



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



**“BIOSSÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO POR
PAENIBACILLUS POLYMYXA E *PAENIBACILLUS TERRAE*”**

Carina Miranda Carvalho

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora:

Profa. Dra. Cristina Kurachi

Bolsista: CNPq Processo nº 134048/2018-0

**São Carlos - SP
2020**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Dissertação de mestrado

Título:

BIOSSÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO POR
PAENIBACILLUS POLYMYXA E *PAENIBACILLUS TERRAE*

Discente: Carina Miranda Carvalho

Orientador(a) Dr(a): Cristina Kurachi

Data de ingresso no programa: 7 de julho de 2017

São Carlos – SP



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Carina Miranda Carvalho, realizada em 26/03/2020.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Cristina Kurachi (IFSC/USP)

Profa. Dra. Cristina Paiva de Sousa (UFSCar)

Prof. Dr. José Dirceu Vollet Filho (IFSC/USP)

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

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

“Ele é o Deus que me reveste de força e torna perfeito o meu caminho.

Salmos 18:32”

Agradecimentos

À Deus, por entregar Seu Filho Jesus Cristo por amor a todos nós. À Jesus Cristo, por ter me dado vida eterna. E ao Espírito Santo que me capacita em tudo.

À minha família e noivo pelo apoio incondicional e orações, e em especial a minha irmã gêmea, Camila, pela orientação e paciência. Sem vocês nada disso seria possível. Aos avós, meus tios e primos pelo carinho e exe

Aos meus amigos e irmãos da IPR pela amizade, conversas e orações. Ter uma família na fé para dividir os momentos bons e ruins é um grande presente.

Ao PPGBiotec, e sua Coordenação pela infraestrutura e recursos para realização desse trabalho.

À Profa Cristina Kurachi (USP) pela orientação e incentivo, e colaboração da Profa. Cristina Paiva de Sousa (UFSCar) “co-orientadora” e apoiadora. Diante dos desafios enfrentados demonstraram humanidade e sabedoria, exemplos de profissionais e ser humano.

Aos docentes do PPG pelo aprendizado adquirido durante a realização das disciplinas. A generosidade em ensinar é um dos maiores presentes do homem para o mundo.

Aos companheiros de pós graduação, em especial ao Rafael Cavicchioli, pela generosidade e conhecimento.

Aos Laboratórios participantes da UFSCar e do IFSC-USP.

Ao CNPq pela concessão da bolsa.

