína M interage com todas as outras proteínas estruturais virais, ajudando, portanto, a moldar e a manter a estrutura do microrganismo. Durante a infecção celular, essa proteína pode participar da inibição da resposta do interferon tipo 1 pelas células infectadas, influenciando o resultado da infecção e o destino celular após a infecção. A proteína N está associada ao genoma viral, desempenha um papel essencial em encapsulá-lo em um nucleocapsídeo helicoidal dentro da partícula viral. Foi demonstrado que a proteína N do SARS-CoV se localiza parcialmente no

nucléolo e desregula o ciclo celular do hospedeiro (DEDIEGO *et al.*, 2014; SONG *et al.*, 2013). A proteína N de diferentes coronavírus também participa da inibição da resposta do interferon tipo 1 pela célula infectada e na indução de apoptose.

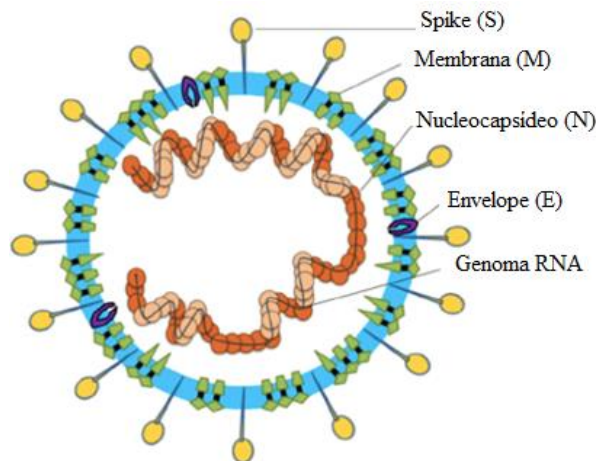


Figura 1. Estrutura SARS-CoV-2. O vírus SARS-CoV-2 apresenta quatro principais proteínas que auxiliam na sua infecção, e que envolvem seu genoma RNA viral. FONTE: Adaptado de LI G., et. al.,2020.

2.1.3. Mecanismo de infecção

Dado o fato do SARS-CoV-2 ser um vírus de RNA, ele possui alta variabilidade genética intrínseca, o que resulta em uma alta taxa de mutação. Com isso, qualquer modificação na sequência SARS-CoV-2 pode torná-lo mais virulento na transmissão de pessoa para pessoa (LAI *et al.*, 2020).

Assim como em todos os coronavírus, a entrada da célula SARS-CoV-2 é dependente de sua proteína Spike (S), que medeia dois eventos essenciais: ligação a ACE2 pela região amino-terminal e fusão de membranas virais e celulares através da região do terminal carboxila (LI, 2015; LAI *et al.*, 2020). A superfície viral contendo as glicoproteínas S, precisa ser separada em domínios S1 e S2, para que o vírus consiga aderir à membrana celular, sendo a Furina e Serina Protease Transmembrana (TMPRSS2), substâncias que possibilitam essa separação. Com isso, a S1 se liga ao receptor ACE2 e a S2 à membrana celular, possibilitando a entrada do vírus na célula por meio de endocitose (DING; LIANG, 2020; MÖNKEMÜLLER; FRY; RICKES, 2020).

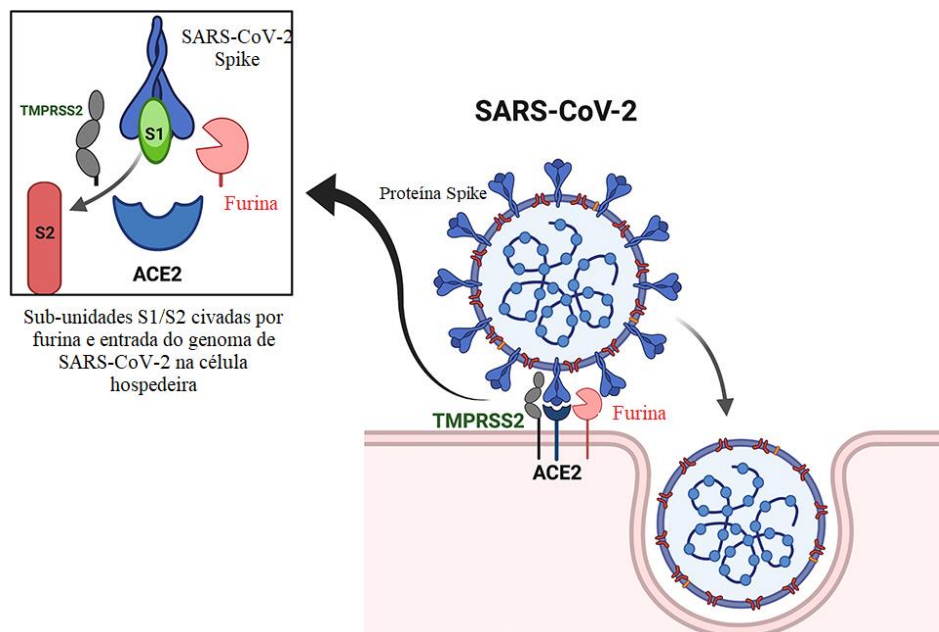


Figura 2. Interações intermoleculares putativas entre a proteína Spike do coronavírus SARS 2 (SARS-CoV-2) e sua enzima conversora de angiotensina 2 do receptor celular (ACE2). A ligação eficaz depende da ativação da proteína Spike pela Serina Protease 2 transmembrana (TMPRSS2) e Furina. FONTE: Adaptado de LIPPI, G., et. al., 2020.

O epitélio das vias aéreas respiratórias é a primeira linha de defesa contra patógenos, com isso, várias infecções são autolimitadas e permanece local, pois o vírus será eliminado pelo sistema imunológico do trato respiratório, com consequências clínicas mínimas. Todavia, patógenos virais oportunistas, como os CoVs, têm a capacidade de vencer a resposta imune e causar doenças respiratórias mais graves ou até se espalhar para outros tecidos (ENJUANES *et al.*, 2016). A replicação primária de SARS-CoVs geralmente é restrita às células epiteliais do trato respiratório, sendo principalmente infectadas células pulmonares. Além disso, a infecção pode levar a liberação de citocinas pró-inflamatórias que contribuirão para o progresso, sugerindo um possível mecanismo imunopatológico da doença. Estudos apontam que a afinidade entre ACE2 e o domínio de ligação ao receptor (RBD, na sigla em inglês) de SARS-CoV-2 é 10 a 20 vezes maior que a do RBD de SARS-CoV (PEIRIS *et al.*, 2003; CERVANTES-BARRAGAN *et al.*, 2007; DING; LIANG, 2020).

A proteína ACE2 é também amplamente expressa no sistema cardiovascular, rins e cérebro, o que proporciona uma variedade de células suscetíveis ao SARS-CoV-2, gerando uma explicação a qual alguns pacientes com a COVID-19 morrerem por falência

múltipla dos órgãos. No sistema respiratório, a ACE2 é amplamente expressa nas células epiteliais de alvéolos, brônquios, traqueia, glândulas serosas brônquicas, monócitos e macrófagos alveolares. O vírus entra e se replica nessas células primárias, liberando posteriormente vírions maduros que infectam novas células-alvo. Secreções respiratórias, urina, fezes e suor de pacientes com SARS-CoV-2 contêm partículas virais infecciosas, que podem ser excretadas e contaminar o meio ambiente, aumentando a transmissibilidade do vírus. A proteína ACE2 é um dos mecanismos de entrada do vírus, porém não o único, depende do alvo inicial de infecção. Entre as vias de entrada estão Neuropilina, Basigina, GRP78, entre outros. (KICKBUSCH; LEUNG, 2020).

2.2. Mecanismos antivirais

As infecções virais são responsáveis pela maioria das doenças infecciosas com alta taxa de morbidade e mortalidade em contraste às infecções bacterianas. O controle eficaz dessas infecções de faz necessário, e muitas vezes são utilizadas substâncias antivirais que atuam em diferentes fases da replicação do vírus, com principal objetivo a sua inibição (FIELD, CLERCQ, 2004; CLERCQ, 2008). Dentre as características da quimioterapia antiviral, uma substância ideal pode atuar na entrada ou na saída do vírus a célula, possuir largo espectro, ter especificidade e potência de inibição, não conduzir ao desenvolvimento de resistências, tudo isso exibindo uma mínima toxicidade para a células hospedeira sem interferir nos mecanismos normais de defesa celular ou suprimir o processo de desenvolvimento da imunidade ativa do hospedeiro (PATRICK, 2009).

Nos últimos anos foram realizadas várias pesquisas e descobertas no âmbito da virologia, entretanto, a evolução na descoberta desses compostos acontece de maneira lenta. Entre os fatos associados, estão a interferência dessas substâncias não só inibindo o crescimento do vírus, mas também afetando negativamente a célula hospedeira, sendo muitas vezes efeitos indesejáveis, uma vez que cada etapa do ciclo viral envolve diversas funções celulares (FLINT *et al.*, 2015).

A descoberta de substâncias antivirais exige tempo desde a sua formulação até a prescrição, significando que nem sempre o composto pode ser administrado a tempo de ser útil para combater as infecções endêmicas.

A nanotecnologia associada a saúde tem ganhado espaço devido ao potencial de mudar o cenário na descoberta de novas medidas terapêuticas, como os medicamentos antivirais. Uma das formas é o uso de nanopartículas (NPs) como ferramenta na entrega

de medicamentos, diagnósticos e até mesmo tratamento de muitas doenças infecciosas. Recentemente, as NPs metálicas têm sido utilizadas como agentes antivirais e avançou rapidamente pela capacidade dos metais em “atacar” vários alvos nos vírus, causando impacto mínimo no desenvolvimento de resistências subsequentes (ADERIBIGBE, 2017; GALDIERO *et al.*, 2011).

2.3. Nanopartículas metálicas

O termo nanopartícula não possui uma única definição, mas são normalmente reconhecidas como partículas que apresentam ao menos uma dimensão na escala nanométrica (1-100 nm). Entretanto, grandes agências regulatórias como o FDA (*Food and Drug Administration*) definem as nanopartículas como sendo estruturas que apresentam propriedades (físicas, químicas ou biológicas) atribuídas à sua dimensão, até 1µm, desta forma, partículas menores que 1µm são consideradas nanoestruturas (BOVERHOF *et al.*, 2015).

As nanopartículas metálicas possuem características próprias se comparadas a partículas macro, como por exemplo, a ampla disponibilidade, funcionalidade e biocompatibilidade, que associado ao menor tamanho e a maior superfície de contato, permite melhor interação com outras moléculas de interesse (KUMARI; SOBHA, 2013; PARVEEN; MISRA; SAHOO, 2012). Um material magnético como o ferro, por exemplo, pode não se comportar como um ímã se preparado sob a forma de nanopartículas. Por outro lado, as nanopartículas de sílica na forma esférica presentes em um material, apesar de incolores e não metálicas, se assumirem arranjos cristalinos, podem difratar a luz visível tornando-se um material colorido (TOMA, 2004; TANSIL; GAO, 2006).

As partículas de tamanho nanométrico têm gerado grande interesse por apresentarem propriedades físicas, químicas e biológicas únicas, em comparação a outras partículas (YANG *et al.*, 2010). Estas propriedades dependentes do tamanho, forma e morfologia, lhes permitem interagir com plantas, animais e microrganismos (SIDDIQI; HUSEN, 2016). Dentre as interações com o meio externo, estão as propriedades antimicrobiana, que possuem a capacidade de interagir com membranas celulares rompendo a estrutura da parede celular (AHMAD *et al.*, 2013; TROP *et al.*, 2006). Essas interações e toxicidade são dependentes de alguns fatores como a composição química, dosagem, tamanho das partículas, o estado de agregação além da área da superfície e o

recobrimento das nanopartículas, que moldarão sua interação com o meio externo (GRASSIAN, 2008; THAKKAR; MHATRE; PARIKH, 2010).

As nanopartículas metálicas são muito estudadas, destacando-se principalmente as de prata, ouro, paládio e platina devido a vasta aplicação em setores associados à eletroquímica, medicina, cosmética, fármacos e alimentos. As nanopartículas de prata (AgNPs) funcionam como compostos antimicrobianos, que induzem a produção de espécies reativas de oxigênio, por exemplo (DEEPAK *et al.*, 2011; DERBALAH; ELKOT; HAMZA, 2011; SIDDIQI; HUSEN; RAO, 2018).

2.4. Nanopartículas de prata

As nanopartículas de prata são constituídas por agregados de átomos de prata, variando de diâmetro e que apresentam diferenças em relação às propriedades da prata metálica. Dentre as propriedades, possuem ações biológicas importantes, como exemplo, a atividade antifúngica contra *Cladosporium cladosporoides*, *Aspergillus niger*, *Candida albicans* (KIM *et al.*, 2009), *Rhizopus* sp., e *Aspergillus* sp. (MEDDA *et al.*, 2015) além da ação contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, por exemplo (MOHAN *et al.*, 2014).

As suspensões de AgNPs são conhecidas por apresentarem um alto pico de absorção de radiação nos comprimentos de onda entre 400-670 nm, tal fenômeno é decorrente da sua ressonância plasmônica de superfície (OLIVEIRA, 2005). Esse pico de absorção acontece quando a frequência do campo magnético das partículas se torna ressonante com o movimento eletrônico. Devido a isso, é observada uma variação de cor característica em uma solução dispersa de AgNPs, indo do marrom avermelhado ao marrom escuro, proveniente do tamanho das NPs produzidas e da composição do meio em que elas estão dispersas (ALBERNAZ, 2014).

Desde tempos antigos, o uso de nanopartículas de prata como agente antimicrobiano vem sendo utilizado, quando a água e o vinho, por exemplo, eram estocados em vasos de prata, evitando, assim, sua contaminação e deterioração (SILVER, S.; PHUNG; SILVER, G., 2006; WANG *et al.*, 2005). No século XVII, o íon da prata era utilizado para curar úlceras e feridas crônicas, terapia esta, que provavelmente se originou na idade média (KLASSEN, 2000).

Na antiguidade, a prata era usada como agente antimicrobiano no tratamento de queimaduras e como agente terapêutico contra patologias causadas por bactérias. Em geral, ela possui uma vantagem em relação a outras classes de antibióticos, devido ao fato de os microrganismos serem pouco resistentes a este metal (SILVER S., 2003). Devido a crescente resistência bacteriana à maioria dos antibióticos comerciais, surgiu a necessidade da elaboração de novos compostos e tecnologias associados no combate a microrganismos, o que impulsionou a utilização das nanopartículas de prata (AgNP) (CHOPRA, 2007; ANTUNES *et al.*, 2013).

Estudos revelam que o mecanismo de ação antimicrobiano das AgNPs está associado a liberação dos íons metálicos pelas AgNPs que reagem com os grupos tiol e sulfidril presentes nas proteínas dos microrganismos (RAI; YADAV; GADE, 2009; ANDRADE, 2013). Elas são capazes de invadir as células, ao interagir com ligações dissulfeto de glicoproteínas e proteínas de microrganismos tais como vírus, bactérias e fungos, sendo nociva às proteínas, e conseqüentemente afetando negativamente o DNA (dificulta sua replicação) e o RNA (impossibilita sua transcrição) (LARA *et al.*, 2011). Tais fatos decorrem da alta afinidade da prata com os elementos enxofre e fósforo. A membrana celular, assim como muitas proteínas, é rica em enxofre, enquanto o DNA é rico em fósforo. Estas modificações nas estruturas prejudicam os processos celulares que podem ocasionar sua morte celular (MORONES, 2005; SHARMA, 2009). Quando as AgNPs penetram o interior celular, os íons de prata liberados provocam a desnaturação do DNA, que impede a divisão celular além de inativar enzimas da cadeia respiratória, o que provoca um aumento na produção de radicais livre e grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio (ROS), que levam a indução apoptótica e conseqüentemente a morte celular (RAI *et al.*, 2009; KON, K., RAI, M., 2013).

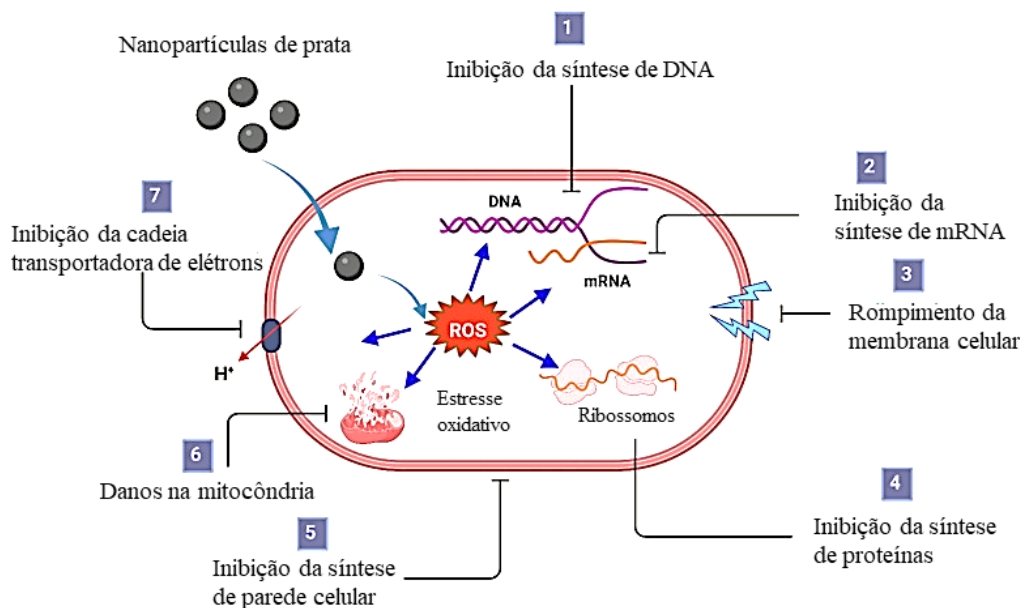


Figura 3. Interação de AgNPs com a célula. Ao chegar na membrana plasmática, as nanopartículas podem penetrar o interior da célula por difusão simples ou por endocitose, isso permite o transporte das NPs do meio extra para o intracelular. Uma vez no meio intracelular, a tendência é que as NPs se decomponham em Ag⁺, que são muito mais tóxicos para a célula. Atuam reduzindo o teor de ATP das células, causando danos na mitocôndria e aumento das espécies reativas de oxigênio (ROS). No núcleo, as nanopartículas podem provocar danos no DNA, como aberrações cromossômicas. Além de interferir no ciclo celular, possivelmente devido ao reparo do DNA modificado, ou de forma irreversível, o que leva à apoptose. FONTE: ASHARANI et.al. 2008 apud SOUSA, E., 2018.

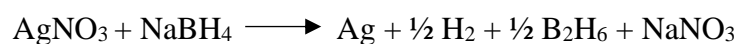
2.4.1. Rotas de síntese

A primeira síntese documentada de nanopartículas metálicas foi descrita por Faraday, desde então inúmeras rotas de síntese têm surgido em busca de uma melhor dispersão de partículas, novas estruturas e reagentes, além de rotas menos nocivas ao meio ambiente. (EDWARDS; THOMAS, 2007).

A síntese de nanopartículas de prata pode ser realizada por diferentes métodos, como físico, químico e biológico. O método de redução química é um dos métodos mais frequentemente utilizados para a síntese de AgNPs que permite um melhor controle do tamanho das NPs. Nesta técnica, é utilizado um agente redutor forte para produzir partículas pequenas de prata, como por exemplo, o hidreto de boro, o citrato e o ácido ascórbico (MARAMBIO-JONES; HOEK, 2010; PANACEK, *et al.*, 2006). Para que elas se mantenham estáveis e não se agreguem, é essencial a presença de uma camada estabilizante. Grupos poliméricos são empregados nessa etapa tais como o dodecil sulfato de sódio (SDS), a polivinilpirrolidona (PVP) e o citrato tri-sódico, a fim de evitar a

aglomeração da solução coloidal de AgNPs, que pode resultar na alteração das suas propriedades iniciais (KHAN; MUKHERJEE; CHANDRASEKARAN, 2011).

Um dos primeiros e principais métodos de síntese consiste na redução das partículas pelo íon citrato (TUKEVITCH et al., 1951). Apesar de continuar a ser utilizada, alternativas estão sendo desenvolvidas, já que este método é sensível a variação de pH, presença de materiais orgânicos e força iônica do meio, sendo um método a redução por Brust-Schiffrin, em que o boro-hidreto de sódio é usado como agente redutor, conforme a reação abaixo (BRUST *et al.*, 1994).



Essa síntese foi modificada e grupos tióis têm sido empregados substituindo o boro-hidreto de sódio por brometo de amônio, aumentando a estabilidade da dispersão. O aperfeiçoamento deste método tem sido investigado visto que a utilização de grupos tióis apresentam limitações, como a necessidade de reagentes compatíveis com o estabilizante (AHAMED *et al.*, 2008).

A síntese de nanopartículas por meios físicos tem sido realizada por energia térmica, fotorredução, irradiação de micro-ondas, além da deposição a vácuo, ablação a laser, sol-gel, co-precipitação, impregnação, deposição a vapor e eletrodeposição. Esses métodos possuem algumas vantagens, como a velocidade de síntese, a radiação usada como agente redutor e não uso de substâncias químicas perigosas envolvidas. Entretanto, entre as desvantagens incluem o baixo rendimento, alto consumo de energia, contaminação por solventes e falta de distribuição uniforme (EL-NOUR *et al.*, 2010; ELSUPIKHE *et al.*, 2015).

Os métodos físicos e químicos são comumente agressivos ao meio ambiente, por usar soluções e metodologias que usualmente geram resíduos tóxicos e demandam alto gasto de energia (RAI; YADAV, 2013). O uso de produtos químicos tóxicos gera ainda mais preocupação, pois podem se depositar na superfície das nanopartículas. Neste contexto, há uma necessidade cada vez maior no desenvolvimento de protocolos de síntese que sejam limpos, e produzam nanopartículas biocompatíveis. Os métodos que se aproximam desses princípios são incluídos numa classe conhecida como “síntese verde” (NARAYANAN; SAKTHIVEL, 2010).

2.4.2. Síntese verde de nanopartículas de prata

A síntese verde de nanopartículas representa um avanço em relação a outros métodos, geralmente envolve organismos não patogênicos, não usa reagentes químicos tóxicos e pode produzir quantidades grandes de nanopartículas. A combinação de síntese de nanopartículas mediada pelo uso de organismos é chamada de síntese biológica. Os seres humanos, assim como outros organismos biológicos, são capazes de produzir e interagir com nanopartículas (BUZEA *et al.*, 2007).

O método de síntese biológico representa um avanço sobre os demais, por ser barato e utilizar tecnologia limpa. Trata-se de uma alternativa viável para exploração da síntese de nanomateriais com propriedades ópticas, químicas, eletrônicas e antimicrobianas únicas (DAR; INGLE; RAI, 2013; DHANASEKARAN *et al.*, 2011). Organismos como bactérias e fungos são muito utilizados na produção de nanopartículas graças a sua facilidade de cultivo (THAKKAR; MHATRE; PARIKH, 2010).

