

LORENA SOUZA CASTRO ALTOÉ

**OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DE PROTEASES DO FUNGO NEMATÓFAGO
Monacrosporium thaumasium A PARTIR DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA
SOBRE MASSAS OVÍGERAS DO MOLUSCO *Biomphalaria glabrata* E SUA
ANÁLISE POR PINÇAMENTO ÓPTICO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientador: Jackson Victor de Araújo

Coorientadores: Fábio Ribeiro Braga
Gabriella Peterlini Tavares

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2022**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus

T

A469o
2022 Altoé, Lorena Souza Castro, 1994-
Obtenção e avaliação de proteases do fungo nematófago
Monacrosporium thaumasium a partir de nanopartículas de prata sobre
massas ovíferas do molusco *Biomphalaria glabrata* e sua análise por
pinçamento óptico: / Lorena Souza Castro Altoé. - Viçosa, MG, 2022.
1 tese eletrônica (70 f.): il. (algumas color.).
Orientador: Jackson Victor de Araújo
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento
de Veterinária, 2022.
Inclui bibliografia.
DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.568>
Modo de acesso: World Wide Web.

1. Helmintologia veterinária; 2. Fungos nematófagos; 3. Controle
biológico; 4. Gastrópodes; 5. Biotecnologia; 6. Nanopartículas; 7.
Trematoda; I. Araújo, Jackson Victor de II. Universidade Federal de
Viçosa.. Departamento de Veterinária. Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária III. Título

CDD 22. ed. 636.0896962

Bibliotecário(a) responsável: BRUNA SILVA CRB-6/2552

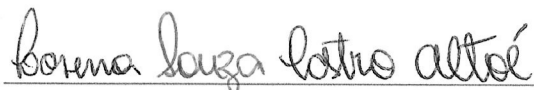
LORENA SOUZA CASTRO ALTOÉ

**OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DE PROTEASES DO FUNGO NEMATÓFAGO
Monacrosporium thaumasium A PARTIR DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA
SOBRE MASSAS OVÍGERAS DO MOLUSCO *Biomphalaria glabrata* E SUA
ANÁLISE POR PINÇAMENTO ÓPTICO**

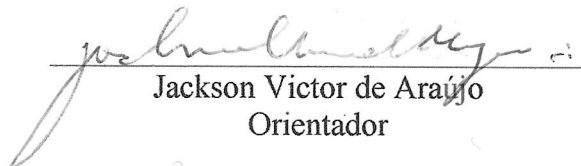
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 20 de julho de 2022.

Assentimento:



Lorena Souza Castro Altoé
Autora



Jackson Victor de Araújo
Orientador

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida e por todo cuidado comigo em todos os momentos.

Aos meus pais, Christiane e Jefferson. Minha amada avó Dalva e minhas irmãs, que mesmo longe de casa, sempre me apoiaram. E ao meu amado marido Rodrigo, por passar comigo todo esse processo durante o meu doutorado.

A Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de fazer o curso, e conhecer pessoas que contribuíram grandemente para que essa pesquisa fosse realizada durante os vários departamentos que tive para fazer a pesquisa, tais como os Departamento de Física, Bioquímica e Biologia Molecular e Medicina Veterinária.

Ao professor e orientador, Jackson Victor de Araújo e minha coorientadora Gabriella Peterlini Tavares pelo suporte, ideias e auxílio da pesquisa. Agradeço também a equipe de Laboratório de Parasitologia do DVT/UFV. E ao professor Márcio Rocha do Departamento de Física pelos ensinamentos da técnica de pinça óptica, juntamente com sua aluna, Ethe Costa.

À professora Cíntia Aparecida da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) pelos moluscos. E às professoras da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) Juliana e Suely por me ajudarem na parte bioquímica.

Aos colegas que fiz durante essa jornada enquanto estive na universidade.

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

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

E a todas as pessoas que contribuíram e torceram por mim!

BIOGRAFIA

Lorena Souza Castro Altoé, filha de Christiane de Souza Castro e Jefferson Rodrigues Castro, nasceu na cidade de Vitória - ES, em 03 de março de 1994. Em novembro de 2012, iniciou o curso Licenciatura em Ciências Biológicas na Universidade Federal do Espírito Santo, concluindo-o em fevereiro de 2017.

Ingressou, em março de 2017, no programa de pós-graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Espírito Santo, concluindo em julho de 2018.

Ingressou em agosto de 2018 no doutorado pelo programa de pós-graduação em Medicina Veterinária concluindo os requisitos necessários para obter o título de *Doctor Scientiae*.

RESUMO

ALTOÉ, Lorena Souza Castro, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2022. **Obtenção e avaliação de proteases do fungo nematófago *Monacrosporium thaumasium* a partir de nanopartículas de prata sobre massas ovíferas do molusco *Biomphalaria glabrata* e sua análise por pinçamento óptico.** Orientador: Jackson Victor de Araújo. Coorientadores: Fábio Ribeiro Braga e Gabriella Peterlini Tavares.

Fungos nematófagos têm sido utilizados amplamente para controle biológico, tanto em helmintos, quanto em hospedeiros intermediários. Dentre os agentes envolvidos na dispersão da doença esquistossomose, estão os caramujos aquáticos do gênero *Biomphalaria*, que são frequentemente acometidos pelo trematódeo *Schistosoma mansoni* e são responsáveis por grandes danos à saúde de animais e humanos, tornando-se um grande fator de importância médico-veterinária. Como alternativa para controlar esses helmintos, fungos predadores e ovicidas são considerados oponentes naturais e essenciais para tal controle. Este trabalho, portanto, tem por objetivo investigar o potencial fungo *Monacrosporium thaumasium* como agente de biossíntese de nanopartículas de prata (AgNPs) e interação de proteases à nível molecular e suas conformações na macromolécula de ácido desoxirribonucleico (DNA). Foram testadas as atividades do extrato bruto e da protease parcialmente purificada provenientes de um isolado de *M. thaumasium* (cepa NF34) associado com nitrato de prata (AgNO₃) sobre massas ovíferas de *Biomphalaria glabrata*, como modelo teste de embriotoxicidade. O experimento foi edificado em delineamento inteiramente casualizado em tratamentos contendo as AgNPs (proporções entre 0,5 mL e 1:1 mL + massas ovíferas expostas) e o grupo controle com água deionada. Ambos os grupos foram mantidos nas condições na temperatura de 25 °C durante dez dias. Sobre a molécula de DNA, foi feita a purificação parcial do extrato bruto do fungo e aplicado à técnica de pinça óptica (PO), a fim de se estudar sobre as possíveis interações dessas proteases à esta molécula. Obteve-se das caracterizações enzimáticas, maior atividade proteolítica até 60 °C em pH 9 durante 25 minutos. As serino-proteases parcialmente purificadas foram verificadas em sistema de gel SDS-PAGE tricina na massa molecular de aproximadamente 40 kDa e as proteases se ligaram fortemente ao ácido desoxirribonucleico, formando o complexo serino protease - DNA. Como conclusão, essas proteases, apresentaram uma constante de associação de ligação de equilíbrio $\sim 10^8 \text{ M}^{-1}$ e um comportamento cooperativo positivo na forma de agregados ligados, com tendência a neutralizar cerca de 100% da carga negativa presente no esqueleto fosfato da

dupla hélice, resultando em complexos DNA-proteínas neutras. Os resultados obtidos evidenciam que *M. thaumasium* é um organismo satisfatório na produção de biossíntese de nanopartículas e ocasionou nas massas ovíferas expostas à inibição de 100% dos caramujos. Logo, as proteases foram importantes nesse tipo de caracterização para elucidar os aspectos moleculares do mecanismo de ação dessa proteína, que pode trazer pistas sobre seu papel como agentes antipatógenos e, assim, contribuir para aprimorar o conhecimento no uso de tais macromoléculas biológicas e possíveis estudos futuros sobre aplicabilidades em programas de controle biológico.

Palavras-chave: Biotecnologia. Controle biológico. Gastrópodes. Nanomateriais. Trematodíases. Pinça óptica.

ABSTRACT

ALTOÉ, Lorena Souza Castro, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July 2022. **Obtention and evaluation of proteases from the nematophagous fungus *Monacrosporium thaumasium* from silver nanoparticles on egg masses of the mollusc *Biomphalaria glabrata* and their analysis by optical clamping.** Advisor: Jackson Victor de Araújo. Co-advisors: Fábio Ribeiro Braga and Gabriella Peterlini Tavares.

Nematophagous fungi have been widely used for biological control, both in helminths and in intermediate hosts. Among the agents involved in the spread of the schistosomiasis disease, there are the aquatic snails of the genus *Biomphalaria*, which are often affected by the trematode *Schistosoma mansoni* and are responsible for great damage to the health of field animals and humans, making it a major factor of medical-veterinary importance consider alternative and ecologically sustainable measures. As an alternative to control these helminths, predatory and ovicidal fungi are considered natural and essential opponents for such control. This work, therefore, aims to investigate the potential fungus *Monacrosporium thaumasium* as an agent of biosynthesis of silver nanoparticles (AgNPs) and interaction of proteases at the molecular level and their conformations in the deoxyribonucleic acid (DNA) macromolecule. The activities of the crude extract and the partially purified protease from an isolate of *M. thaumasium* (strain NF34) associated with silver nitrate (AgNO₃) were tested on ovigerous masses of *Biomphalaria glabrata*, as a test model for embryotoxicity. The experiment was built in a completely randomized design with treatments containing AgNPs (proportions between 0.5 mL and 1:1 mL + exposed ovigerous masses) and the control group with dechlorinated water. Both groups were kept under the same conditions at 25°C for ten days. On the DNA molecule, a partial purification of the crude extract of the fungus was performed and applied to the optical tweezers (OT) technique, in order to study the possible interactions of these proteases with this molecule. It was obtained from the enzymatic characterizations, higher proteolytic activity up to 60° C at pH 9 for 25 minutes. The partially purified serine proteases were verified in a tricine SDS-PAGE gel system at a molecular mass of approximately 40 kDa and the proteases strongly bind to deoxyribonucleic acid, forming the serine protease - DNA complex. In conclusion, these proteases showed an equilibrium binding association constant $\sim 10^8 \text{ M}^{-1}$ and a positive cooperative behavior in the form of bound aggregates, with a tendency to neutralize about 100% of the negative charge present in the phosphate backbone of the double helix, resulting in neutral protein-DNA complexes. The

results obtained show that *M. thaumasium* is a satisfactory organism in the production of nanoparticle biosynthesis and caused the ovigerous masses exposed to 100% inhibition of the snails. Therefore, proteases were important in this type of characterization to elucidate the molecular aspects of the mechanism of action of this protein, which may bring clues about its role as antipathogenic agents and, thus, contribute to improve knowledge in the use of such biological macromolecules and possible studies futures on applicability in biological control programs.

Keywords: Biotechnology. Biological control. Gastropods. Nanomaterials. Trematodiasis. Optical tweezers.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Capítulo 1

- Fig. 1 - Evaluation of the variation of the effects of pH, temperature and reaction time on the protease activity. a) Variation of pH values - citrate phosphate 50 mM (3.0 to 7.0) and glycine-NaOH (7.0 to 10). b) Variation of temperature values from 20° C to 80° C.34
- Fig. 2 - Elution profil showing the purification of serino protease from *Monacrosporium thaumasium*. Ionexchange chromatography of four mL fraction from DEAE-Sepharose (5 x 2 cm), equilibrated with 1 mM phosphate buffer (pH 9). Elution was performed with linear gradient of NaCl (0 - 1 M) glycine phosphate buffer at pH 9 and fractions of 2 mL. Content measured by the Bradford method fractions with proteolytic activity.35
- Fig. 3 - Profile of extracellular proteins of *M. thaumasium*. in SDS-PAGE gel (10%) electrophoresis stained with Coomassie (A) and Silver Solution (B). M - markers (Precision Plus Protein™) - mixture of ten blue-stained recombinant proteins (10–250 kD); EB – crude extract; P0.15 – protein pool 0.15 M; P0.30 – protein pool 0.30 M; protein pool 0.50 M.36
- Fig. 4 - Contour length of the DNA-serine protease complexes as a function of the protein concentration in the sample. Observe that such mechanical parameter remains constant within the error bars as more protein is added.....37
- Fig. 5 - Corresponding persistence length of the DNA-serine protease complexes, which presents a non-monotonic behavior increasing for low protein concentrations (< 6 nM) and then decreasing for higher concentrations. The *red solid line* is a fitting to the quenched-disorder statistical model, from where the physicochemical (binding) parameters of the interaction can be extracted.38
- Fig. 6 - *Upper panel*: Exemplifying gel with various different serine protease concentrations used (indicated below the bands in nM), maintaining the DNA, GelRed and all other parameters constant. A systematic decrease of the band intensity can be seen for higher protein concentrations. *Bottom panel*: band intensity analysis, from where one can estimate the equilibrium binding association constant of the interaction.....40
- ### Capítulo 2
- Fig. 7 - Equipamento de espalhamento de luz Brookhaven Co., localizado no Laboratório de Microfluídica e Fluidos Complexos do Departamento de Física da Universidade Federal de Viçosa (DPF/ UFV).53
- Fig. 8 - *Stubs* onde foi depositada uma gota da suspensão contendo as nanopartículas de prata (AgNPs).....54
- Fig. 9 - Massas ovíferas de *Biomphalaria glabrata*, depositadas na placa de poliestireno.55
- Fig. 10 – Placa de cultivo contendo o fungo *Monacrosporium thaumasium* cultivado em meio de cultura BDA + Extrato de Malte e Extrato de Levedura a 28° C após cinco de incubação e no escuro.....56

- Fig. 11 – Frasco de vidro de 250 mL contendo 10g do micélio fúngico de *Monacrosporium thaumasium* em 100 mL de água destilada ultrapura.57
- Fig. 12 –Erlenmeyer de 250 mL contendo filtrado fúngico de *Monacrosporium thaumasium* após 72 h de incubação a 28° C e no escuro.57
- Fig. 13 - Alteração reacional das suspensões obtidas através do fungo *Monacrosporium thaumasium*. A) Filtrado fúngico de NF34 com água destilada. B) Filtrado fúngico com nitrato de prata (AgNO₃).58
- Fig. 14 - Fluorescência das amostras do meio reacional. A) Suspensão de nanopartículas de prata pelo fungo *Monacrosporium thaumasium* (cepa NF34). B) Filtrado fúngico de *M. thaumasium* sem adição do AgNO₃.59
- Fig. 15 - Espectros em UV-Visível registrados de biossíntese de nanopartículas de prata mediados por *Monacrosporium thaumasium*.60
- Fig. 16 - Micrografia em MEV das nanopartículas de prata biossintetizadas por intermédio do fungo *Monacrosporium thaumasium*: A) aumento em 2000x; B) aumento em 5000x; C) Histograma de componentes inorgânicos e orgânicos da amostra AgNPs.....61
- Fig. 17 - Função de autocorrelação da amostra para os ângulos de espalhamento 30°, 40°, 60° e 90° do meio reacional obtido através da biossíntese de nanopartículas de prata (AgNPs) pelo fungo *Monacrosporium thaumasium*.....62
- Fig. 18 - Gráfico do Γ pelo vetor de espalhamento ao quadrado para os ângulos de espalhamento de 30°, 40°, 60° e 90° do meio reacional obtido através da biossíntese de nanopartículas de prata (AgNPs) pelo fungo *Monacrosporium thaumasium*. As retas são ajustes lineares para a obtenção do coeficiente de difusão.....63
- Fig. 19 - Função de autocorrelação para o ângulo de espalhamento de 30° e com a posição do polarizador orientado na horizontal.64
- Fig. 20 - Taxa de eclodibilidade dos caramujos. C1, C2, C3 – Grupo controle com água declorada e massas ovíferas (não expostas às nanopartículas de prata). T1, T2, T3 – Tratamento de exposição com as AgNPs nas massas ovíferas de *Biomphalaria glabrata* durante dez dias a 25° C.65
- Fig. 21 - Aspecto externo das alterações de massas ovíferas de *Biomphalaria glabrata*. (A, B e C) Grupo controle – água declorada; A – s – caramujo (snail); B, C mo – massa ovífera. (D, E e F) Grupo tratado – D – água declorada e E, F- AgNPs; F) Estágio do caramujo em fase trocófora (t). Escala = 500 μ m.66

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Informação sobre os materiais, quantificações, microrganismos e procedência, utilizados na execução da biossíntese de nanopartículas de prata (AgNPs).....51
- Tabela 2 – Proporções das concentrações de alíquotas de água (H₂O) e nanopartículas (AgNPs) dos grupos de tratamentos utilizando respectivamente, água dechlorada, massa ovígera e AgNPs biossintetizados pelo isolado NF34.55
- Tabela 3 - Valores de coeficiente de difusão na amostra do meio reacional obtido através da biossíntese de nanopartículas de prata (AgNPs) pelo fungo *Monacrosporium thaumasium*. Verifica-se o menor e maior tamanho encontrado.64

LISTA DE ABREVIACOES

AgNPs - Nanopartículas de prata.

BDA - Batata Dextrose  gar.

BOD - Biochemical Oxygen Demand.

CAPES - Coordenao de Aperfeioamento de Pessoal de Nível Superior.

CMA - Corn Meal Agar.

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

DNA -  cido Desoxirribonucleico.

EDS - Espectroscopia por disperso de energia (do inglês, *energy dispersive spectroscopy*).

FAPEMIG - Fundao de Amparo   Pesquisa do Estado de Minas Gerais.

GIN - Gastrointestinal nematodes.

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura.

mL - Mililitros.

NF34 - *Monacrosporium thaumasium*.

UV-Vis - Ultravioleta e visível.

 L - Microlitros.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 <i>Schistosoma mansoni</i>	16
2.1.2 Hospedeiros intermediários	16
2.2.3 Medidas de controle sobre moluscos gastrópodes.....	17
2.2.4 Biossíntese de nanopartículas por fungos como controle biológico.....	17
2.3.5 <i>Monacrosporium thaumasium</i>	18
2.5.6 Ligantes e pinça óptica	18
3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	26
3.1 Objetivos gerais	26
3.2 Objetivos específicos.....	26
Capítulo 1	27
Capítulo 2	47
5. CONCLUSÕES GERAIS	70

1. INTRODUÇÃO GERAL

A doença infecto-parasitária esquistossomose tem como hospedeiros intermediários caramujos aquáticos. No Brasil, os principais moluscos planorbídeos que atuam como hospedeiro do *Schistosoma mansoni* são os espécimes *Biomphalaria glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea*.

Segundo Medeiros et al. (2014), tais gastrópodes estabelecem em águas estagnadas ou de cursos lânticos presentes em áreas neotropicais. Sendo assim, necessita-se de medidas de controle contra essa doença, tal como o controle dos hospedeiros intermediários que em meio aquoso e na presença larval do parasito, favorece a interação entre ambos.

De maneira geral, para o controle desses gastrópodes, faz-se necessário não apenas o tratamento químico dos animais parasitados, mais também o controle da densidade populacional de moluscos hospedeiros (WHO, 2002) não sendo o bastante somente a drenagem de locais alagados, pois estes organismos entram em estivação e conseguem retornar novamente (TELES; MARQUES, 1989).

O controle das verminoses tem sido feito predominantemente através do uso de anti-helmínticos (KAPLAN, 2020) e ainda existe uma preocupação crescente com o surgimento e reemergência de patógenos resistentes a medicamentos, como parasitas (TENOVER, 2006). Dentre os estudos envolvidos com controle biológico, fungos nematófagos tem se destacado como promissores no controle de parasitos gastrointestinais (GIN) (BRAGA et al., 2010, 2014; DA SILVA et al., 2013; FRASSY et al., 2010; SANTOS-AMARAL et al., 2022) e alguns estudos utilizados em moluscos gastrópodes (DUARTE et al., 2015; CASTRO et al., 2019).