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

SUMÁRIO

Resumo	5
Abstract.	6
1. Introdução.....	7
2. Justificativa.....	9
3. Revisão de Literatura.....	11
3.1. Nanopartículas.....	11
3.2. Nanopartícula de Ouro.....	13
3.3. Síntese de Nanopartículas.....	14
3.4. Biossíntese de Nanopartículas	15
3.4.1 Rotas de síntese: extratos de plantas, bactérias e fungos.....	16
3.5. <i>Paenibacillus polymyxa</i> e <i>Paenibacillus terrae</i>	21
3.6. Caracterização Estrutural e Físico Química.....	23
3.6.1. Espectroscopia UV-Vis.....	23
3.6.2. Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS).....	25
4. Objetivos.....	26
4.1. Objetivos Específicos.....	26
5. Materiais e Métodos	27
5.1. Fase 1.....	27
5.2. Fase 2.....	28
5.3. Fase 3.....	31
6. Resultados e Discussão.....	32
7. Conclusão.....	40
Perspectivas futuras	40
Referências Bibliográficas	42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Escala Nanométrica e associação com figuras da natureza ou do cotidiano. Fonte: FAUNGNAWAKIJ, 2012.	13
Figura 2 - Características das nanopartículas metálicas: materiais, formas, propriedades e tamanho. Fonte: Adaptado de SUN, T. et al., 2014.	14
Figura 3 - As propriedades das nanopartículas dependem de alguns fatores como: tamanho, agregação, forma e recobrimento. Fonte: ALBERNAZ, 2014. .	14
Figura 4 - Comparação entre os tipos de síntese de nanopartículas (SILVA et al., 2017).....	18
Figura 5 - Esquema do caminho óptico UV-Vis. Fonte: JULIANO, 2013.	27
Figura 6 - Diagrama das ondas propagadas a partir da luz dispersa pelas partículas. Fonte: MANO, 2004.	29
Figura 7 - Esquema de cores indicando as reações para a microplaca com 96 poços.....	33
Figura 8 - Esquema das reações para as diluições 1, 1:2, 1:4, 1: 8 e 1:16.	34
Figura 9 - Gráfico de absorvância pelo tempo das soluções de biossíntese para as diferentes diluições (1, 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16) do extrato bruto PP por 72 horas, com o intervalo de 12 em 12 horas no comprimento de onda de 540nm (absorção da AuNp).	37
Figura 10 - Gráfico de absorvância pelo tempo das soluções de biossíntese para as diferentes diluições (1, 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16) do extrato bruto PT por 72 horas, com o intervalo de 12 em 12 horas no comprimento de onda de 540nm (absorção da AuNp).	38
Figura 11 – Gráfico de absorvância pelo tempo das soluções de biossíntese para as diferentes diluições (1, 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16) do extrato bruto PP e PT por 24 horas, com o intervalo de 1 em 1 horas no comprimento de onda de 540nm (absorção da AuNp).	40
Figura 12 – Gráfico da absorvância pelo tempo das soluções de biossíntese sintetizadas pelos extratos bruto PP e PT para as diluições (1:2 e 1:4) analisadas por 12 horas, de 1 em 1 hora.	41
Figura 13 - Gráfico da absorvância pelo comprimento de onda para a solução de biossíntese PP (1:2), apresentando o comportamento em relação a absorvância e seu comprimento de onda correspondente para cada curva em um tempo específico, foi analisado por 24 horas, onde cada curva corresponde a 1 hora.....	42

Figura 14 - Gráfico da absorvância pelo comprimento de onda para a solução de biossintese PP (1:2), apresentando o comportamento em relação a absorvância e seu comprimento de onda correspondente para cada curva em um tempo específico, foi analisado por 12 horas.	43
Figura 15 - Absorvância por comprimento de onda para o PT 1:2 por tempo (1 em 1 hora por 24 horas) para a faixa de comprimento de onda de 300 a 800nm.	44
Figura 16 - Distribuição de tamanho por Intensidade.	45
Figura 17 - Análise do Raio hidrodinâmico da AuNps para PT 1:2.	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Processo de P&D (Pesquisa e Desenvolvimento) e Introdução de um Novo Medicamento no Mercado. Fonte: PINTO ,2017.....	11
Tabela 2 - Alocação dos gastos em P&D (Pesquisa e Desenvolvimento) decomposta - (preços de 2011)* . Fonte: PINTO, 2017.	12
Tabela 3 - Resumo dos prós e contras dos métodos de síntese de nanopartículas (baseado em SILVA et al., 2017).....	18
Tabela 4 - Biossíntese de nanopartículas metálicas por extratos de plantas Fonte: SILVA, 2017.	20
Tabela 5 - Biossíntese de nanopartículas metálicas por bactérias. Fonte: SILVA, 2017.....	21
Tabela 6 - Biossíntese de nanopartículas metálicas através de fungos. Fonte: SILVA et al., 2017.....	23
Tabela 7 - Comparação entre os tipos de biossíntese de nanopartículas, através de bactérias (intra e extracelular) e através de extratos de plantas (parte da planta). Baseado em SILVA et al., 2017.	24
Tabela 8 - Resumo entre as propriedades de <i>Paenibacillus polymyxa</i> e <i>Paenibacillus terra</i> e (produzido pelo autor).....	26
Tabela 9 - Dados do DLS para PP 1:2.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS

AuNps	Nanopartículas de ouro
Nps	Nanopartículas
PP	<i>Paenibacillus polymyxa</i> ou <i>P. polymyxa</i>
PT	<i>Paenibacillus terrae</i> ou <i>P. Terrae</i>
DLS	Espalhamento Dinâmico de Luz (<i>Dynamic Light Scattering</i>)
UV-Vis	Ultravioleta visível
EB	Extrato Bruto
Pdl	Índice de Polidispersão
A	Aborbância
I	Intensidade

Carvalho, Carina **Biossíntese de nanopartículas de ouro por *Paenibacillus polymyxa* e *Paenibacillus terrae***. 2020. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Biotecnologia) – UFSCar, São Carlos, 2020.