Na síntese de nanopartículas essencialmente química, três componentes principais são requeridos: um sal de prata (geralmente AgNO_3); um agente redutor responsável pela transformação química do íon prata (geralmente boro-hidreto de sódio) e um agente estabilizador, usado para controlar o crescimento das nanopartículas, prevenindo sua agregação (geralmente polivinilpirrolidona) (SI, G. *et al.*, 2011). Entretanto, pela síntese oriunda de microrganismos, o agente redutor e o estabilizador são substituídos por moléculas produzidas pelo próprio microrganismo (LEDWITH; WHELAN; KELLY, 2007).

A primeira síntese de AgNPs com a utilização de bactérias aconteceu em 2000; AgNPs com tamanho inferior a 200 nm foram sintetizadas a partir do organismo *Pseudomonas stutzeri*. Em 2008, foi realizada a biossíntese de nanocristais de prata com o uso de *Bacillus licheniformis*, em que a adição de solução aquosa de íons prata em contato com a biomassa bacteriana promoveu a redução desses íons e a formação de AgNPs (GHORBANI *et al.*, 2011). Em 2001, o uso de fungos do gênero *Verticillium* representou um novo método biológico de síntese de nanopartículas de prata, em que a interação entre o fungo e os íons prata, em solução aquosa, resultou na redução intracelular dos íons Ag^+ e a formação de nanopartículas com dimensões entre 13 e 37 nm. A redução dos íons prata ocorre por um processo enzimático, demonstrado por Duran e colaboradores ao produzir nanopartículas metálicas, via síntese extracelular, com a utilização de fungos *Fusarium oxysporum* (DURÁN *et al.*, 2015).

A síntese de nanopartículas é uma forma de resposta de defesa do microrganismo à toxicidade do material em seu estado de origem (KLAUS-JOERGER *et al.*, 2001). Por exemplo, boa parte dos metais são tóxicos, e a redução no interior da célula com a formação de complexos insolúveis em água, é um mecanismo desenvolvido para diminuir a toxicidade do metal. A síntese biológica pode ser influenciada por fatores como: temperatura de cultivo, pH, substratos utilizados na síntese, osmolaridade, entre outros. Diversos microrganismos são capazes de sintetizar nanopartículas no meio intracelular ou no meio extracelular, após excreção de enzimas redutoras; outros, ainda, podem realizar ambos os processos (RAI; DURAN, 2011).

Dentre os sistemas biológicos usados na produção de nanopartículas de prata, os fungos apresentam vantagens em relação a bactérias e plantas. A secreção extracelular das proteínas que atuam na síntese de nanopartículas é uma característica vantajosa dos fungos, considerando que o cultivo e processamento do micélio são mais simples e adaptáveis em comparação com fermentações bacterianas, que necessitam de equipamentos sofisticados. Além disso, há uma alta secreção do composto relacionado à síntese em “nano fábricas” de fungos, o que aumenta significativamente a produtividade de nanopartículas (SASTRY *et al.*, 2003; HULKOTI; TARANATH, 2014).

2.4.3. Biossíntese de nanopartículas de prata por fungos

A biossíntese de nanopartículas metálicas por fungos apresenta vantagem devido ao fato destes metais apresentarem-se monodispersos com diferentes composições químicas, tamanhos variados e dimensões bem definidas. Quando biossintetizadas intracelularmente, são menores quando comparadas com as nanopartículas de pratas produzidas extracelularmente (HULKOTI; TARANATH, 2014).

As nanopartículas de prata apresentam um melhor rendimento na produção por fungos em comparação com bactérias, e um dos fatores é a presença de enzimas específicas nos fungos que ajudam a redução dos íons de prata. Dentre elas, a presença de nitrato redutase dependente de α -NADPH e uma proteína fitoquelatina como agente estabilizador, forma nanopartículas com tamanho variando entre 10 e 25 nm (KUMAR, S. A *et al.*, 2007).

Dentre as vias sugeridas para a síntese de nanopartículas através de fungos, estão duas etapas: Na primeira, está a interação eletrostática entre grupos COO^- presentes nas enzimas da parede celular do micélio e os íons Ag^+ , o que leva à absorção de íons de prata

carregados positivamente pela superfície da célula fúngica. A segunda etapa é a redução dos íons Ag^+ pelas enzimas presentes na parede celular, seguida pela geração de núcleos de prata, que eventualmente formam as AgNPs (MUKHERJEE *et al.*, 2001).

A produção extracelular de AgNPs de alguns fungos é mediada por nitrato redutase, entretanto, apenas a presença dessa enzima não é suficiente, sendo necessária a participação de uma cadeia transportadora de elétrons para redução dos íons de prata. Tal mecanismo foi proposto em 2005, conforme demonstrado no esquema abaixo (DURÁN *et al.*, 2005).

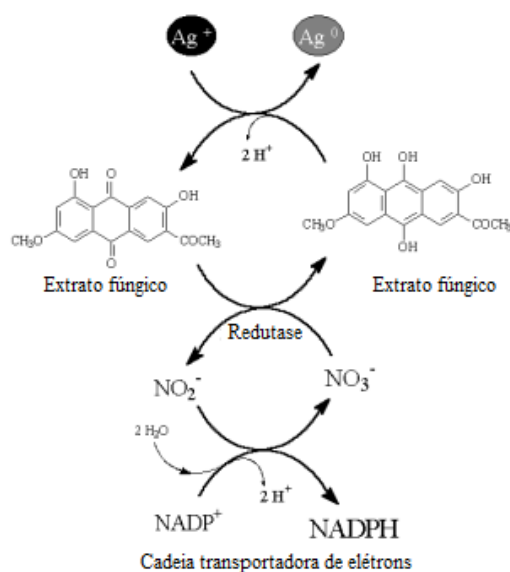


Figura 4. Mecanismo da biossíntese de nanopartículas de prata por intermédio de nitrato redutase e cadeia transportadora de elétrons. FONTE: Adaptado de DURÁN *et al.*, 2005.

O uso de agentes biológicos como os fungos para levar à formação de NPs é uma estratégia moderna de biossíntese racional, sendo uma alternativa para os métodos físicos e químicos. Diversas espécies fúngicas podem ser utilizadas na biossíntese, fungos do gênero *Cladosporium*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus*, entre outros, por exemplo, são capazes de produzir grandes quantidades de enzimas extracelulares. Além da redução mediada por nitrato redutases, é necessária a secreção de aminoácidos, peptídeos e proteínas que se liguem às nanopartículas para promover a formação de compostos estáveis e monodispersos. Nesta condição, os grupos carbonila dos aminoácidos, por exemplo, podem se ligar fortemente à prata e revestir as nanopartículas impedindo a sua aglomeração, formando um capping proteico ao redor das

nanopartículas, aumentando sua biocompatibilidade, estabilidade, além de diminuir sua toxicidade (DURÁN *et al.*, 2011; GUILGER-CASAGRANDE, M. *et al.*, 2019).

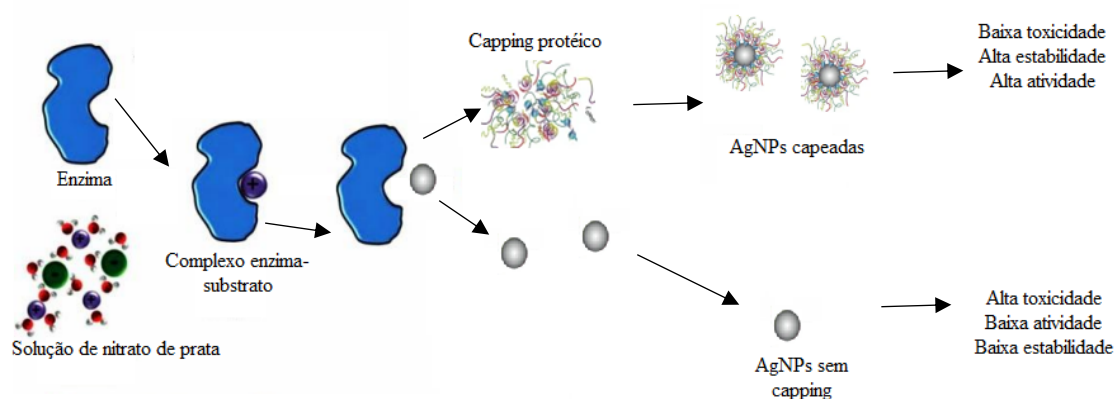


Figura 5. Mecanismo que mostra o papel das proteínas extracelulares na síntese de nanopartículas de prata. FONTE: Adaptado de JAIN *et al.* (2010).

2.4.4. *Trichoderma reesei* na produção de nanopartículas

O gênero *Trichoderma* contém espécies que apresentam importância econômica devido à sua grande produção de enzimas industriais e antibióticos, além da sua capacidade de agir como agentes de controle biológico contra patógenos. *O Trichoderma reesei* é conhecido por seu alto crescimento, facilidade de manuseio na produção em larga escala e pouca exigência para procedimentos de produção (SIVASITHAMPARAM; GHISALBERTI, 1998; BISCHOF, R.H.; RAMONI J.; SEIBOTH B., 2016).

Na síntese biológica de nanopartículas de prata, o micélio é exposto à solução de sal metálico (nitrato de prata), que leva o fungo a produzir enzimas e metabólitos para sua própria sobrevivência, devido à toxicidade natural do metal. Nesse processo, os íons de prata são reduzidos às nanopartículas metálicas através do efeito catalítico da enzima extracelular e metabólitos produzidos pelo fungo (DAS; MARSILI, 2010; VAHABI, MANSOORI, KARIMI, 2011).

A presença de hidrogenases e redutases em fungos como *Fusarium oxysporum*, *T. reesei* e *T. viride*, em suspensões de células lavadas, cultivadas aerobiamente ou anacronicamente em um meio com glicose e sais, mostraram-se essenciais para a redução do ferro férrico (OTTOW, KLOPOTEK, 1969). Muitos fungos que apresentam essas propriedades, em geral, são capazes de reduzir Au (ouro) ou Ag (prata) (LLOYD, 2003)

Além disso, foram relatadas que enzimas extracelulares, várias naftoquinonas (BELL *et al.*, 2003) e antraquinonas (BAKER; TATUM, 1998) com excelente propriedade de redução, em *Fusarium oxysporum*, poderiam atuar como transporte de elétrons em reduções de metais (KUMAR, C.; MCLENDON, 1997).

A formação de AgNPs, assim como suas propriedades (tamanho e forma) depende de diferentes parâmetros, como a concentração do sal de prata, pH, tempo de reação, temperatura, além de condições de transferência de massa (VERMA; KHARWAR; GANGE, 2010). O *Trichoderma reesei* é bem conhecido por sua alta produção de enzima extracelular, até 100 g/L (OKSANEN *et al.*, 2000), quantidade superior em comparação a outros fungos. Também produz uma grande variedade de metabólitos, sendo o melhor fungo celulolítico usado em estudos (DURAND; CLANET; TIRABY, 1988; BISCHOF, R.H.; RAMONI J.; SEIBOTH B., 2016). É amplamente utilizado para a transformação de genes em larga escala e outras indústrias que lidam com a superexpressão de enzimas extracelulares (ARCHER; JEENES, MACKENZIE, 1994), sendo agora também explorado na redução de sais de prata em nanopartículas biotecnologicamente.

2.4.5. Mecanismo antiviral das nanopartículas de prata

As AgNPs podem atuar em vários alvos no vírus e inibir sua replicação. Comparado a outros antivirais convencionais, há menos chance de desenvolver resistência. O principal mecanismo antiviral das AgNPs é através da inibição da ligação entre o vírus e a célula hospedeira (MORI *et al.*, 2013; MORRIS *et al.*, 2019).

A infecção viral acontece a partir da adesão do vírus aos receptores do hospedeiro, seguida de penetração, replicação e brotamento. As principais estratégias dos mecanismos antivirais são através do bloqueio da fixação viral nos receptores do hospedeiro (efeito profilático), e inibir a replicação e brotamento viral (efeito terapêutico) (DU *et al.*, 2018; GALDIERO *et al.*, 2011; KHANDELWAL *et al.*, 2014;). Estudos indicam que as AgNPs podem atuar sendo inibidores da entrada viral, bloqueadores de glicoproteína (gp120), inibidores da síntese de RNA viral e do brotamento viral, além da competição com vírus para se ligar à célula através do sulfato de heparam (BARAM-PINTO *et al.*, 2009; DU *et al.*, 2018; ELECHIGUERRA *et al.*, 2005; MORI *et al.*, 2013; SPESHOCK *et al.*, 2010; MORRIS *et al.*, 2019).

Testes de citotoxicidade mitocondrial e integridade da membrana plasmática indicaram que AgNPs não afetaram a viabilidade da célula, além de exibir capacidade de ativar macrófagos, induzindo a produção de genes estimuladores de interferon (IFN) ativados (ISG-20, ISG-54) e citocinas pró-inflamatórias, como interleucina (IL-6, IL-8) (CASTILLO *et al.*, 2008; DU *et al.*, 2018; LUO; CHANG; LIN, 2015; MORRIS *et al.*, 2019). A eficácia das AgNPs frente a diversos vírus foi demonstrada em estudos, como por exemplo, o vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1), vírus Herpes simplex tipo 1 (HSV-1), vírus da diarreia epidêmica suína (PEDV), que é um vírus pertencente à família dos Coronavírus, vírus Tacaribe (TCRV), além de vírus respiratórios, como adenovírus, parainfluenza e influenza (H1N1, H3N2) (BARAM-PINTO *et al.*, 2009; DU *et al.*, 2018; ELECHIGUERRA *et al.*, 2005; MORRIS *et al.*, 2019; SPESHOCK *et al.*, 2010; XIANG *et al.*, 2013).

Através de experimentos realizados *in vitro* e *in vivo*, foi demonstrado o potencial de redução das AgNPs frente a replicação do vírus sincicial respiratório (RSV), além da produção de citocinas pró-inflamatórias nos pulmões dos camundongos e em linhagens de células epiteliais (MORRIS *et al.*, 2019).

De acordo com Galdiero *et al.* 2011, as AgNPs se ligam à membrana da glicoproteína spike (S) por meio de ligações dissulfeto, devido à sua afinidade química pelo enxofre, essa interação dificulta a internalização do vírus nas células ao inibir a interação entre a glicoproteína e seu receptor específico. A absorção celular de AgNPs ocorre através dos processos de endocitose e macropinocitose. Uma vez dentro da célula, as AgNPs inibem a capacidade de replicação do vírus (GALDIERO *et al.*, 2011).

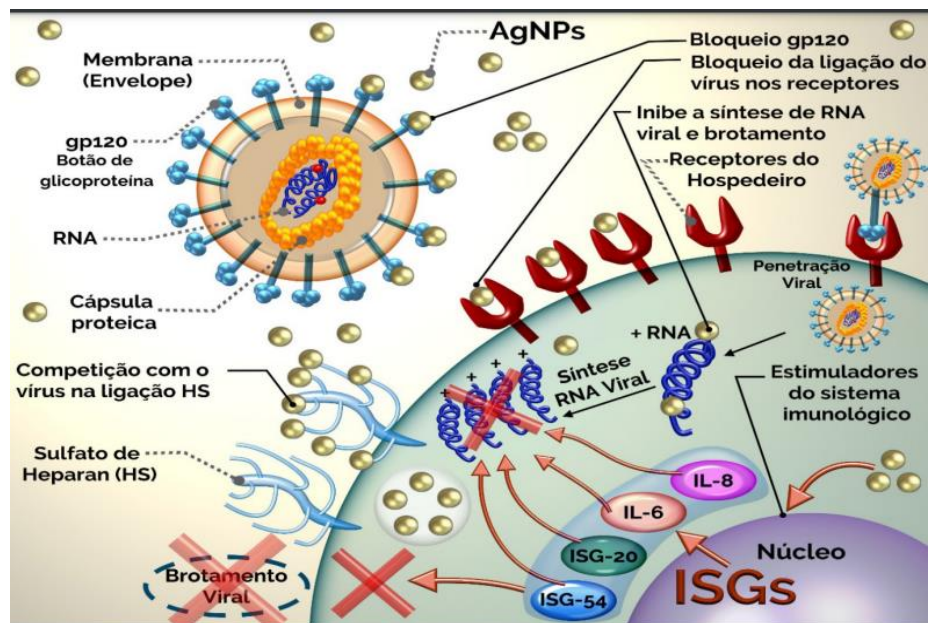


Figura 6. Esquema representativo dos potenciais mecanismos de ação das AgNPs frente a partículas virais. As nanopartículas de prata podem atuar no meio extracelular impedindo a ligação do SARS-CoV-2 com a proteína ACE-2, ou no meio intracelular dificultando a replicação do RNA viral e a saída do vírus da célula. FONTE: MISIRLI et al., 2022

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do trabalho é a produção de nanopartículas de prata por síntese biológica (AgNPs) usando o fungo *Trichoderma reesei*, e estudo seu potencial antimicrobiano a doença pandêmica COVID-19.

3.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir de AgNPs;
- Caracterizar as nanopartículas de prata produzidas pelo fungo *Trichoderma reesei*;
- Avaliar a citotoxicidade das nanopartículas de prata em ensaios *in vitro* usando células de adenocarcinoma de pulmão Calu-3;
- Investigar o potencial das AgNPs sobre o efeito citopático causado por SARS-CoV-2;
- Investigar o efeito no inflamassoma das células infectadas por SARS-CoV-2;
- Investigar o potencial de ação das AgNPs em modelo animal de COVID-19;

Materials e Métodos

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Organismos e linhagens celulares utilizados

I. Linhagem *Trichoderma reesei* QM9414 proveniente do estoque particular do Laboratório de Biotecnologia Molecular (LBM) FMRP, USP;

II. Linhagem celular Calu-3 (ATCC: HTB-55) obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (<http://bcrj.org.br/celula/Calu-3-Lung-Adenocarcinoma-Human>), inicialmente crio-preservadas em 95% de meio soro fetal bovino (FBS) e 5% de DMSO;

III. Linhagem de células Vero-E6 (ATCC: CCL-81-VHG) obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (<https://bcrj.org.br/celula/0245>), inicialmente crio-preservadas em 95% de meio soro fetal bovino (FBS) e 5% de DMSO;

IV. O SARS-CoV-2 Brasil/SPBR-02/2020 foi gentilmente cedido pelo Prof. Edison Luiz Durigon (ICB-USP, São Paulo). Os estoques de vírus foram feitos em células Vero-E6. A titulação do vírus foi feita por diluições seriadas de 10 vezes inoculadas em monocamadas quadruplicadas de células Vero-E6 e incubadas a 37°C em 5% de CO₂. Todos os experimentos in vivo SARS-CoV-2 foram feitos em um laboratório de biossegurança nível 3 (BSL-3) localizado no Centro de Pesquisa de Vírus da Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto. Os experimentos in vitro, envolvendo o SARS-CoV-2 foram realizados em um laboratório de biossegurança nível 2 (BSL-2), parte integrante do Laboratório de Imunologia e Inflamação Pulmonar Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto.

V. Camundongos Wild-type C57BL/6 e camundongos transgênicos para expressão do gene ACE2, K18-hAce2

4.2. Meios de cultura utilizados

I. Meio Maltose-dextrose ágar (MEX)

Extrato de malte 3% (p/v)

Ágar-Ágar 2% (p/v)

II. Meio Batata-dextrose broth

26,5 gramas do meio (CAT: K25-1261- Kasvi) para cada litro de água

III. Meio Mendels-Andreotti

I. Solução mineral (500mL) – 50%

- 2,8 g/L $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$

- 4 g/L KH_2PO_4

- 0,6 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$

- 0,8 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$

II. Tampão Citrato-Fosfato 0,1M pH 5 (480mL) – 48%

- 0,2M $\text{Na}_2 \text{HPO}_4$ (PM: 141,96 g/mol)

- Adicionar ácido cítrico 2M até atingir o pH 5

III. Solução de elementos traços 50X (20mL) – 2%

- 250 mg/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$

- 85 mg/L $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

- 70 mg/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

- 100 mg/L $\text{CoCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

- Ajustar o pH para 2 com H_2SO_4

Preparar as soluções 1, 2 e 3 separadamente e acrescentar 1 g/L de peptona bacteriológica e 0,3 g/L de ureia. Misturar as 3 soluções e adicionar a fonte de carbono (glicerol) 2% (p/v).

IV. Meio DEMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) completo para Calu-3

Meio DMEM (#11885-084, Gibco) completo contendo 20% de soro fetal bovino (#12657-029, Gibco) , 1% de Antibiótico/Antimicótico (#15-240 Gibco) , 1% de aminoácidos não essenciais (#M7145 Sigma).

V. Meio RPMI 5%

Meio RPMI 1640 (#11875093, Gibco) suplementado com 5% de soro fetal bovino. É um meio que contém biotina, vitamina B₁₂ e PABA, que não são encontrados no Dulbecco's Modified Eagle Medium (DEMEM).

4.3. Produção de bio-nanopartículas de prata (AgNPs)

4.3.1. Crescimento e manutenção do fungo

O fungo *Trichoderma reesei* (QM9414) foi cultivado em placa de Petri contendo meio de cultura MEX-ágar, constituído de 3% de maltose e 2% de ágar. O cultivo foi mantido em estufa a uma temperatura de 30°C, até crescimento e esporulação, que ocorre de 7 a 10 dias. Após esse período, para estimular o crescimento a formação de micélios, os esporos foram raspados das placas de meio MEX-ágar e adicionados a uma suspensão salina (NaCl 0,8% (p/v); Tween 80 0,05% (v/v)) (10^8 esporos/mL), o qual foi submetido a uma filtração com lã de vidro, e posteriormente adicionado em erlenmeyers de 1 litro, contendo 200 mL de meio Mendels-Andreotti, suplementado com 1% de glicerol, mantendo-se sob a agitação de 200 rpm (rotações por minuto) durante 24 horas.

4.3.2. Cultivo do fungo em condições limitantes para estimular a produção de proteínas

Os micélios do fungo previamente crescidos em meio Mendels-Andreotti foram coletados e inoculados em um volume de 100 mL em de meio de batata-dextrose broth, no qual foi mantido em repouso (condição com baixo teor de oxigênio) em estufa à 30°C, por 7 dias. Em condição de baixa concentração de oxigênio (hipóxia), *Trichoderma reesei* passa a produzir enzimas capazes de produzir nanopartículas de prata.

4.3.3. Produção de nanopartículas de prata usando sal nitrato de prata (AgNO₃)

O sobrenadante contendo as proteínas e metabólitos do fungo foi separado do micélio por miracloth autoclavado. A biossíntese da prata ocorre pela mistura, em erlenmeyer de cor âmbar, do sobrenadante do cultivo (volume variável dependendo da quantidade a ser produzida – foi usado em cada erlenmeyer 50 mL) e de uma solução aquosa de nitrato de prata (AgNO₃) (mesmo volume – 50mL), na concentração de 1 mM. Após a mistura, o pH da mistura foi ajustado a 8.5 usando NaOH. Após isso, foi feita uma filtração usando filtros 0,22µm. A mistura foi então mantida no escuro a 40°C sob rotação de 200 rpm. Conforme a nanopartícula é produzida observa-se que a coloração da solução muda de amarelada, para caramelo escuro a cinza escuro, em um período utilizado de 10 dias, sendo que a biossíntese já é detectada com 24 horas.

4.3.4. Caracterização das nanopartículas de prata produzidas

a) Determinação da concentração das nanopartículas produzidas

A concentração das amostras produzidas foi validada através de uma curva padrão construída utilizando nanopartículas de prata de tamanho e concentração conhecidos (Sigma-Aldrich, #MKCK5339), de 20 nm de diâmetro, na concentração estoque de 0,02 mg/mL, dispersas em solução tampão.