Entre todos os biosistemas, os fungos têm muitas vantagens em relação aos outros, devido à sua alta tolerância aos metais pesados, facilidade de escalonamento, fácil manuseio da biomassa, recuperação e viabilidade econômica (MADAKKA; JAYARAJU; RAJESH, 2018). Além disto, os fungos produzem diversas proteases que são alvo de estudos em nematoides e outros organismos (BRAGA et al., 2011a, 2012b, 2015; SOARES et al., 2012).

O fungo predador *Monacrosporium thaumasium* pertencente ao grupo de fungos helmintófagos ou nematófagos, e possui mecanismos de ação no controle biológico de helmintos (MOTA; CAMPOS; DE ARAÚJO, 2003). Além disso, fungos nematófagos quando em contato com larvas ou ovos de helmintos, produzem substâncias extra e intracelulares que permitem seu mecanismo de predação (YANG et al., 2014). Embora haja estudos sobre estruturas e extração de compostos enzimáticos, ainda não se sabe da possibilidade dessa produção natural deste fungo interagir à nível molecular no DNA e as

possíveis implicações que pode haver entre esta macromolécula a longo prazo em uma célula ou em um sistema.

Compreendendo suas características enzimáticas, o uso de enzimas extracelulares pela *M. thaumasium* sendo de um fungo predador, não foi verificado a sua viabilidade de biossíntese de nanopartículas de prata (AgNPs), que poderão ser utilizadas também como atividade ovicida, incluindo assim, mais uma medida que poderá ser aplicada ao controle biológico.

Portanto, há uma necessidade crescente de desenvolver procedimentos de alto rendimento, baixo custo, não tóxicos e ambientalmente benignos para a síntese de nanopartículas metálicas (THAKKAR; MHATRE; PARIKH, 2010) do qual existe uma vasta gama de recursos biológicos disponíveis na natureza, incluindo plantas e produtos vegetais, algas, bactérias e vírus e fungos, podem ser empregados para a síntese de nanopartículas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Schistosoma mansoni*

O gênero *Schistosoma* é composto por trematódeos com sexos separados, possuindo diferentes estágios de desenvolvimentos (helminto adulto, ovos, miracídio, esporocistos, cercárias e esquistossômulos) sendo cada um deles com características peculiares (SOUZA et al., 2011; VITORINO; GOMES, 2011).

Em seu ciclo evolutivo, o helminto alterna fases assexuadas e sexuadas de reprodução, sendo heteroxênico (SOUZA et al., 2011). Quando se encontra no hospedeiro vertebrado o *S. mansoni* evolui para sua forma adulta no sistema vascular mesentérico macho e fêmea copulam.

Em relação a patogênese do *S. mansoni* são importantes a cepa, a fase evolutiva, a intensidade e o número de infecções. O evento patogênico mais importante na esquistossomose é a formação do granuloma hepático e a fibrose hepática (LINS et al., 2008).

Estima-se que 779 milhões pessoas estão em risco de esquistossomose em todo o mundo e 207 milhões pessoas podem estar infectadas (GLINZ et al., 2010). Destes, estima-se que 120 milhões pessoas sejam sintomáticas e 20 milhões sofram de complicações de longo prazo (CHITSULO et al., 2000; WHO, 2002). O fato dessa parasitose ser negligenciada por autoridades políticas constitui forte incentivo para estudos de vários aspectos da sua epidemiologia e controle (WHO, 2008).

2.1.2 Hospedeiros intermediários

As espécies do gênero *Biomphalaria* encontram-se no filo Mollusca, classe Gastropoda, subclasse Pulmonata, ordem Basommatophora e família Planorbidae. (PRESTON, 1910).

Schistosoma spp. possui um ciclo de vida que envolve caramujos de água doce do gênero *Biomphalaria* (SOARES et al., 2018). Atualmente, existem dez espécies e uma subespécie do gênero *Biomphalaria* e, destas, três são hospedeiras intermediárias naturais (*B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea*) (CARVALHO et al., 2018).

Caracterizam-se por apresentarem concha em disco bicôncavo planispiral, com lados aproximadamente paralelos e última volta muito larga. A abertura da concha varia de acordo com a espécie e os giros são esculpidos apenas com estrias de crescimento (PARAENSE, 1975). A grande responsável pela manutenção e disseminação do *S. mansoni*, no Brasil, é sem

dúvida, *B. glabrata*, por se mostrar altamente suscetível, em decorrência da compatibilidade entre parasito-hospedeiro, e de sua larga distribuição.

Sendo hermafroditas, os caramujos desse gênero preferem a reprodução por fecundação cruzada sendo sua maturidade sexual atingida em aproximadamente 35 a 50 dias. E quando ocorre a oviposição destes organismos, os ovos são protegidos por uma substância gelatinosa e glicoproteica e depositados em uma superfície, geralmente folhas de plantas, pedras ou até na concha de outros caramujos que irão eclodir aproximadamente dentro de 7 a 9 dias (PARAENSE, 1972; PALASIO et al., 2015).

2.2.3 Medidas de controle sobre moluscos gastrópodes

As aplicações de moluscidas químicas, tiveram amplo destaque nos programas de controle da esquistossomose, sobretudo as drogas disponíveis para o tratamento dos casos diagnosticados, porém de eficiência limitada, pois apresentavam efeitos colaterais muito intensos e graves. Contudo, os métodos mais utilizados além do químico, são através de drenagem de água e catação manual que ainda assim, não são eficientes o bastante (TELES; MARQUES, 1989; COLLEY, 2010).

Outras medidas de controle se baseiam na utilização do controle biológico utilizados em ovos, fases larvais e hospedeiros intermediários (DUARTE et al., 2015; CASTRO et al., 2022), feitos em sua maioria seguindo o “Teste de Embriotoxicidade de *Biomphalaria*” (BET), no qual foi avaliado a eclodibilidade dos caramujos.

2.2.4 Biossíntese de nanopartículas por fungos como controle biológico

Sabe-se que a maioria dos agentes antimicrobianos utilizados comercialmente, incluindo a prata, são biocidas para grande parte dos microrganismos relevantes à área médica incluindo bactérias, fungos e leveduras. A forma de atuação destes agentes consiste em danificar a parede celular ou alterar a permeabilidade da membrana celular, desnaturar proteínas e inibir a atividade enzimática ou a síntese de lipídios, os quais são mecanismos essenciais para a sobrevivência celular (JOVETIC et al., 2010; NEDERBERG et al., 2011).

O mecanismo exato de redução das nanopartículas de prata (Ag^+ para Ag^0) ainda é pouco conhecido (DURÁN et al., 2011). Isto ocorre pelo fato de que diferentes agentes biológicos reagem de forma diferente com os íons metálicos que conduzem à formação das nanopartículas de prata (HULKOTI & TARANATH, 2014). O mecanismo intracelular de biossíntese de nanopartículas de prata envolve o transporte de íons no interior da célula

microbiana. Na biossíntese intracelular de nanopartículas de prata, a parede celular da célula microbiana desempenha um papel fundamental. As enzimas presentes na parede celular serão as biomoléculas responsáveis pela redução dos íons de prata, e estas irão se difundir para o meio extracelular (HULKOTI & TARANATH, 2014).

Esse mecanismo permanece íntegro e corrobora a proposta definida por Mukherjee et al. (2001) os quais, em um estudo da biossíntese e imobilização de nanopartículas de prata, verificaram que a maioria das nanopartículas fica claramente aderida à superfície da membrana citoplasmática de diversos fungos (ALMEIDA; DE OLIVEIRA; HOTZA, 2017).

2.3.5 *Monacrosporium thaumasium*

Rubner, (1996), descreveu o gênero *Monacrosporium* e classificou as características do gênero como: hifas septadas, ramificadas, conidióforos geralmente simples e translúcidos. Alguns isolados de *M. thaumasium* são considerados termotolerantes e crescem a 33 °C, seus conidióforos possuem entre 150-420 µm de altura, com 2-10 pequenos ramos perpendiculares (principalmente 2-10 µm de comprimento). E em seus conídios, medindo 35-42-51 x 15-19-23 µm, sendo na maioria das vezes desigualmente três septados. Além dessas características, possuem a capacidade de captura de nematoides por meio de redes adesivas (LI et al., 2005; ARAUJO et al., 2009) .

Trabalhos realizados por diversos pesquisadores demonstram a capacidade predatória e enzimática de fungos do gênero *Monacrosporium* (SOARES et al., 2015b, 2013; DA SILVA et al., 2013; MOTA; CAMPOS; DE ARAÚJO, 2003). As enzimas secretadas por este fungo são importantes agentes capazes de degradar cutículas de diversos helmintos. Além disso, *M. thaumasium* têm se destacado como potencial biotecnológico de enzimas extracelulares e seu fator de virulência em nematoides (SOARES et al., 2015, 2012, 2013).

Essas enzimas, classificadas como serino proteases, são encontradas em vírus, bactérias e em eucariotos, o que é de extrema participação vital no metabolismo desses organismos, conhecido como uma tríade catalítica (BETZEL; PAL; SAENGER, 1988; BETZEL et al., 2001).

2.5.6 Ligantes e pinça óptica

O ácido desoxirribonucleico (ADN) ou, como é mais conhecido por sua sigla em inglês, DNA, é o responsável pela transmissão dos caracteres através das gerações. As informações transmitidas e presentes no DNA de um novo ser desempenham, cada uma

dentro de sua própria célula, um conjunto de funções específicas, ligadas às produções e ao controle de proteínas. Esta organização designa a estrutura e a funcionalidade das células (SILVA et al., 2020).

A técnica de pinça óptica foi desenvolvida com o intuito de manipulação e aprisionamento de pequenos átomos, do qual o nome de pinça óptica, e tem sido de grande utilidade, dentro da Biologia (ASHKIN; DZIEDZIC, 1987; AVSIEVICH et al., 2020), incluindo estudos que relacionam proteínas, interação DNA-compostos, fármacos e até microrganismos (ALVES; MESQUITA; ROCHA, 2020).

O DNA tem uma forma mais comum de conformação estrutural em solução de concentração de sal fisiológica (~ pH 7) e em pH neutro, que é a forma conhecida como B-DNA, usada em nossos experimentos. Esta forma possui giro para a direita e é a forma descrita pelo modelo de Watson e Crick. Entretanto, duas outras formas de conformação da dupla hélice são possíveis: elas são as formas A-DNA e Z-DNA. Entre as formas há diferenças no passo da hélice, no diâmetro e até no sentido de giro da hélice (ROCHA, 2020).

Segundo Rocha, (2009) o fato da utilização da técnica se baseia na precisão na possibilidade de medir as alterações mecânicas na molécula de DNA e outros parâmetros mecânicos de interesse dos quais são: seu comprimento de persistência (A) e seu comprimento de contorno (L). É ligado a rigidez da molécula de DNA, quanto maior o comprimento de persistência, mais rígida é a molécula e mais inviável de ser dobrada ela é; entretanto quanto menor for o comprimento de persistência, mais maleável é a molécula. O segundo é o comprimento da molécula quando esticada de uma ponta a outra, que fornece uma ideia direta do tamanho linear da molécula de DNA.

As ligações de hidrogênio desta macromolécula, são relativamente fracas (ISRAELACHVILI, 2011), e podem, em determinadas situações, se romper formando duas fitas simples (desnaturação). Mesmo sendo um efeito coletivo, a desnaturação pode ser parcial ou total e sua causa pode ser a temperatura, o meio no qual o DNA está inserido ou a ação de forças externas (TESSMER et al., 2003; ROCHA; FERREIRA; MESQUITA, 2007; ROCHA et al., 2009; REIS; RAMOS; ROCHA, 2013; CRISAFULI; RAMOS; ROCHA, 2015). Mesmo após a desnaturação parcial, as ligações de hidrogênio podem se refazer, dependendo do processo utilizado na desnaturação ser reversível (lento ou quase estático) e também do processo utilizado na renaturação (DAUNE, 1999; ROCHA, 2009, 2020).

As conformações dependem principalmente do meio onde o DNA é inserido (umidade e força iônica), ou seja, ele pode transitar entre uma conformação e outra dependendo do

ambiente, supondo um ambiente com uma quantidade insignificante de proteínas (ALVES; MESQUITA; ROCHA, 2020).

Os agentes químicos que de alguma forma interagem com a molécula de DNA dá-se a designação ligante, que podem interagir de forma simplesmente eletrostática como é o caso de vários tipos de proteínas (ALVES; MESQUITA; ROCHA, 2020). Também há a possibilidade de interagirem formando: intercalação, ligação covalente e condensação do DNA, podendo alterar suas propriedades mecânicas (ROCHA, 2020).

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, É. S.; DE OLIVEIRA, D.; HOTZA, D. Characterization of silver nanoparticles produced by biosynthesis mediated by *Fusarium oxysporum* under different processing conditions. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 40, n. 9, p. 1291–1303, 2017.
- ALVES, P. S.; MESQUITA, O. N.; ROCHA, M. S. Model for DNA interactions with proteins and other large ligands: extracting physical chemistry from pure mechanical measurements. *The Journal of Physical Chemistry B*, v. 124, n. 6, p. 1020–1024, 13 fev. 2020.
- ARAÚJO, J. M. et al. Activity of the nematophagous fungi *Pochonia chlamydosporia*, *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium thaumasium* on egg capsules of *Dipylidium caninum*. *Veterinary Parasitology*, v. 166, n. 1, p. 86–89, 2009.
- ASHKIN, A.; DZIEDZIC, J. M. Optical Trapping and Manipulation of Viruses and Bacteria. *Science*, v. 235, n. 4795, p. 1517–1520, 3 jul. 1987.
- AVSIEVICH, T. et al. The advancement of blood cell research by optical tweezers. *Reviews in Physics*, v. 5, p. 100043, 2020.
- BETZEL, C. et al. Structure of a serine protease proteinase K from *Tritirachium album* limber at 0.98 Å resolution. *Biochemistry*, v. 40, n. 10, p. 3080–3088, 1 mar. 2001.
- BETZEL, C.; PAL, G. P.; SAENGER, W. Three-dimensional structure of proteinase K at 0.15-nm resolution. *European Journal of Biochemistry*, v. 178, n. 1, p. 155–171, 1 dez. 1988.
- BRAGA, F. R. et al. Viability of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* after passage through the gastrointestinal tract of horses. *Veterinary Parasitology*, v. 194, n. 3–4, p. 264–268, 2010.
- BRAGA, F. R. et al. Larvicidal activity of a crude enzyme extract of the fungus *Duddingtonia flagrans* on first-stage larvae of *Angiostrongylus vasorum*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 44, n. 3, p. 383–385, 2011.
- BRAGA, F. R. et al. An extracellular serine protease of an isolate of *Duddingtonia flagrans* nematophagous fungus. *Biocontrol Science and Technology*, v. 22, n. 10, p. 1131–1142, 1 out. 2012.
- BRAGA, F. R. et al. Zoonotic neglected tropical diseases: New approaches to combat old enemies. *BioMed Research International*, p. 2, 2014.
- BRAGA, F. R. et al. Nematocidal activity of extracellular enzymes produced by the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* on cyathostomin infective larvae. *Veterinary Parasitology*, v. 212, n. 3–4, p. 214–218, set. 2015.
- CASTRO, L. S. et al. Ovicidal potential of *Pochonia chlamydosporia* isolate Pc-10

- (Ascomycota: Sordariomycetes) on egg masses of the snail *Pseudosuccinea columella* (Mollusca: Gastropoda). *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 166, n. 1, p. 107212, set. 2019.
- CASTRO, L. S. et al. Susceptibility of embryos of *Biomphalaria tenagophila* (Mollusca: Gastropoda) to infection by *Pochonia chlamydosporia* (Ascomycota: Sordariomycetes). *Archives of Microbiology*, v. 204, n. 5, p. 271, 2022.
- CHITSULO, L. et al. The global status of schistosomiasis and its control. *Acta Tropica*, 2000.
- COLLEY, E. Medidas de controle de *Achatina fulica*. O caramujo gigante africano *Achatina fulica* no Brasil, p. 203- citation_lastpage, 2010.
- CRISAFULI, F. A. P.; RAMOS, E. B.; ROCHA, M. S. Characterizing the interaction between DNA and GelRed fluorescent stain. *European Biophysics Journal*, v. 44, n. 1, p. 1–7, 2015.
- DA SILVA, M. E. et al. Mycelial mass production of fungi *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium thaumasium* under different culture conditions. *BMC research notes*, v. 6, p. 340, 29 ago. 2013.
- DAUNE, M. *Molecular biophysics: structures in motion*. Oxford [England]; Oxford University Press, 1999.
- DE FREITAS SOARES, F. E. et al. Fungal Natural Products Focused on Combating Helminthiasis. In: *Studies in Natural Products Chemistry*. p. 221–245.
- DUARTE, G. F. et al. New insights into the amphibious life of *Biomphalaria glabrata* and susceptibility of its egg masses to fungal infection. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 125, p. 31–36, 2015.
- FRASSY, L. N. et al. Destruição de ovos de *Toxocara canis* pelo fungo nematófago *Pochonia chlamydosporia*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 43, n. 1, p. 102–104, fev. 2010.
- GLINZ, D. et al. Comparing diagnostic accuracy of Kato-Katz, Koga Agar Plate, Ether-Concentration, and FLOTAC for *Schistosoma mansoni* and Soil-transmitted helminths. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 4, n. 7, p. e754, 2010.
- ISRAELACHVILI, J. N. Strong intermolecular forces: covalent and Coulomb interactions. In: ISRAELACHVILI, J. N. B. T.-I. AND S. F. (THIRD E. (Ed.). . San Diego: Academic Press, 2011. p. 53–70.
- JOVETIC, S. et al. β -Lactam and glycopeptide antibiotics: first and last line of defense? *Trends in biotechnology*, v. 28, n. 12, p. 596–604, 2010.
- LI, Y. et al. Phylogenetics and Evolution of Nematode-Trapping Fungi (Orbiliiales) Estimated

- from Nuclear and Protein Coding Genes. *Mycologia*, v. 97, n. 5, p. 1034–1046, 11 jul. 2005.
- LINS, R. A. B. et al. A distribuição dos eosinófilos nas diferentes fases de evolução do granuloma hepático em camundongos infectados pelo *Schistosoma mansoni*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 41, n. 2, p. 173–178, 2008.
- MADAKKA, M.; JAYARAJU, N.; RAJESH, N. Mycosynthesis of silver nanoparticles and their characterization. *MethodsX*, v. 5, p. 20–29, 2018.
- MOTA, M. D. A.; CAMPOS, A. K.; DE ARAÚJO, J. V. Controle biológico de helmintos parasitos de animais: Estágio atual e perspectivas futuras. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, v. 23, n. 3, p. 93–100, 2003.
- NEDERBERG, F. et al. Biodegradable nanostructures with selective lysis of microbial membranes. *Nature chemistry*, v. 3, n. 5, p. 409, 2011.
- PALASIO, R. G. S. et al. The current distribution pattern of *Biomphalaria tenagophila* and *Biomphalaria straminea* in the northern and southern regions of the coastal fluvial plain in the state of São Paulo. *Biota Neotropica*, v. 15, n. 3, 31 jul. 2015.
- PARAENSE, W. L. Introdução à geografia médica do Brasil. In: *Fauna planorbídica do Brasil*. p. 213–239.
- PARAENSE, W. L. Estudo atual da sistemática dos planorbídeos brasileiros. *Arq Mus Nac*, v. 55, p. 105–128, 1975.
- PRESTON, H. B. LX.—Additions to the non-Marine molluscan fauna of British and German East Africa and Lake Abert Edward. *Annals and Magazine of Natural History*, v. 6, n. 35, p. 526–536, 1 nov. 1910.
- REIS, L. A.; RAMOS, E. B.; ROCHA, M. S. DNA Interaction with Diaminobenzidine Studied with Optical Tweezers and Dynamic Light Scattering. *The Journal of Physical Chemistry B*, v. 117, n. 46, p. 14345–14350, 21 nov. 2013.
- ROCHA, L. F. N. et al. Occurrence of invertebrate-pathogenic fungi in a Cerrado ecosystem in Central Brazil. *Biocontrol Science and Technology*, 2009.
- ROCHA, M. Optical tweezers for undergraduates: theoretical analysis and experiments. *American Journal of Physics - AMER J PHYS*, v. 77, p. 704–712, 1 ago. 2009.
- ROCHA, M. S. Interações DNA-ligantes: uma introdução. 1. ed. São Paulo: Editora Livraria da Física, 2020.
- ROCHA, M. S.; FERREIRA, M. C.; MESQUITA, O. N. Transition on the entropic elasticity of DNA induced by intercalating molecules. *The Journal of Chemical Physics*, v. 127, n. 10, p. 105108, 14 set. 2007.