Resumo

Para sintetizar nanopartículas de ouro através de um processo ecologicamente correto, este trabalho visou à produção de nanopartículas à base de extratos brutos produzidos por fitobactérias. As fitobactérias utilizadas possuem interesse biotecnológico na área médica, (e) estudos têm apontado o potencial dos microrganismos endofíticos na produção de substâncias antibacterianas e antitumorais. As técnicas de biossíntese de nanopartículas são atóxicas e limpas, ao contrário das sintetizadas quimicamente ou fisicamente, onde há consumo intensivo de energia e às vezes podem envolver substâncias químicas tóxicas. Foram utilizadas as nanopartículas metálicas pois possuem aplicações importantes na área médica, particularmente a nanopartícula de ouro. Através do método de biossíntese de nanopartículas foram sintetizadas as nanopartículas de ouro empregando *P. polymyxa* e *P. terrae*, e o processo foi otimizado, considerando o tempo de síntese, a concentração do extrato, o comprimento de onda e o diâmetro médio da partícula. O experimento foi dividido em fases onde foi analisado a melhor concentração (1, 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16), observando através da espectroscopia UV-Vis (no ultravioleta visível) em 540 nm a melhor absorção da luz (quanto) em relação ao tempo ao longo de 72 horas em intervalo de 12 horas. As melhores concentrações foram de 1:2 e 1:4, para ambos os extratos das fitobactérias e de 12 a 24 horas como melhores períodos. A próxima fase foi analisada de hora em hora por 24 horas, com as concentrações 1:2 e 1:4, para a (em relação a) absorção de luz em 540 nm e na faixa espectral de 300 a 800 nm, demonstrando a síntese da nanopartícula de ouro para a diluição 1:2, cujo pico em torno de 540 nm, e a partir das 7 horas já há síntese. Baseado nos resultados da caracterização por DLS (*Dynamic Light Scattering* - Espalhamento Dinâmico de Luz) e absorbância, as nanopartículas de ouro sintetizadas através dos extratos brutos PP 1:2 e PT 1:2 foram as que obtiveram melhores resultados, obtendo diâmetro médio de 262 nm e 372 nm respectivamente em sistemas monodispersos, com as sínteses ocorrendo (ocorrem) a partir das 7 horas de reação de biossíntese, obtendo maior resultado entre 12 e 24 horas, e

com absorção principal na região do vermelho do espectro eletromagnético.

Palavras-chave: Síntese verde. Nanopartículas metálicas. Fitobactérias. Cerrado.

Carvalho, Carina **Biosynthesis of gold nanoparticles by *Paenibacillus polymyxa* and *Paenibacillus terrae***. 2020. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Biotecnologia) – UFSCar, São Carlos, 2020.