A curva foi determinada utilizando concentrações de 0,02; 0,01; 0,005; 0,0025; 0,00125 mg/mL.

b) Análise da curva de absorvância

Ao longo do período de produção das nanopartículas, 10 dias, foram aliqüotadas amostras a cada 2 dias para medir absorvância em espectrofotômetro, para avaliar o perfil de achatamento da curva para pico de absorvância à medida que passavam os dias de síntese. Para a medida, a suspensão de partículas foi diluída na proporção 1:1, utilizando-se 50 µl das amostras e 50 µl do controle negativo (meio de cultivo batata-broth). As análises foram feitas em forma de varredura (300 nm a 1000 nm) em placa de 96 poços, com volume total de 100 µl, lida em espectrofotômetro.

c) Espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial Zeta

As medidas foram realizadas utilizando o aparelho ZetaSizer Nano ZS. A metodologia de espalhamento de luz dinâmico (*Dinamic Light Scattering*- DLS) permite determinar o diâmetro hidrodinâmico das partículas em suspensão através do espalhamento de luz provocado pelo movimento Browniano das partículas. As medidas foram realizadas utilizando o aparelho Zeta Sizer ZN (Malvern Instruments Ltd., 2004_a).

Essa metodologia também oferece informações sobre a distribuição de populações de nanopartículas de tamanhos diferentes, analisadas por meio da determinação do índice de polidispersividade (PdI). O PdI se refere à variedade do tamanho da amostra em relação à sua distribuição por intensidade (Malvern Instruments Ltd., 2004_b). Esse valor varia de 0 a 1 e, quanto menor, mais monodispersa e, conseqüentemente, menos populações diferentes dispersas na amostra. Foi determinada também a carga de superfície das partículas por meio do potencial Zeta de superfície, valor esse, referente à carga da bicamada elétrica ao redor da partícula sendo, então, um indicativo da

estabilidade coloidal. Quanto maior o valor das cargas, em módulo, maior a repulsão eletrostática entre as partículas e menor o estado de agregação.

Os valores medidos no DLS são sensíveis a variação dos fatores de temperatura, pH e concentração de eletrólitos na solução. Por esse motivo, todas as medidas foram feitas de forma padronizada, utilizando 1 mL de amostra colocadas em cubeta de vidro transparente própria do aparelho. As amostras foram analisadas em triplicata, com número de medidas automático, ângulo de espalhamento fixado em 173° e temperatura a 25°C, com estabilização da temperatura antes das medições. Para as medições, as amostras foram diluídas na proporção 1:1. Os dados foram analisados utilizando o software do equipamento (Malvern Instruments Ltd., 2004_b).

d) Microscopia eletrônica de transmissão (MET) e microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), 10 µL das amostras foram fixados em fixador de Karnovsky (2,5% glutaraldeído, 2% paraformaldeído a 0,1 M, pH 7,2, tampão cacodilato) por 2 horas. A pós-fixação ocorreu em 1% de tetróxido de ósmio no mesmo tampão por 1 hora e, em seguida, corado em bloco com 0,5% de acetato de uranila aquoso, desidratado em acetona e incorporado em meio de Spurr de baixa viscosidade. As seções ultrafinas foram contrastadas com acetato de uranila/citrato de chumbo e observadas em um TEM Jeol 1011 a 80 kV (D.M.P. et al., 2014).

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi feita utilizando a mesma metodologia da MET. Para tal, foram utilizadas a linhagem de células Vero-E6 (ATCC: CCL-81-VHG) e o vírus SARS-CoV-2 (Brasil/SPBR-02/2020).

4.4. Cultura de células de adenocarcinoma de pulmão Calu-3

Para cultivo, primeiramente o frasco contendo a solução estoque das células foi descongelado por agitação suave em banho-maria a 37°C (aproximadamente 2 minutos). Após isso, o frasco foi removido do banho-maria assim que o conteúdo estivesse descongelado, e transferido para um tubo contendo 9,0 mL de meio de cultura DEMEM completo para que o agente crioprotetor DMSO (dimetilsulfóxido) não matasse as células. Em uma centrífuga, após rotação de 125 x g, de 5 a 7 minutos, o sobrenadante foi descartado e o pellet celular ressuspendido com meio completo. As células foram então

ser incubadas em frascos T-75, em atmosfera com 95% de oxigênio (O₂) e 5% de dióxido de carbono (CO₂) à temperatura de 37°C até que se observou confluência.

Para subcultura, e uso em experimentos, o meio de cultura dos frascos foi removido e descartado, seguido de enxágue da camada de células com PBS (tampão fosfato-salino) desprovido de cálcio e magnésio, para remover os vestígios de soro fetal bovino que contém inibidor de tripsina. Então foi adicionado de 3,0 mL a 5,0 mL de solução de Tripsina-EDTA 1X ao frasco, agitado e aguardado um tempo de 5 a 15 minutos a 37°C para que a camada de células estivesse dispersa. Para inativar a ação da Tripsina-EDTA, colocou-se um pouco de meio DEMEM completo. As células foram então coletadas com pipeta, e contadas em microcomputador automático para posteriores experimentos.

4.4.1. Ensaio de citotoxicidade

Foi realizado um ensaio de citotoxicidade, utilizando MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio) para saber qual a concentração máxima de nanopartículas suportada pelas células de adenocarcinoma de pulmão.

O teste do MTT mede os danos provocados por um agente no metabolismo celular de glicídeos, através da avaliação da atividade de desidrogenases mitocondriais. A viabilidade mitocondrial e sua viabilidade celular, é quantificada pela redução do MTT ao sal formazan, insolúvel, que tem a coloração roxa, pela atividade das enzimas desidrogenases. Dessa forma, a quantificação da redução do MTT a formazan é diretamente proporcional à atividade mitocondrial e à viabilidade celular (MOSMANN, 1983).

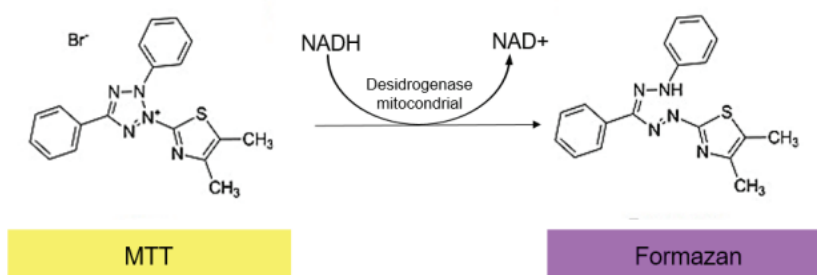


Figura 7. Reação de redução do MTT (um sal de coloração amarela e solúvel em água) a formazan (sal de coloração arroxeadada e insolúvel em água). FONTE: MAGALHÃES, W. et al., 2018.

Para o ensaio de citotoxicidade, as células foram inicialmente plaqueadas em placa de 96 poços contendo 200 µl de meio DEMEM completo em cada poço, e células na quantificação de 1×10^5 células por poço, até a sua aderência na superfície da placa, durante 24 horas. Após isso, o meio foi retirado, e as células aderidas foram submetidas a tratamentos contendo nanopartículas em concentrações que variavam de 0,5 µg/mL a 100 µg/mL diluídas em meio DEMEM completo, e permaneceu em estufa, em atmosfera com 95% de oxigênio (O₂) e 5% de dióxido de carbono (CO₂) à temperatura de 37°C durante 48 horas.

Passado o período, o meio de cultura contendo as nanopartículas foi retirado, e colocado o MTT na concentração de 5mg/mL, previamente preparado e aliqotado, diluído em PBS. Foi utilizado 10 µl de MTT por poço, diluído em 200 µl de meio DEMEM completo. Após 2 horas, todo o meio foi retirado, e as células foram tratadas com 100 µl de DMSO por poço, para que rompesse a membrana celular das células e liberasse os cristais de formazan formados. Após isso, a placa foi submetida a leitura em espectrofotômetro, utilizando 540 nm de absorvância, para avaliar a taxa de sobrevivência.

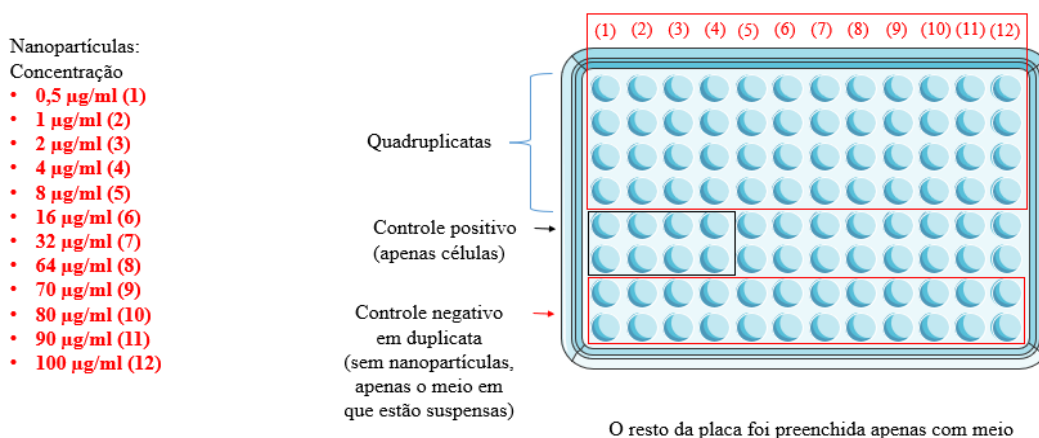


Figura 8. Delineamento experimental do ensaio de citotoxicidade em Calu-3. A concentração de AgNPs usada variou de 0,5 a 100 µg/mL. Para controle positivo foi utilizado apenas células sem AgNPs. Para controle negativo foi utilizado o meio de dispersão das AgNPs. FONTE: autor

4.4.2. Ensaio de infecção de células Calu-3 com o vírus SARS-CoV-2, e tratamento com AgNPs

As células Calu-3, na concentração de 1×10^5 células por poço, foram plaqueadas em placa de 96 poços contendo meio DEMEM (200 µl por poço) completo até sua completa aderência durante 24 horas. Após esse período, metade do volume de cada poço foi retirado e 3 grupos de ensaios foram delimitados conforme a figura 9, sendo o grupo

A submetido ao pré-tratamento com nanopartículas de 4 $\mu\text{g/mL}$ e 8 $\mu\text{g/mL}$ por 1 hora, antes da infecção viral; o grupo B submetido ao tratamento simultâneo de nanopartículas de 4 $\mu\text{g/mL}$ e 8 $\mu\text{g/mL}$, seguido da infecção viral; e o grupo C submetido primeiramente ao contato com o vírus durante 1 hora, e após esse período, suplementado com nanopartículas a 4 $\mu\text{g/mL}$ e 8 $\mu\text{g/mL}$, ambas concentrações diluídas em 100 μl de meio para que completasse o volume total de 200 μl por poço.

Para controle foi utilizado apenas células na mesma concentração e o vírus SARS-CoV-2, que inicialmente estava criopreservado em meio DEMEM sem soro fetal bovino, na concentração $0,2 \times 10^5$ vírus por poço, MOI 0,2, também sendo utilizada essa concentração viral em células em contato com AgNPs.

Após 48 horas, foi realizado a técnica de MTT conforme descrito no ensaio de citotoxicidade.

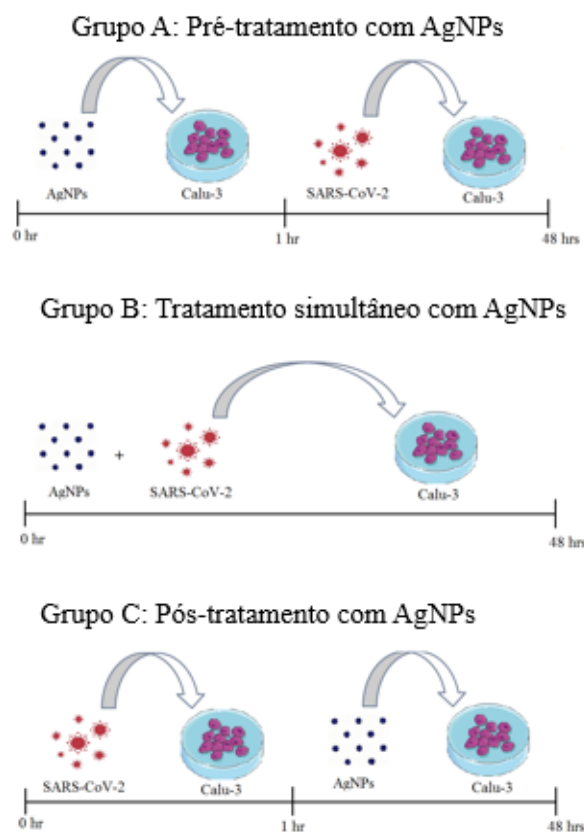


Figura 9. Esquema representativo do ensaio de infecção das células Calu-3 por SARS-CoV-2 e uso de AgNPs. Foram utilizados 3 esquemas de infecção e tratamento. Grupo A represente um pré-tratamento das células com AgNPs antes da infecção viral. Grupo B representa a infecção e tratamento com AgNPs de forma simultânea. Grupo C representa um pós-tratamento das células com AgNPs após a infecção com SARS-CoV-2. FONTE: autor

4.5. Análise in silico da interação entre o RBD da proteína S viral e as nanopartículas de prata

As estruturas 3-D do receptor humano ACE-2 ligado ao RBD da proteína Spike viral para as variantes α , β , δ , γ , κ , \omicron e a linhagem parental (WT) foram obtidas a partir do banco de dados Protein Data Bank (PDB) (<https://www.rcsb.org/>) sob os códigos 7EKF, 7VX4, 7W9I, 7V84, 7VX5, 7WPB e 6M0J, respectivamente. A nanopartícula de prata (AgNP) foi modelada pelo servidor Nanomaterial Modeler, da plataforma CHARMM-GUI (<http://www.charmm-gui.org/?doc=input/nanomaterial>) (JO *et al.*, 2008). Todas as estruturas 3-D foram submetidas à análise de docagem molecular (*docking*) pelo *software* Hex 8.0.0 (<http://www.loria.fr/~ritchied/hex/>) (GHOORAH *et al.*, 2013), por meio das configurações padrões oferecidas no programa, com exceção dos alcances do receptor e ligante, os quais foram definidos como sendo de 45° para cada, uma vez que a área de interface entre os diversos RBD e o receptor ACE-2 já era conhecida experimentalmente. A mesma posição foi utilizada para a verificação da interação entre a proteína viral e a nanopartícula de prata.

O processo de docagem foi validado por meio da metodologia de re-docagem (*re-docking*), em triplicata, entre os variados RBDs e a proteína ACE-2, sendo avaliados os valores de RMSD obtidos a partir da sobreposição dos complexos obtidos pela docagem e seus respectivos originais recuperados experimentalmente do banco de dados PDB (SHIVANIKA *et al.*, 2022; SHEN *et al.*, 2021; ZHENG *et al.*, 2022). A validação das energias de ligação obtidas pelo *docking* no *software* Hex 8.0.0 foi feita pela comparação com a energia de afinidade calculada no *web-servidor* PRODIGY (<https://wenmr.science.uu.nl/prodigy/>) (VANGONE; BONVIN, 2015; XUE *et al.*, 2016; YUNTA, 2016). Os *softwares* Pymol (<https://pymol.org/2/>) e BIOVIA Discovery Studio Visualizer v21.1.0.20295 (<https://www.3ds.com/products-services/biovia/>) foram usados para a visualização e manipulação dos complexos formados, enquanto o pacote GraphPad Prism 8 (<http://www.graphpad.com/>) foi utilizado para a realização das análises estatísticas.

4.6. Infecção de monócitos humanos com SARS-CoV-2 e tratamento com AgNPs

Inicialmente, foram isolados PBMCs (células mononucleares do sangue periférico humano) de indivíduos saudáveis através do método de separação celular por gradiente

de densidade utilizando o Ficoll (Histopaque®-1077, Sigma). O anel de PBMCs foi separado, e marcado com beads anti-CD14+ (CD14+ microbeads human, Myltenil) que permitem a marcação apenas dos monócitos humanos. As células foram passadas em colunas para seleção positiva dos monócitos CD14+ que ficam retidos na coluna enquanto os linfócitos passam livremente. As células CD14+ foram plaqueadas na concentração de 2×10^5 células por poço em placa de 48 poços, no volume final de 200 μ L por poço em meio RPMI 5% e incubadas overnight a 37 °C para a infecção no dia seguinte.

No dia seguinte, o tratamento foi realizado seguindo os 3 grupos utilizados no ensaio de infecção de Calu-3, 1h antes da infecção com SARS-COV-2 (pré-tratamento), junto com a infecção (simultâneo) ou 1h após a adsorção do vírus (pós-tratamento). A concentração de partículas utilizada foi de 4 μ g/mL. Nas três formas de tratamento a partícula e o vírus foram deixados em cultura por 24 horas. A infecção foi realizada com SARS-CoV-2, MOI 5. Como controle de ativação do inflamassoma, foi utilizado a Nigericina na concentração de 10 μ M. Após 24h de incubação, foi coletado o sobrenadante para dosagem de IL-1 β por ELISA, caspase-1 por luminescência e LDH (CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay).

4.7. Quantificação da carga viral de SARS-CoV-2 em células Vero

As células Vero ccl-81 foram plaqueadas em placas de 24 poços seguido da infecção viral de SARS-COV-2, considerando MOI igual a 1. Em duplicata, o vírus foi adicionado em poços contendo apenas meio de infecção viral (DMEM 10% de SFB, 1% Antibiótico/Antimicótico, 2 μ g/ml de tripsina-TPCK) e em poços contendo o mesmo meio de infecção viral com adição de nanopartículas de prata (500 μ g/ml). Após 1 hora de incubação em temperatura ambiente, sob leve agitação para otimizar a adsorção viral, o inóculo viral foi removido com três lavagens usando PBS 1x, e em seguida foi adicionado novamente o meio de infecção viral com e sem suplementação de nanopartículas de prata. As placas foram incubadas por 24h, em estufa com 95% de oxigênio (O₂) e 5% de dióxido de carbono (CO₂) à temperatura de 37°C. O sobrenadante dos poços infectados foram aliqüotados em trizol para realizar a extração do RNA. Após a transcrição reversa utilizando primers randômicos, o cDNA obtido foi utilizado para amplificar o controle endógeno RNase-P e o gene viral de interesse N1. Os resultados foram interpretados realizando o cálculo de Δ Ct.

4.8. Ensaio de toxicidade das nanopartículas de prata *in vivo*

No ensaio realizado *in vivo* foram utilizados animais wild-type com ao menos 8 semanas de vida, de ambos os sexos. Os animais estavam mantidos em gaiolas com até 4 animais, tratados com dieta a base de ração padronizada. Para os testes, os animais foram tratados com AgNPs em concentrações de 5 µg e 10 µg de nanopartículas administradas em 100 µl para cada animal, durante 7 dias. Para controle negativo, foram utilizados animais tratados apenas com 100 µl de água. Para controle da toxicidade, foi medido e acompanhado o peso dos animais ao longo do tempo experimental.

4.9. Ensaio *in vivo* de infecção viral usando SARS-CoV-2 e tratamento com AgNPs

Nos testes realizados *in vivo* foram utilizados camundongos com ao menos 8 semanas de vida, sendo camundongos de ambos os sexos, transgênicos que expressavam o gene para a proteína ACE2, e animais wild-type. A infecção dos animais utilizou concentração de vírus de 2×10^4 e 5×10^4 partículas virais/mL.

Os animais tratados de forma intranasal, com nanopartículas nas concentrações de 5 µg/mL e 25 µg/mL, tendo um pré-tratamento 30 minutos antes da infecção pelo vírus, e um tratamento após 30 minutos da infecção, nos quais foram aplicados 100 µl da solução de nanopartículas por animal. Foram realizados também testes com concentrações de nanopartículas a 5 mg/kg de animal, tratados via vaporização, utilizando 1 mL de solução de nanopartículas. Para controle negativo, os animais foram apenas infectados com o vírus, sem tratamento.

Os animais foram avaliados quanto a perda de peso durante todos os dias pós-infecção para avaliar a possível ação das nanopartículas em evitar essa perda.

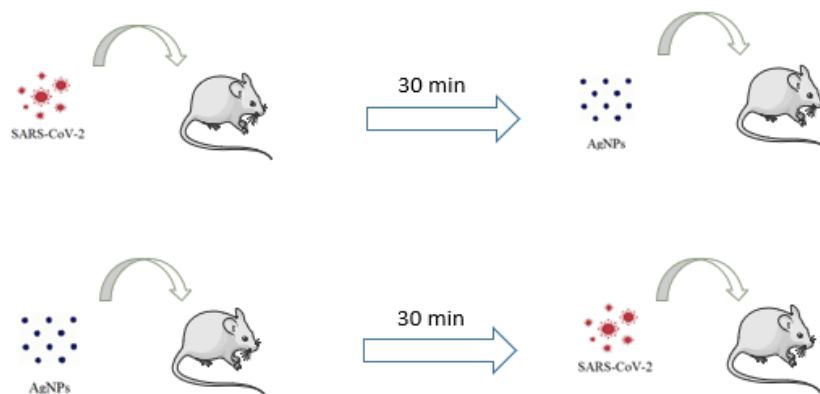


Figura 10. Esquema representativo do teste *in vivo* de infecção viral com SARS-CoV-2 e tratamento com AgNPs. Foram realizados dois tratamentos, um com infecção e posterior aplicação de AgNPs e um com um pré-tratamento com AgNPs e posterior infecção com SARS-CoV-2. FONTE: autor

4.10. Análises estatísticas

Os testes de significância estatística foram realizados utilizando one-way ANOVA seguida de Unpaired t tests no software GraphPad Prism versão 8.0.1. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

Resultados e Discussões

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. *T. reesei* se mostrou um bom produtor de AgNPs

a) Concentração das AgNPs

Com base em um padrão de nanopartículas de prata comercial (Sigma-Aldrich, #MKCK5339), com tamanho conhecido de 20 nm de diâmetro e concentração de 0,02 mg/mL, foi obtida uma curva padrão a partir de diferentes concentrações dessa nanopartícula (Figura 11). O maior pico de absorvância da nanopartícula comercial foi de 395 nm. As nanopartículas de prata possuem picos de absorvância que variam de 370 a 670 nm, qualquer absorvância entre esses valores, é característico da presença de prata. Com isso, a curva padrão para determinar a concentração de prata nas futuras nanopartículas produzidas biologicamente foi feita a partir da leitura em espectrofotômetro a 395 nm.