- RUBNER, A. Revision of predacious hyphomycetes in the *Dactylella-Monacrosporium* complex. Centraalbu ed. Baarn: [s.n.].
- SANTOS-AMARAL, L. et al. Heterorhabditis bacteriophora (Rhabditida: Heterorhabditidae), isolate HP88, induces reproductive and physiological alterations in *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda: Planorbidae): an alternative for biological control of schistosomiasis. *Acta Tropica*, p. 106396, 10 mar. 2022.
- SILVA, E. F. et al. Dodecyltrimethylammonium bromide surfactant effects on DNA: Unraveling the competition between electrostatic and hydrophobic interactions. *Physical Review E*, v. 102, n. 3, p. 32401, 1 set. 2020.
- SOARES, F. E. DE F. et al. The nematophagous fungus *Monacrosporium thaumasium* and its nematicidal activity on *Angiostrongylus vasorum*. *Revista Iberoamericana de Micologia*, v. 32, n. 1, p. 51–53, 2015.
- SOARES, F. E. F. et al. In vitro activity of a serine protease from *Monacrosporium thaumasium* fungus against first-stage larvae of *Angiostrongylus vasorum*. *Parasitology Research*, v. 110, n. 6, p. 2423–2427, 2012.
- SOARES, F. E. F. et al. Nematicidal activity of three novel extracellular proteases of the nematophagous fungus *Monacrosporium sinense*. *Parasitology research*, v. 112, n. 4, p. 1557–1565, abr. 2013.
- SOUZA, F. P. C. DE et al. Esquistossomose mansônica: aspectos gerais, imunologia, patogênese e história natural. *Rev. Soc. Bras. Clín. Méd*, v. 4, n. 9, p. 300–307, 2011.
- TELES, H. M.; MARQUES, C. C. Estivação de *Biomphalaria tenagophila* (Pulmonata, Planorbidae). *Revista de Saude Publica*, v. 1, n. 23, p. 76–8, 1989.
- TENOVER, F. C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *American Journal of Infection Control*, 2006.
- TESSMER, I. et al. Mode of drug binding to DNA determined by optical tweezers force spectroscopy. *Journal of Modern Optics*, v. 50, n. 10, p. 1627–1636, 1 jul. 2003.
- THAKKAR, K. N.; MHATRE, S. S.; PARIKH, R. Y. Biological synthesis of metallic nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, v. 6, n. 2, p. 257–262, 2010.
- TUNHOLI, V. M. et al. Molluscicidal potential of Heterorhabditis baujardi (Rhabditida: Heterorhabditidae), strain LPP7, o *Lymnaea columella* (Gastropoda: Pulmonata): An alternative for biological control of fasciolosis. *Acta Tropica*, v. 173, n. 1, p. 23–29, 2017.
- VITORINO, R. R.; GOMES, A. Esquistossomose mansônica: aspectos gerais , imunologia ,

patogênese e história natural. *Revista Brasileira de Clínica Médica*, 2011.

WHO. Prevention and control of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis World Health Organization - Technical Report Series, 2002.

WHO. The social context of schistosomiasis and its control: an introduction and annotated bibliography Genève, 2008.

YANG, J. et al. Molecular Mechanism of Nematophagous Fungi Infection of Nematodes BT - Nematode-Trapping Fungi. In: ZHANG, K.-Q.; HYDE, K. D. (Eds.). Dordrecht: Springer Netherlands, 2014. p. 263–311.

3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

O uso irregular de moluscidas tem promovido a seleção de espécies de gastrópodes mais resistentes, atingindo outros organismos além do alvo em questão. Na atual conjuntura, vários desses pesticidas químicos são proibidos pelas legislações sanitárias por causarem riscos à saúde animal, e humana e ambiental. Entretanto com o advento da biotecnologia e o controle biológico por meio de fungos, visa-se a utilização de compostos destes organismos juntamente com estruturas que possam promover a eficácia do composto biológico em hospedeiros intermediários de importância médico-veterinária. Explicar ideia

3.1 Objetivos gerais

- ✓ Promover a biossíntese de nanopartículas de prata (AgNPs), mediada pela utilização do fungo *Monacrosporium thaumasium* (cepa NF34);
- ✓ Avaliar as nanopartículas de prata (AgNPs) através da ação do fungo *M. thaumasium* sobre massas ovíferas do caramujo *Biomphalaria glabrata*;
- ✓ Avaliar as proteases produzidas pelo fungo *M. thaumasium* na técnica de pinça óptica.
- ✓ Sintetizar AgNPs utilizando o fungo *M. thaumasium* e testar seus efeitos sobre massas ovíferas do caramujo *Biomphalaria glabrata*.
- ✓ Avaliar as proteases produzidas pelo fungo *M. thaumasium* na técnica de pinça óptica.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Purificar as proteases produzidas pelo fungo *Monacrosporium thaumasium*;
- ✓ Caracterizar a atividade caseinolítica das enzimas produzidas pelo fungo *M. thaumasium* em função de pH e temperatura;
- ✓ Caracterizar estruturalmente as nanopartículas de prata sintetizadas pela ação do fungo *M. thaumasium* via ensaios em espectroscopia UV-Visível (UV-Vis) e microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- ✓ Avaliar as interações das proteases produzidas pelo fungo *M. thaumasium* na macromolécula de ácido desoxirribonucleico (λ -DNA) através da pinça óptica.

Capítulo 1

On the interactions involving serine proteases obtained from *Monacrosporium thaumasium* (Ascomycota: Orbiliomycetes) and deoxyribonucleic acid (DNA): biological macromolecules in action

Submetido à revista *International Journal of Biological Macromolecules*

On the interactions involving serine proteases obtained from *Monacrosporium thaumasium* (Ascomycota: Orbiliomycetes) and deoxyribonucleic acid (DNA): biological macromolecules in action

Lorena Souza Castro¹, Ethe de Araújo Costa², Gabriella Peterlini Tavares⁴, Márcio Santos Rocha², José Humberto Queiroz³, Juliana Barbosa Coitinho Gonçalves⁵, Suely Gomes de Figueiredo⁵, Jackson Victor de Araújo¹

¹ Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

² Departamento de Física, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

³ Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

⁴ Centro de Formação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Sul da Bahia, Itabuna, Bahia, Brasil.

⁵ Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Espírito Santo, Brasil.

Abstract

The use of force spectroscopy approaches performed with optical tweezers can be very useful in determining the binding modes and the physical chemistry of DNA interactions with ligands, from small drugs to proteins. Helminthophagous fungi, on the other hand, have important enzyme secretion mechanisms for various purposes, and the interactions between such enzymes and nucleic acids are very poorly studied. Therefore, the main goal of the present work was to investigate, at the molecular level, the mechanisms of interaction between fungal serine proteases and the double-stranded (ds) DNA molecule. Extracellular enzymes of the nematophagous fungus *Monacrosporium thaumasium* (Isolate-NF34) were purified and used in typical optical tweezers force spectroscopy experiments. Experimental assays performed with this single molecule technique consist in exposing different concentrations of the protease of this fungus to dsDNA until saturation while monitoring the changes on the mechanical properties of the macromolecular complexes formed, from where the physical chemistry of the interaction can be deduced. It was found that the protease binds strongly to the double-helix, forming aggregates and changing the persistence length of the DNA molecule. The results confirm that the serine proteases are potential candidates for applications which intend to interfere on the DNA basic functions inside living cells, possibly

hindering some of these functions. The present work thus allowed us to infer information at the molecular level on the pathogenicity of these proteins, an important class of biological macromolecules, when applied to a target specimen.

Keyword: Nematophagous fungi; Biological activity; Biotechnology; Enzymes; DNA; Biological control.

1. Introduction

The exploratory use of helminthophagous fungi has been a major advance in the area of biological control of helminths [1–5]. Biological control using nematophagous fungi is a reality in intestinal helminthiasis control strategies. The dispersion of fungal structures directly in feces, where the hatching of eggs occurs and larvae become infectants, is one of the forms used to establish this biological control of parasitic nematodes of animals [6]. It is extremely important to recognize the problems caused by parasitic nematodes of animals worldwide, evidencing that parasitic control must, above all, start from knowledge about the population dynamics and epidemiology of helminths, their characteristics and the main species present in the most diverse categories of animal husbandry worldwide [2]. The fungus *Monacrosporium thaumasium* in the treatment of gastrointestinal nematodes (GIN) of several domestic animals demonstrated its potential in reducing the free life phases of parasitic nematodes in the field [1,7–14]. This fungus is classified as a predator of nematodes and in it is adhesive nets present in hyphae, secrete enzymes capable of degrading cuticles of various helminths.

In addition, *M. thaumasium* has stood out as a biotechnological potential of extracellular enzymes and their virulence factor in nematodes [15–17]. These enzymes, classified as serine proteases, are found in viruses, bacteria, and although eukaryotes that are extremely vital participation in the metabolism of these organisms. It is known that these enzymes function as a catalytic triad and oxyanion in catalysis, clearly established [18,19] of how these interactions with their substrates occur.

Optical tweezers (OT) is a single molecule technique which, in turn, consists of a laser beam focused by a high numerical aperture microscope objective, capable of exerting forces and trapping dielectric particles (e. g. microspheres) close to the focus of the lens [20–22].

Some of its applications consist of capturing and manipulating macromolecules like RNA and DNA, thus allowing several important studies on their interactions with ligands such as drugs [23] and proteins [24]. In addition, the technique has also been used to study parasites [25], cells [26,27] and other biological systems.

Until now, little is known about the interactions among enzymes produced by nematophagous fungi and dsDNA, as well as the possible consequences of these interactions. In addition, because of the wide range of studies focused on these enzymes, our goal here was to characterize the behavior of serine proteases from *M. thaumasium* when interacting with dsDNA using optical tweezers, unveiling the binding mode and the physical chemistry of the interaction. In summary, it was found the serine proteases significantly interact with dsDNA molecules at a very a low concentration range (nM), which is probably related to their efficiency as antipathogen agents.

2. Materials and methods

2.1 Fungus and serine protease production

The nematophagous fungus isolate *Monacrosporium thaumasium* (Strain NF34) from Brazil soil was kept in a solid corn-meal-agar medium 2% (CMA 2%) at 4° C in the dark in the mycoteca of the Parasitology Laboratory of the Veterinary Department of the Universidade Federal de Viçosa.

The production of proteases was made from small discs (8 mm) of NF34 fungal mycelium, transferred to previously sterilized 250 mL vials, containing a culture medium prepared with 8 g of wheat bran, 16 ml of minimum mineral medium containing in g/liter: KH_2PO_4 , 1.5; K_2HPO_4 , 1.0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.2; NaCl, 0.2 and glucose, 1.0 adapted [28]:

The semi-solid fermentation was obtained in six days of incubation in a darkroom at 28° C. Then, 80 mL of distilled water was added to this medium, manually stirred and filtered in a glass funnel with gauze, to remove the solid medium from the wheat bran. Therefore, this material was called crude enzymatic extract and was stored at 4° C until use.

2.2 Partial purification

An aliquot of the crude extract obtained was previously centrifuged (5000 g – 5 min.), and subsequently subjected to ultrafiltration using a membrane system (Pellicon® XL Cassette Durapore® - Millipore membrane 0.45 µm) according to the manufacturer's specifications. After this procedure, the retained fraction was used for partial purification of the serine protease produced by the fungus.

For this, four mL was applied to a DEAE-Sepharose™ (Amershan Biosciences®) column (5 x 2 cm) equilibrated with glycine phosphate buffer 50 mM (pH 9). The column was eluted with a linear gradient de 0 to 1M of NaCl in the balance buffer at 1 mL/min. and flow rate of 2 mL. The proteins were detected by monitoring by protein content, measured by the method of Bradford (1976), and assayed for proteolytic activity, using casein as a substrate .

2.2.1 Electrophoresis SDS- PAGE

The homogeneity of the fractions obtained in the first purification stage was evaluated by electrophoresis in polyacrylamide gel (SDS-PAGE), tricine system [30]. The gels were stained with Coomassie Brilliant Blue R-250 and silver nitrate solution [31].

2.3 Enzymatic assay and characterization of serine protease

The precharacterization tests were performed in triplicates in three independent experiments at a temperature of 50° C for 15 minutes and later according to the results obtained from the analyses. The volumes of solution used were: 50 µl of the enzyme (crude extract), 450 µl glycine-NaOH buffer 50 mM (pH 8) and 500 µl casein 1% (pH 8) and paralyzed the reaction with 1 mL of trichloroacetic acid (TCA 10%). The supernatant was collected, and the absorbance was measured at 280 nm using a spectrophotometer (Thermo Scientific Multiskan GO). A standard tyrosine curve was constructed by varying tyrosine (U) concentrations. Still, later the characterization and quantification tests were monitored by enzymatic assay and measurement of the protein content [29] was done.

2.4 Effect of pH, temperature and reaction time on serine protease activity

Different pH values were used with the following buffers: citrate phosphate 50 mM (pH 3.0 to 7.0) and glycine-NaOH (pH 7.0 to 10). The temperature values used in the thermal

bath were: 20° C to 80° C and as for the enzyme activity concerning time, were 2.5; 5; 10; 15; 20; 25; 30; 40 minutes.

2.5 Experimental assays with optical tweezers

The optical tweezers assays performed to study DNA-serine protease interaction at the single molecule level were done with the following details.

2.5.1 Sample preparation and optical tweezers setup.

The samples consist of a phosphate buffer saline (PBS) with pH = 7.4 and [Na] = 150 mM containing biotin-labeled λ -DNA molecules (New England Biolabs). One end of these molecule is attached on a coverslip coated with streptavidin protein, while the other end is attached to a 3 μ m diameter polystyrene microsphere also coated with streptavidin (Bangs Labs). Thus, using such a configuration, one can trap the microsphere with the optical tweezers in order to manipulate and stretch the tethered DNA molecules.

The optical tweezers setup consists of a solid-state laser (CNI Lasers) with a wavelength of 1,064 nm operating in the TEM₀₀ mode. The laser enters an inverted microscope (Nikon Ti2) and is focused on the sample by an objective lens with numerical aperture of 1.4, creating the tweezers inside the sample chamber. A piezoelectric (PiNano, Physik Instrumente) is coupled to the microscope stage, allowing one to move such stage and to stretch the tethered the DNA molecule. Details on the sample preparation and experimental setup can be found in previous works [32].

2.5.2 Experimental procedure

The first step was to obtain the force-extension curves of the DNA molecule and the DNA-serine protease complexes under various protein concentrations. Optical tweezers were used to capture a microsphere bound to DNA. The biopolymer was then stretched by moving the microscope stage while the microsphere is maintained trapped by the tweezers. The microsphere displacements inside the optical potential were measured using videomicroscopy, and the applied force can finally be calculated by multiplying the bead displacement by the previous measured trap stiffness of the apparatus, a standard procedure in the field [22].

Through this procedure, the force-extension curve of the biopolymer and the complexes formed with the serine protease can be determined, which allows one to infer how

the binding of these proteins affect the elastic behavior of the single tethered DNA. It is worth mentioning that the experiments were carried out in the entropic regime, that is, the maximum forces applied to the DNA-serine protease complexes were below 5 pN. This regime of low forces ensures that the complexes were close to the equilibrium conditions and the physicochemical parameters of the interaction were basically independent on the applied forces [33,34].

The analysis of the obtained force-extension curves was performed using the Marko-Siggia Worm-Like Chain (WLC) model [34] to fit the experimental data, and from such fittings the basic mechanical parameters, contour length (L) and persistence length (A) of the DNA- serine protease complexes, were extracted for each protein concentration used. Finally, the data of the persistence length as a function of the protein concentration was analyzed and fitted to a quenched-disorder statistical model of ligand binding previously developed [24,34]. Such analysis allows the determination of the physicochemical (binding) parameters that characterize the interaction. Complete details of the model and fitting analysis procedure can be found in a previous work [24].

2.5.3 Gel electrophoresis assays

Agarose gel electrophoresis assays were performed to complement and confirm the conclusions about the DNA-serine protease interaction obtained in the optical tweezers experiments. The samples contained in the case 3 kbp DNA molecules, serine protease at different concentrations [0.5 to 15 nM], bromophenol blue (dye), GelRed [35] and the PBS buffer. The electrophoretic runs of the DNA-serine protease complexes were analyzed in 1.5% agarose gels. Each run was performed under a voltage of 60 Volts in a horizontal vat containing TAE buffer (Tris+ acid + EDTA) for 30 minutes. Images were obtained using a UV-transilluminator with an ultraviolet light excitation and an appropriate bandpass filter to collect fluorescence at (605 ± 10) nm.

3. Results and discussion

3.1 Protein characterization

The effect of the pH on enzymatic characterization (Fig.1) was previously described in the literature [36]. Here, the effect of pH (Fig.1a) on the enzymatic activity was to increase

such activity from pH 6 until its optimization at pH 9. The temperature (Fig.1b) reached up to 70°C for activity optimization, and the results from 40 to 60°C are basically constant, exhibiting a good activity.

Serine proteases are probably one of the most investigated enzymatic systems and are involved in many biological processes. Its catalytic triad function, develops electrostatic stability of charges (charge retransmission), promoting interactions, this also highlights some unknown characteristics that go beyond catalysis, being, therefore, interesting to explore other attributions of its use.