Abstract

In order to synthesize gold nanoparticles utilizing a green process, this work intended to produce nanoparticles using bacterial crude extract. *Paenibacillus polymyxa* (PP) and *P. terrae* (PT) have biotechnological interest in medical field, and some studies have been showing the potential of endophytic microorganisms in the production of antitumoral and antibacterial substances. Nanoparticles biosynthetic techniques are no toxic and clean when compared to traditional ones, where there is intensive energy consumption and sometimes may involve toxic chemical substances. Metallic nanoparticles have important applications in medical field, specially the gold ones. Through the nanoparticles biosynthesis using *P. polymyxa* and *P. terrae*, the process was optimized considering the synthesis time, the extract concentration, the wavelength and the particle size. The experiment was divided into phases where the best focus (1, 1: 2, 1: 4, 1: 8 and 1:16) was analyzed, observing through UV-Vis spectroscopy (without visible ultraviolet) at 540 nm the best absorption of light (how much) in relation to time and over 72 hours in a 12-hour interval. As the best indicators were 1: 2 and 1: 4, for both phyto-bacterial extracts and 12 to 24 hours as the best periods. The next phase was analyzed hourly for 24 hours, with the values 1: 2 and 1: 4, for (in relation to) light absorption at 540 nm and in the spectral range of 300 to 800 nm, demonstrating a statistic of gold nanoparticle for 1: 2 dilution, whose peak at around 540 nm, and as of 7 am are already described. Based on the results of the characterization by DLS (Dynamic Light Scattering - Dynamic Light Scattering) and absorbance, such as gold nanoparticles synthesized through crude extractions PP 1: 2 and PT 1: 2 were as obtaining better results, obtaining the average level of 262 nm and 372 nm, respectively, in monodispersed systems, with the following analyzes (occurrences) after 7 hours of biosynthesis reaction, obtaining greater results between 12 and 24 hours. The main absorption was detected at the red spectral range.

Keywords: Green synthesis. Metallic nanoparticles. Phyto-bacteria. Cerrado.

1. Introdução

A nanotecnologia é uma área de pesquisa interdisciplinar, em que as áreas da ciência como a física, química, engenharia de materiais, microbiologia dentre outras se unem a fim de produzir e usufruir de materiais com características diferenciadas e únicas. É considerado um nanomaterial quando uma das escalas de mensuração é nanométrica, ou seja, materiais cujos tamanhos das partículas que os constituem encontram-se na faixa de 1 a 100 nm (nanômetro, 1 nm equivale a 10^{-9} metros) (DASA, 2019), entretanto na biotecnologia e na medicina essa definição é mais flexível, dependendo da aplicação (RATNER, 2013).

Os nanomateriais possuem características diferentes dos mesmos materiais em maior escala e o seu potencial para melhorar a qualidade de vida e contribuir para a competitividade industrial é muito grande. As propriedades dos nanomateriais são atrativas devido principalmente ao grande aumento da razão área superficial/volume do material e da energia de superfície, a resistência, reatividade química, condutividade, propriedades químicas e físicas (TOMA; ARAKI, 2011). E podem ser utilizados na produção de: marcadores fluorescentes (CAO, 2004), catalisadores (ZHANG et al., 2014), sensores (LUO et al., 2006; AMIRI et al., 2015), sistemas de entrega de medicamentos e genes (SALATA, 2004), agentes antibacterianos e/ou antifúngicos entre outros.

Embora o ganho seja grande, estudos mais detalhados precisam ser realizados, já que os novos materiais podem também oferecer riscos ao meio ambiente e organismos a que são expostos, gerando preocupações relevantes quanto a sua toxicidade para a saúde e segurança (GAO et al., 2009). Juntamente com o seu desenvolvimento, regulamentações precisam ser geradas para que sejam aplicados protocolos para a sua utilização (OBERDORSTER et al., 2004).

As sínteses mais empregadas atualmente para gerar nanopartículas são sínteses físicas e químicas. Embora muito utilizadas, elas acarretam um alto consumo de energia (síntese física) e geralmente envolvem substâncias químicas tóxicas (síntese química). As substâncias químicas tóxicas do meio de síntese podem ser adsorvidas pela superfície da nanopartícula (RAI et al., 2009).

Nesse contexto, a biossíntese de nanopartículas, tem o seu papel importante. A biossíntese, síntese verde, síntese biológica ou síntese biogênica são termos comumente usados para a síntese ecologicamente correta de nanopartículas. Essas técnicas não geram prejuízos ao meio ambiente, há a possibilidade da nanopartícula adsorver substâncias benéficas provindas do meio de síntese, e a grande maioria das técnicas são mais simples e baratas que outros tipos de sínteses de nanopartículas.