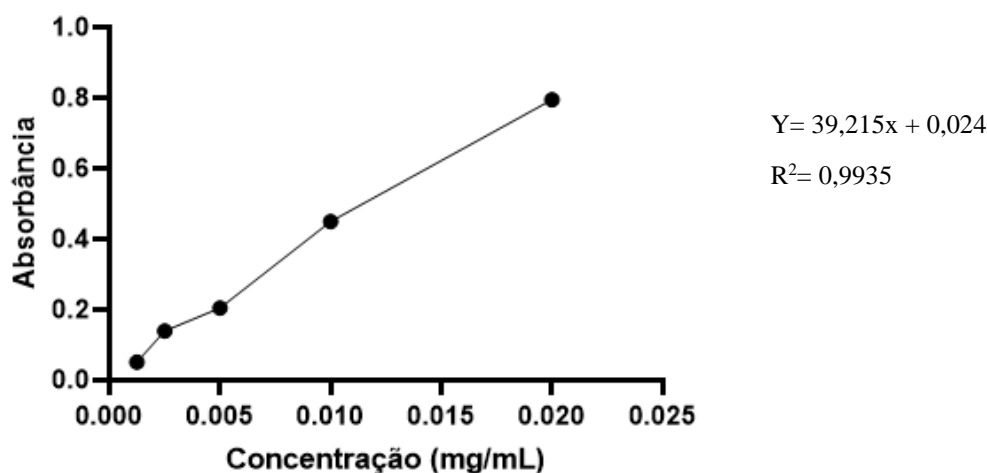


Figura 11. Gráfico de concentração de prata em função da absorvância no comprimento de onda 395 nm.

De acordo com a curva padrão obtida, as AgNPs produzidas biologicamente por *T. reesei* encontravam-se na concentração de 0,022 mg/mL ou 22 µg/mL. Esse valor foi utilizado em futuras diluições para aplicações experimentais. Tal concentração se assemelhou à concentração da nanopartícula comercial, sendo fator indicativo da eficácia do método de produção.

b) Curva de absorbância UV-visível

A biossíntese extracelular das nanopartículas de prata por intermédio do *Trichoderma reesei* envolve a biorredução de íons de prata no filtrado biológico. Segundo Link e El-Sayed (2003), a dispersão das nanopartículas de prata manifesta coloração marrom-amarelada devido à absorção de fótons associados à ressonância de plasma. Tal coloração pode ser vista na Figura 12. A origem da forte absorção de luz por nanopartículas metálicas está associada à oscilação de elétrons induzida por interação com o campo eletromagnético. O campo elétrico de uma onda leva a formação de um polo eletrônico em relação ao núcleo iônico da nanopartícula, criando uma diferença de carga na superfície da nanopartícula. Quando a frequência do campo eletromagnético se torna ressonante com o movimento dos elétrons, uma forte absorção dos elétrons é vista, originando a cor observada (LINK; EL-SAYED, 2003).



Figura 12. Mudança de coloração representando o 1º dia (coloração clara) de contato do filtrado fúngico de *T.reesei* com AgNO_3 e o 10º dia após a formação das nanopartículas (coloração amarronzada).

A mudança na coloração da solução é a primeira evidência da formação das AgNPs, que se confirma através da espectroscopia UV-Vis (Ultravioleta-visível). Após adição de AgNO_3 (1 mM) no filtrado fúngico obtido, passados os 7 dias sob condições de hipóxia, foram feitas análises ópticas por espectrofotômetro UV-Vis a cada 2 dias. O perfil de absorção de luz visível originou-se a partir do espectro de 300 a 1000 nanômetros (nm), conforme mostrado na Figura 13. Tem-se conhecimento que a prata em escala nanométrica tem o seu máximo de absorção variando de 370 a 670 nm (OLIVEIRA,

2005), entretanto, o intervalo mais citado na literatura está entre 400-430 nm para nanopartículas com formato esférico (GONZÁLES *et al.*, 2014).

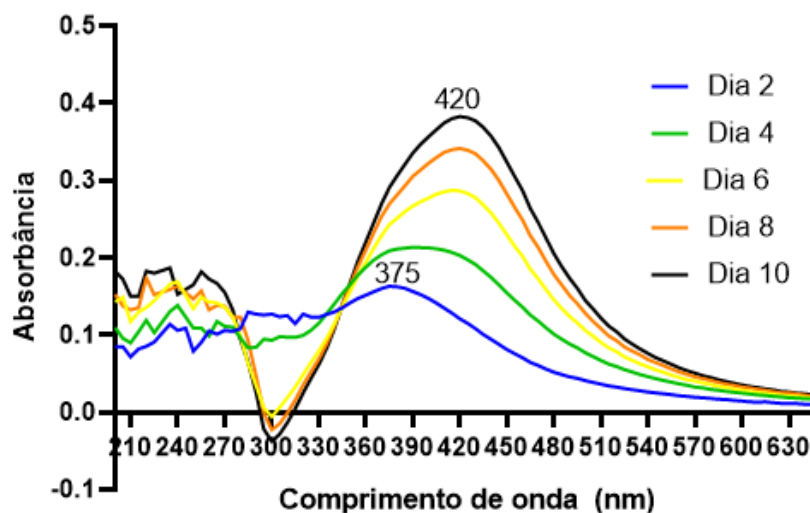


Figura 13. Gráfico representativo do perfil de absorvância da produção de AgNPs de alíquotas recolhidas a cada 2 dias durante o processo de produção das AgNPs.

Considerando a síntese biológica da produção de nanopartículas, o filtrado fúngico utilizado contém proteínas e metabólitos produzidos pelo fungo durante o processo. Por meio das análises do espectro de luz visível ao longo do período de produção, observa-se picos de absorvância entre 210 nm e 270 nm, característico desses compostos orgânicos presentes no meio, que auxiliam na produção e estabilização das nanopartículas. Phanjom e Ahmed relataram picos de 210 e 260 nm para filtragem do fungo *Aspergillus oryzae* usado para a síntese de nanopartículas de prata, que foram atribuídos a amidos e resíduos de aminoácidos, respectivamente (PHANJOM; AHMED, 2017). Durán *et al.* usou *Fusarium oxysporum* para sintetizar nanopartículas de prata, com picos de 265 nm atribuídos a aminoácidos aromáticos de proteínas liberadas no filtrado, o que contribuiu para a redução do nitrato de prata e estabilização das nanopartículas (DURÁN *et al.*, 2005).

A síntese de nanopartículas foi confirmada pela presença de picos variando de 375 nm a 420 nm. Mostrando que após os 2 primeiros dias já estava acontecendo a síntese. O pico aumentou de 375 para 420 nm à medida que a reação prosseguia. De acordo com Khabat *et al.*, espectros mostram que o aumento da intensidade de absorvância com o

tempo indica a formação de maior número de nanopartículas de prata em solução (KHABAT, V. et al. 2011).

De acordo com Paramelle *et al.* 2012, é possível estimar o tamanho das nanopartículas a partir de sua absorvância por UV-visível. Nanopartículas com pico de absorvância de 400 nm apresentam distribuição de tamanho de 20 nm de diâmetro. Enquanto nanopartículas com 430 nm de absorvância, apresentam tamanho de 60 nm de diâmetro (PARAMELLE *et al.*, 2012). Com base nisso, pode-se inferir que a partir do pico de absorvância de 420 nm das nanopartículas após os 10 dias de síntese, o tamanho estimado do diâmetro das nanopartículas é de 50 nm. As análises de distribuição de tamanho foram confirmadas por avaliações usando a técnica DLS.

c) Espalhamento de luz dinâmico (DLS) e Potencial Zeta

Quando uma partícula está dispersa em um meio líquido, forma-se uma camada de solvatação em sua superfície. No diâmetro hidrodinâmico está incluso a medida dessa camada de solvatação, fazendo com que os valores de diâmetro sejam maiores, se comparado, por exemplo, a medidas através da microscopia, que determinam o diâmetro das partículas secas. Além disso, partículas com o tamanho maior do que 1 μm estão sujeitas ao movimento gravitacional, além do Browniano, fazendo com que essa técnica seja adequada apenas para a caracterização de partículas $< 1 \mu\text{m}$ (Malvern Instruments Ltd., 2004_a).

A dupla camada elétrica ao redor das nanopartículas supõe sistemas coloidais como uma fase sólida suspensa em meio líquido. A fase sólida consiste em uma camada de íons firmemente ligados (cargas fixas na superfície), que são os íons determinantes do potencial, e uma carga equivalente de íons carregados com carga oposta, os contra-íons, dispersos na fase líquida, mas próximo a interface, que neutralizam as cargas da superfície. Íons dispersos na fase fluida com a mesma carga da superfície são chamados co-íons. Os contra-íons são atraídos pela superfície e os co-íons são repelidos para longe (VOYUTSKY, 1978; LIMA et al., 2008). Cada partícula e os íons fortemente ligados à mesma se movem como uma unidade, e o potencial elétrico no plano entre a unidade e o meio de dispersão é chamado potencial Zeta (TECHINICAL note, 2022), esse potencial é a função da carga superficial da superfície, de qualquer camada adsorvida na interface, com o meio que a circunda, conforme ilustrado na Figura 14.

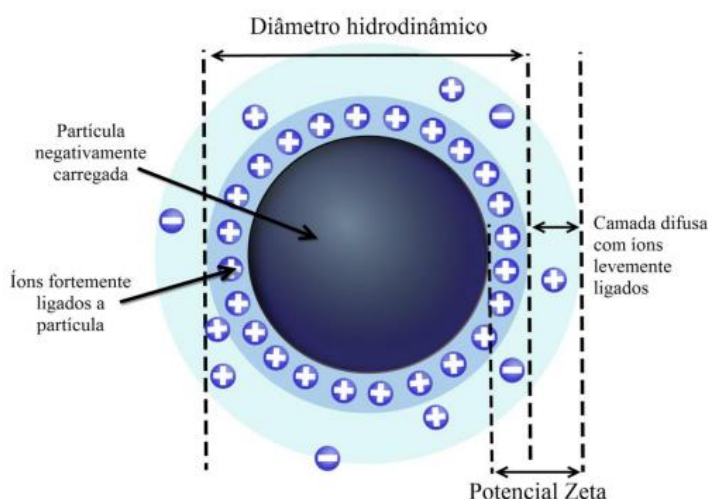


Figura 14. Esquema representativo de partículas em solução, mostrando as medidas de diâmetro hidrodinâmico e potencial Zeta obtidas através da técnica de espalhamento de luz dinâmica (DLS). FONTE: Adaptado de ALBERNAZ, V., 2014.

De acordo com a Tabela 1, o diâmetro hidrodinâmico obtido se apresentou de forma bimodal, com dois tamanhos de nanopartículas dispersas no meio, 86,74 nm, representando a maioria das nanopartículas, 86,5%, e tamanho de 12,21 nm, representando 13,5% do total produzido. Tal informação é confirmada pelo índice de polidispersão (PdI) maior que 0,4, indicando distribuição múltipla. Valores de PdI entre 0,1 e 0,3 são considerados para partículas monodispersas, enquanto valores maiores que 0,3 consideram-se nanopartículas polidispersas. O PdI mostra a intensidade da luz espalhada por diferentes frações das partículas que diferem em seus tamanhos. Esse valor é importante no estudo do tamanho das nanopartículas, pois determina a quantidade de partículas com o mesmo tamanho em solução (SCHATZ *et al.*, 2005).

Tabela 1. Caracterização físico-química das AgNPs

	Z-Average (d.nm)	PdI	Potencial Zeta (mV)
AgNPs	86,74 (86,5%)	0,441	-25,3
	12,21 (13,5%)		

FONTE: autor

A estabilidade das nanopartículas em suspensão depende do balanço entre as forças repulsivas e atrativas no meio. Em geral, a linha divisória entre partículas estáveis e instáveis está entre -30,0 e +30,0 mV. Valores de potenciais iguais a zero (ponto isoelétrico) indicam suspensões completamente instáveis (APPLICATION note, 2022). Neste contexto, o valor obtido de potencial Zeta, -25,3 mV, indica que as nanopartículas produzidas possuem estabilidade isoelétrica devido à carga e possivelmente a presença de proteínas decorrentes do método de síntese em sua superfície.

d) Imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão e microscopia eletrônica de varredura

Para analisar a distribuição das nanopartículas produzidas, seus tamanhos e interações com as superfícies virais e células, foram realizadas microscopias eletrônicas de transmissão e varredura.

Com base imagem obtida por microscopia eletrônica de transmissão (Figura 15), pode-se observar uma distribuição heterogênea de diferentes tamanhos de nanopartículas, variando de 9,98 nm a 25,25 nm. Essa distribuição heterogênea de tamanhos entra em conformidade com o perfil observado na medida DLS.

A diferença de medidas do tamanho das nanopartículas entre a técnica DLS e a MET se dá devido ao fato da técnica DLS medir o tamanho das nanopartículas em solução aquosa, na qual o tamanho pode ser maior devido a outros compostos oriundos da síntese ligados às nanopartículas (proteínas, por exemplo). Essa heterogeneidade das nanopartículas é característica da produção biológica (DURÁN *et al.*, 2010; ISHIDA *et al.*, 2013; PABISCH *et al.*, 2012). A morfologia das AgNPs demonstradas pela imagem de MET sugerem que elas possuem formato esférico, assim como descrito na síntese biológica usando *Fusarium oxysporum* (ABBAS; ABADI, 2017).

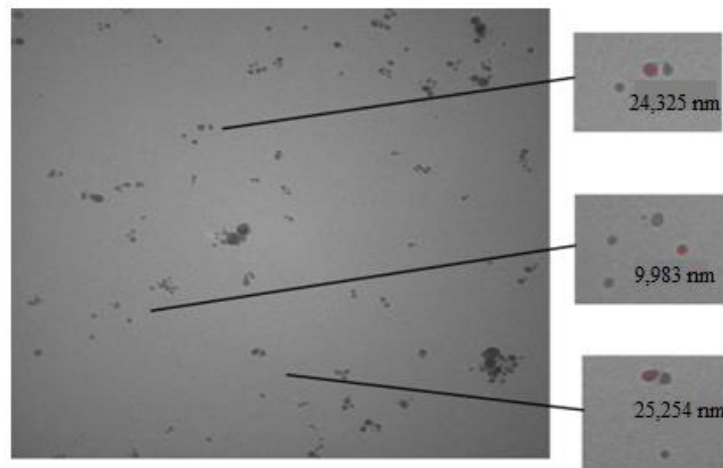


Figura 15. Microscopia eletrônica de transmissão (MET) mostrando a distribuição heterogênea dos tamanhos das AgNPs.

Imagens obtidas por meio de microscopia eletrônica de varredura (Figura 16), mostram a diferença de concentração de partículas virais na superfície de uma célula infectada em contraste a uma célula não infectada, além de células infectadas, e com tratamento de AgNPs. Percebe-se que as células tratadas com AgNPs possuem menor concentração de partículas virais em sua superfície, indicando o poder de ação das nanopartículas.

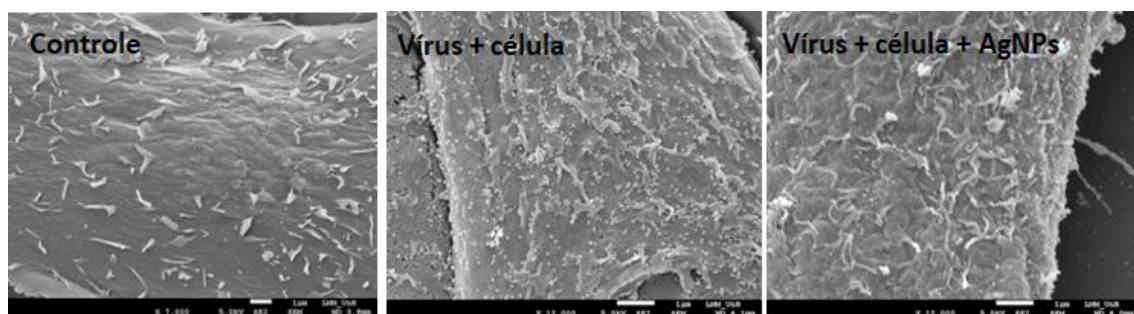


Figura 16. MEV mostrando a interação da superfície de células Vero E-6 sem vírus, apenas em contato com o vírus SARS-CoV-2, e infectado com o vírus junto ao tratamento com AgNPs.

Estudos revelam que as AgNPs se ligam preferencialmente a proteínas da superfície viral ricas em grupos sulfidril e rompem as ligações dissulfeto para desestabilizar a proteína, afetando assim o potencial de infecção viral (ELECHIGUERRA J.L., et al., 2005; KIM J. *et al.*, 2020). Hati e Bhattacharyya demonstraram a importância das ligações dissulfeto na ligação da proteína de pico do SARS-CoV-2 com o receptor de enzima conversor de angiotensina-2 (ACE2) e como a interrupção das ligações levam à ligação viral prejudicada ao receptor (HATI; BHATTACHARYYA, 2020).

Na Figura 17, é possível observar inicialmente que o vírus sem tratamento de AgNPs apresenta característica morfológica arredondado com pouco contraste observado na microscopia. Em contato com as AgNPs, pode-se observar um acúmulo dessas partículas ao redor do vírus, aumentando o contraste visual, e posterior “estrangulamento” do vírus, completando seu mecanismo de ação antiviral.

Considerando o mecanismo de ação dos AgNPs mostrado por outros autores, pode-se presumir que uma das formas das AgNPs exercerem seu efeito antiviral no SARS-CoV-2, é através da interrupção das ligações de dissulfeto na proteína de pico e receptores ACE2. De acordo com a virologista Clarice Weis Arns, do Instituto de Biologia da Unicamp, as nanopartículas de prata agem destruindo a camada externa do Coronavírus, impedindo a sua disseminação (STANISIC *et al.*, 2022).

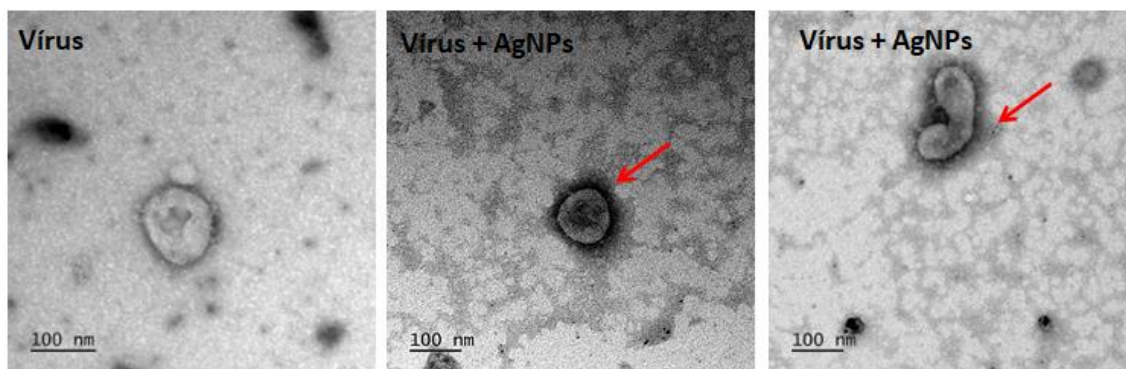


Figura 17. MEV mostrando o mecanismo de ação contra SARS-CoV-2 das AgNPs em células Vero-E6

5.2. Análises in silico

Primeiramente foi analisada a interação entre os diversos RBD (domínio de ligação ao receptor) da proteína S viral e o receptor humano ACE-2 para validar os experimentos de docagem (*re-docking*), sendo que todas as estruturas foram consideradas como válidas, já que, para todas, foram encontrados valores de RMSD (do inglês root-mean-square deviation) $< 2 \text{ \AA}$ (Figuras 18a-b). Além disso, os valores de variação de energia livre obtidos pelo *software* utilizado para a re-docagem dos complexos foram comparados com os valores para os mesmos parâmetros calculados pelo *web-servidor* PRODIGY para os complexos re-docados, tendo sido observada uma correlação satisfatória entre essas diferentes metodologias ($r = 0,8449$, $p = 0,0167$), indicando que a energia computada pela re-docagem pode ser considerada confiável (Figura 18c). Portanto, foi possível dar continuidade às análises computacionais com os complexos que

respeitavam tanto os parâmetros de menores valores de RMSD como de menores valores de energia de afinidade, uma vez que essa combinação é ideal para interações proteína-proteína favoráveis e confiáveis, quando comparada com as estruturas adquiridas experimentalmente.

A Figura 18d mostra as diferentes médias de variações de energia livre de Gibbs (ΔG) para cada interação analisada, sendo que, quanto menor o valor de ΔG , mais favorável essa afinidade. Foi possível notar que, em média, a menor afinidade de ligação pode ser apontada para a interação entre o receptor humano ACE-2 e o RBD da linhagem viral parental ($\Delta G = -306,98$ kcal/mol), enquanto a maior afinidade pôde ser observada entre a proteína ACE-2 e o RBD da variante δ ($\Delta G = -443,58$ kcal/mol). Na verdade, foi possível observar melhor afinidade de ligação entre o receptor humano ACE-2 e todas as variantes do RBD viral, ao contrário da linhagem parental.

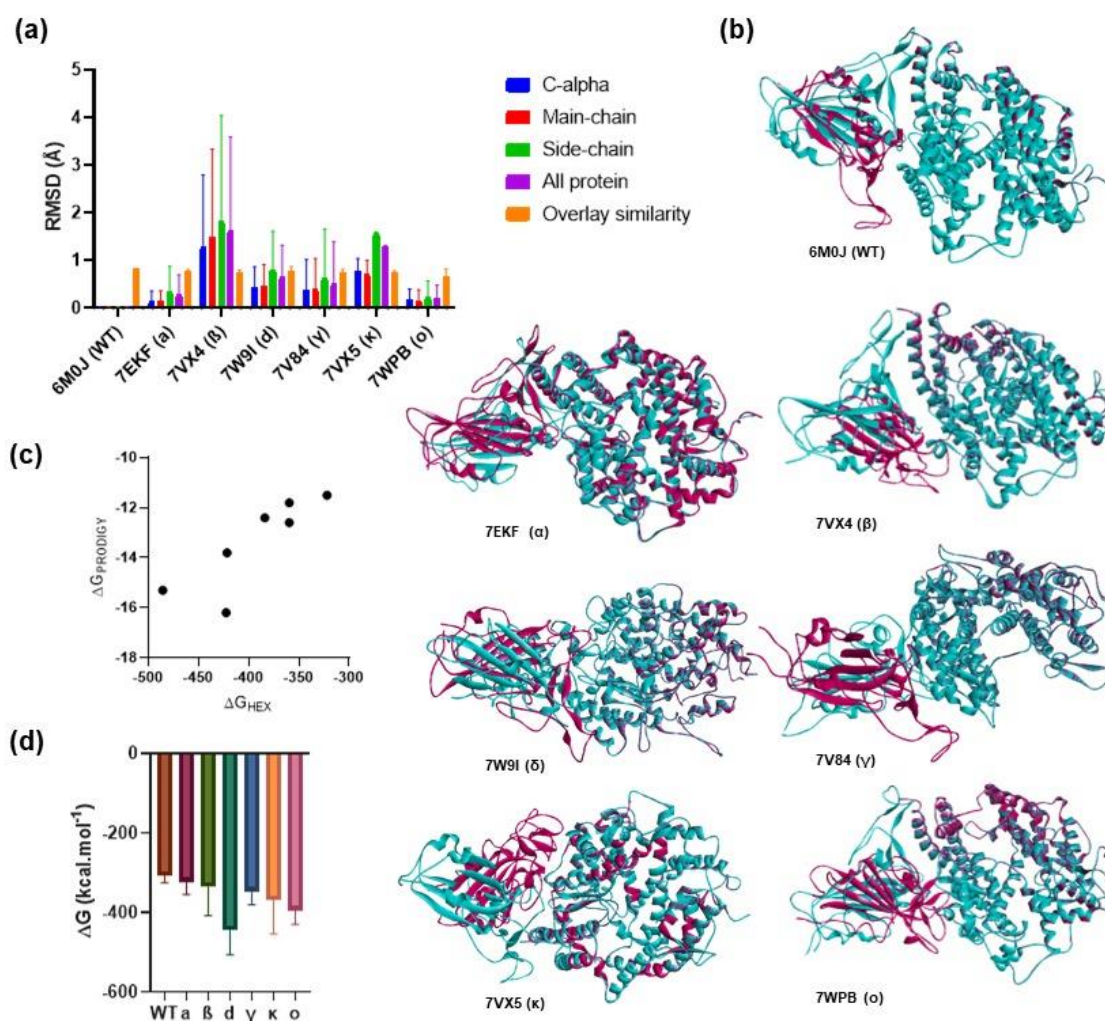


Figura 18. **(a)** RMSDs (Å) obtidos a partir da sobreposição dos complexos docados (RBD x ACE-2) adquiridos pela análise de docagem no software Hex e os complexos obtidos a partir do banco de dados PDB; **(b)** Sobreposições dos complexos obtidos no banco de dados PDB (azul) e seus respectivos complexos re-docados (magenta); **(c)** Correlação entre os valores de energia livre de Gibbs (ΔG) obtidos a partir da re-docagem no software Hex e os valores calculados pelo web-servidor PRODIGY para os mesmos complexos ($r = 0,8449$, $p = 0,0167$); **(d)** Variação média dos valores de energia livre de Gibbs (ΔG) adquiridos através das análises de docagem dos RBDs de cada uma das variantes de SARS-CoV-2 interagindo com o receptor humano ACE-2. (WT: wild-type).