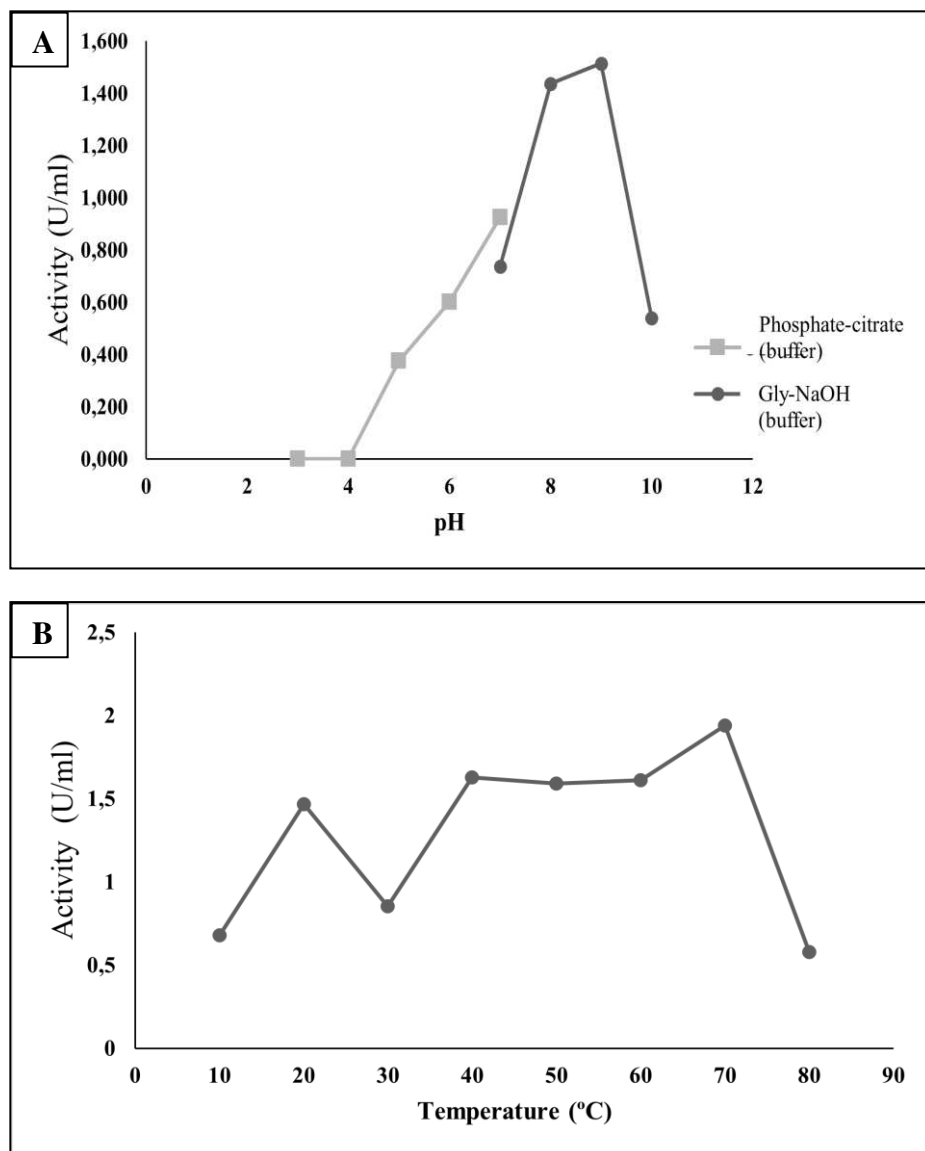


Fig. 1 - Evaluation of the variation of the effects of pH, temperature and reaction time on the protease activity. a) Variation of pH values - citrate phosphate 50 mM (3.0 to 7.0) and glycine-NaOH (7.0 to 10). b) Variation of temperature values from 20° C to 80° C.

Each fraction obtained in chromatography was used to perform different serine protease activity tests in order to obtain a peak of maximum activity. After performing the tests with the fractions, the resulting graphs revealed the occurrence of four significant peaks of serine proteases (Fig. 2) in numbered microtubes, well defined for each activity tested.

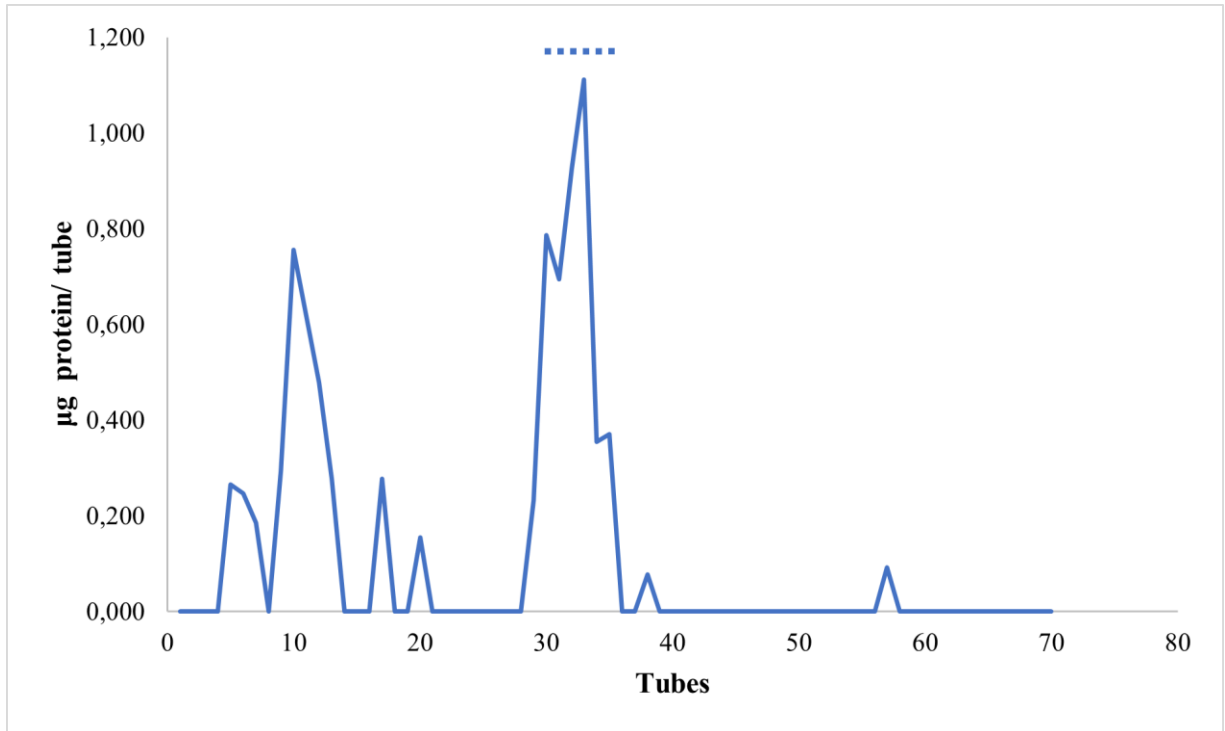


Fig. 2 - Elution profil showing the purification of serino protease from *Monacrosporium thaumasium*. Ionexchange chromatography of four mL fraction from DEAE-Sepharose (5 x 2 cm), equilibrated with 1 mM phosphate buffer (pH 9). Elution was performed with linear gradient of NaCl (0 - 1 M) glycine phosphate buffer at pH 9 and fractions of 2 mL. Content measured by the Bradford method fractions with proteolytic activity.

Regarding the electrophoretic patterns analyzed (Fig. 3), the total protein systems, which were saline precipitation at 0.15M, 0.30M and 0.50M showed more pronounced bands, demonstrating an approximate size of 40 kDa corroborating with Soares [37].

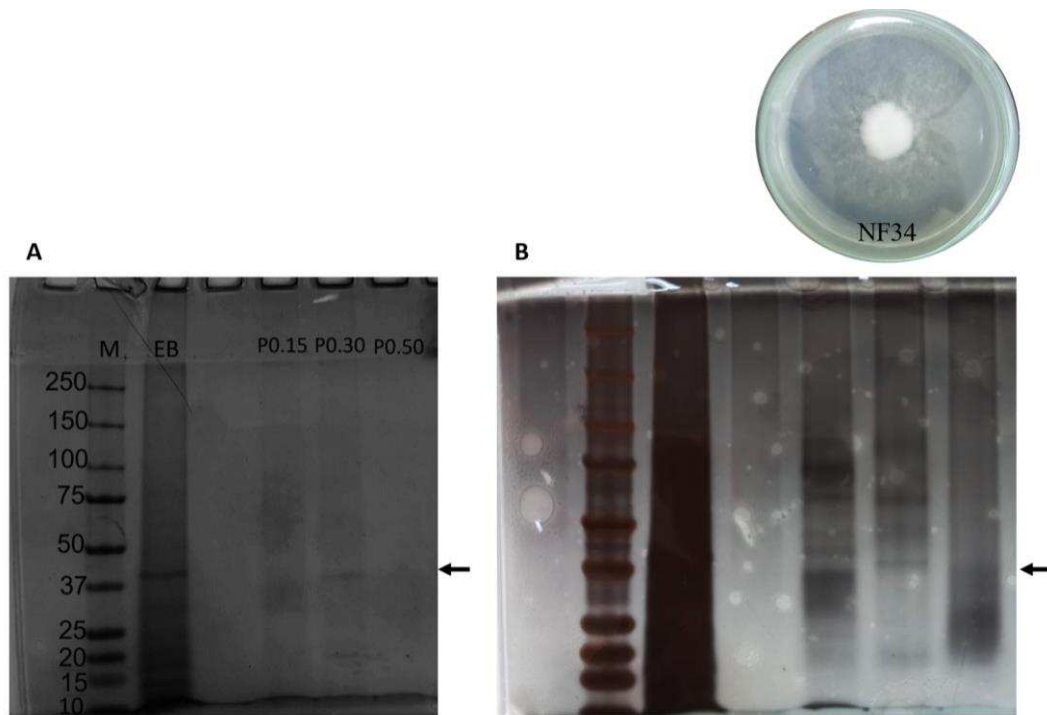


Fig. 3 - Profile of extracellular proteins of *M. thaumasium*. in SDS-PAGE gel (10%) electrophoresis stained with Coomassie (A) and Silver Solution (B). M - markers (Precision Plus Protein™) - mixture of ten blue-stained recombinant proteins (10–250 kD); EB – crude extract; P0.15 – protein pool 0.15 M; P0.30 – protein pool 0.30 M; protein pool 0.50 M.

Studies using serine proteases from other predatory fungi were also effective in helminth control, such as *Pochonia chlamydosporia* in parasite eggs [38,39] and *Duddingtonia flagrans* [40] in larval phases. Soares [41] using the same fungal isolate, purified and attributed protease as Mt1, and demonstrated its molecular mass of approximately 40 kDa, thus confirming by gel, results similar to this work. When comparing the similarities between proteases and other nematophagous fungi, a high degree of similarity is evidenced, and PII protease (*Arthrobotrys oligospora*) is more similar to the proteases of fungi that capture nematodes than opportunistic proteases.

Optical tweezers results

The results obtained from the optical tweezers assays have shown that serine proteases do not induce any change on the DNA contour length, but considerably changes its persistence length upon binding.

In fact, in Fig. 4 show the contour length of the DNA-serine protease complexes (L) as a function of the protein concentration in the sample (C_T). Observe that this mechanical parameter remains constant within the error bars as more protein is added.

Such a behavior allows one to conclude that, if the protein interacts with DNA, it does not change the average interspace between consecutive base-pairs along the double-helix upon binding.

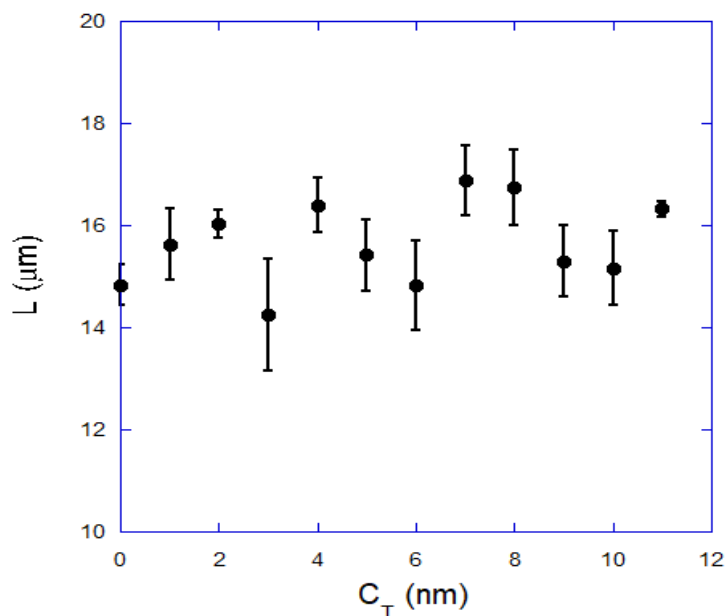


Fig. 4 - Contour length of the DNA-serine protease complexes as a function of the protein concentration in the sample. Observe that such mechanical parameter remains constant within the error bars as more protein is added.

In Fig. 5 we show the corresponding persistence length of the DNA-serine protease complexes, which presents a non-monotonic behavior increasing for low protein concentrations (< 6 nM) and then decreasing for higher concentrations. Such behavior confirms that the interaction occurs, and that the protein modifies the bending flexibility of the double-helix upon binding.

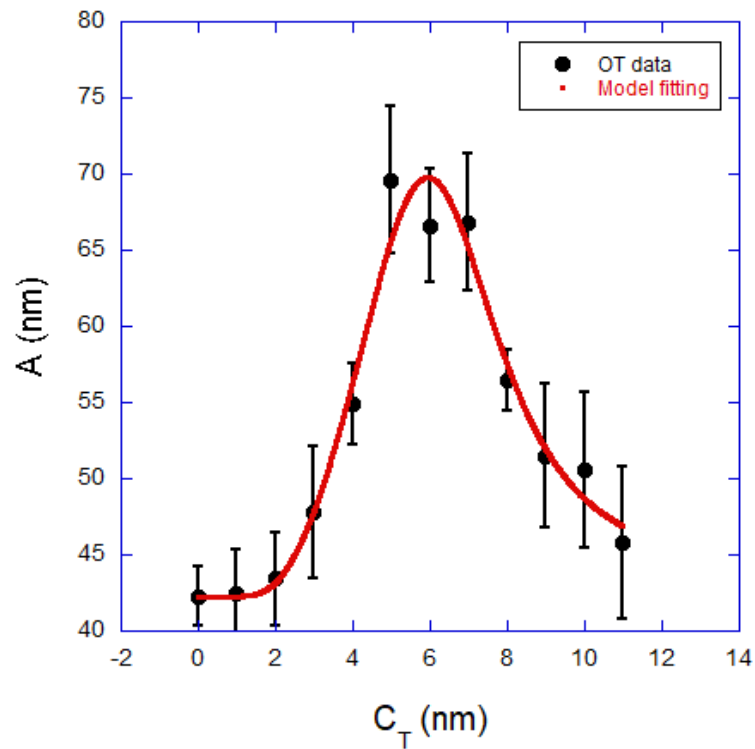


Fig. 5 - Corresponding persistence length of the DNA-serine protease complexes, which presents a non-monotonic behavior increasing for low protein concentrations (< 6 nM) and then decreasing for higher concentrations. The *red solid line* is a fitting to the quenched-disorder statistical model, from where the physicochemical (binding) parameters of the interaction can be extracted.

The *red solid line* is a fitting to the quenched-disorder statistical model using the Hill binding isotherm [24], from where the physicochemical (binding) parameters of the interaction can be extracted. Such fitting returns the following results for the binding parameters: the equilibrium binding association constant $K = (3.2 \pm 0.6) \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, the Hill exponent $n = 4.4 \pm 0.3$, the average radius of the bound protein aggregates $R = (4.6 \pm 0.4) \text{ nm}$ and the fraction of neutralized charges on the double-helix at bound protein saturation $f = 1.0 \pm 0.1$.

The value found for the equilibrium association constant is on the order of $\sim 10^8 \text{ M}^{-1}$, which shows that the serine proteases bind strongly to dsDNA at least under the experimental conditions used here. Such a result confirms that the serine proteases are potential candidates for applications which intend to interfere on the DNA basic functions inside living cells, possibly hindering some of these functions.

The value found for the Hill exponent (4.4 ± 0.3), on the other hand, gives the important information that the interaction is positively cooperative, *i. e.*, the binding of a protein molecule facilitates the subsequent binding of other protein molecules. Also, they tend to bind along the double-helix forming aggregates of at least 4 to 5 molecules (considering the error bar of the Hill exponent).

The result found for the average radius of the bound protein aggregates, $R = (4.6 \pm 0.4)$ nm, suggests that the average size of the serine proteases is between 1 to 3 nm, which is in excellent agreement with its known molecular weight (40 kDa).

Finally, the result found for the fraction of neutralized charges on the double-helix at bound protein saturation $f = 1.0 \pm 0.1$ says that at bound protein saturation about 100% of the DNA charge is neutralized by the positive domains of the bound proteins.

These results combined give a very insightful overview of the physical chemistry of the serine proteases interaction with dsDNA: they bind strongly presenting a positive cooperativity behavior in the form of bound aggregates and tend to neutralize about 100% of the negative charge present in the phosphate backbone of the double-helix, resulting in neutral DNA-protein complexes.

Gel electrophoresis

The electrophoresis gels indicate that in all cases there is a systematic decrease in the concentration of intercalated GelRed with the increase of the used protein concentration. A significant example is shown in Fig. 6, upper panel, in which one can see a systematic decrease of the band intensity for higher protein concentrations. This result suggests that the protein interaction with the double-helix competes with GelRed intercalation, which is reasonable because GelRed is a bis-intercalant formed by attaching two ethidium bromide (EtBr) molecules using a large linker that accommodates outside the double-helix when the intercalation of the aromatic parts (EtBr) occurs [35]. Therefore, with the protein previously bound to the double helix, it is reasonable to assume that it interferes on the regular accommodation of the GelRed molecule, especially the linker, explaining the result obtained in the electrophoresis assays.

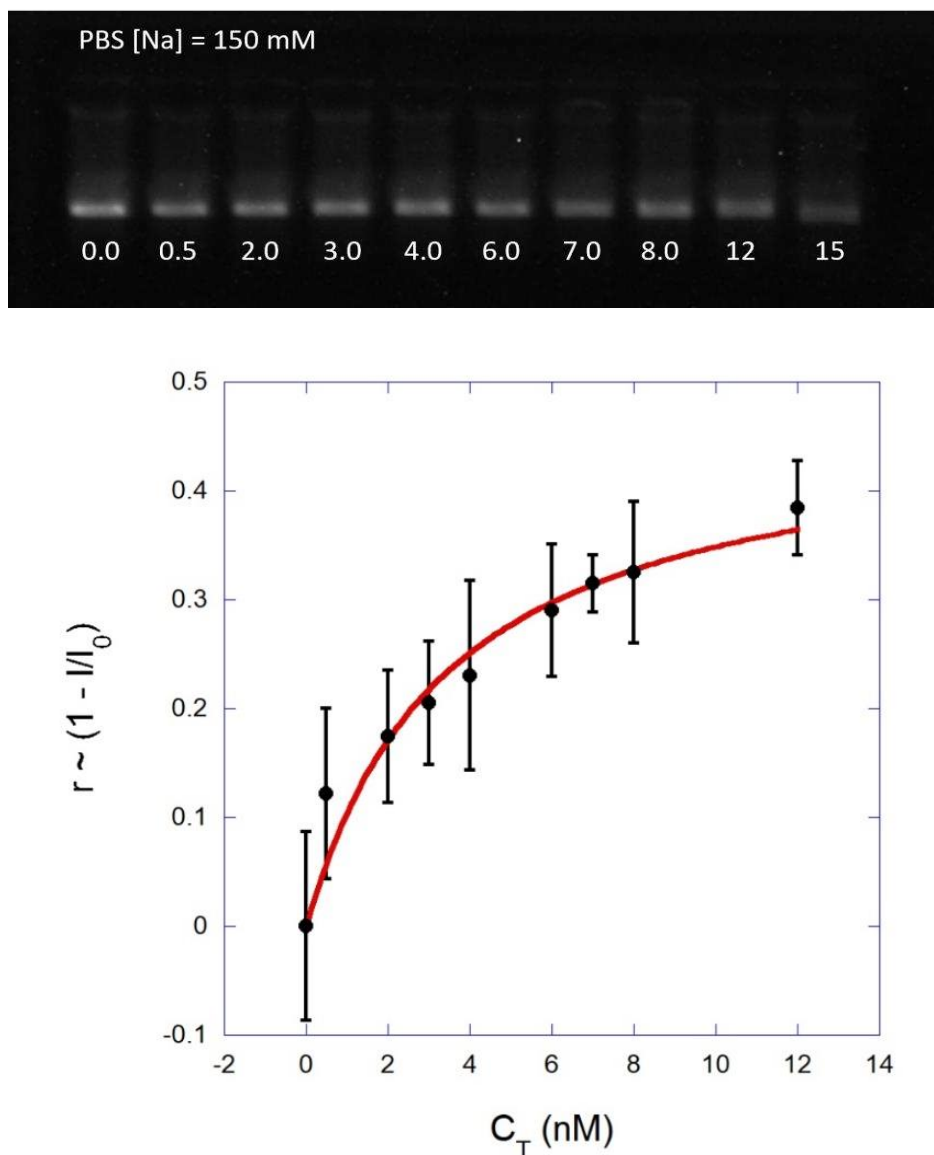


Fig. 6 - *Upper panel*: Exemplifying gel with various different serine protease concentrations used (indicated below the bands in nM), maintaining the DNA, GelRed and all other parameters constant. A systematic decrease of the band intensity can be seen for higher protein concentrations. *Bottom panel*: band intensity analysis, from where one can estimate the equilibrium binding association constant of the interaction.