Neste trabalho foram estudadas as biossínteses de nanopartículas de ouro (AuNp) por bactérias endofíticas *Paenibacillus polymyxa* (PP) e *Paenibacillus terrae* (PT), isoladas de *Prunus sp* e *Tabebuia ssp* respectivamente, vegetais do cerrado da UFSCar na cidade de São Carlos - SP. Os meios gerados pelas fitobactérias possuem propriedades bioativas de interesse como agentes antimicrobianos e antitumoral.

2. Justificativa

A resistência humana a medicamentos antimicrobianos e antitumorais e a falta de medicamentos eficazes são problemas crescentes e a busca por fármacos mais efetivos se faz necessária, pois as drogas necessitam ter maior especificidade de ação e menor toxicidade. (ROMANO, 2014).

A resistência antimicrobiana é algo que deve nos preocupar pois há cepas resistentes a quase todos os agentes conhecidos atualmente. As novas substâncias precisam não só ter um bom espectro de atividade, mas também novos mecanismos de ação (NISHAMINY, 2006). A necessidade de desenvolvimento de novos fármacos antibacterianos é crescente, mas infelizmente as empresas farmacêuticas têm optado por reduzir ou cessar suas atividades de pesquisa e desenvolvimento neste campo de estudo, embora o mercado mundial de fármacos utilizados no combate a doenças infecciosas seja da ordem de 70 bilhões de dólares (DEMAIN, 2009). Isso acontece devido aos elevados custos e o tempo gerados no desenvolvimento de um medicamento e os estudos clínicos para aprovação de um medicamento retratado pela Tabelas 1 e 2.

Tabela 1 - Processo de P&D (Pesquisa e Desenvolvimento) e Introdução de um Novo Medicamento no Mercado. Fonte: PINTO, 2017.

ETAPAS		DURAÇÃO (Anos)	TESTES	OBJETIVOS	TAXA DE SUCESSO* (%)	CUSTO MÉDIO (US\$ Milhão)
Pesquisa Básica		4-5	<i>in vitro</i>	Encontrar compostos ativos; determinar alvos; testar mecanismos de ação	Menos de 1	80
Testes Pré-Clínicos		1-2	<i>in vitro</i> e em animais	Determinar segurança e eficácia	10	0,2 a 23
Testes Clínicos	Fase I	1-2	20 a 100 voluntários sadios	Verificar segurança e dosagem	18	14
	Fase II	1-2	100 a 500 pacientes voluntários	Avaliar eficácia; investigar efeitos colaterais	28	17
	Fase III	2-3	1.000 a 5.000 pacientes voluntários	Confirmar eficácia; monitorar reações adversas	66	62
Registro		1-2	-	-	91	-
Pós-Comercialização	Fase IV	Contínuo	1.000 a 5.000 pacientes voluntários	Verificar efeitos adversos não previstos na população	-	30

Tabela 2 - Alocação dos gastos em P&D (Pesquisa e Desenvolvimento) decomposta - (preços de 2011)* . Fonte: PINTO, 2017.

Intervalo	Gasto hipotético (US\$ milhões)	Tempo do intervalo até o lançamento do medicamento (anos)	Custo mínimo de capital	Ganho capitalizado por medicamento bem-sucedido (US\$ milhões)
1 - Pré-primeira dose tóxica	86,1	9,6	11%	207,4
2 - Primeira dose tóxica até primeira dose em humanos	97,6	7,2	11%	184,1
3 - Primeira dose em humanos até primeira dose em pacientes	168,1	6,2	11%	284,0
4 - Primeira dose em pacientes até primeira dose crítica	356,3	4,4	11%	501,6
5 - Primeira dose crítica até primeira submissão	265,3	2,1	11%	293,8
6 - Primeira submissão até primeiro lançamento	37,3	0,5	11%	34,9
Total	1.010,6			1.506