Com relação à interação entre os diversos RBD virais e a nanopartícula de prata, foi possível notar que o RBD da variante γ foi o que apresentou menor afinidade de interação com a AgNP ($\Delta G = -384,73$ kcal/mol), enquanto o pertencente à variante α apresentou maior afinidade com a nanopartícula ($\Delta G = -465,10$ kcal/mol) (Figura 19a). Interessantemente, apesar de verificarmos proporções diferentes de energia livre obtida e

de padrões diferentes de resíduos aminoacídicos participantes dessas interações (Figuras 19b-c), todas as variantes virais e a linhagem parental apresentaram menores valores de variação de energia livre para a interação com a AgNP quando comparando-se com a interação entre as proteínas virais e o receptor humano ACE-2, ou seja, os RBD virais demonstram possuir maior afinidade pela nanopartícula de prata, em geral, do que pelo receptor humano, indicando a possibilidade de a AgNP competir com a proteína ACE-2 para interagir com os diversos RBD virais aqui estudados, podendo, hipoteticamente, haver bloqueio físico da interação entre as proteínas virais e humana. Tomando esses resultados em conjunto, podemos sugerir que a nanopartícula de prata poderia agir como um método profilático contra a infecção pelo SARS-CoV-2, uma vez que ela poderia, em teoria, impedir a entrada do vírus na célula humana, diminuindo a possibilidade de posterior estabelecimento da doença no hospedeiro humano.

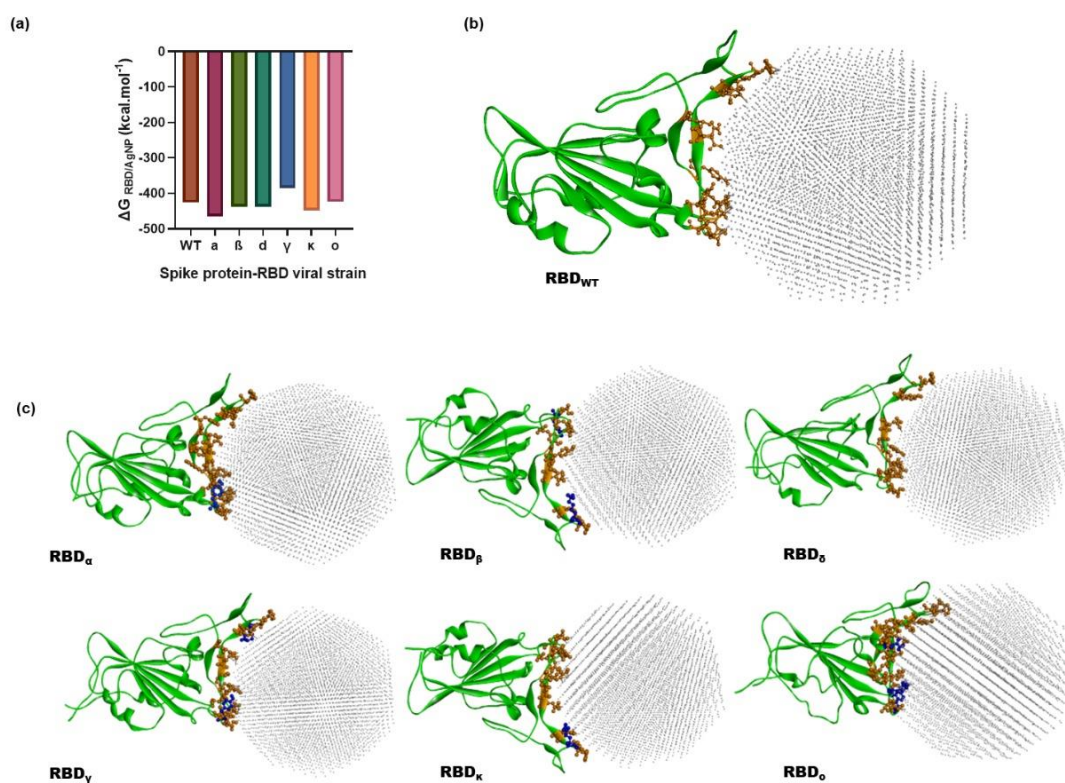


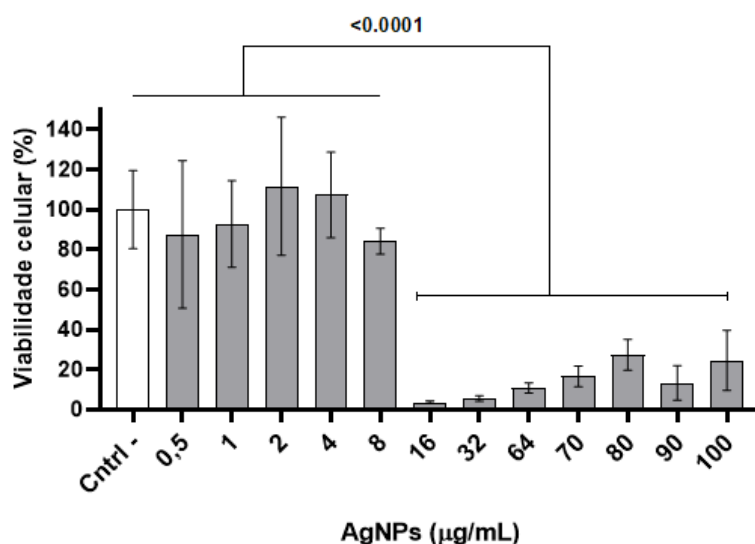
Figura 19. (a) Variação da energia livre de Gibbs (ΔG) para as interações entre a nanopartícula de prata e cada um dos diferentes RBD virais; (b) Ilustração 3-D da interação entre o RBD da linhagem parental de SARS-CoV-2 e a AgNP; (c) Representações 3-D das interações entre a nanopartícula de prata e os RBDs de cada variante de SARS-CoV-2. Os RBDs estão representados em verde, com seus resíduos de aminoácidos coloridos em alaranjado e as mutações pontuais participantes dessa interação para cada uma

das variantes de SARS-CoV-2 realçados em azul escuro. A nanopartícula está representada por um espectro de pontos cinzas.

5.3. Ensaio de citotoxicidade

O tamanho nanométrico das nanopartículas de prata permite sua internalização dentro das células de organismos vivos, o que pode levar a sérias consequências, uma das formas de avaliar o potencial de toxicidade é através do teste de citotoxicidade. Neste trabalho, o potencial de citotoxicidade das AgNPs produzidas pelo fungo *Trichoderma reesei* foi avaliado com base no teste de redução do sal MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio a formazan, conforme demonstrado na Figura 20.

(a)



(b)

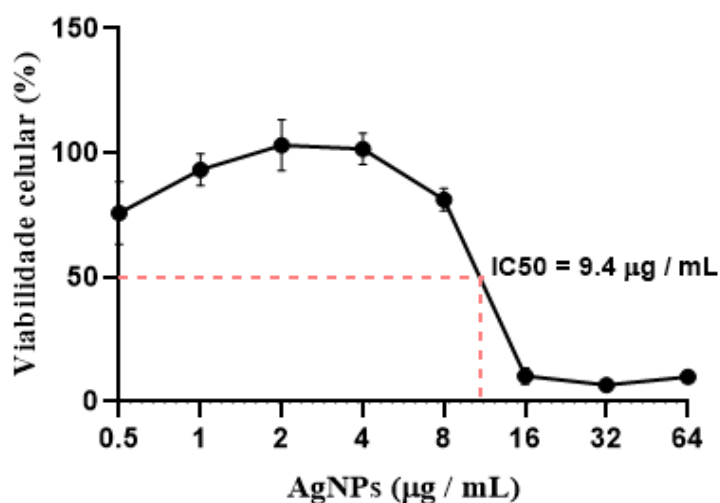


Figura 20. Análise de citotoxicidade das AgNPs em células Calu-3 usando concentrações variando de 0,5 a 100 µg/ml (A). Para avaliar a concentração necessária para inibir 50% das células vivas, foi encontrado o IC50 (B).

Em um primeiro experimento para avaliar o potencial de citotoxicidade das AgNPs, foram escolhidas concentrações variando de 0,5 µg/mL a 100 µg/mL. Observa-se que em concentrações até 8 µg/mL a viabilidade celular se mantém próximo à do controle negativo (sem nanopartículas) (Figura 20a). Concentrações superiores a 8 µg/mL há um decréscimo muito significativo na porcentagem de viabilidade celular, tendo valores inferiores à concentração inibitória de 50% (IC50) das células já na concentração de 16 µg/mL. Para avaliar mais especificamente qual concentração era responsável pela toxicidade de 50% das células, foi encontrado o valor da IC50 igual a 9,4 µg/mL (Figura 20b), isso significa que é necessária essa concentração para matar 50% das células.

A viabilidade celular por MTT é baseada na capacidade das enzimas mitocondriais presentes nas células vivas em reduzir o MTT à um produto roxo-lilás, o formazan. A quantidade de formazan formado é medido por espectrofotômetro para calcular a viabilidade celular relativa, sendo amplamente aceito, visto que essa redução só ocorre em células vivas (ZHU *et al.*, 2004).

Neto *et al.* (2008) relataram que a prata é o metal que apresenta a menor toxicidade para as células animais quando comparado a outros. Entre efeitos que a ingestão de prata em altas concentrações pode ocasionar, estão problemas neurológicos, renais, dores de

cabeça e a Argyria, patologia que causa o azulamento da pele. Doses de 5 mg / Kg / dia de prata são aceitáveis com improváveis riscos para a saúde, sendo a dose limite de 14 mg / Kg / dia. Uma pessoa com um peso de 70 Kg em uma dieta regular pode consumir até 90 mg / dia de prata. (NETO; RIBEIRO; ZUCOLOTTI, 2008).

Estudos realizados por Foldbjerg e colaboradores (2010) relatam que a concentração de 5 µg/mL de nanopartículas de prata apresentam significativa citotoxicidade em linhagens CHO-XRS5 e CHO-K1 (FOLDBJERG; DANG; AUTRUP, 2010). Analogamente, concentrações de 5,64 µg/mL de AgNPs é suficiente para reduzir a viabilidade em 50% em células CHO-K1 e 4,80 µg/mL nas células CHO-XRS5, enquanto a concentração de 4 µg/mL foi o valor de IC50 para células de fígado humano (MEI *et al.*, 2011). Ambos os estudos foram realizados utilizando nanopartículas em escala de tamanho de 5 a 10 nm.

Nanopartículas de prata podem atuar alterando funções celulares normais, afetando a integridade da membrana, além de iniciar processos de morte programados. Essa citotoxicidade pode vir de interações físico-químicas entre átomos de prata e os grupos funcionais de proteínas celulares (SHAHBAZZADEH *et al.*, 2011). Embora esses efeitos se apliquem às nanopartículas de prata em geral, as nanopartículas obtidas por meio da síntese biogênica apresentam características específicas relacionadas ao processo de redução, como por exemplo a presença de proteínas ao redor, formando um capping. Isso geralmente garante uma citotoxicidade menor do que a observada para nanopartículas comerciais e soluções contendo íons de prata (LIMA; SEABRA; DURÁN, 2012). Como pode-se observar nos experimentos conduzidos por Foldbjerg (2010) e MEI (2011), a toxicidade das nanopartículas obtidas de fontes não biogênicas se dá em concentrações muito inferiores à concentração obtida para IC50 pela síntese por *Trichoderma reesei* neste trabalho.

Sabe-se que o potencial de toxicidade da nanopartícula está intimamente ligado ao tamanho das mesmas, ou seja, quanto menor a nanopartícula mais tóxica ela é, além de estar relacionada aos agentes ligados à sua superfície e o pH (MAKAMA *et al.*, 2018). Neste contexto, pode-se observar que as nanopartículas produzidas nesse trabalho com diâmetro médio de 85 nm, estabilizadas pelas próprias proteínas do fungo na biossíntese, apresenta, entre os fatores inibidores de sua toxicidade, um tamanho relativo que diminui essa toxicidade. Grosse e colaboradores que utilizaram demonstraram que as partículas maiores ou mais aglomeradas apresentavam uma liberação de íons Ag⁺ reduzida

comparada com AgNPs menores (GROSSE; EVJE; SYVERSEN, 2013), o que pode justificar o fato de as AgNPs entre 5-10 nm serem mais tóxicas do que as de 85 nm.

Determinada a concentração responsável por inibir em 50% a viabilidade celular, testes aplicando concentrações inferiores foram realizados para avaliar seu potencial de inibir infecções virais, conforme demonstrado nos próximos experimentos.

5.4. Infecção de células Calu-3 com o vírus SARS-CoV-2, e o uso de AgNPs

As AgNPs estão sendo extensivamente pesquisadas por seus efeitos microbiano e a propriedade antiviral. Tem sido observado que as AgNPs interagem com as proteínas estruturais na superfície de vírus extracelulares para inibir a infecção na fase inicial, seja impedindo a ligação viral na entrada, ou danificando as proteínas superficiais para afetar a integridade estrutural dos virions (ELECHIGUERRA et al., 2005; SWATHY *et al.*, 2014). Neste trabalho, observa-se que as AgNPs agem efetivamente inibindo o SARS-CoV-2 conforme demonstrado na Figura 21.

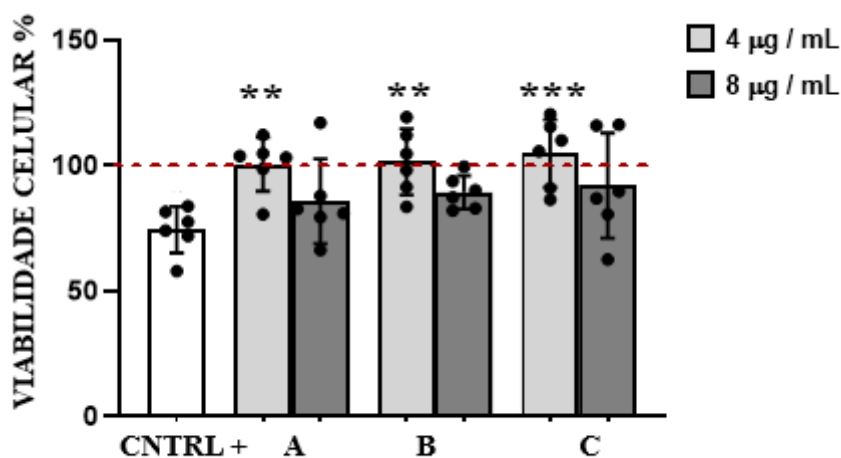


Figura 21. Ensaio de viabilidade celular em Calu-3 infectada com SARS-CoV-2 e ação das AgNPs.

CNTRL+ representa células Calu-3 apenas infectada com o vírus; A representa tratamento com AgNPs 1 hr antes da infecção; B representa aplicação simultânea do vírus e AgNPs; C representa infecção viral 1 hr antes do tratamento com AgNPs. ** $p < 0,0015$; *** $p < 0,007$.

Nos ensaios realizados, observa-se que a concentração de AgNPs de 4 µg/mL foi mais eficaz no quesito taxa de sobrevivência celular, se comparado a concentração de 8 µg/mL. Tal fato entra de acordo com o teste de citotoxicidade, em que concentrações de 8 µg/mL e superiores, há um decréscimo significativo da viabilidade celular. Em todos os ensaios realizados (pré-tratamento das células com nanopartículas por 1 hora antes da

infecção (A); tratamento simultâneo de AgNPs e infecção (B); e pós-tratamento das células com AgNPs após 1 hora decorrente da infecção (C)), observou-se um aumento semelhante da viabilidade celular com o uso da concentração de 4 µg/mL. Esses resultados evidenciam que as nanopartículas de prata (AgNPs) apresentam potencial virucida contra o SARS-CoV-2.

Vários estudos reiteraram o potencial do efeito antiviral dependente do tamanho das AgNPs, com partículas de cerca de 10 nm de diâmetro sendo mais eficazes (GALDIERO *et al.*, 2011). AgNPs revestidas ou tampadas apresentam maiores vantagens em comparação com AgNPs simples, à medida que o revestimento aumenta a estabilidade, diminui a aglomeração e reduz a citotoxicidade dos AgNPs (FAHMY *et al.*, 2019). Tal fato pode ser observado na constância do potencial antiviral das nanopartículas produzidas neste trabalho em concentrações menores, 4 µg/mL, concentração essa, que em nanopartículas de prata sem revestimento, já seria suficiente para matar células.

Existem discussões a respeito do mecanismo de ação das AgNPs como agentes antivirais, que apresentam interferência na replicação viral por dois mecanismos distintos. Esses mecanismos antivirais são ocasionados basicamente por estresse nas células infectadas (devido ao contato físico), geração de espécies reativas de oxigênio, interações com DNA e dano enzimático (AKBARZADEH *et al.*, 2018).

O primeiro mecanismo de ação antiviral é por meio da ligação de AgNPs com resíduos de enxofre das glicoproteínas de superfície do vírus, que evita a interação com o receptor e sua entrada na célula hospedeira (SPESCHOCK *et al.*, 2010; LARA *et al.*, 2011). Em pré-tratamentos com nanopartículas de prata antes da infecção, esse mecanismo seria o mais provável, ao estabelecer um contato prévio do vírus com as AgNPs, e um possível bloqueio da ligação do vírus com as células, dificultando a infecção viral. O segundo mecanismo está relacionado com a passagem de AgNPs por meio da membrana celular que, conseqüentemente, bloqueia de forma eficaz os fatores de transcrição precisos para a montagem adequada da partícula viral (GREULICH *et al.*, 2011). Este mecanismo seria mais observado em tratamentos com AgNPs em células já infectadas com o vírus, sugerindo que pode haver um impedimento na saída de partículas virais para uma reinfeção em novas células.

Considerando os mecanismos de ação das nanopartículas de prata propostos por outros autores, pode-se observar que as AgNPs produzidas por *T. reesei* apresenta ambos os mecanismos de ação, ao inibir a infecção inicial e reinfeção de forma homogênea.

5.5. Quantificação da carga viral

Por meio de análises da carga viral, determinada através da quantificação do número de cópias transcritas do RNA viral presente no meio de cultura, pode-se observar uma maior inibição da quantidade de vírus pela nanopartícula na concentração de 4 $\mu\text{g/mL}$ conforme a Figura 22. É possível observar que em ambos os métodos de pré-tratamento das células Calu-3 com AgNPs, e tratamento simultâneo à infecção, na dose de 4 $\mu\text{g/mL}$, houve diminuição da carga viral, isso indica que as nanopartículas estão oferecendo uma proteção contra multiplicação viral. Como essa multiplicação é dependente da entrada do vírus na célula hospedeira, uma medida profilática está sendo oferecida pelas nanopartículas, estando possivelmente essas nanopartículas agindo no meio externo às células.

No tratamento das células com AgNPs após um prévio contato de 1 hora com o SARS-CoV-2 houve uma maior redução da carga viral (Figura 22, esquema C). Como essa metodologia se baseia na quantificação total da carga viral no meio de cultura das células, pode-se dizer que as células realmente foram infectadas durante esse primeiro contato com o vírus, porém não houve multiplicação das partículas virais, fato observado no decréscimo da concentração da carga viral no meio, indicando uma proteção contra a replicação viral, sendo essa proteção possivelmente de forma intracelular, que impede a saída de partículas virais para o meio de cultivo. Fato esse comprobatório que além de oferecer proteção competitiva contra a infecção viral, conforme demonstrado no mecanismo in silico, também apresenta proteção contra reinfeção, impedindo a saída dos vírions maduros para infectar outras células. Em ambos os tratamentos, concentrações de 8 $\mu\text{g/mL}$ não ofereceram proteção contra multiplicação viral.

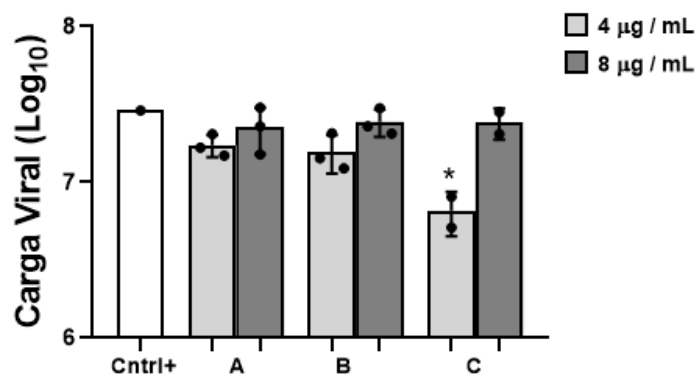


Figura 22. Quantificação da carga viral de SARS-CoV-2 em Calu-3 por meio de 3 sistemas de infecção. A representa tratamento com AgNPs 1 hr antes da infecção; B representa aplicação simultânea do vírus e AgNPs; C representa infecção viral 1 hr antes do tratamento com AgNPs. * $p < 0,0155$.

Conforme demonstrado, as nanopartículas metálicas exercem importante ação contra microrganismos, entretanto, as atividades antimicrobianas e a citotoxicidade das AgNPs estão intimamente ligadas aos materiais de cobertura usados e da carga de superfície. Conforme demonstrado na Figura 23, é possível observar que a solução de filtrado fúngico, contendo apenas as proteínas e metabólitos secretados por *Trichoderma reesei*, utilizadas no processo de formação das AgNPs, também apresentam atividade antiviral, independente da presença da prata.