The graph shown in the bottom panel is the band intensity analysis performed. The bound fraction (r) of protein is proportional to $1 - I/I_0$, where I is the measured intensity of each band on the gel and I_0 is the intensity corresponding to pure DNA (first band). The Scatchard binding isotherm [34] was used as a first approximation to fit the experimental curve, and an equilibrium constant of $(2.9 \pm 0.8) \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ was found, in excellent agreement with the optical tweezers result.

One of the advantages of using the optical tweezer technique is because of its ability to test macro and micromolecules alone, using a system without interference of organelles that are present in a cell. Effectively, this type of approach may eventually contribute to new methodologies that can assist in the biocontrol of helminths.

4. Conclusion

In the present study we analyzed the molecular interactions between extracted and purified serine proteases and double-stranded (ds)DNA using single molecule force spectroscopy performed with optical tweezers. These assays allowed a robust characterization of the physical chemistry of the interaction. In particular, we were able to conclude that these proteins bind strongly to ds DNA, presenting an equilibrium binding association constant on the order of $\sim 10^8 \text{ M}^{-1}$. In addition, they present a positively cooperative behavior in the form of bound aggregates and tend to neutralize about 100% of the negative charge present in the phosphate backbone of the double-helix, resulting in neutral DNA-protein complexes. Finally, the average size of these proteins was also estimated from the experiments (1 – 3 nm), being compatible to their measured molecular weight (40 kDa). This type of characterization is important to elucidate the molecular aspects of the mechanism of action of this type of protein, which can bring clues to their role as antipathogen agents and thus contribute to improve the knowledge in the use of such biological macromolecules for this purpose.

Acknowledgments

The authors thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) for their support in this study.

Conflicts of Interest

The authors declare that they have no competing financial interests or personal relationships that may have influenced the work reported in this article.

6. References

- [1] P.H. Alves, J.V. Araújo, M.P. Guimarães, R.C.L. Assis, P. Sarti, A.K. Campos, Aplicação de formulação do fungo predador de nematóides *Monacrosporium thaumasium* (Drechsler, 1937) no controle de nematóides de bovinos, Arq. Bras. Med. Veterinária e Zootec. 55 (2003) 568–573. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352003000500009>.
- [2] J.V. Araújo, F.R. Braga, P. Mendoza-de-Gives, A. Paz-Silva, V.L.R. Vilela, Recent Advances in the Control of Helminths of Domestic Animals by Helminthophagous Fungi, Parasitologia. 1 (2021) 168–176. <https://doi.org/10.3390/parasitologia1030018>.
- [3] J.G.M. Minguetto, A.L.G. Bogado, W. Okano, L.F.C. da C. Filho, L.C. da Silva, D. Zanol, C.M. Ferraz, T.F. Moreira, F.L. Tobias, F.R. Braga, J.V. de Araújo, Biological control of gastrointestinal nematodes in young ewes treated with fungi, Biocontrol Sci. Technol. 31 (2021) 499–511. <https://doi.org/10.1080/09583157.2020.1869699>.
- [4] M.D.A. Mota, A.K. Campos, J.V. De Araújo, Controle biológico de helmintos parasitos de animais: Estágio atual e perspectivas futuras, Pesqui. Vet. Bras. 23 (2003) 93–100.
- [5] Í.S. Vieira, I. de C. Oliveira, S.G. Freitas, A.K. Campos, J.V. de Araújo, Arthrobotrys cladodes and *Pochonia chlamydosporia* in the biological control of nematodiosis in extensive bovine production system, Parasitology. 147 (2020) 699–705. <https://doi.org/DOI: 10.1017/S0031182020000098>.
- [6] F.R. Braga, J.V. De Araújo, Nematophagous fungi for biological control of gastrointestinal nematodes in domestic animals, Appl. Microbiol. Biotechnol. (2014). <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5366-z>.
- [7] J.V. de Araújo, M.P. Guimarães, A.K. Campos, N.C. de Sá, P. Sarti, R.C.L. Assis, Control of bovine gastrointestinal nematode parasites using pellets of the nematode-trapping fungus *Monacrosporium thaumasium*, Ciência Rural. 34 (2004) 457–463. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782004000200019>.
- [8] J.V. de Araújo, M. de L. de A. Rodrigues, W.W. Silva, L. da S. Vieira, Controle biológico de nematóides gastrintestinais de caprinos em clima semi-árido pelo fungo *Monacrosporium thaumasium*, Pesqui. Agropecuária Bras. 42 (2007) 1177–1181. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2007000800015>.
- [9] R.O. Carvalho, J. V Araújo, F.R. Braga, S.R. Ferreira, J.M. Araujo, A.R. Silva, L.N.

- Frassy, C.D.F. Alves, Biological control of Ancylostomosis in dogs using the nematode-trapping fungus *Monacrosporium thaumasium* in southeastern Brazil, *Vet. Parasitol.* 165 (2009) 179–183. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.06.024>.
- [10] F.D. Luns, R.C.L. Assis, L.P.C. Silva, C.M. Ferraz, F.R. Braga, J.V. de Araújo, Coadministration of nematophagous fungi for biological control over nematodes in bovine in the south-eastern Brazil, *Biomed Res. Int.* 2018 (2018) 2934674. <https://doi.org/10.1155/2018/2934674>.
- [11] A.R. Silva, J. V Araújo, F.R. Braga, L.N. Frassy, A.O. Tavela, R.O. Carvalho, F. V Castejon, Biological control of sheep gastrointestinal nematodiasis in a tropical region of the southeast of Brazil with the nematode predatory fungi *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium thaumasium*, *Parasitol. Res.* 105 (2009) 1707. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1613-8>.
- [12] A.O. Tavela, J. V Araújo, F.R. Braga, J.M. Araujo, L.Q. Magalhães, W.F. Silveira, L.A. Borges, In vitro association of nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans* (AC001), *Monacrosporium thaumasium* (NF34) and *Pochonia chlamydosporia* (VC1) to control horse cyathostomin (Nematoda: Strongylidae), *Biocontrol Sci. Technol.* 22 (2012) 607–610. <https://doi.org/10.1080/09583157.2012.672952>.
- [13] A. de O. Tavela, J.V. Araújo, F.R. Braga, A.R. Silva, R.O. Carvalho, J.M. Araujo, S.R. Ferreira, G.R. Carvalho, Biological control of cyathostomin (Nematoda: Cyathostominae) with nematophagous fungus *Monacrosporium thaumasium* in tropical southeastern Brazil, *Vet. Parasitol.* 175 (2011) 92–96. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.09.035>.
- [14] V.L.R. Vilela, T.F. Feitosa, F.R. Braga, J.V. de Araújo, S.C. de Lucena, E.S. Dantas, A.C.R. Athayde, W.W. Silva, Efficacy of *Monacrosporium thaumasium* in the control of goat gastrointestinal helminthiasis in a semi-arid region of Brazil, *Parasitol. Res.* 112 (2013) 871–877. <https://doi.org/10.1007/s00436-012-3078-4>.
- [15] F.R. Braga, F.E.F. Soares, T.Z. Giuberti, A. Del Carmen Garcias Lopes, T. Lacerda, T. de H. Ayupe, P.V. Queiroz, A. de S. Gouveia, L. Pinheiro, A.L. Araújo, J.H. Queiroz, J.V. Araújo, Nematocidal activity of extracellular enzymes produced by the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* on cyathostomin infective larvae, *Vet. Parasitol.* 212 (2015) 214–218. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.08.018>.
- [16] F.E.F. Soares, F.R. Braga, J. V Araújo, W. dos Santos Lima, L.R. Mozer, J.H. Queiróz,

- In vitro activity of a serine protease from *Monacrosporium thaumasium* fungus against first-stage larvae of *Angiostrongylus vasorum*, *Parasitol. Res.* 110 (2012) 2423–2427. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2781-x>.
- [17] M.E. da Silva, J.V. de Araújo, F.R. Braga, F.E. de Freitas Soares, D.S. Rodrigues, Control of infective larvae of gastrointestinal nematodes in heifers using different isolates of nematophagous fungi, *Rev. Bras. Parasitol. Veterinária.* 22 (2013) 78–83. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612013005000012>.
- [18] C. Betzel, G.P. Pal, W. Saenger, Three-dimensional structure of proteinase K at 0.15-nm resolution, *Eur. J. Biochem.* 178 (1988) 155–171. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1988.tb14440.x>.
- [19] C. Betzel, S. Gourinath, P. Kumar, P. Kaur, M. Perbandt, S. Eschenburg, T.P. Singh, Structure of a serine protease proteinase K from *Tritirachium album* limber at 0.98 Å resolution, *Biochemistry.* 40 (2001) 3080–3088. <https://doi.org/10.1021/bi002538n>.
- [20] A. Ashkin, Acceleration and trapping of particles by radiation pressure, *Phys. Rev. Lett.* 24 (1970) 156–159. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.24.156>.
- [21] A. Ashkin, Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime, *Biophys. J.* 61 (1992) 569–582. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(92\)81860-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0006-3495(92)81860-X).
- [22] M. Rocha, Optical tweezers for undergraduates: theoretical analysis and experiments, *Am. J. Phys. - AMER J PHYS.* 77 (2009) 704–712. <https://doi.org/10.1119/1.3138698>.
- [23] R.F. Bazoni, T.A. Moura, M.S. Rocha, Hydroxychloroquine exhibits a strong complex interaction with DNA: unraveling the mechanism of action, *J. Phys. Chem. Lett.* 11 (2020) 9528–9534. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcclett.0c02590>.
- [24] P.S. Alves, O.N. Mesquita, M.S. Rocha, Model for DNA interactions with proteins and other large ligands: extracting physical chemistry from pure mechanical measurements, *J. Phys. Chem. B.* 124 (2020) 1020–1024. <https://doi.org/10.1021/acs.jpccb.0c00155>.
- [25] P.J. Hotez, M.E. Bottazzi, C. Franco-Paredes, S.K. Ault, M.R. Periago, The neglected tropical diseases of Latin America and the Caribbean: A review of disease burden and distribution and a roadmap for control and elimination, *PLoS Negl. Trop. Dis.* (2008). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000300>.
- [26] T. Avsievich, R. Zhu, A. Popov, A. Bykov, I. Meglinski, The advancement of blood cell research by optical tweezers, *Rev. Phys.* 5 (2020) 100043. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.revip.2020.100043>.

- [27] H. Zhang, K.-K. Liu, Optical tweezers for single cells, *J. R. Soc. Interface.* 5 (2008) 671–690. <https://doi.org/10.1098/rsif.2008.0052>.
- [28] H. Gradišar, J. Friedrich, I. Križaj, R. Jerala, Similarities and specificities of fungal keratinolytic proteases: comparison of keratinases of *Paecilomyces marquandii* and *Doratomyces microsporus* to some known proteases, *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (2005) 3420–3426. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.7.3420-3426.2005>.
- [29] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- [30] H. Schägger, G. von Jagow, Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa, *Anal. Biochem.* 166 (1987) 368–379. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90587-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90587-2).
- [31] H. Blum, H. Beier, H.J. Gross, Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels, *Electrophoresis.* 8 (1987) 93–99. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/elps.1150080203>.
- [32] E.F. Silva, R.F. Bazoni, E.B. Ramos, M.S. Rocha, DNA-doxorubicin interaction: New insights and peculiarities, *Biopolymers.* 107 (2017) e22998. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/bip.22998>.
- [33] I.D. Vladescu, M.J. McCauley, M.E. Nuñez, I. Rouzina, M.C. Williams, Quantifying force-dependent and zero-force DNA intercalation by single-molecule stretching, *Nat. Methods.* 4 (2007) 517–522. <https://doi.org/10.1038/nmeth1044>.
- [34] M.S. Rocha, Extracting physical chemistry from mechanics: a new approach to investigate DNA interactions with drugs and proteins in single molecule experiments, *Integr. Biol.* 7 (2015) 967–986. <https://doi.org/10.1039/C5IB00127G>.
- [35] F.A.P. Crisafuli, E.B. Ramos, M.S. Rocha, Characterizing the interaction between DNA and GelRed fluorescent stain, *Eur. Biophys. J.* 44 (2015) 1–7. <https://doi.org/10.1007/s00249-014-0995-4>.
- [36] K.S. Vishwanatha, A.G. Appu Rao, S.A. Singh, Characterisation of acid protease expressed from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341, *Food Chem.* 114 (2009) 402–407. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.070>.
- [37] F. Soares, J. Queiroz, V. Jackson, V. Paula, A. Gouveia, M. Gracilene, M. Susy, F. Braga, Statistical screening for the chitinase production by nematophagous fungi from

- Monacrosporium* genu, African J. Microbiol. Res. 9 (2015) 448–454. <https://doi.org/10.5897/AJMR2014.7225>.
- [38] F.R. Braga, J.M. Araujo, A.R. Silva, J.V. de Araújo, R.O. Carvalho, F.E. de Freitas Soares, J.H. de Queiroz, H.L.A. Gênier, Ação ovicida do extrato bruto enzimático do fungo *Pochonia chlamydosporia* sobre ovos de *Ancylostoma* sp, Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 44 (2011) 116–118. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822011000100027>.
- [39] J. Palma-Guerrero, S. Gómez-Vidal, V.E. Tikhonov, J. Salinas, H.B. Jansson, L.V. Lopez-Llorca, Comparative analysis of extracellular proteins from *Pochonia chlamydosporia* grown with chitosan or chitin as main carbon and nitrogen sources, Enzyme Microb. Technol. (2010). <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2010.02.009>.
- [40] F.R. Braga, J. V Araújo, F.E.F. Soares, H.L.A. Geniêr, J.H. Queiroz, An extracellular serine protease of an isolate of *Duddingtonia flagrans* nematophagous fungus, Biocontrol Sci. Technol. 22 (2012) 1131–1142. <https://doi.org/10.1080/09583157.2012.713912>.
- [41] F.E. de F. Soares, J.H. de Queiroz, J.V. de Araújo, P.V. Queiroz, A. de S. Gouveia, E. Hiura, F.R. Braga, Nematicidal action of chitinases produced by the fungus *Monacrosporium thaumasium* under laboratorial conditions, Biocontrol Sci. Technol. 25 (2015) 337–344. <https://doi.org/10.1080/09583157.2014.979133>.

Capítulo 2

Biossíntese de nanopartículas de prata pelo fungo nematófago *Monacrosporium thaumasium* e sua ação sobre massas ovíferas de molusco *Biomphalaria glabrata*

RESUMO

Fungos nematófagos possuem propriedades no controle biológicos de parasitos. O uso de seus produtos provenientes de seu metabolismo pode ser explorados através da produção de nanopartículas, que são utilizados em diversos setores industriais. Sendo assim, o principal objetivo deste trabalho foi verificar e obter a biossíntese de nanopartículas de prata através do fungo *Monacrosporium thaumasium* (cepa NF34) e aplicar em massas ovígeras de caramujos *Biomphalaria glabrata*. As análises experimentais foram realizadas em tubos de ensaios feitos em triplicata durante 10 dias sob fotoperíodo ambiente, com grupos expostos as nanopartículas com água deionada e grupo controle, apenas com água deionada. Os resultados obtidos desta análise pode-se inferir que 100% das massas do grupo exposto às nanopartículas, corresponderam a letalidade e inviabilidade dos embriões. Portanto, o trabalho possui resultados satisfatórios quanto a produção de nanopartículas, do qual foi promovido pelo fungo em questão e a letalidade no embrião dos caramujos. Este estudo mostrou que o fungo utilizado pode ser promissor no controle da densidade populacional do caramujo vetor da esquistossomose.

Palavras-chave: Controle biológico. Nanomateriais. Hospedeiros intermediários.

ABSTRACT

Nematophagous fungi have properties in the biological control of parasites. The use of its products from its metabolism can be explored through the production of nanoparticles, which are used in various industrial sectors. Therefore, the main objective of this work was to verify and obtain the biosynthesis of silver nanoparticles through the fungus *Monacrosporium thaumasium* (NF34 strain) and apply it to ovigerous masses of *Biomphalaria glabrata* snails. The experimental analyzes were performed in test tubes made in triplicate for 10 days under ambient photoperiod, containing groups exposed to nanoparticles with dechlorinated water and control group, only with dechlorinated water. The results obtained from this analysis can be lower than 100% of the masses of the group exposed to nanoparticles, corresponding to the lethality and inviability of the embryos. Therefore, the work has satisfactory results regarding the production of nanoparticles, which was promoted by the fungus in question and the lethality in the embryonation of the snails. This study showed that the fungus used may be promising in controlling the population density of the schistosomiasis vector snail.

Keywords: Biological control. Nanomaterials. Intermediate hosts.

1. INTRODUÇÃO

O controle biológico utilizando fungos tem sido vastamente pesquisado e utilizado contra vários agentes etiológicos (BRAGA et al., 2008; BRAGA; ARAÚJO, 2014b; MINGUETTO et al., 2021) e hospedeiros intermediários (CASTRO et al., 2019, 2022). Além da utilização de estruturas de propagação destes, há ainda o emprego de compostos extracelulares provenientes desses organismos.

Os fungos expressam diversas proteases em determinados meios ou quando em contato com outros organismos que os auxiliam na sua nutrição e toxicidade (BRAGA et al., 2012a; SOARES et al., 2015c). Ademais, estes organismos estão naturalmente presentes no solo e têm se destacado pelo seu potencial biológico contra as helmintoses (ARAÚJO et al., 2021). Contudo, existem mecanismos em que o fungo consegue produzir nanopartículas (NPs) viabilizando a estabilidade de compostos que podem auxiliar no combate a parasitos.

Existem diversos microrganismos que estão envolvidos na produção biogênica de nanopartículas, que incluem desde bactérias, fungos e leveduras capazes de participar na síntese desses compostos a partir de seu próprio metabolismo, ou seja, secreção de enzimas extracelulares (MOHANPURIA; RANA; YADAV, 2008). Apesar disto, casos em que a síntese ocorre apenas em elementos químicos e geralmente inorgânicos, são necessários três componentes principais, dentro os quais estão 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 para controlar e prevenir sua agregação (SI et al., 2011). Entretanto, a síntese também pode ser oriunda de microrganismos, onde, o agente redutor e o estabilizador são substituídos por moléculas produzidas pelo próprio organismo (LEDWITH; WHELAN; KELLY, 2007).

Diante disto, existem fungos predadores de destaque, como *Duddingtonia flagrans* (COSTA SILVA et al., 2017) que foi possível estabelecer esta biossíntese de nanopartículas de prata (AgNPs). Dentre outros, o *Monacrosporium thaumasium*, fungo nematófago, ainda não foi elucidado o seu mecanismo de biossíntese de AgNPs em teste de toxicidade embriotóxica (BET).