O desenvolvimento do setor farmacêutico brasileiro ao longo dos anos é caracterizado por grande dependência tecnológica externa, baixos esforços em inovação e baixa interação entre o setor empresarial e o setor científico. As empresas internacionais que tem mantido importante participação no mercado brasileiro tem concentrado suas atividades de desenvolvimento de novos produtos nas suas sedes ou em centros de pesquisa internos em outros países. No Brasil essas empresas são especializadas em relação à pesquisa, que se dá na coordenação de estudos clínicos de fase III. Por outro lado, as empresas nacionais se especializaram na produção de medicamentos genéricos, não em novos medicamentos. Mesmo havendo esforços para essas empresas, eles não chegam a ser tão elevados e complexos o investimento e o retorno quanto os necessários para o desenvolvimento de novos produtos (PARANHOS, 2012).

Analisando o contexto de outro problema de saúde mundial, o câncer é um problema crescente, e há uma estimativa de que o número de novos casos de câncer aumente de mais de 14 milhões em 2012 para cerca de 22 milhões em 2030 em todo o mundo (MIGUEZ, 2016), devido ao envelhecimento e crescimento da população. Os medicamentos contra o câncer têm recebido importante destaque nas pesquisas por todo o mundo devido a essa realidade iminente.

E é nesse contexto que as nanopartículas de ouro podem ser empregadas. A sua aplicação na área médica e a sinergia com outras técnicas e produtos naturais constituem a estratégia de maior sucesso para a

descoberta de novos fármacos, implicando em uma busca contínua por novos produtos pelas indústrias farmacêuticas.

A síntese verde de nanopartículas apresenta um método produção de nanopartículas simples, de baixo custo e reprodutível, eliminando a necessidade de produtos químicos agressivos ou tóxicos (ou seja, limpa) e apresenta geralmente biocompatibilidade devido as substâncias adsorvidas na sua superfície e biodegradabilidade do meio de produção com o meio ambiente.

A hipótese do presente trabalho foi verificar a capacidade dos extratos brutos de *Paenibacillus polymyxa* e *Paenibacillus terrae* em sintetizar nanopartículas de ouro por uma rota sustentável com o intuito de tais nanopartículas serem futuramente aplicadas como agentes antimicrobiano e/ou antitumoral.

3. Revisão de literatura

3.1. Nanopartículas

Nanopartículas são estruturas cujas dimensões estão entre 1 e 100 nm em pelo menos 50% da sua população (em número) (EUROPEAN COMMISSION, 2011). Abaixo na figura 1 é apresentada a escala nanométrica comparando-a com diferentes estruturas biológicas, materiais e seres vivos.