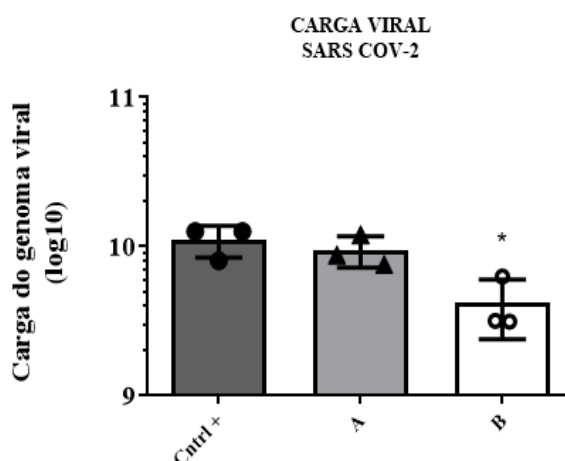


Figura 23. Análise da carga viral em Vero-E6. Cntrl+ representando as células infectadas apenas com SARS-CoV-2; A representando tratamento das células com AgNPs no tempo 0; B representando o tratamento das células apenas com o sobrenadante fúngico. * $p < 0,0088$.

Tal fato demonstra que, além do potencial antimicrobiano da prata, as nanopartículas produzidas por síntese biológica, apresentam em seu *capping* um fator adicional responsável por aumentar sua atividade.

Moléculas antivirais atuam por diversos mecanismos, desde dificultando a entrada do vírus na célula, até atuando diretamente na replicação viral ou ativando mecanismos de defesa celulares (JEROME, 2005). Existem peptídeos utilizados como inibidores virais, agindo como inibidores de enzimas relacionadas a diversas etapas da replicação viral ou competidores de estruturas virais, bloqueando a fusão do vírus na célula hospedeira (CARTER; SAUNDERS, 2013).

Existem drogas que são capazes de inibir a fusão de membranas do vírus e célula hospedeira, um exemplo disso é o efuvirite, um peptídeo de 36 aminoácidos capaz prevenir a infecção da célula hospedeira pelo vírus HIV ao interagir com a gp421, glicoproteína responsável pela fusão do envelope viral à membrana celular, e inibir sua atividade. (RICHMAN, 2003).

Uma das proteínas de superfície dos vírus influenza é a neuraminidase, enzima com papel essencial nos estágios finais da saída do vírus da célula hospedeira. Uma vez inibida, os vírus não são liberados. Sequências de aminoácidos se ligam ao sítio ativo da neuraminidase inibindo sua atividade, a exemplo disso, tem-se o oseltamivir, amplamente utilizado como droga anti-influenza (CLERCQ, 2005).

Com isso, pode-se inferir que as nanopartículas de prata produzidas via biológica pelo fungo *T. reesei* apresentam uma vantagem frente a nanopartículas comerciais, por apresentar um *capping* proteico que aumenta sua atividade antiviral.

5.6. Efeitos das AgNPs no inflamassoma de monócitos humanos

Os receptores Nod-like (NLRs) estão presentes no citoplasma celular e, devido a esta localização, atuam como sensores de defesa do hospedeiro ao reconhecerem PAMPs (Padrões Moleculares Associados a Patógenos) ou DAMPs (Padrões Moleculares Associados a Danos) que não foram reconhecidos pelos receptores transmembrânicos (PHILPOTT *et al.*, 2000; KIM; SHIN; NAHM, 2016).

Com o reconhecimento e sinalização da presença de partículas estranhas, os receptores NLRs formam complexos multiprotéicos chamados inflamassomas. Os receptores NLRP1, NLRP3, NLRC4 e AIM2 formam os inflamassomas mais estudados.

O receptor NLRP3 é considerado o mais versátil devido à sua ampla especificidade em mediar a resposta imune do hospedeiro frente a bactérias (KIM, J. J.; JO, 2013), fungos (MAO *et al.*, 2014), vírus (GUO; CALLAWAY; TING, 2015) e parasitas (GORFU *et al.*, 2014), assim como a produtos de células hospedeiras danificadas.

Após a sinalização promovida pelo reconhecimento de PAMPs ou DAMPs, os receptores NLRP3 se ligam uma molécula adaptadora, que por sua vez ativa a enzima caspase-1, formando o inflamassoma NLRP3 (ANAND; MALIREDDI; KANNEGANTI, 2011; MARTINON; MAYOR; TSCHOPP, 2009). Ao ser ativada, a caspase-1 atua promovendo a clivagem da pró-IL-1 β e pró-IL-18 em suas respectivas formas ativas. Por sua vez, a IL-1 β e a IL-18 atuam contribuindo com a defesa do hospedeiro frente às infecções microbianas por aumentarem as propriedades antimicrobianas dos fagócitos, e iniciarem as respostas imunes adaptativas (VAN DE VEERDONK *et al.*, 2011).

A IL-1 β é uma citocina pró-inflamatória que atua como sendo um importante mediador imunológico, apresentando papel protetor nas infecções bacterianas, virais e fúngicas, uma vez que é essencial para induzir o desenvolvimento da resposta imune Th17 (LEE W. W. *et al.*, 2010; SUTTON *et al.*, 2009)

Além da produção de potentes mediadores pró-inflamatórios, o inflamassoma NLRP3 defende o hospedeiro dos agentes invasores por meio da piroptose, uma morte celular altamente inflamatória regulada pela caspase-1. Durante o processo de piroptose, ocorre formação de poros na membrana plasmática da célula que promovem um inchaço, levando a célula à lise osmótica, e conseqüentemente, a liberação do conteúdo celular, principalmente, LDH e IL-1 β (MALIREDDI; KANNEGANTI, 2013; WELLINGTON *et al.*, 2014).

A morte das células infectadas e, conseqüentemente, a morte do agente infectante, promove uma eficiente eliminação do patógeno, o que confere proteção ao hospedeiro. A piroptose era inicialmente confundida com a apoptose, pois ambas são processos celulares de auto-destruição mediado por caspases. Entretanto, o mecanismo característico de cada uma dessas mortes celulares é diferente. A piroptose é altamente inflamatória, enquanto

a apoptose não é inflamatória pelo fato de promover a absorção do conteúdo celular (ACCARIAS *et al.*, 2015; BERGSBAKEN; FINK; COOKSON, 2009).

Casos graves de COVID-19 são caracterizados por apresentarem um forte processo inflamatório que pode levar à falência de órgãos e morte do paciente. Embora os mecanismos moleculares que conduzem à gravidade da doença ainda permaneçam obscuros, a associação clínica de mediadores inflamatórios como IL-6 e lactato desidrogenase (LDH) com casos graves, sugere que a inflamação excessiva é central em casos com desfecho ruim (CHEN *et al.*, 2020; HAN *et al.*, 2020; HUANG *et al.*, 2020). A indução de processos inflamatórios na célula hospedeira muitas vezes requer o envolvimento dos inflamassomas, que são plataformas de proteínas que se agregam no citosol em resposta a diferentes estímulos (BROZ; DIXIT, 2016).

Com base nisso, testes ativação da caspase-1 e liberação IL-1 β , LDH foram feitos em monócitos humanos doados por indivíduos saudáveis, para avaliar o potencial de inibição do inflamassoma por AgNPs, conforme demonstrado nas Figuras 24A, 24B, 24C.

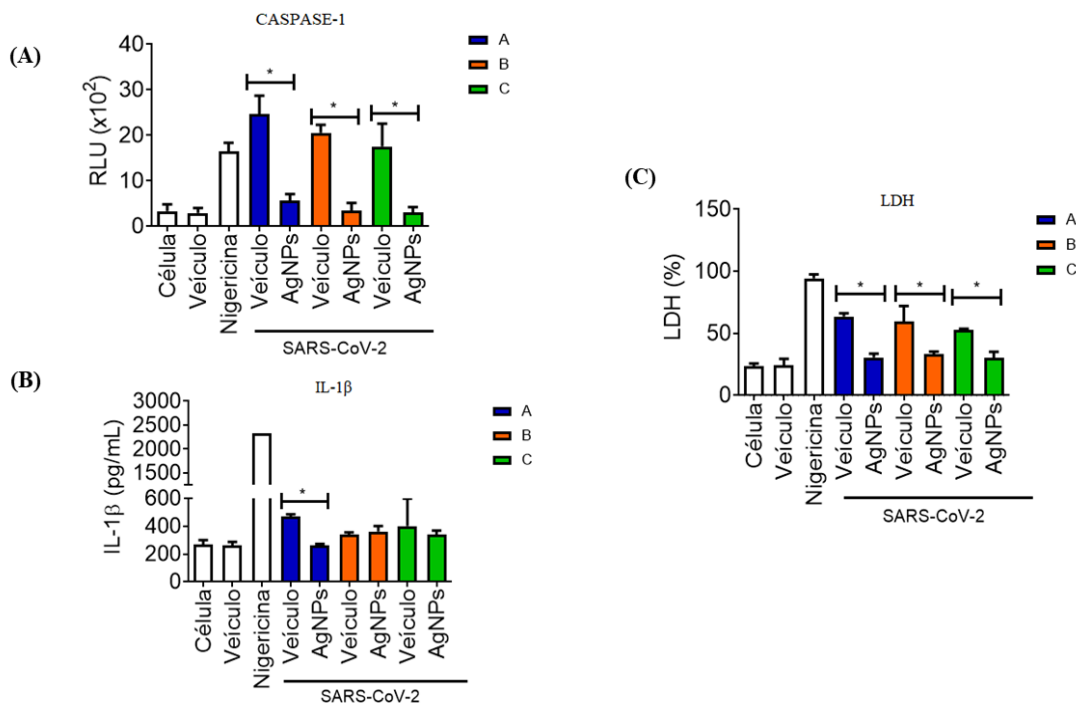


Figura 24. Dosagem de Caspase-1 (A); IL-1 β (B); LDH (C) em monócitos humanos infectados com SARS-CoV-2 e tratados com AgNPs conforme: A representa tratamento com AgNPs 1 hr antes da infecção; B

representa aplicação simultânea do vírus e AgNPs; C representa infecção viral 1 hr antes do tratamento com AgNPs. (A) * $p < 0,0001$; (B) * $p < 0,0397$; (C) * $p < 0,01$.

Nos testes realizados a Nigericina, uma toxina bacteriana conhecida por desencadear o inflamassoma NLRP3, foi usada como controle positivo. O Veículo representa o meio em que as nanopartículas estão dispersas, que é o sobrenadante fúngico com as proteínas e metabólitos envolvidos na síntese de nanopartículas.

De acordo com Rodrigues *et al.* 2021, a ativação da caspase-1 e a produção de IL-1 β e LDH exigem que o vírus SARS-CoV-2 esteja viável, no qual foi demonstrado que o vírus inativado por UV não induziu a ativação da caspase-1 e a produção de IL-1 β ou LDH (RODRIGUES *et al.*, 2021).

Conforme observado nos resultados obtidos pelo tratamento com AgNPs, é notável que a aplicação de nanopartículas de prata antes, concomitantemente ou após a infecção, inibe a resposta inflamatória, ao reduzir os níveis de Caspase-1 ativados, e conseqüentemente a liberação de LDH, enquanto a ação de AgNPs como medida profilática, inibe a liberação de IL-1 β . Como a ativação do inflamassoma depende da viabilidade do vírus SARS-CoV-2, pode-se inferir que as nanopartículas estão inativando o vírus, seja antes de infectar as células, ou impedindo que novos vírions saiam de células infectadas e comprometam outras.

Diferente do observado na quantificação da carga viral, apenas o meio de dispersão das nanopartículas (sobrenadante fúngico) não apresenta ação inibitória do vírus frente a resposta inflamatória, necessitando da associação do complexo nanopartícula de prata-proteínas, para se tornar efetiva.

Dado o fato da COVID-19 ser uma doença altamente inflamatória, pode-se inferir que as nanopartículas de prata produzidas por *Trichoderma reesei* apresentam capacidade de diminuir esse processo de dano celular, que na maioria das vezes está associado ao agravamento da doença e óbitos. Os resultados entram em concordância com o mecanismo de ação proposto por teste in sílico, no qual a preferência de ligação do vírus com as nanopartículas age de forma competitiva a evitar a infecção viral nas células.

5.7. Análises *in vivo*

O primeiro estudo *in vivo* relacionado às propriedades antivirais das AgNPs foi realizado com vírus influenza, em que demonstraram a redução de 78% da carga viral após a exposição do vírus ao tratamento (MEHRBOD *et al.* 2009). Em 2020, em outro estudo envolvendo o vírus influenza, o índice de proteção atingiu 60-70% em camundongos tratados com AgNPs, a vida útil média foi prolongada, além de uma normalização da dinâmica do peso dos animais (KISELVA *et al.*, 2020).

A eficácia da prata no combate a infecções microbianas tem inúmeras comprovações. Associando evidências de ação *in vivo* na literatura, com resultados promissores *in vitro* neste trabalho, testes *in vivo* usando AgNPs sintetizadas por *T. reesei* foram realizados para avaliar o potencial de inibição do SARS-CoV-2.

Para avaliar o potencial tóxico das AgNPs *in vivo*, foi realizado um primeiro ensaio com nanopartículas na massa de 25 µg diluída em 100 µl de água, aplicadas via intranasal, e 5 mg/kg diluída em 1 mL de água aplicada via vaporização. Os animais foram tratados com nanopartículas ao longo de 7 dias e a massa corporal foi medida para verificar se estava tendo perda significativa. Conforme mostra a Figura 25, pode-se observar que as nanopartículas não influenciaram na perda de peso, demonstrando não serem tóxicas para os animais.

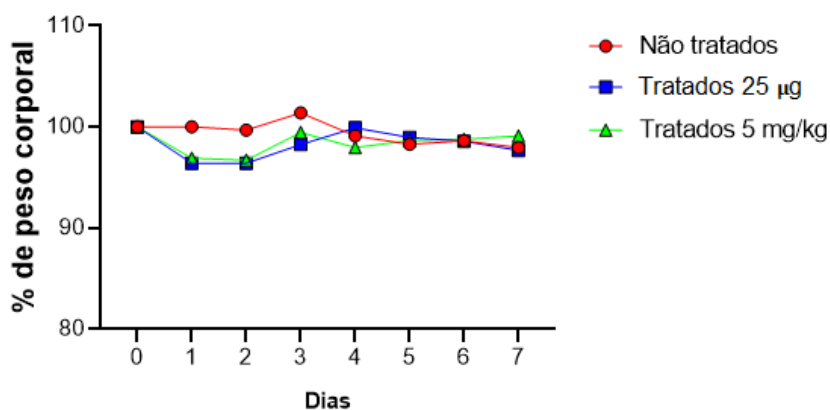


Figura 25. Ensaio de toxicidade de AgNPs *in vivo* usando concentrações de 25 µg e 5mg/kg em animais Wild-type C57BL/6.

Com base nesses dados, e em dados encontrados na literatura, conforme demonstrado na Tabela 2, pressupõe-se que as nanopartículas utilizadas não apresentam

efeito negativo nas concentrações utilizadas. É notado que são necessárias concentrações superiores a 10 mg/kg de animal para causar efeitos negativos em modelo animal. Sendo assim, concentrações que variavam de 25 µg e 5 mg de AgNPs foram utilizadas em ensaios de infecção com SARS-CoV-2 para avaliar o potencial de ação das nanopartículas frente à doença COVID-19.

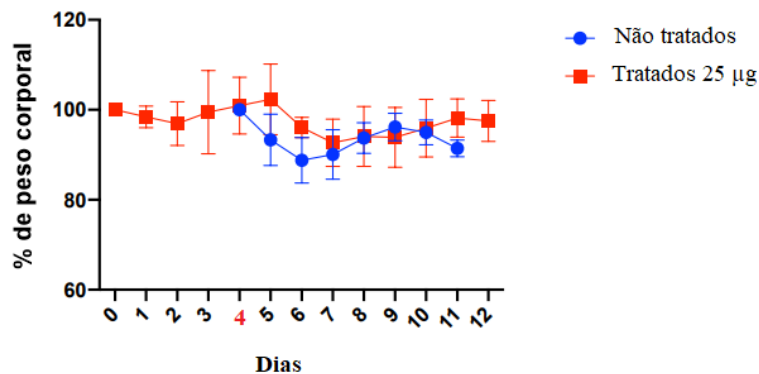
Tabela 2. Potencial de ação de diferentes tipos de AgNPs em modelo animal

NP	Tamanho (nm)	Dose	Modelo	Acúmulo de tecido	Resultados breves	Referências
AgNPs	15	49, 117, 381 µg/m ³ , (90 dias), inalação	Ratos (Sprague Dawley)	Pulmões	Os animais não apresentaram diminuição da função pulmonar durante ou após o período de exposição	SONG <i>et al.</i> (2013)
AgNPs-etilenoglicol	15-40	4, 10, 20, 40 mg/kg (32 dias), parenteral	Ratos (Wistar)	Fígado	Os animais apresentaram alterações hepatológicas com doses de 20 e 40 mg/kg, também foi relatado aumento de ROS no sangue	TIWARI; JIN; BEHARI (2011)
AgNPs	60	30, 300, 1000 mg/kg (28 dias), oral	Ratos (Sprague Dawley)	Bexiga, testículos, ovários, útero, língua, pulmões e rins	Os animais não apresentaram alterações no peso corporal. Exposições superiores a 300 mg/kg podem causar problemas no fígado	KIM <i>et al.</i> (2007)
AgNPs-hidróxido de sódio-hidrazina	3-20	5, 10, 15, 20 mg/kg (21 dias), oral	Ratos albino suíços	Rim, fígado, baço, cérebro e pulmão	Os animais apresentaram redução significativa de peso; perdas máximas de peso foram observadas em doses superiores a 10 mg/kg	SHAHARE; YASHPAL, (2013)

Em um primeiro ensaio, foram administradas as nanopartículas de forma que cada animal recebesse 25 µg, diluídas em 100 µl de água, e aplicadas via intranasal. Os animais foram tratados 3 dias antes da infecção com SARS-CoV-2, e continuado o tratamento ao

longo da evolução da doença. Para análises de efeito das nanopartículas foi avaliado o percentual de peso corporal dos animais, visto que animais infectados com a COVID-19 tendem a perder peso mais rapidamente na evolução da doença. Conforme observado nas Figuras 26A e 26B o perfil dos animais tratados e não tratados, permaneceu o mesmo, havendo perda de peso, em ambos os animais Wild-type C57BL/6 e K18-hAce2.

(A)



(B)

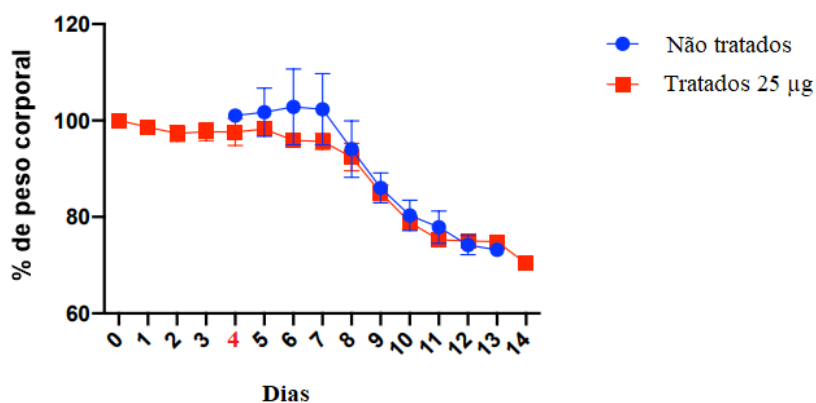
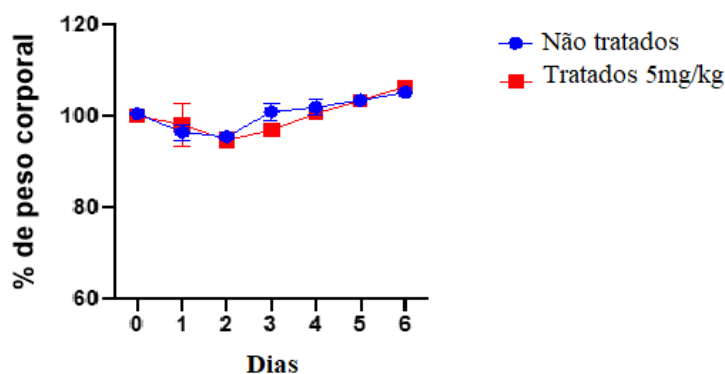


Figura 26. Animais Wild-type C57BL/6 (A) e animais K18-hAc (B) infectados com SARS-CoV-2, tratados com 25 µg de AgNPs e não tratados. Dia 4 representa o dia da infecção com SARS-CoV-2.

Como não houve mudanças significativas, uma dosagem maior de nanopartículas foi aplicada, considerando 5 mg/kg de animal. Dado o fato de a solução de nanopartículas nessa concentração ser muito viscosa, a via de administração foi feita através de vaporização, em que as nanopartículas estavam dissolvidas em 1 mL de água para cada animal, conforme demonstrado nas Figuras 27A e 27B.

(A)



(B)

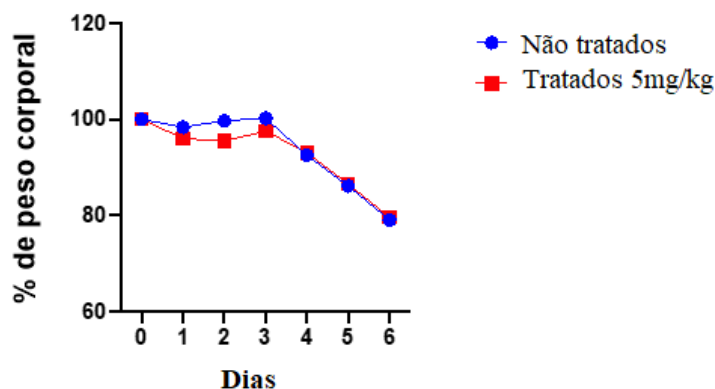


Figura 27. Animais Wild-type C57BL (A) e animais K18-hAce2 (B) infectados com SARS-CoV-2, tratados com 5 mg/kg de AgNPs e não tratados.

É possível observar que em ambos os testes *in vivo* não houve respostas significativas do efeito das AgNPs em prevenir a evolução da doença. Dado o fato da COVID-19 ser uma doença multifatorial, agressiva e que atinge diversos órgãos, sugere-se duas hipóteses. A primeira, devido ao fato de as partículas de prata estarem em escala nanométrica, o caminho percorrido desde a aplicação até o alvo final, que seriam os alvéolos pulmonares (alvo principal de infecção do SARS-CoV-2), a dispersão de nanopartículas pode não estar chegando a atuar no destino pretendido, se perdendo no sistema respiratório. Em outra hipótese, assim como demonstrado na Tabela 2, as nanopartículas de prata têm seu poder de ação em tecidos, visto a evolução rápida da doença, dados baseados apenas em perda de peso não oferecem uma visão específica de

sua ação, com isso, avaliações teciduais e de controle da carga viral foram feitas para inferir o potencial de ação das AgNPs.

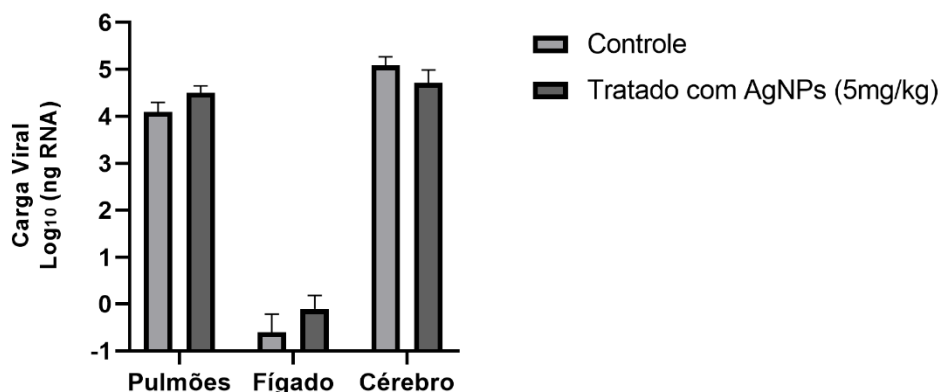


Figura 28. Quantificação da carga viral em tecidos animal, tratados com AgNPs pré e pós-infecção, com dose de 5 mg/kg de peso animal.