No presente estudo, foi realizada a biossíntese de AgNPs mediada pelo fungo *Monacrosporium thaumasium* (cepa NF34) após sua caracterização as AgNPs foram testadas sobre massas ovíferas de *Biomphalaria glabrata* visando sua ação em caramujos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho consistiu em promover a biossíntese de nanopartículas de prata (AgNPs) por intermédio do fungo *Monacrosporium thaumasium* proveniente do laboratório de parasitologia do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa (DTV/UFV) no Laboratório de Doenças Parasitárias.

Em seguida algumas caracterizações do produto a fim de se determinar suas propriedades químicas e biológicas. Os principais materiais e organismos utilizados no método envolvendo a biossíntese das nanopartículas de prata estão listados na tabela 1.

Tabela 1 – Informação sobre os materiais, quantificações, microrganismos e procedência, utilizados na execução da biossíntese de nanopartículas de prata (AgNPs).

	Concentração utilizada	Quantidade utilizada	Procedência
Microrganismo			
<i>Monacrosporium thaumasium</i> (cepa NF34)	--	10 g	Departamento de Medicina Veterinária – UFV (Laboratório de Parasitologia)
Meio de cultivo			
Batata Dextrose Ágar (BDA)	2,3% m/v	2,3 g	Sigma-Aldrich
Extrato de levedura	0,5% m/v	0,5 g	MicroMed
Extrato de malte	2% m/v	2 g	Biobrás diagnósticos
Reagente analítico para formação das AgNPs			
Nitrato de prata (AgNO ₃)	1 mM	0,017 g	Vetec

2.1 Meios de cultura para o fungo

O protocolo empregado, foi a síntese de nanopartículas de prata pelo método biológico, utilizando-se fungo. Para o crescimento do fungo, foram utilizados meio sólido de cultura de

Batata Dextrose Ágar, extrato de malte e extrato de levedura e incubados em demanda bioquímica de oxigênio (BOD) durante cinco dias a 28°C.

2.2 Síntese das nanopartículas (AgNPs) mediada pelo fungo *Monacrosporium thaumasium*

A síntese das AgNPs foi realizada no Laboratório de Metabolismo e Fermentação (LMF). Os protocolos foram seguidos de acordo a Almeida (2017).

Após o período de crescimento de 5 dias da cepa fúngica, $10 \pm 0,5$ g da biomassa do isolado NF34 foi transferida para um frasco Erlenmeyer contendo 100 mL de água destilada por meio de raspagem do micélio formado pela cepa fúngica sobre o meio sólido BDA. Em seguida, mantido durante 72 h a 28 °C em suspensão aquosa em incubadora horizontal a 120 rpm no escuro.

Após o período de 72 h, a biomassa foi separada do meio por filtração utilizando filtro de papel quantitativo de porosidade 25 μm (12,5 cm). Após a filtração, ao filtrado fúngico adicionou-se 1 mM (10^{-3} M ou 0,017g/100 mL) de AgNO_3 (nitrato de prata). Posteriormente, a suspensão contendo o filtrado fúngico com o nitrato de prata foi mantido durante cinco dias sob incubadora no escuro a 28° C sob os mesmos procedimentos anteriores.

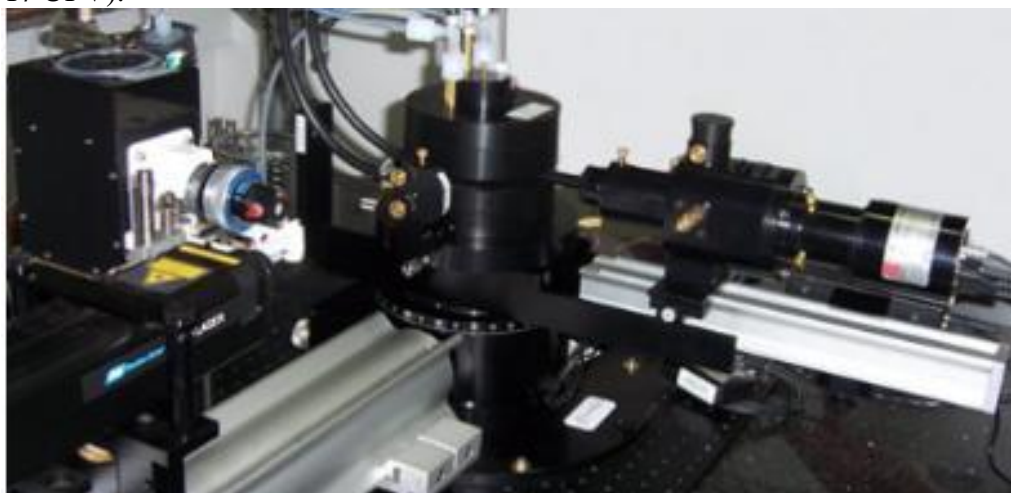
A avaliação da eficiência da biossíntese foi observada posteriormente através da alteração do tom de cor do meio reacional. O aparecimento de uma coloração castanha escura do filtrado de células fúngicas indica a formação das AgNPs.

Ao final dos processos da biossíntese, a suspensão foi armazenada em temperatura a 4° C no escuro para as caracterizações do meio reacional.

2.3 Espalhamento de luz dinâmico

A medição do tamanho das nanopartículas de prata foi determinada por espalhamento de luz dinâmico (Fig. 7).

Fig. 7 - Equipamento de espalhamento de luz Brookhaven Co., localizado no Laboratório de Microfluídica e Fluidos Complexos do Departamento de Física da Universidade Federal de Viçosa (DPF/ UFV).



Fonte: Página do Laboratório de Microfluídica e Fluidos Complexos acessado por <http://www.lmffc.ufv.br/>.

Para a execução experimental da medição do tamanho das AgNPs via DLS, cerca de 2 mL das amostras coloidais contendo as nanopartículas de prata foram transferidas para um tubo de ensaio. Em seguida, o componente contendo a fonte de luz a laser foi imerso na amostra. A análise da frequência da luz incidida sobre as partículas foi executada pelo software do equipamento gerando um histograma contendo os percentuais dos diferentes tamanhos das nanopartículas.

2.4 Caracterização via espectroscopia na região ultravioleta visível (UV-Vis)

As alíquotas contendo as nanopartículas foram periodicamente removidas e submetidas à análise em espectroscopia UV-Vis, em um espectrofotômetro (Shimadzu UV-Vis-1501), as medições de emissão de fluorescência foram realizadas usando um Coherent Cube Laser de 378nm como fonte de excitação e espectrômetro Ocean Optics USB4000 para coletar o sinal de todas as amostras e referências. Cerca de 2 mL das amostras contendo as nanopartículas de prata coloidais foram analisadas em cubetas de quartzo. Todas as análises em UV-Vis foram realizadas no Laboratório de Preparação de Amostras (Produção de Nanoestruturas Semicondutoras e Nanocompósitos) - UFV.

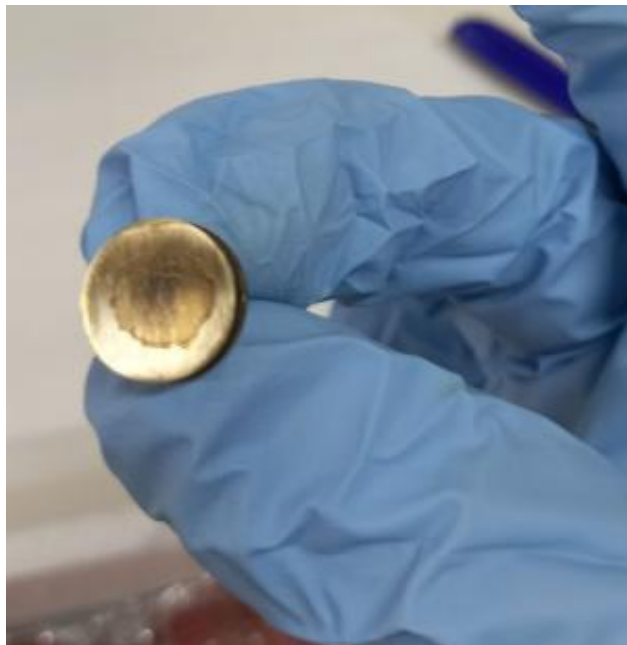
2.5 Caracterização via Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As análises em microscopia eletrônica de varredura das nanopartículas de prata foram realizadas com a finalidade de avaliar a forma, o tamanho e os aspectos de disposição espacial

e de superfície das nanopartículas. Os ensaios com ambos os equipamentos foram realizados no Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura (DPF/ UFV).

A preparação das amostras de nanopartículas de prata para visualização no MEV foi conduzida a partir do gotejamento destas sobre pequenos suportes de alumínio previamente limpos e esterilizados denominados “*stubs*”. Após o gotejamento, os *stubs* foram levados à um dessecador com sílica gel onde permaneceram por um período de 48 h para promover a secagem da amostra gotejada (Fig.8). As análises em MEV foram realizadas em um equipamento (JEOL, modelo JSM-6010LA).

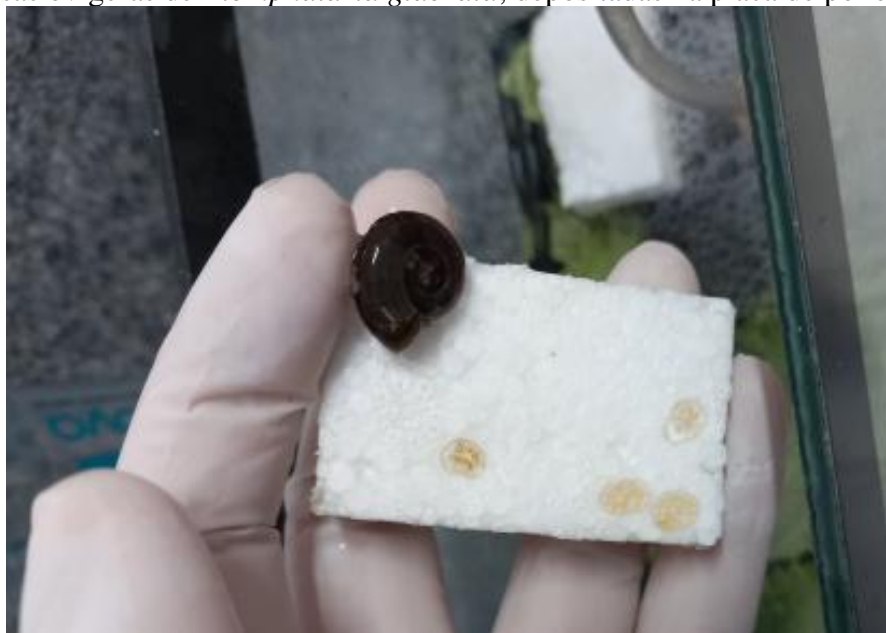
Fig. 8 - *Stubs* onde foi depositada uma gota da suspensão contendo as nanopartículas de prata (AgNPs).



2.6 Obtenção das massas ovígeras de *Biomphalaria glabrata*

Os caramujos foram obtidos do Laboratório de Helminologia Veterinária, localizados no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Gerações já mantidas em condições laboratoriais foram acondicionados em aquários de vidros em água declorada e aeração artificial, temperatura e fotoperíodo ambiente. Tais organismos foram alimentados com folhas de alface (*Lactuca sativa*) *ad libitum*. Para a obtenção das massas ovígeras (Fig. 9), foram utilizadas placas de poliestireno ($\pm 4 \text{ cm}^2$) colocadas no interior dos aquários para servirem como substratos para oviposição.

Fig. 9 - Massas ovígeras de *Biomphalaria glabrata*, depositadas na placa de poliestireno.



2.7 Teste embriotóxico de *Biomphalaria* (BET)

As massas ovígeras foram coletadas suavemente com auxílio de alça de sementeira estéril e transferidas para uma placa de vidro com água decolorada (nova água, porém na mesma condição da água do aquário, onde há os caramujos adultos). Em seguida, foram inseridos em três tubos de ensaios para o grupo controle - respectivamente água decolorada e as massas ovígeras; e o grupo de tratamento - respectivamente água decolorada, massas ovígeras e AgNPs nas proporções (Tab. 2):

Tabela 2 – Proporções das concentrações de alíquotas de água (H₂O) e nanopartículas (AgNPs) dos grupos de tratamentos utilizando respectivamente, água decolorada, massa ovígera e AgNPs biossintetizados pelo isolado de *Monacrosporium thaumasium* NF34.

H ₂ O	AgNPs
500 µL	1000 µL
2000 µL	500 µL
1000 µL	1000 µL

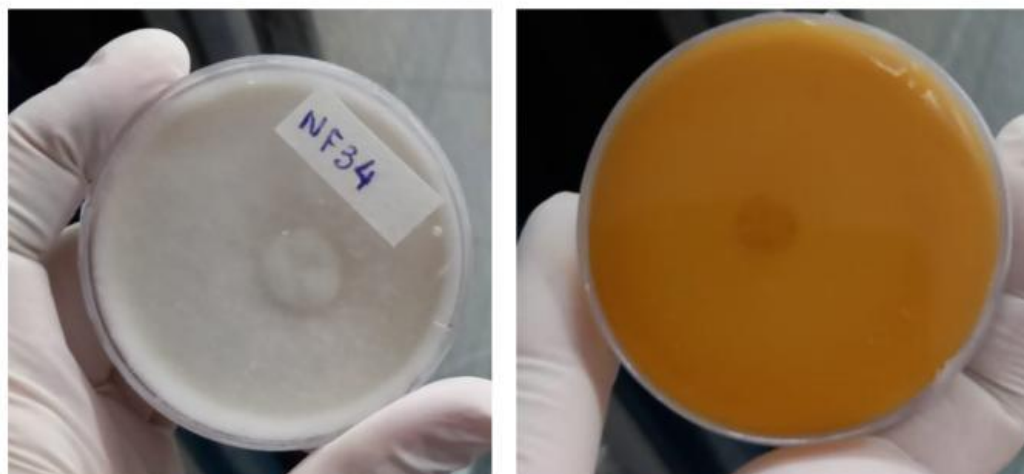
3. Análises estatísticas

O experimento foi esquematizado em delineamento inteiramente casualizado (DIC), constando de três grupos controles (C1, C2 e C3 – água dechlorada + massas ovíferas) e três grupos de tratamentos (água dechlorada + massas ovíferas + AgNPs) em triplicatas, mantidos nas condições de ambiente, luz e temperatura. Os resultados obtidos foram expressos como média \pm desvio-padrão e submetidos aos testes de one-way ANOVA com um fator: eclodibilidade x tratamentos, e para a comparação das médias no Minitab Statistical Software[®].

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O fungo *Monacrosporium thaumasium* crescido em BDA + Extrato de Malte e Extrato de Levedura, após cinco dias de incubação, foi possível evidenciar o crescimento do micélio (Fig. 10) para prosseguir para as etapas de biossíntese das nanopartículas de prata (AgNPs).

Fig. 10 – Placa de cultivo contendo o fungo *Monacrosporium thaumasium* cultivado em meio de cultura BDA + Extrato de Malte e Extrato de Levedura a 28 °C após cinco de incubação e no escuro.

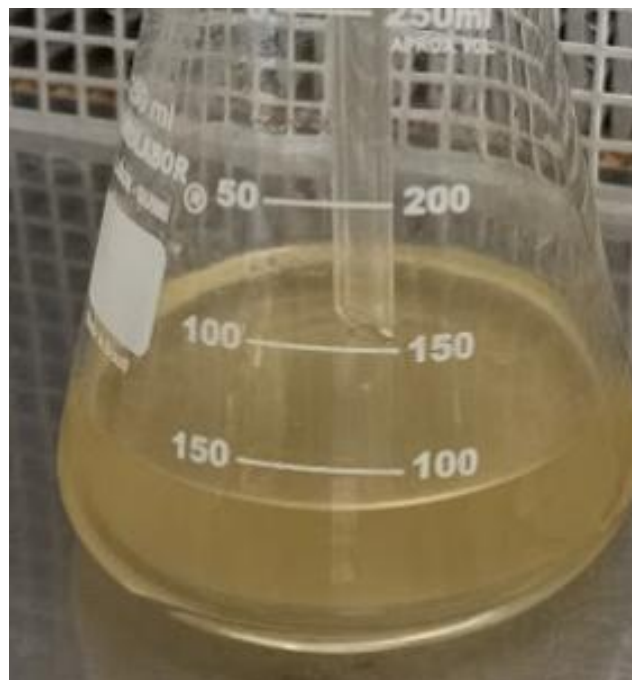


Posteriormente os micélios obtidos do cultivo em BDA, foram pesados e raspados levemente com lâminas de bisturi (aço inox) em ambiente estéril e inoculados em frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de água ultrapura que foram submetidos novamente nas mesmas condições de temperatura e incubação durante 72h para um novo crescimento em meio líquido (Fig.11 e 12).

Fig. 11 – Frasco de vidro de 250 mL contendo 10g do micélio fúngico de *Monacroporium thaumasium* em 100 mL de água destilada ultrapura.



Fig. 12 –Erlenmeyer de 250 mL contendo filtrado fúngico de *Monacrosporium thaumasium* após 72 h de incubação a 28 °C e no escuro.

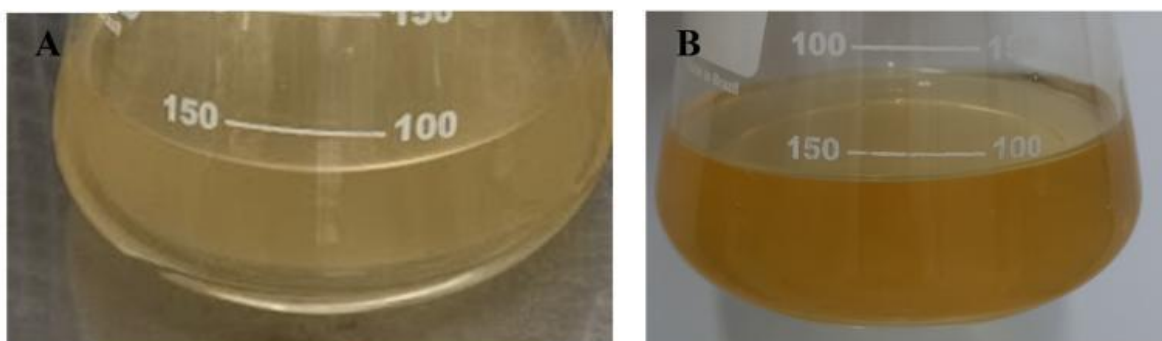


4.1 Caracterização de amostra das AgNPs

Após o processo de biossíntese das AgNPs, as nanopartículas foram submetidas à determinação parcial das características dessa suspensão, para posteriormente serem utilizadas como agente no BET. A biossíntese das AgNPs foi promovida por meio da adição do sal de prata (AgNO_3) no filtrado fúngico, permitindo assim que as proteínas e demais biomoléculas biossintetizadas pelo *Monacrosporium thaumasium* atuem no mecanismo de biorredução dos íons de prata bem como no processo de estabilização das nanopartículas.

Com relação à eficiência da biossíntese mediada pelo fungo, foi evidente a alteração na cor do meio de reação (Fig. 13) quando comparado com o filtrado fúngico (Fig. - 13A).

Fig. 13 - Alteração reacional das suspensões obtidas através do fungo *Monacrosporium thaumaisum*. A) Filtrado fúngico de NF34 com água destilada. B) Filtrado fúngico com nitrato de prata (AgNO_3).