Pode-se observar que não houve diferenças significativas na análise de carga viral em tecidos. A hipótese de a dispersão de nanopartículas não estar chegando a atuar no destino pretendido, podendo estar se perdendo no sistema respiratório, se mantém. Pode-se inferir que as AgNPs produzidas pelo fungo *T. reesei* possuem sua melhor ação na prevenção da infecção com SARS-CoV-2, e não como medida de tratamento.

Com relação à dosagem de AgNPs, ainda há poucos estudos envolvendo participantes humanos, portanto, a extrapolação de informações toxicológicas *in vivo* de camundongos para humanos é de grande importância. Essa extrapolação para estimar a exposição humana através da inalação de AgNPs já foi realizada e tomou como base que os camundongos têm uma área de superfície alveolar de 0,409 m², enquanto a dos humanos é de 62,7 m². Feita a correlação por meio de modelagem de dosimetria de partículas multipercurso, utilizando concentração de exposição em relação à massa depositada por área de superfície alveolar, determinou-se que ratos expostos a 100 µg/m³ equivalem a 19 µg/m³ em humanos (JI; YU, 2012; OLLER; OBERDÖRSTER, 2010), o que equivale a 2,398 µg de nanopartículas em camundongos. No entanto, é difícil determinar a toxicidade de AgNPs para humanos porque estudos sobre exposição em humanos ainda são escassos (COUTIÑO *et al.*, 2017).

O uso de AgNPs está em fase pré-clínica, e uma avaliação geral do risco à saúde pública ainda não é possível, embora vários produtos estejam no mercado. Devido às suas aplicações, frente a controle de infecções microbianas, e a necessidade de controle de pandemias, deve-se supor que a exposição humana às AgNPs aumentará substancialmente em um futuro imediato.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

A prata é usada há longo tempo devido suas características antimicrobianas, seja em tratamento de feridas, infecções, ou até mesmo na conservação de alimentos e bebidas. A pandemia da doença COVID-19 iniciada em 2019 colocou o mundo em alerta na busca de alternativas que pudessem ajudar no combate à disseminação dessa doença. Dado o crescente destaque da nanotecnologia em áreas médicas e ciências da saúde, o uso de nanopartículas de prata se mostrou uma alternativa viável na luta contra o SARS-CoV-2.

Dada as vantagens de toxicidade, ambiental ou de aplicação, das nanopartículas de síntese biológica, as AgNPs produzidas por *Trichoderma reesei* aconteceu de forma eficiente, ao produzir nanopartículas dispersas, de formato esférico e que apresentam características físico-químicas desejáveis para sua aplicação. Além disso, a presença de um capping protéico envolto às nanopartículas, garantiu a elas uma maior estabilidade e menor toxicidade.

Ensaio *in vitro* envolvendo linhagens celulares, demonstraram que as nanopartículas de síntese biológica apresentaram baixa toxicidade e elevado potencial de ação contra infecções do SARS-CoV-2, mostrando atividade competitiva com o vírus antes da infecção, estando associada à maior probabilidade de ligação da estrutura viral à nanopartícula, e posterior inativação do vírus, conforme demonstrado em análises *in silico*. Ademais, mostrou também atividade pós-infecção, demonstrando que as nanopartículas também podem ser utilizadas no tratamento de doenças, e não apenas como medida profilática.

Dado o fato da doença COVID-19 ser altamente inflamatória, as AgNPs utilizadas nesse trabalho apresentaram vantagens ao inibir esse potencial de inflamação, que muitas vezes está associado a evoluções críticas e quadros ruins da doença.

Em contrapartida, análises *in vivo* não apresentaram resultados esperados, estando esses, muito provavelmente relacionada à não ação das nanopartículas por dispersão no sistema respiratório. Dada a evolução rápida e multifatorial da doença, novas análises podem ser realizadas, como por exemplo, análises de histologia para visualização do poder de ação nos processos inflamatórios dos tecidos.

Em síntese, entrando em conformidade com trabalhos presentes na literatura, as nanopartículas de prata produzidas biologicamente pelo fungo *Trichoderma reesei*

mostram-se altamente candidatas em aplicações nas áreas da saúde, em especial no combate à pandemia de COVID-19.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACCARIAS, S. *et al.* Pyroptosis of resident macrophages differentially orchestrates inflammatory responses to *Staphylococcus aureus* in resistant and susceptible mice. **European Journal of Immunology**, [S. l.], v. 45, n. 3, p.794–806, mar. 2015.

ADERIBIGBE, B. A. Metal-Based Nanoparticles for the Treatment of Infectious Diseases. **Molecules**, [S. l.], v. 22, n. 8, p. 1370, aug. 2017.

AHAMED, M. *et al.* DNA damage response to different surface chemistry of silver nanoparticles in mammalian cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, [S. l.], v. 233, n. 3, p. 404-410, dec. 2008.

AHMAD, T. *et al.* Biosynthesis, structural characterization and antimicrobial activity of gold and silver nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [S. l.], v. 107, p. 227-234, jul. 2013.

ALBERNAZ, V. L. **Síntese verde de nanopartículas de prata com extrato aquoso de folhas de *Brosimum gaudichaudii*, caracterização fisicoquímica, morfológica e suas aplicações no desenvolvimento de um nanobiossensor eletroquímico**. 2014. 122f. Dissertação (Mestrado em Nanociência e Nanobiotecnologia) – Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2014.

ANAND, P. K.; MALIREDDI, R. K.; KANNEGANTI, T. D. Role of the Nlrp3 inflammasome in microbial infection. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 2, n. 12, p. 1-6, feb. 2011.

ANDRADE, P. F. **Preparação e caracterização de nanopartículas de prata e de nanocompósitos poliméricos antimicrobianos**. 2013. 147p. Tese (Doutorado em Físico-Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2013.

ANTUNES, F. *et al.* Síntese, caracterização e aplicação de nanopartículas de prata como agentes antimicrobianos. **Estudos Tecnológicos em Engenharia**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 20-26, jan 2013.

APPLICATION note, The measurement of zeta potential using na autotitrator Effect of conductivity. Disponível em: <http://www.malvern.com> Acesso em junho 2022.

ARCHER, D. B.; JEENES, D. J., MACKENZIE, D. A. Strategies for Improving Heterologous Protein Production from Filamentous Fungi. **Antonie Van Leeuwenhoek**, [S. l.], v. 65, n. 3, p. 245–250, 1994.

ARDISSON-ARAÚJO, D. M. P. *et al.* Complete genome sequence of the first non-Asian isolate of *Bombyx mori nucleopolyhedrovirus*, **Virus Genes**, [S. l.], v. 49, n. 3, p. 477-484, dec. 2014.

ASHARANI, P. V. *et al.* Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. **ACS nano**, [S. l.], v. 3, n. 2, p. 279-290, dec. 2008.

BAILEY, O. T. *et al.* A murine virus (JHM) causing disseminated encephalomyelitis with extensive destruction of myelin. **Journal of Experimental Medicine**, [S. l.], v. 90, n. 3., p.195-212, sep. 1949.

BAKER, R. A.; TATUM, J. H. Novel Anthraquinones from Stationary Cultures of *Fusarium Oxysporum*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, [S. l.], v. 85, n. 4, p. 359-361, 1998.

BALAGNA, C. *et al.* Virucidal effect against coronavirus SARS-CoV-2 of a silver nanocluster/silica composite sputtered coating. **Open Ceramics**, [S. l.], v. 1, p. 100006, may. 2020.

BARAM-PINTO, D. *et al.* Inhibition of herpes simplex virus type 1 infection by silver nanoparticles capped with mercaptoethane sulfonate. **Bioconjugate Chemistry**, [S. l.], v. 20, n. 8, p. 1497-1502, jul. 2009.

BELL, A. A. *et al.* United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service Studies on Polyketide Toxins of *Fusarium Oxysporum* f sp *Vasinfecum*: Potential Targets for Disease Control. **Pest Management Science**, [S. l.], v. 59, p. 736-747, may. 2003.

BERGSBAKEN, T.; FINK, S. L.; COOKSON, B. T. Pyroptosis: host cell death and inflammation. **Nature Reviews Microbiology**, [S. l.], v. 2, n. 7, p. 99–109, jul. 2009.

BISCHOF, R.H.; RAMONI J.; SEIBOTH B. Cellulases and beyond: the first 70 years of the enzyme producer *Trichoderma reesei*. **Microb Cell Fact.** 2016;15:1–13.

BOVERHOF, D. R. *et al.* Comparative assessment of nanomaterial definitions and safety evaluation considerations. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, [S. l.], v. 73, n. 1, p. 137-150, oct. 2015.

BROZ, P.; DIXIT, V. M. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. **Nature Reviews Immunology**, [S. l.], v. 16, p. 407–420, jun. 2016.

BRUST, M. *et al.* Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase liquid-liquid system. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, [S. l.], v.7, p. 801-802, 1994.

BUZEA, C.; PACHECO, I. I.; ROBBIE, K. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. **Biointerphases**, [S. l.], v. 2, n. 4, p. MR17-MR71, dec. 2007.

CARTER, J. B.; SAUNDERS, V. A. **Virology: Principles and Applications**. 2 nd. ed. Londres: John Wiley & Sons Ltd, may. 2013. *E-book*. ISBN: 978-1-119-99142-7.

CASTILLO, P. M. *et al.* Tiopronin monolayer-protected silver nanoparticles modulate IL-6 secretion mediated by toll-like receptor ligands. **Nanomedicine**, [S. l.], v. 3, n. 5, p. 627-635, oct. 2008.

CERVANTES-BARRAGAN, L. *et al.* Control of coronavirus infection through plasmacytoid dendritic-cell-derived type I interferon. **Blood**, [S. l.], v. 109, n. 3, p. 1131-1137, feb. 2007.

CHEEVER, F. S. *et al.* A murine virus (JHM) causing disseminated encephalomyelitis with extensive destruction of myelin. **Journal of Experimental Medicine**, [S. l.], v. 90, p. 181-194, sep. 1949.

CHEN, G. *et al.* Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. **The Journal of Clinical Investigation**, [S. l.], v. 130, n. 5, p. 2620–2629, may. 2020.

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

CLERCQ, E. D. Antiviral drugs Discovery and development: where chemistry meets with biomedicine. **Antiviral Research**, [S. l.], v. 67, n. 2, p. 56-75, aug. 2005.

CLERCQ, E. D. The discovery of antiviral agents: ten different compounds, ten different stories, **Medicinal Research Reviews**, [S. l.], v. 28, n. 6, p. 929-953, nov. 2008.

COUTIÑO, E. M. R.; ÁVILA, L.; ARROYO, H. O. Las nanopartículas de plata: mecanismos de entrada, toxicidad y estrés oxidativo. *Revista de Educación Bioquímica*, [S. l.], v. 36, n. 2, p. 39–54, may. 2017.

DAR, M. A.; INGLE, A.; RAI, M. Enhanced antimicrobial activity of silver nanoparticles synthesized by *Cryphonectria* sp. evaluated singly and in combination with antibiotics. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 105–110, jan. 2013.

DAS, S. K.; MARSILI, E. A green chemical approach for the synthesis of gold nanoparticles: characterization and mechanistic aspect. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, [S. l.], v. 9, p. 199-204, feb. 2010.

DEDIEGO, M. L. *et al.* Coronavirus virulence genes with main focus on SARS-CoV envelope gene. **Virus Research**, [S. l.], v. 19, n. 194, p. 124-137, dec. 2014.

DEEPAK, V. *et al.* An insight into the bacterial biogenesis of silver nanoparticles, industrial production and scale-up. In: RAI, M.; DURÁN, N. **Metal nanoparticles in microbiology**. Springer Berlin, Heidelberg, p. 17–35, 2011. *E-Book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-3-642-18312-6>. Acesso em: 11 de jul. de 2022.

DE MIRANDA, DANIEL AP *et al.*, Long COVID-19 syndrome: a 14-months longitudinal study during the two first epidemic peaks in Southeast Brazil, **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Volume 116, Issue 11, November 2022, Pages 1007–1014.

DERBALAH, A. S.; ELKOT, G. A. E.; HAMZA, A. M. Laboratory evaluation of botanical extracts, microbial culture filtrates and silver nanoparticles against *Botrytis cinerea*. **Annals of Microbiology**, [S. l.], v. 62, n. 3, p. 1331-1337, nov. 2011.

DESFORGES, M. *et al.* Neuroinvasive and neurotropic human respiratory coronaviruses: potential neurovirulent agents in humans. **Advances in Experimental medicine and biology**, [S. l.], v. 807, p. 75-96, 2014.

DHANASEKARAN, D. *et al.* Biosynthesis and antimicrobial potential of metal nanoparticles. **International Journal of Green Nanotechnology**, [S. l.], v. 3, n. 1, p. 72-82, jul. 2011.

DING, S.; LIANG, T. J. Is SARS-CoV-2 Also an Enteric Pathogen With Potential Fecal-Oral Transmission? A COVID-19 Virological and Clinical Review. **Gastroenterology**, [S. l.], v. 159, n. 1, p. 53-61, apr. 2020.

DU, T. *et al.* Glutathione-capped Ag₂S nanoclusters inhibit coronavirus proliferation through blockage of viral RNA synthesis and budding. **ACS Applied Materials & Interfaces**, [S. l.], v. 10, n. 5, p. 4369-4378, jan. 2018.

DURÁN, N. *et al.* Fungi-Mediated Synthesis of Silver Nanoparticles: Characterization Processes and Applications. *In: Progress in Mycology*. Springer Netherlands, Dordrecht, p. 425-449, 2010. *E-Book*. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-90-481-3713-8_16. Acesso em: 11 de jul. de 2022.

DURÁN, N. *et al.* Mechanistic aspects in the biogenic synthesis of extracellular metal nanoparticles by peptides, bacteria, fungi, and plants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 90, n. 5, p. 1609–1624, jun. 2011.

DURÁN, N. *et al.* Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains. **Journal of Nanobiotechnology**, [S. l.], v. 3, n. 8, p. 1-7, jul. 2005.

DURÁN, N. *et al.* Silver nanoparticle protein corona and toxicity: a mini-review. **Journal of Nanobiotechnology**, [S. l.], v.13, n. 55, p. 1-17, sep. 2015.

DURAND, H.; CLANET, M.; TIRABY, G. Genetic Improvement of *Trichoderma Reesei* for Large Scale Cellulase Production. **Enzyme and Microbial Technology**, [S. l.], v. 10, n. 6, p. 341–346, jun. 1988.

EDWARDS, P. P.; THOMAS, J. M. Gold metallic divided state-form faraday to present-day nanoscience. **Angewadte Chemie International Edition**, [S. l.], v. 46, p. 5480 – 5486, jul. 2007.

ELECHIGUERRA, J. L. *et al.* Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. **Journal of Nanobiotechnology**, [S. l.], v. 3, n. 6, jun. 2005.

EL-NOUR, A. *et al.* Synthesis and applications of silver nanoparticles. **Arabian Journal of Chemistry**, [S. l.], v. 3, n. 3, p. 135-140, jul. 2010.

ELSUPIKHE, R. F. *et al.* Green sonochemical synthesis of silver nanoparticles at varying concentrations of κ carrageenan. **Nanoscale Research Letters**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 916, dec. 2015.

ENJUANES, L. *et al.* Molecular Basis of Coronavirus Virulence and Vaccine Development. *Advances in Virus Research*, [S. l.], v. 96, n. 245, p. 245-286, aug. 2016.

FAHMY, H. M. *et al.* Coated silver nanoparticles: synthesis, cytotoxicity, and optical properties. **RSC Advances**, [S. l.], v. 9, p. 20118-20136, jun. 2019.

FIELD, H.; CLERCQ, E. Antiviral drugs- A short story of their Discovery and development. **Microbiology Today**, [S. l.], v. 53, p. 55-75, jan. 2004.

FLINT S. J. *et al.* **Principles of Virology**, 4 th ed. Virginia: ASM Press, 2015. *E-Book*. ISBN: 978-1-55581-933-0.

FOLDBJERG, R.; DANG, D. A.; AUTRUP, H. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in the human lung cancer cell line, A549. **Archives of Toxicology**, [S. l.], v.85, n.7, p.743-750, jul. 2010.

GALDIERO, S. *et al.* Silver Nanoparticles as Potential Antiviral Agents. **Molecules**, [S. l.], v. 16, n. 10, p. 8894-8918, sep. 2011.

GE, X. Y. *et al.* Isolation and characterization of a bat SARS-like coronavirus that uses the ACE2 receptor. **Nature**, [S. l.], v. 503, n. 7477, p. 535-538, oct. 2013.

GHOORAH, A. W. *et al.* Protein docking using case-based reasoning. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, [S. l.], v. 81, n. 12, p. 2150–2158, dec. 2013.

GHOORBANI, H. R. *et al.* Biological and non-biological methods for silver nanoparticles synthesis. **Chemical Biochemical Engineering Quarterly**, [S. l.], v. 25, n. 3, p. 317-326, 2011.

GONZÁLEZ, A. L. *et al.* Size, shape, stability, and color of plasmonic silver nanoparticles. **The Journal of Physical Chemistry C**, [S. l.], v. 118, n. 17, p. 9128–9136, apr. 2014.

GORFU, G. *et al.* Dual Role for Inflammasome sensors NLRP1 and NLRP3 in murine resistance to *Toxoplasma gondii*. **mBIO**, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 1113-1117, feb. 2014.

GRASSIAN, V. H. When size really matters: size-dependent properties and surface chemistry of metal and metal oxide nanoparticles in gas and liquid phase environments. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 112, n. 47, p. 18303-18313, 2008.

GREULICH, C *et al.* Uptake and intracellular distribution of silver nanoparticles in human mesenchymal stem cells. **Acta Biomater**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 347-354, jan. 2011.

GROSSE, S.; EVJE, L.; SYVERSEN, T. Silver nanoparticle-induced cytotoxicity in rat brain endothelial cell culture. **Toxicology in Vitro**, [S. l.], v. 27, n. 1, p. 305-313, feb. 2013.

GUILGER-CASAGRANDE, M., DE LIMA, R. Synthesis of Silver Nanoparticles Mediated by Fungi: A Review. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [S. l.], v. 7, p. 2296-4185, oct. 2019.

GUO, H.; CALLAWAY, J. B.; TING, J. P.Y. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. **Nature medicine**, [S. l.], v. 21, p. 677-687, jun. 2015.

HAMED, S. *et al.* Controlled biosynthesis of silver nanoparticles using nitrate reductase enzyme induction of filamentous fungus and their antibacterial evaluation. **Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology**, [S. l.], v. 45, n. 8, p. 1588-1596, dec. 2016.

HAN, Y. *et al.* Lactate dehydrogenase, an independent risk factor of severe COVID-19 patients: a retrospective and observational study. **Ageing (Albany NY)**, [S. l.], v. 12, n. 12, p. 11245–11258, 2020.

HATI, S.; BHATTACHARYYA, S. Impact of Thiol–Disulfide Balance on the Binding of COVID-19 Spike Protein with Angiotensin-Converting Enzyme 2 Receptor. **ACS Omega**, [S. l.], v. 5, n. 26, p. 16292-16298, jun. 2020.

HUANG, C., Y. *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **Lanceta**, [S. l.], v. 395, n. 10223, p. P497–P506, feb. 2020.

HULKOTI, N. I.; TARANATH, T. C. Biosynthesis of nanoparticles using microbes-A review. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [S. l.], v. 1, n. 121, p. 474–483, sep. 2014.

ISHIDA, K. *et al.* Silver nanoparticles production by the fungus *Fusarium oxysporum*: nanoparticle characterisation and analysis of antifungal activity against pathogenic yeasts. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [S. l.], v. 109, n. 2, p. 220-228, Apr. 2013.

JEREMIAH, S. S. *et al.* Potent antiviral effect of silver nanoparticles on SARS-CoV-2. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [S. l.], v. 533, n. 1, p. 195-200, nov. 2020.

JEROME, K. R. The road to new antiviral therapies. **Clinical and Applied Immunology Reviews**, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 65-76, feb. 2005.

JI, J. H.; YU, I. J. Estimation of human equivalent exposure from rat inhalation toxicity study of silver nanoparticles using multi-path particle dosimetry model. **Toxicology Research**, [S. l.], v. 1, n. 3, p. 206-210, oct. 2012.

JO, S. *et al.* CHARMM-GUI: A web-based graphical user interface for CHARMM. **Journal of Computational Chemistry**, [*S. l.*], v. 29, n. 11, p. 1859–1865, aug. 2008.

KHAN, S. S.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. Studies on interaction of colloidal silver nanoparticles (SNPs) with five different bacterial species. **Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces**, [*S. l.*], v. 87, n. 1, p. 129-138, oct. 2011.

KHANDELWAL, N. *et al.* Application of silver nanoparticles in viral inhibition: a new hope for antivirals. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**, [*S. l.*], v. 9, n. 1, p. 175-186, jan. 2014.

KICKBUSCH, I *et al.* COVID-19: how a virus is turning the world upside down. **The BMJ**, [*S. l.*], v. 369, n. m1336, apr. 2020.

KIM, J. *et al.* Porous gold nanoparticles for attenuating infectivity of influenza A virus. **Journal of Nanobiotechnology**, [*S. l.*], v. 18, n. 54, mar. 2020.

KIM, J. J.; JO, E. K. NLRP3 inflammasome and host protection against bacterial infection. **Journal of Korean Medical Science**, [*S. l.*], v. 28, n. 10, p. 1415-1423, oct. 2013.

KIM, K. J. *et al.* Antifungal activity and mode of action of silver nano-particles on *Candida albicans*. **Biometals**, [*S. l.*], v. 22, n. 2, p. 235-242, apr. 2009.

KIM, Y. K.; SHIN, J. S.; NAHM, M. H. NOD-Like Receptors in Infection, Immunity, and Diseases. **Yonsei Medical Journal**, [*S. l.*], v. 57, n. 1, p. 5-14, jan. 2016.

KIM, Y. S. *et al.* Twenty-Eight-Day Oral Toxicity, Genotoxicity, and Gender-Related Tissue Distribution of Silver Nanoparticles in Sprague-Dawley Rats. **Inhalation Toxicology**, [*S. l.*], v. 20, n. 6, p. 575-583, dec. 2007.

KISELEVA, I. V. *et al.* Anti-Influenza Effect of Nanosilver in a Mouse Model. **Vaccines (Basel)**, [*S. l.*], v. 8, n. 4, p. 679, nov. 2020.

KISSELVA, V. I. *et al.* Anti-Influenza Effect of Nanosilver in a Mouse Model. **Vaccines (Basel)**, [*S. l.*], v. 8, n. 4, p. 679, dec. 2020.