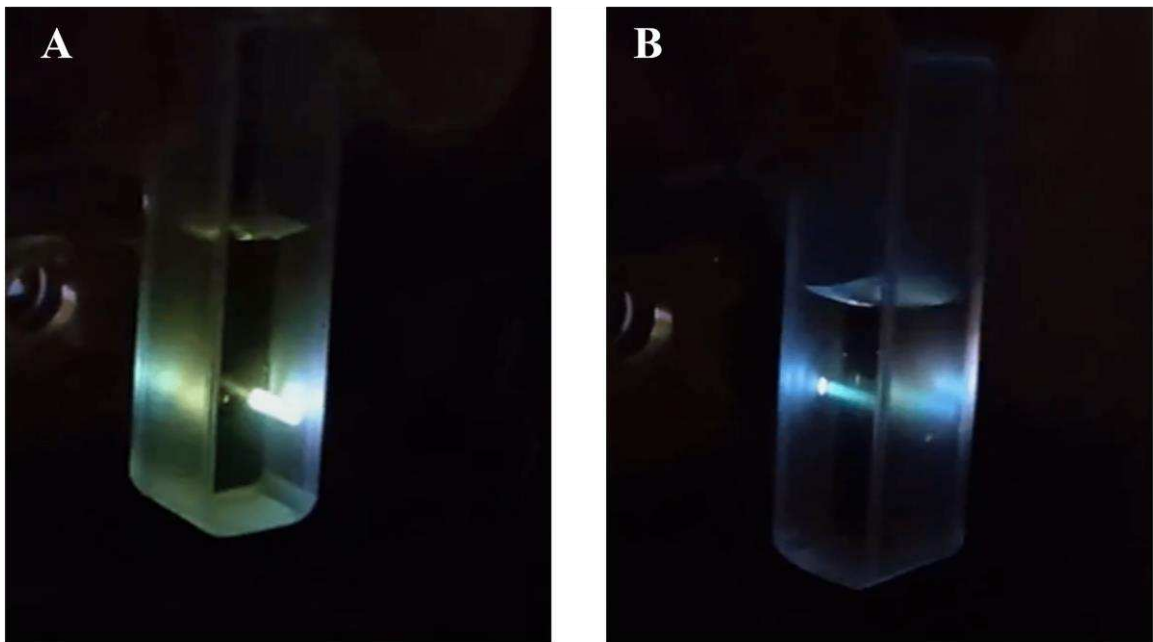


A evidência da formação das AgNPs, como demonstrado após a adição do nitrato de prata (1 mM) no frasco contendo o filtrado fúngico, é demonstrada pela mudança de cor do meio que passou para uma tonalidade marrom-amarelado após 5 dias da adição do sal de prata. O aparecimento desta coloração sugere a formação das nanopartículas de prata em suspensão (DURÁN et al., 2005; AHMAD et al., 2003). Estudos envolvendo outros fungos, realizados por Basavaraja et al., 2008 verificaram que a mudança de cor ocorre devido a redução dos íons Ag^+ para Ag^0 de acordo com a liberação de enzimas extracelulares. De modo que, o fungo segrega uma enzima extracelular que provavelmente vai promover a redução dos íons de prata, acarretando na formação das nanopartículas de prata metálica (GADE et al., 2010).

4.2 Espectroscopia UV-Visível

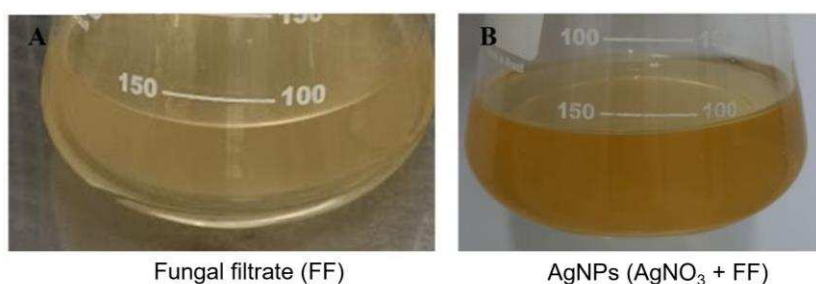
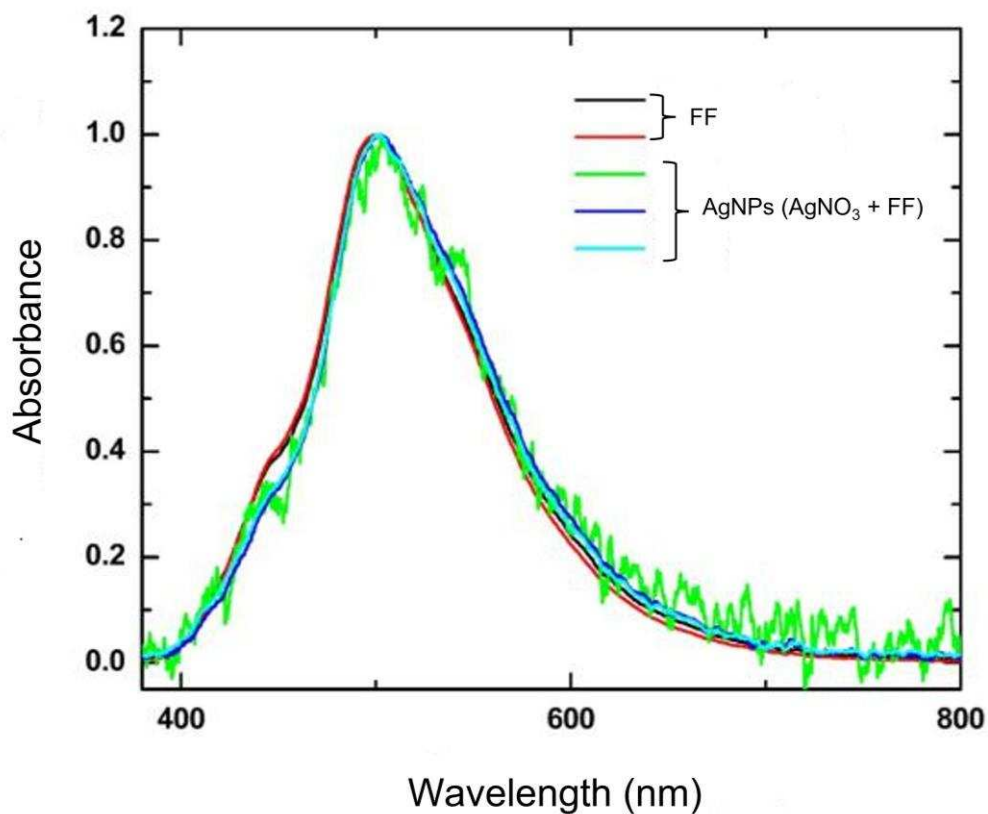
Os espectros em UV-Vis foram registados a partir das amostras contidas nas cubetas (Fig. 14) com o filtrado fúngico com e sem após adição de AgNO_3 (1 mM) e depois foi submetido a medições ópticas por espectrofotômetro UV-Vis.

Fig. 14 - Fluorescência das amostras do meio reacional. A) Suspensão de nanopartículas de prata pelo fungo *Monacrosporium thaumasium* (cepa NF34). B) Filtrado fúngico de *M. thaumasium* sem adição do AgNO_3 .



A análise mostrou que o pico de ressonância de superfície encontra-se fortemente acentuada em torno de 500 nm (Fig. 15). Esse resultado se aproxima da biossíntese por *Duddingtonia flagrans* (COSTA SILVA et al., 2017), fungo também com atividade nematófaga que promoveu a biossíntese de nanopartículas.

Fig. 15 - Espectros em UV-Visível registrados de biossíntese de nanopartículas de prata mediados por *Monacrosporium thaumasium*.

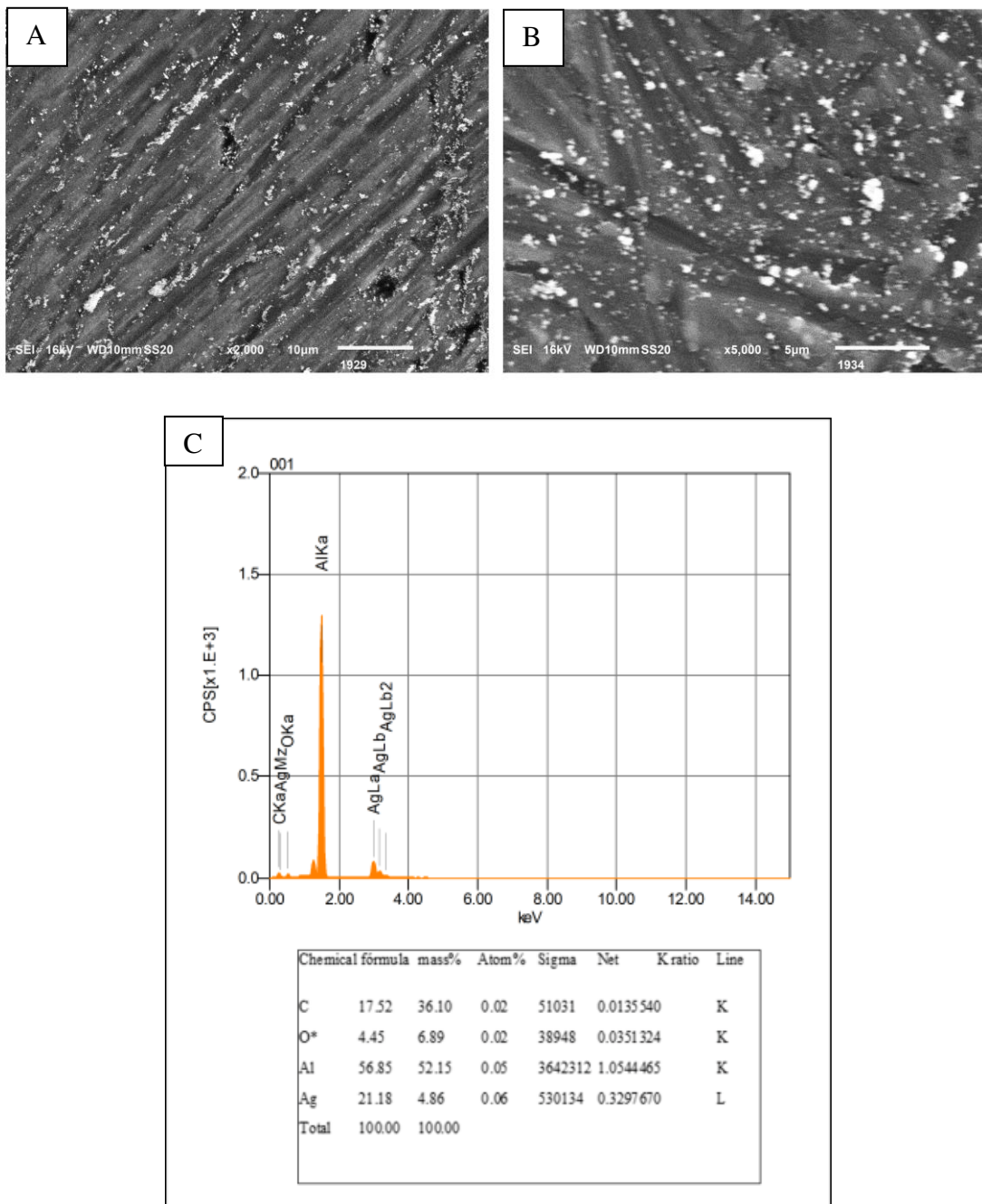


Olhando os espectros da figura 15 vê-se que os espectros são praticamente iguais e se sobrepõem. A intensidade do pico no UV-Vis foi diretamente proporcional ao rendimento da biossíntese das NPs. Assim, embora ainda não seja totalmente esclarecida, a teoria mais aceita atualmente para o mecanismo exato da biossíntese de AgNPs implica que os íons de prata gerados pela adição de AgNO_3 ao filtrado fúngico requerem a enzima nitrato redutase dependente de NADPH para a sua redução (Ag^+ a Ag^0) (MATTHIAS et al., 2000). Diante disto, o complexo enzimático responsável pelo processo de biorredução de íons de prata foi sintetizado e liberado pelo fungo *Monacrosporium thaumasium*.

4.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As análises em MEV foram utilizadas para determinar o formato e o tamanho das nanopartículas de prata. As imagens em MEV estão apresentadas na Figura 16.

Fig. 16 - Micrografia em MEV das nanopartículas de prata biossintetizadas por intermédio do fungo *Monacrosporium thaumasium*: A) aumento em 2000x; B) aumento em 5000x; C) Histograma de componentes inorgânicos e orgânicos da amostra AgNPs.



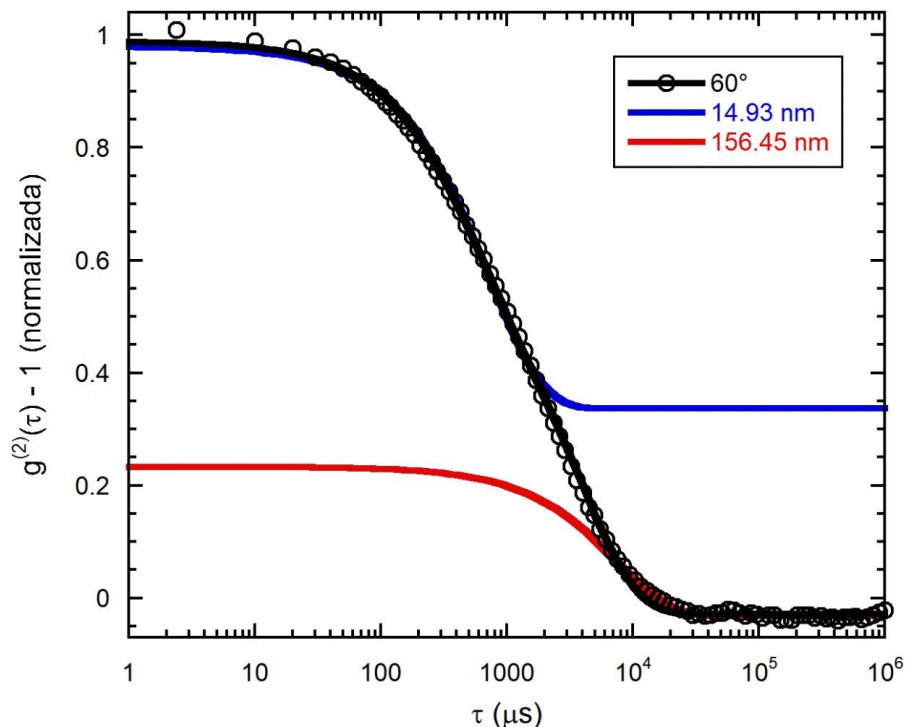
A partir dos resultados obtidos pelo MEV, pode-se observar a presença das AgNPs com morfologia variável. Contudo, pode-se concluir que as NPs possuem formato e tamanho variável, descrito por Bhainsa e D'Souza (2006), onde foi possível observar essas NP em formas agrupadas ou dispersas.

4.5 Espalhamento dinâmico de luz

A técnica de espalhamento dinâmico de luz (*Dynamic Light Scattering, DLS*) é uma técnica que estuda a correlação da intensidade de luz espalhada pela amostra após a mesma ser atingida por uma onda eletromagnética. O raio hidrodinâmico, considerando que as partículas são esféricas.

O equipamento fornece a função de autocorrelação, $g^{(2)}(\tau)$. Foram realizadas medidas para os ângulos de detecção 30°, 40°, 60° e 90° as quais estão mostradas na Fig. 17.

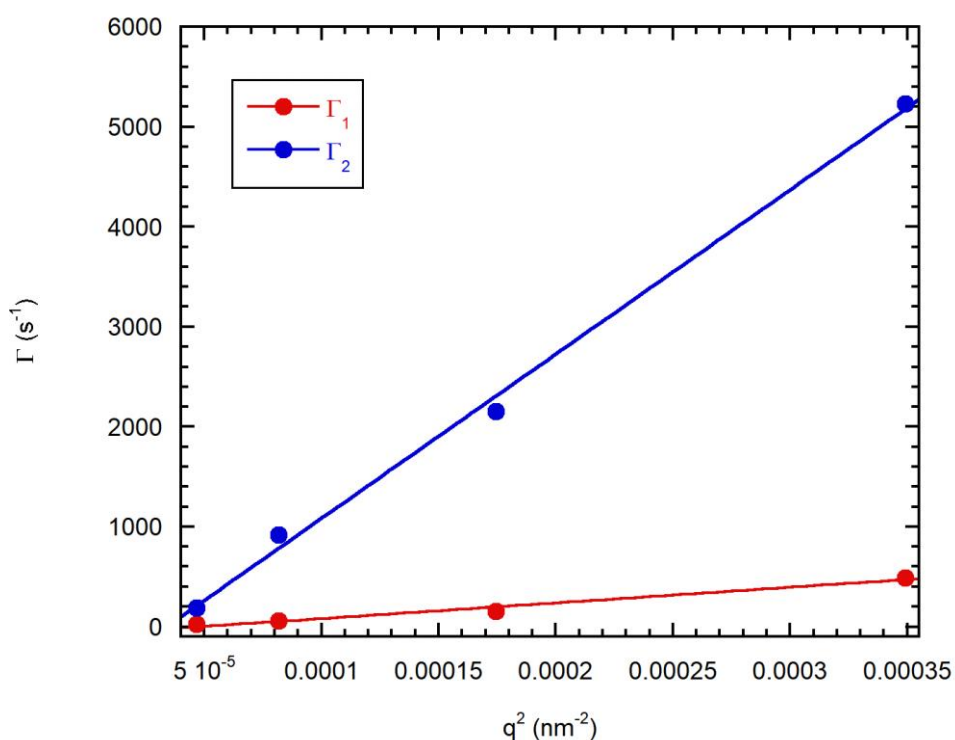
Fig. 17 - Função de autocorrelação da amostra para os ângulos de espalhamento 30°, 40°, 60° e 90° do meio reacional obtido através da biossíntese de nanopartículas de prata (AgNPs) pelo fungo *Monacrosporium thaumasium*.



Com o ajuste das funções observadas na Figura 17, notou-se duas populações de estruturas com diferentes tamanhos em suspensão.

Através do ajuste da equação, obtemos os Γ_1 e Γ_2 para as duas populações com diferentes tamanhos em suspensão. Através da Fig. 18, o gráfico de $\Gamma \times q^2$, é possível obter o coeficiente de difusão através de um ajuste linear.

Fig. 18 - Gráfico do Γ pelo vetor de espalhamento ao quadrado para os ângulos de espalhamento de 30°, 40°, 60° e 90° do meio reacional obtido através da biossíntese de nanopartículas de prata (AgNPs) pelo fungo *Monacrosporium thaumasium*. As retas são ajustes lineares para a obtenção do coeficiente de difusão.



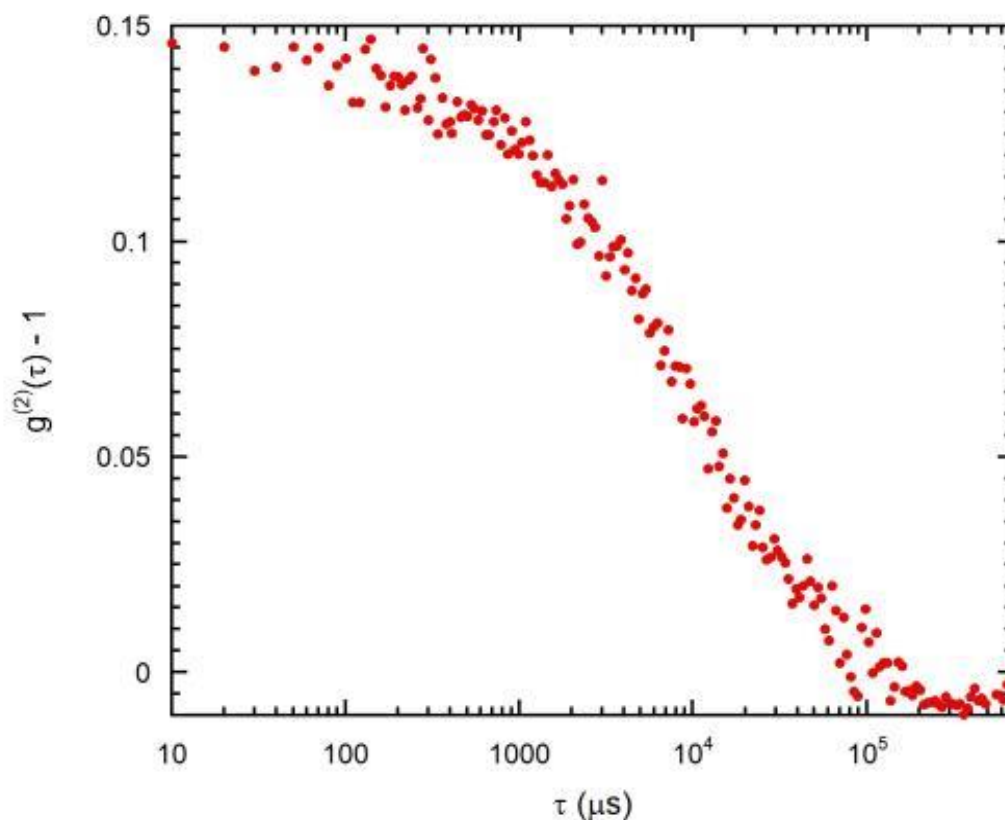
Os valores dos coeficientes de difusão obtidos estão mostrados na Tab. 3. Obteve-se os valores de raio hidrodinâmico que também foram mostrados na Fig. 18, sendo a $\eta = 0.891$ cP, $n = 1.331$ e $\lambda = 632$ nm.

Tabela 3 - Valores de coeficiente de difusão na amostra do meio reacional obtido através da biossíntese de nanopartículas de prata (AgNPs) pelo fungo *Monacrosporium thaumasium*. Verifica-se o menor e maior tamanho encontrado.

	Menor tamanho	Maior tamanho
Coeficiente de difusão (m ² /s)	1.6431x10 ⁷	1.5683x10 ⁶
Raio hidrodinâmico (nm)	14.93	156.45

As estruturas com menor tamanho podem ser associadas a proteínas e já as partículas possuem um raio hidrodinâmico médio de nm. Foi notado que as partículas não possuem uma forma totalmente esférica e, sim, possuem um pequeno alongamento (Fig. 19). No entanto, por ser pouco este alongamento, o sinal emitido não favoreceu a caracterização, sendo possível fazer medidas para baixos ângulos de espalhamento 30°.

Fig. 19 - Função de autocorrelação para o ângulo de espalhamento de 30° e com a posição do polarizador orientado na horizontal.



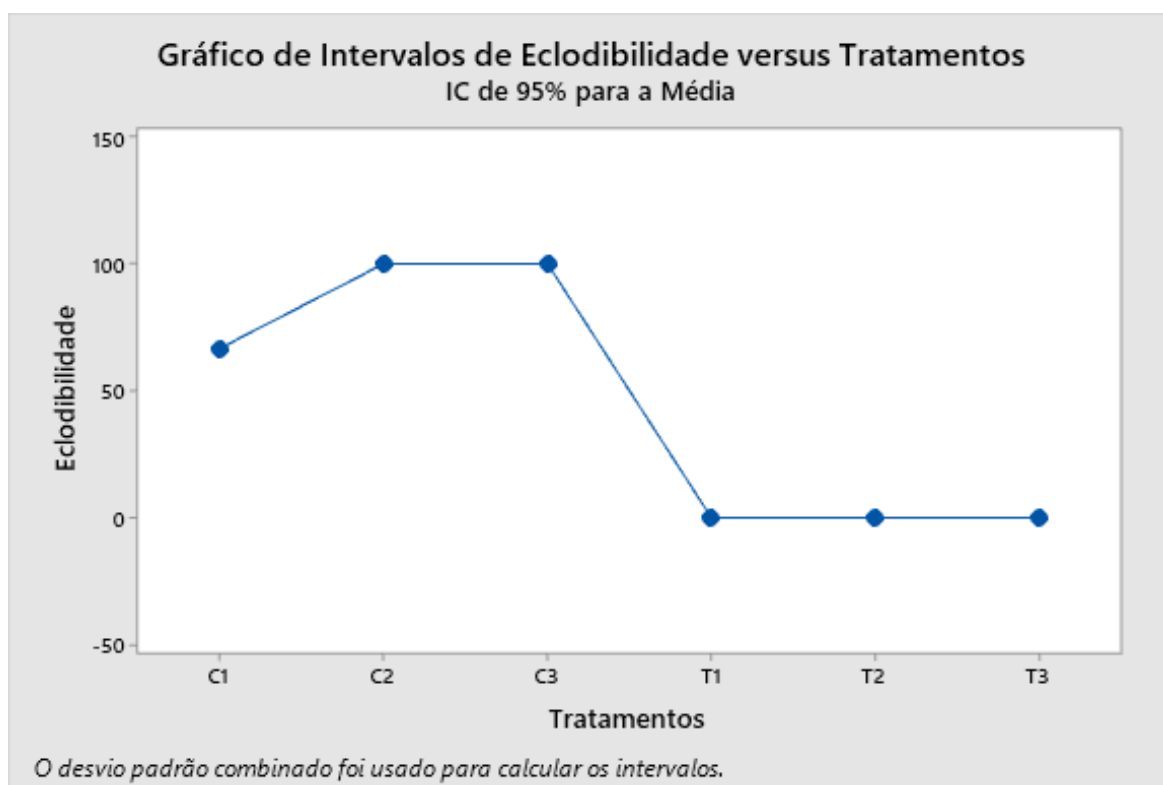
Esta medida foi realizada utilizando o polarizador na posição horizontal, logo só haverá sinal se as partículas não forem perfeitamente esféricas.

4.6 Testes embriotóxicos em *Biomphalaria* (BET)

Após as caracterizações, foram realizados os testes de toxicidade das AgNPs em massas ovígeras de *Biomphalaria glabrata*.

A suspensão contendo AgNPs promoveu uma taxa de inibição da eclosão de 100% (Fig. 20) dos caramujos durante os 10 dias de exposição.

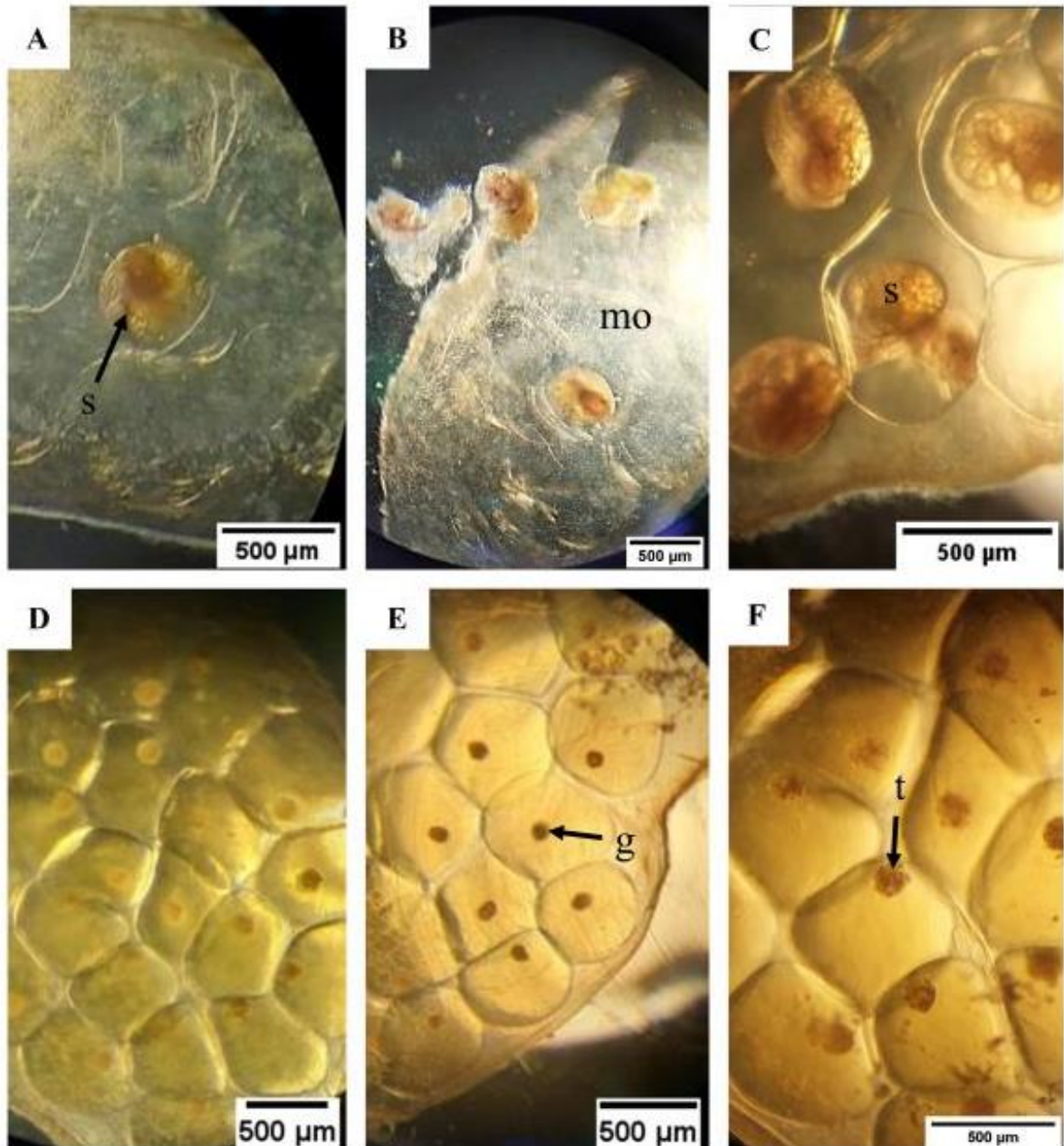
Fig. 20 - Taxa de eclodibilidade dos caramujos. C1, C2, C3 – Grupo controle com água declorada e massas ovígeras (não expostas às nanopartículas de prata). T1, T2, T3 – Tratamento de exposição com as AgNPs nas massas ovígeras de *Biomphalaria glabrata* durante dez dias a 25 °C.



Pode-se observar que para todas as massas ovígeras contendo a suspensão de AgNPs foram sensíveis ao teste quando comparados ao grupo controle. As triplicatas do grupo controle, apenas um grupo por fatores naturais da própria espécie em questão, não foi verificado a eclosão dos caramujos. No entanto em todos os tratamentos com os

nanomateriais, foi perceptível e possível a visualização das estruturas que abarcavam os ovos (Fig. 21).

Fig. 21 - Aspecto externo das alterações de massas ovígeras de *Biomphalaria glabrata*. (A, B e C) Grupo controle – água declorada; A – s – caramujo (snail); B, C mo – massa ovígera. (D, E e F) Grupo tratado – D – água declorada e E, F- AgNPs; F) Estágio do caramujo em fase trocófora (t). Escala = 500 μ m.



Os resultados são satisfatórios para os tratamentos a base de AgNPs em massas ovígeras, visto que não houve eclosão de nenhum caramujo, nem desenvolvimento completo das fases desse organismo.

Estes tamanhos variados de AgNPs provaram uma capacidade potencial de se aderir e serem absorvidos pela superfície de agentes alvo (caramujos) que induzem a mortalidade desses caramujos que são hospedeiros intermediários da esquistossomose. Estes estudos corroboram com Mansur (2010) que se refere a combinação do baixo volume com a elevada área superficial presente nas nanopartículas, que proporciona uma elevada área de contato aliada a uma quantidade mássica (AgNPs) reduzida e fenômenos quânticos associados aos materiais quando se encontram em escala nanométrica. Com isto, a membrana dessas massas, sofreram permeabilidade que indicam o ocasionamento de morte das células, o que revelou que AgNPs funcionassem como atividade moluscicida contra *B. glabrata*.

Compreende-se que o fungo *M. thaumasium* não é ovicida e atua como predador de nematoides através de redes adesivas (ARAÚJO et al., 2009). Contudo, o uso das enzimas extracelulares de fungos e outros microrganismos (COSTA SILVA et al., 2017; MADAKKA; JAYARAJU; RAJESH, 2018), podem ser capazes de atuarem como biorredutores na síntese de AgNPs. Dentre os fungos utilizados como controle biológico, o isolado de *Duddingtonia flagrans* também foi utilizado como NPs e testado em nematoides (COSTA SILVA et al., 2017), mostrando resultados promissores como controle biológico.

De acordo com Almeida et al. (2017), a quantidade de biomassa desempenha um papel fundamental no mecanismo de biorredução dos íons Ag^+ para Ag^0 . O aumento da quantidade de biomassa no meio reacional permite uma liberação mais elevada das enzimas redutase e de outras proteínas responsáveis tanto pelo processo de biorredução como também pelo processo de estabilização das nanopartículas de prata. Sendo, portanto, neste presente trabalho o uso dessas enzimas como suposição para inviabilização e toxicidade nas massas ovígeras e consequentemente nos ovos, através dos íons de Ag. Entretanto, os mecanismos de caracterização dessas enzimas e sua toxicidade necessitam de estudos futuros.

5. Conclusão

O fungo *Monacrosporium thaumasium* promoveu e viabilizou a biossíntese de nanopartículas de prata. A utilização destas AgNPs envolvendo massas ovígeras como modelo de embriotoxicidade foram satisfatórios, comprometendo a eclosão dos caramujos *Biomphalaria glablata*.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, A. et al. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium oxysporum*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 28, n. 4, p. 313–318, 2003.
- ALMEIDA, É. S.; DE OLIVEIRA, D.; HOTZA, D. Characterization of silver nanoparticles produced by biosynthesis mediated by *Fusarium oxysporum* under different processing conditions. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 40, n. 9, p. 1291–1303, 2017.
- ARAUJO, J. M. et al. Activity of the nematophagous fungi *Pochonia chlamydosporia*, *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium thaumasium* on egg capsules of *Dipylidium caninum*. *Veterinary Parasitology*, v. 166, n. 1, p. 86–89, 2009.
- ARAUJO, J. V. et al. Recent Advances in the Control of Helminths of Domestic Animals by Helminthophagous Fungi. *Parasitologia*, v. 1, n. 3, p. 168–176, 7 set. 2021.
- BASAVARAJA, S. et al. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium semitectum*. *Materials Research Bulletin*, v. 43, n. 5, p. 1164–1170, maio 2008.
- BHAINSA, K. C.; D'SOUZA, S. F. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Aspergillus fumigatus*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2006.
- BRAGA, F. R. et al. In vitro evaluation of the action of the nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium sinense* and *Pochonia chlamydosporia* on *Fasciola hepatica* eggs. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 24, n. 1, p. 1559–1564, 2008.
- BRAGA, F. R. et al. An extracellular serine protease of an isolate of *Duddingtonia flagrans* nematophagous fungus. *Biocontrol Science and Technology*, v. 22, n. 10, p. 1131–1142, out. 2012.
- BRAGA, F. R.; DE ARAÚJO, J. V. Nematophagous fungi for biological control of gastrointestinal nematodes in domestic animals. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014.
- CASTRO, L. S. et al. Ovicidal potential of *Pochonia chlamydosporia* isolate Pc-10 (Ascomycota: Sordariomycetes) on egg masses of the snail *Pseudosuccinea columella* (Mollusca: Gastropoda). *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 166, n. 1, p. 107212, set. 2019.
- CASTRO, L. S. et al. Susceptibility of embryos of *Biomphalaria tenagophila* (Mollusca: Gastropoda) to infection by *Pochonia chlamydosporia* (Ascomycota: Sordariomycetes). *Archives of Microbiology*, v. 204, n. 5, p. 271, 2022.
- COSTA SILVA, L. P. et al. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the cell-

- free filtrate of nematophagous fungus em *Duddingtonia flagrans*. International Journal of Nanomedicine, v. Volume 12, p. 6373–6381, 31 ago. 2017.
- DURÁN, N. et al. Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains. Journal of Nanobiotechnology, v. 3, n. 1, p. 8, 2005.
- GADE, A. et al. Mycogenic metal nanoparticles: progress and applications. Biotechnology Letters, v. 32, n. 5, p. 593–600, 2010.
- LEDWITH, D.; WHELAN, A.; KELLY, J. A rapid, straight-forward method for controlling the morphology of stable silver nanoparticles. Journal of Materials Chemistry - J MATER CHEM, v. 17, 5 jun. 2007.
- MADAKKA, M.; JAYARAJU, N.; RAJESH, N. Mycosynthesis of silver nanoparticles and their characterization. MethodsX, v. 5, p. 20–29, 2018.
- MANSUR, H. S. Quantum dots and nanocomposites. WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology, v. 2, n. 2, p. 113–129, 1 mar. 2010.
- MATTHIAS, L. et al. Formation of Sphalerite (ZnS) Deposits in Natural Biofilms of Sulfate-Reducing Bacteria. Science, v. 290, n. 5497, p. 1744–1747, 1 dez. 2000.
- MINGUETTO, J. G. M. et al. Biological control of gastrointestinal nematodes in young ewes treated with fungi. Biocontrol Science and Technology, v. 31, n. 5, p. 499–511, 4 maio 2021.
- MOHANPURIA, P.; RANA, N.; YADAV, S. Biosynthesis of nanoparticles: Technological concepts and future applications. Journal of Nanoparticle Research, v. 10, p. 507–517, 1 mar. 2008.
- SI, G. et al. Synthesis of PSS-capped triangular silver nanoplates with tunable SPR. Colloids and Surfaces A-physicochemical and Engineering Aspects - COLLOID SURFACE A, v. 380, p. 257–260, 1 maio 2011.
- SOARES, F. E. DE F. et al. The nematophagous fungus *Monacrosporium thaumasium* and its nematicidal activity on *Angiostrongylus vasorum*. Revista Iberoamericana de Micologia, v. 32, n. 1, p. 51–53, 2015a.
- SOARES, F. E. DE F. et al. Nematicidal action of chitinases produced by the fungus *Monacrosporium thaumasium* under laboratorial conditions. Biocontrol Science and Technology, v. 25, n. 3, p. 337–344, 4 mar. 2015b.
- SOARES, F. E. F. et al. Nematicidal activity of three novel extracellular proteases of the nematophagous fungus *Monacrosporium sinense*. Parasitology research, v. 112, n. 4, p. 1557–1565, abr. 2013.

5. CONCLUSÕES GERAIS

CAPÍTULO 1

✓ As serino-proteases se ligaram fortemente ao ácido desoxirribonucleico, formando o complexo serino protease - DNA pela técnica de pinça óptica.

✓ Essas proteases, se associaram numa ligação de equilíbrio com tendência a neutralizar cerca de 100% da carga negativa presente no esqueleto fosfato da dupla hélice, resultando em complexos DNA-proteínas neutras

CAPÍTULO 2

✓ As enzimas extracelulares do fungo *Monacrosporium thaumasium* do isolado (NF34) mostraram-se promissoras em suas ações na biossíntese de nanopartículas de prata.

✓ Os testes de toxicidade com nanopartículas envolvendo massas ovíferas como modelo de embriotoxicidade foram satisfatórios, comprometendo a eclosão dos caramujos *Biomphalaria glabrata*.