KLASSEN, H. J. A historical review of the use of silver in the treatment of burns. **Burns**, [*S. l.*], v. 26, n. 2, p. 117–130, mar. 2000.

KLAUS-JOERGER, T. *et al.* Bacteria as workers in the living factory: metal-accumulating bacteria and their potential for materials Science. **Trends in Biotechnology**, [S. l.], v. 19, n. 1, p. 15-20, jan. 2001.

KON, K.; RAI, M. Metallic nanoparticles: mechanism of antibacterial action and influencing factors. **Journal of Comparative Clinical Pathology Research**, [S. l.], v. 2, n. 1, p. 160-174, 2013.

KUMAR, C. V.; MCLENDON, G. L. Nanoencapsulation of Cytochrome c and Horseradish Peroxidase at the Galleries of Alpha-Zirconium Phosphate. **Chemistry of Materials**, [S. l.], v. 9, n. 3, p. 863-870, mar. 1997.

KUMAR, S. A. *et al.* Nitrate reductase-mediated synthesis of silver nanoparticles from AgNO₃. **Biotechnology Letters**, [S. l.], v. 29, n. 3, p. 439–445, mar. 2007.

KUMARI, A. R.; SOBHA, K. Nanobiotechnology as a prospective approach For safe environmental remediation – A Review. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, [S. l.], v. 4, n. 4, p. 69-95, 2013.

KUPFERSCHMIDT, K; COHEN, J. Race to find COVID-19 treatments accelerates. **Science**, [S. l.], v. 367m n. 6485, p. 1412-1413, mar. 2020.

LAI, J., *et al.* Factors associated with mental health outcomes among health care workers exposed to coronavirus disease 2019. **JAMA Network Open**, [S. l.], v. 3, n. 3, p. e203976, mar. 2020.

LARA, H. H. *et al.* Silver nanoparticles are broad-spectrum bactericidal and virucidal compounds. **Journal of Nanobiotechnology**, [S. l.], v. 9, n. 30, aug. 2011.

LAU, S. K. P. *et al.* Severe acute respiratory syndrome coronavirus- like virus in Chinese horseshoe bats. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 102, n. 39, p. 14040-14045, sep. 2005.

LEDWITH, D. M.; WHELAN, A. M.; KELLY, J. M. A rapid, straightforward method for controlling the morphology of stable silver nanoparticles. **Journal of Materials Chemistry**, [S. l.], v. 17, n. 23, p. 2459-2464, mar. 2007.

LEE, C. Porcine epidemic diarrhea virus: An emerging and re-emerging epizootic swine virus. **Virology Journal**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 193, dec. 2015.

LEE, W. W. *et al.* Regulating human Th17 cells via differential expression of IL-1 receptor. **Blood**, [S. l.], v. 115, n. 3, p. 530–540, jan. 2010.

LI, W. *et al.* Bats are natural reservoirs of SARS- like coronaviruses. **Science**, [S. l.], v. 310, n. 5748, p. 676-679, oct. 2005.

LIMA, E. R. A. *et al.* Ion-Specific Forces between a Colloidal Nanoprobe and a Charged Surface. **Langmuir**, [S. l.], v. 23, n. 14, p. 7456-7458, may. 2008.

LIMA, R.; SEABRA, A. B; DURÁN, N. Silver nanoparticles: a brief review of cytotoxicity and genotoxicity of chemically and biogenically synthesized nanoparticles. **Journal of Applied Toxicology**, [S. l.], v. 32, n. 11, p. 867-879, nov. 2012.

LINK, S.; EL-SAYED, M.A. Optical properties and ultrafast dynamics of metallic nanocrystals. **Annual Review of Physical Chemistry**, v.54, p. 331-366, 2003.

LLOYD, J. R. Microbial Reduction of Metals and Radionuclides. **FEMS Microbiology Reviews**, [S. l.], v. 27, n. 2-3, p. 411- 425, jun. 2003.

LUO, Y.; CHANG, L. W.; LIN, P. Metal-based nanoparticles and the immune system: activation, inflammation, and potential applications. **BioMed Research International**, [S. l.], n. 143720, jun. 2015.

MAGALHÃES, W. L. E.; THÁ, E. L.; LEME, D. M. **Método de determinação de concentrações não citotóxicas para avaliação da capacidade protetora da lignina contra danos ao DNA**. Embrapa, 2018. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1104215/metodo-de-determinacao-de-concentracoes-nao-citotoxicas-para-avaliacao-da-capacidade-protetora-da-lignina-contradanos-ao-dna>. Acesso em: 11 de jul. de 2022.

MAHASE, E. Long covid could be four different syndromes, review suggests. **The BMJ**, [S. l.], v. 371, n. m3981, p. 1., 2020.

MALIREDDI, R. K.; KANNEGANTI, T. D. Role of type I interferons in inflammasome activation, cell death, and disease during microbial infection. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [S. l.], v. 3, n. 77, p. 1-11, sep. 2013.

MAO, L. *et al.* Pathogenic Fungus *Microsporium canis* Activates the NLRP3 Inflammasome. **Infection and Immunity**, [S. l.], v. 82, n. 2, p. 882-892, feb. 2014.

MARAMBIO-JONES, C.; HOEK, E. M. V. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. **Journal of Nanoparticle Research**, [S. l.], v. 12, n. 5, p. 1531-1551, mar. 2010.

MARTINON, F.; MAYOR, A.; TSCHOPP, J. The inflammasomes: guardians of the body. **Annual review of immunology**, [S. l.], v. 27, p. 229-265, dec. 2009.

MASTERS, P. S. The molecular biology of coronaviruses. **Advancer in Virus Research**, [S. l.], v. 66, p. 193-292, 2006.

MEDDA, S. *et al.* Biosynthesis of silver nanoparticles from Aloe vera leaf extract and antifungal activity against *Rhizopus* sp. and *Aspergillus* sp. **Applied Nanoscience**, v. 5, [S. l.], n. 7, p. 875-880, 2015.

MEHRBOD, P. *et al.* In Vitro Antiviral Effect of "Nanosilver" on Influenza Virus. **DARU**, [S. l.], v. 17, n. 2, p. 88-93, 2009.

MEI, J. P. *et al.* Silver nanoparticles induce oxidative cell damage in human liver cells through inhibition of reduced glutathione and induction of mitochondria-involved apoptosis. **Toxicology Letters**, [S. l.], v. 201, n. 1, p.92-100, feb. 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Coronavírus Brasil. Ministério da Saúde, 2020. Disponível em: <https://covid.saude.gov.br/>. Último acesso em: 14 de jul. de 2022.

MISIRLI, G. F. *et al.* Nanopartículas de Prata para uso Bactericida: Fatores Extrínsecos e Intrínsecos para Aumento da Estabilidade. **Revista Virtual de Química**, [S. l.], p. 1-14, abr. 2022.

MOHAN, S. *et al.* Completely green synthesis of dextrose reduced silver nanoparticles, its antimicrobial and sensing properties. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 106, p. 469-474, 2014.

MOHANPURIA, P.; RANA, N. K.; YADAV, S. K. Biosynthesis of nanoparticles: technological concepts and future applications. **Journal of Nanoparticle Research**, [S. l.], v. 10, n. 3, p. 507-517, aug. 2007.

MÖNKEMÜLLER, K.; FRY, L., RICKES, S. COVID-19, coronavirus, SARS-CoV-2 and the small bowel. **Revista Espanola de Enfermedades Digestivas**, [S. l.], v. 112, n. 5, p. 383-388, may. 2020.

MORI, Y. *et al.* Antiviral activity of silver nanoparticle/chitosan composites against H1N1 influenza A Virus. **Nanoscale Research Letters**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 93, feb. 2013.

MORONES, J. R. *et al.* The Bactericidal effect of silver nanoparticles. **Nanotechnology**, [S. l.], v. 16, n. 10, p. 2346-2353, oct. 2005.

MORRIS, D. *et al.* Antiviral and immunomodulatory activity of silver nanoparticles in experimental RSV infection. **Viruses**, [S. l.], v. 11, n. 8, p. 732, aug. 2019.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, [S. l.], v. 65, n. 1-2, p. 55-63, dec. 1983.

MUKHERJEE, P. *et al.* Fungus-Mediated Synthesis of Silver Nanoparticles and Their Immobilization in the Mycelial Matrix: A Novel Biological Approach to Nanoparticle Synthesis. **Nano Letters**. [S. l.], v. 1, n. 10, p. 515-519, aug. 2011.

NARAYANAN, K. B.; SAKTHIVEL, N. Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes. **Advances in Colloid and Interface Science**, [S. l.], v. 156, n. 1-2, p. 1-13, apr. 2010.

NETO, E. A. B.; RIBEIRO, C.; ZUCOLOTTO, V. **Síntese de Nanopartículas de Prata para Aplicação na Sanitização de Embalagens**, 2008, p. 1-4. Disponível em: https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPDIA-2009-09/11896/1/CT99_2008.pdf. Último acesso em: 11 de jul. de 2022.

NIETO-TORRES, J. L. *et al.* Severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein ion channel activity promotes virus fitness and pathogenesis. **PLoS Pathogens**, [S. l.], v. 10, n. 5, p. e1004077, may. 2014.

OKSANEN, T. *et al.* Treatment of Recycled Kraft Pulps with *Trichoderma Reesei* Hemicellulases and Cellulases. **Journal of Biotechnology**, [S. l.], v. 78, n. 1, p. 39-48, feb. 2000.

OLIVEIRA, M. M. **Nanopartículas de prata e seus nanocompósitos com polianilina: síntese, caracterização e propriedades**. 2005. 174p. Tese (Doutorado em Química) - Universidade do Paraná, Curitiba, PR, 2005. Disponível em: <https://acervodigital.ufpr.br/handle/1884/3098>. Último acesso em: 11 de jul. de 2022.

OLLER, A. R.; OBERDÖRSTER, G. Incorporation of particle size differences between animal studies and human workplace aerosols for deriving exposure limit

values. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, [S. l.], v. 57, n. 2–3, p. 181–194, aug. 2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Doença causada pelo novo coronavírus (COVID-19). Geneva: WHO, 2019. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/topicos/coronavirus/doenca-causada-pelo-novo-coronavirus-covid-19>. Último acesso em: 14 de jul. de 2022.

OTTOW, J. C. G.; KLOPOTEK, A. V. Enzymatic Reduction of Iron Oxide by Fungi. *Applied Microbiology*, [S. l.], v. 18, n. 1, p. 41-43, jul. 1969.

PABISCH, S. *et al.* Effect of interparticle interactions of size determination of zirconia and silica based systems- A comparison of SAXS, DLS, BET, XRD and TEM. *Chemical Physics Letters*, [S. l.], v. 521, p. 91-97, jan. 2012.

PANACEK, A. *et al.* Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. *The Journal of Physical Chemistry B*, [S. l.], v. 110, n. 33, p. 16248-16253, aug 2006.

PARAMELLE, D. *et al.* Rapid method to estimate the concentration of citrate capped silver nanoparticles from UV-visible light spectra. *The Royal Society of Chemistry*, v. 139, n. 19, p. 4855-4861, jul. 2014.

PARVEEN, S.; MISRA, R.; SAHOO, S. K. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. *Nanomedicine*, [S. l.], v. 8, n. 2, p. 147-166, jun. 2012.

PATRICK, G. L. **An Introduction to medicinal chemistry**, 5th ed. Lavis: L. E. G. O. S. p. a, 2009. *E-Book*. ISBN: 978-0-19-969739-7.

PEIRIS, J. S. *et al.* Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet*, [S. l.], v. 361, n. 9366, p. 1319-1325, apr. 2003.

PHANJOM, P.; AHMED, G. Effect of different physicochemical conditions on the synthesis of silver nanoparticles using fungal cell filtrate of *Aspergillus oryzae* (MTCC No. 1846) and their antibacterial effect. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, [S. l.], v. 8, n. 045016, p. 1-13, oct. 2017.

PHILPOTT, D. J. *et al.* Invasive *Shigella flexneri* activates NF-Kappa B through a lipopolysaccharide-dependent innate intracellular response and leads to IL-8 expression in epithelial cells. *The Journal of Immunology*, [S. l.], v. 165, n. 2, p.903-914, jul. 2000.

PRADESH, U.; UPADHAYAY, P. D. D.; VIGYAN, P. C. Coronavirus infection in equines: A review. **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances**, [S. l.], v. 9, n. 3, p. 164-176, 2014.

RAI, M.; DURAN, N. **Metal nanoparticles in microbiology**. Springer Berlin, Heidelberg, p. 17–35, 2011. *E-Book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-3-642-18312-6>. Acesso em: 11 de jul. de 2022.

RAI, M.; YADAV, A. Plants as potential synthesiser of precious metal nanoparticles: progress and prospects. **IET Nanobiotechnology**, [S. l.], v. 7, n. 3, p. 117-124, sep. 2013.

RAI, M.; YADAV, A.; GADE, A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. **Biotechnology Advances**, [S. l.], v. 27, n. 1, p. 76-83, feb. 2009.

RAMADAN, N.; SHAIIB, H. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): A review. **Germs**, [S. l.], v. 9, p. 35-42, mar. 2019.

RICHMAN, D. D. **Human immunodeficiency virus**. London: International Medical Press; 2003.

RODRIGUES, T. S. *et al.* Inflammasomes are activated in response to SARS-CoV-2 infection and are associated with COVID-19 severity in patients. *The Journal of Experimental Medicine*, [S. l.], v. 218, n. 3, p. e20201707, mar. 2021.

ROUJIAN, L. *et al.* Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. **Lancet**, [S. l.], v. 395, n. 10224, p. P565-P574, jan. 2020.

RUCH, T. R., MACHAMER, C. E. The coronavirus E protein: assembly and beyond. **Viruses**, [S. l.], v. 4, n. 3, p. 363-382, mar. 2012.

SASTRY, M. *et al.* Biosynthesis of metal nanoparticles using fungi and actinomycete. **Current Science**, [S. l.], v. 85, n. 2, p. 162-170, jul. 2003.

SCHATZ, C. *et al.* Formation of polyelectrolyte complex particles form self-complexation of N-sulfated chitosan. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 3, p. 1642-1647, may. 2005.

SCHNEIDER, E. Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS). **Netter's Infectious Diseases**, [S. l.], v. 1, p. 537–543, mar. 2012.

SHAHARE, B.; YASHPAL, M. Toxic effects of repeated oral exposure of silver nanoparticles on small intestine mucosa of mice. *Toxicology Mechanisms and Methods*, [S. l.], v. 23, n. 3, p. 161–167, mar. 2013.

SHAHBAZZADEH, D. *et al.* In vitro effect of Nanosilver toxicity on fibroblast and mesenchymal stem cell lines. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, [S. l.], v. 10, n. 3, p. 487-496, mar. 2011.

SHARMA, V. K.; YNGARD, R. A.; LIN, Y. Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. *Advances in colloid and interface science*, [S. l.], v. 145, n. 1-2, p. 83-96, jan. 2009.

SHEN, C. *et al.* The impact of cross-docked poses on performance of machine learning classifier for protein–ligand binding pose prediction. *Journal of Cheminformatics*, [S. l.], v. 13, n. 1, p. 81, oct. 2021.

SHIVANIKA, C. *et al.* Molecular docking, validation, dynamics simulations, and pharmacokinetic prediction of natural compounds against the SARS-CoV-2 main-protease. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, [S. l.], v. 40, n. 2, p. 585–611, feb. 2022.

SI, G. *et al.* Synthesis of PSS-capped triangular silver nanoplates with tunable SPR. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, [S. l.], v. 380, n. 1–3, p. 257–260, may. 2011.

SIDDIQI, K. S.; HUSEN, A. Engineered Gold Nanoparticles and Plant Adaptation Potential. *Nanoscale Research Letters*, [S.l.], v. 11, p. 400, sep. 2016.

SIDDIQI, K. S.; HUSEN, A.; RAO, R. A. K. A review on biosynthesis of silver nanoparticles and their biocidal properties. *Journal of Nanobiotechnology*, [S. l.], v. 16, n. 14, feb. 2018.

SILVER, S. Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds. *FEMS Microbiology Reviews*, [S. l.], v. 27, n. 2, p. 341-353, jun. 2003.

SILVER, S.; PHUNG, L. T.; SILVER, G. Silver as biocides in burn and wound dressings and bacterial resistance to silver compounds. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 33, n. 7, p. 627– 634, jul. 2006.

SIVASITHAMPARAM, K., GHISALBERTI, E. L. Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. In: HARMAN, G. E.; KUBICEK, C. P. **Secondary**

metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. Taylor e Francis Ltd: Londres, p. 139-191, 1998. *E-book*. ISBN: 9780429078934.

SOARES, S. *et al.* Nanomedicine: Principles, Properties, and Regulatory Issues. **Frontiers in Chemistry**, [S. l.], v. 6, n. 360, p. 1-15, aug. 2018.

SONG, K. S. *et al.* Recovery from silver-nanoparticle-exposure-induced lung inflammation and lung function changes in Sprague Dawley rats. **Nanotoxicology**, [S. l.], v. 7, n. 2, p. 169-180, mar. 2013.

SPESHOCK, J. L. *et al.* Interaction of silver nanoparticles with tacaribe virus. **Journal of Nanobiotechnology**, [S. l.], v. 8, n. 19, aug. 2010.

STANISIC, D. *et al.* High-Resolution Magic-Angle Spinning NMR Spectroscopy for Evaluation of Cell Shielding by Virucidal Composites Based on Biogenic Silver Nanoparticles, Flexible Cellulose Nanofibers and Graphene Oxide. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 10, n. 858156, may. 2022.

SUTTON, C. E. *et al.* Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. **Immunity**, [S. l.], v. 31, n. 7081, p. 331–341, aug. 2009.

SWATHY, J. R. *et al.* Antimicrobial silver: An unprecedented anion effect. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 4, n. 7161, p. 1-5, nov. 2014.

TANSIL, N. C.; GAO, Z. Nanoparticles in biomolecular detection. **NanoToday**, [S. l.], v. 1, n. 1, p. 28-37, feb. 2006.

THAKKAR, K. N.; MHATRE, S.S.; PARIKH, R.Y. Biological synthesis of metallic nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and medicine**, [S. l.], v. 6, n. 2, p. 257-262, apr. 2010.

TIWARI, D. K.; JIN, T.; BEHARI, J. Dose-dependent in-vivo toxicity assessment of silver nanoparticle in Wistar rats. **Toxicology Mechanisms and Methods**, [S. l.], v. 21, n. 1, p. 13–24, jul. 2010.

TOMA, H. E. **O mundo nanométrico: a dimensão do novo século.** Ed. 2. Oficina de Textos: São Paulo, 2004. *E-book*. ISBN: 978-85-86238-86-4.

TROP, M. *et al.* Silver-coated dressing acticoat caused raised liver enzymes and argyria-like symptoms in burn patient. **The Journal of Trauma Injury, Infection, and Critical Care**, [S. l.], v. 60, p. 648-652, mar. 2006.

TURKEVITCH, J.; STEVENSON, P. C.; HILIER, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. **Discussions of the Faraday Society**, [S. l.], v. 11, p. 55, 1951.

VAHABI, K.; MANSOORI, G. A., KARIMI, S. Biosynthesis of Silver Nanoparticles by Fungus *Trichoderma Reesei* (A Route for Large-Scale Production of AgNPs). **Insciencas Journal**, [S. l.], v. 1, n. 1, p. 65-79, mar. 2011.

VAN DE VEERDONK, F. L. *et al.* The inflammasome drives protective Th1 and Th17 cellular responses in disseminated candidiasis. **European Journal of Immunology**, [S. l.], v. 41, n. 8, p. 2260–2268, jul. 2011.

VANGONE, A.; BONVIN, A. M. J. J. Contacts-based prediction of binding affinity in protein–protein complexes. **ELife**, [S. l.], v. 4, n. e07454, jul. 2015.

VERMA, V. C.; KHARWAR, R. N.; GANGE, A. C. Biosynthesis of Antimicrobial Silver Nanoparticles by the Endophytic Fungus *Aspergillus Clavatus*. **Nanomedicine**, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 33-40, jan. 2010.

VOYUTSKY, S. **Colloid Chemistry**. Moscow: Mir Publishers, 1978. *E-book*. ISBN: 978-3-03897-459-8.

WANG, D. *et al.* Synthesis of silver nanoparticles with flake-like shapes. **Materials Letters**, [S. l.], v. 59, n. 14–15, p. 1760–1763, jun. 2005.

WEISS, S. R.; NAVAS-MARTIN, S. Coronavirus Pathogenesis and the Emerging Pathogen Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, [S. l.], v. 69, p. 635-664, dec. 2005.

WELLINGTON, M. *et al.* *Candida albicans* triggers NLRP3-mediated pyroptosis in macrophages. **Eukaryotic Cell**, [S. l.], v. 13, n. 2, p. 329–340, feb. 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard | WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard**. Geneva: WHO, 2020. Disponível em: <https://covid19.who.int/>. Último acesso em: 11 de jul. de 2022.

WU, F. *et al.* A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. **Nature**, [S. l.], v. 579, p. 265-269, feb. 2020.

XIANG, D. *et al.* Inhibition of A/Human/Hubei/3/2005 (H3N2) influenza virus infection by silver nanoparticles in vitro and in vivo. **International Journal of Nanomedicine**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 4703-4704, nov. 2013.

XUE, L. C. *et al.* PRODIGY: a web server for predicting the binding affinity of protein-protein complexes. **Bioinformatics**, [S. l.], v. 32, n. 23, p. 3676-3678, 2016.

YANG, X. *et al.* Green synthesis of palladium nanoparticles using broth of Cinnamom camphora leaf. **Journal Nanoparticle Research**, [S. l.], v. 12, n. 5, 1589-1598, jun. 2010.

YUNTA, M. J. R. Docking and Ligand Binding Affinity: Uses and Pitfalls. **American Journal of Modeling and Optimization**, [S. l.], v. 4, n. 3, p. 74-114, 2016.

Zeta Potential Na Introduction in 30 minutes. England: Malvern Instruments Ltd., apr. 2004. Disponível em: <https://www.research.colostate.edu/wp-content/uploads/2018/11/ZetaPotential-Introduction-in-30min-Malvern.pdf>. Último acesso em: 11 de jul. de 2022.

Zetasizer Nano Series User Manual. England: Malvern Instruments Ltd., apr. 2004a. Disponível em: <https://www.chem.uci.edu/~dmitryf/manuals/Malvern%20Zetasizer%20ZS%20DLS%20User%20manual.pdf>. Último acesso em: 11 de jul. de 2022.

ZHANG, B. *et al.* Diagnosing dengue virus infection: rapid tests and the role of micro/nanotechnologies. **Nanomedicine**, [S. l.], v. 11, n. 7, p. 1745-1761, oct. 2015.

ZHENG, L. *et al.* Improving protein-ligand docking and screening accuracies by incorporating a scoring function correction term. **Briefings in Bioinformatics**, [S. l.], v. 23, n. 3, p. bbac051, 2022.

ZHOU, Z.; QIU, Y.; GE, X. The taxonomy, host range and pathogenicity of coronaviruses and other viruses in the Nidovirales order. **Animal Disease**, [S. l.], v. 1, p. 5, mar. 2021.

ZHU, X. *et al.* Effects of topography and composition of titanium surface oxides on osteoblast responses. **Biomaterials**, [S. l.], v. 25, n. 18, p. 4087-4103, aug. 2004.