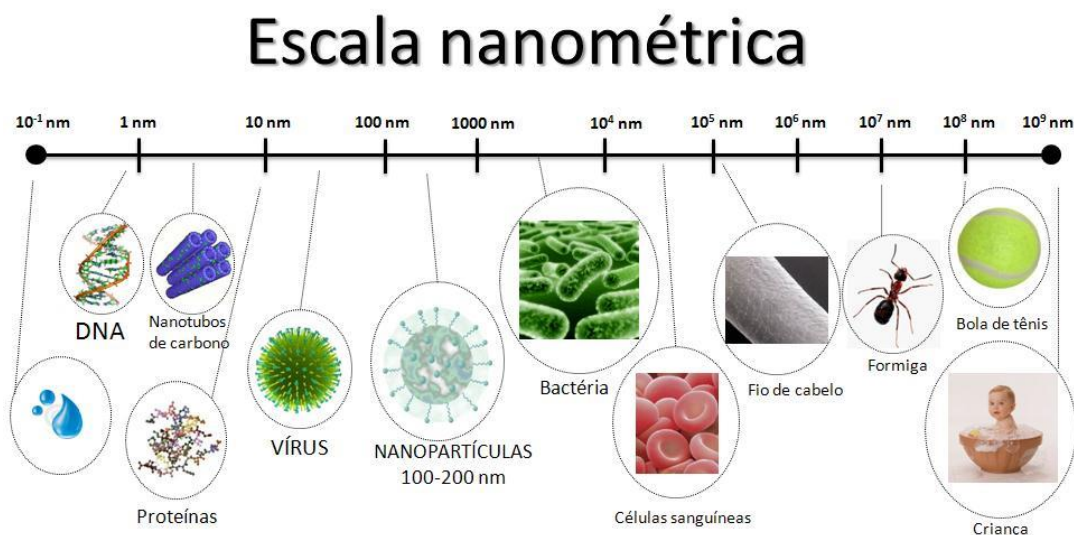


Figura: Cândice Felippi

Figura 1 - Escala Nanométrica e associação com figuras da natureza ou do cotidiano. Fonte: FAUNGNWAKIJ, 2012.

As características dos nanomateriais são diferentes dos mesmos materiais quando comparados aos seus equivalentes macroestruturados, quanto a resistência, reatividade química, condutividade, propriedades químicas, físicas etc se tornando outro material (TOMA; ARAKI, 2011). A figura 2 mostra alguns tipos de nanopartículas metálicas, formatos e propriedades.

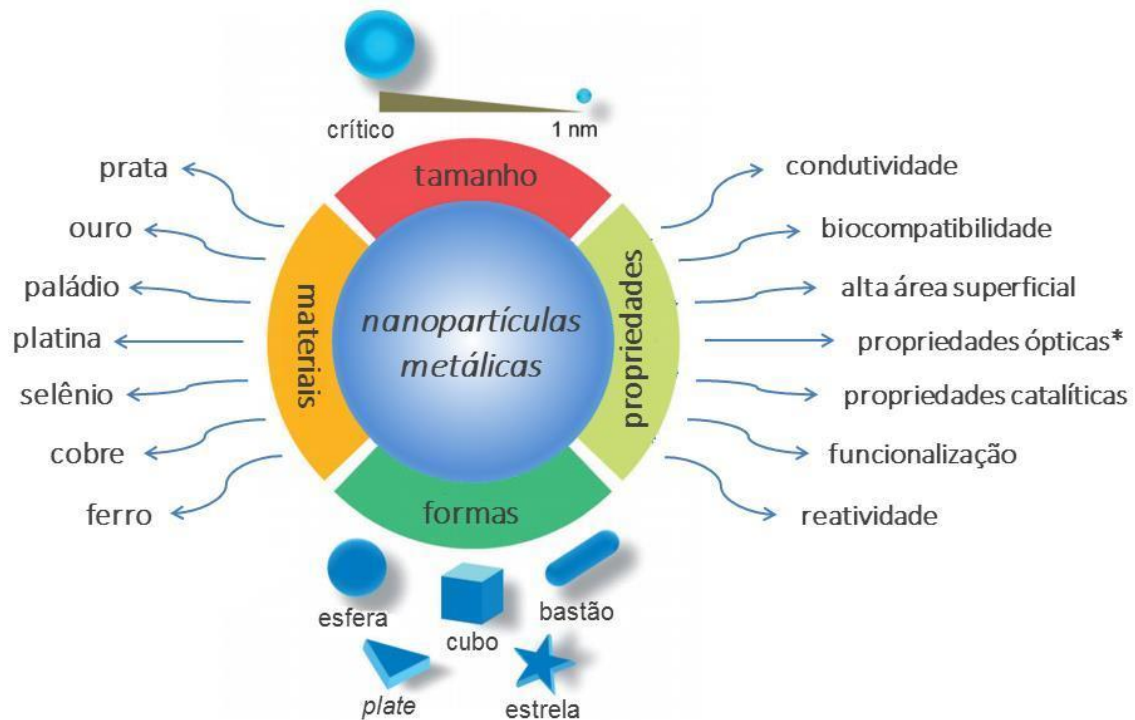


Figura 2 - Características das nanopartículas metálicas: materiais, formas, propriedades e tamanho. Fonte: Adaptado de SUN, T. et al., 2014.

As propriedades irão ser definidas pelo tamanho, recobrimento, forma e agregação das nanopartículas conforme representado na figura 3.

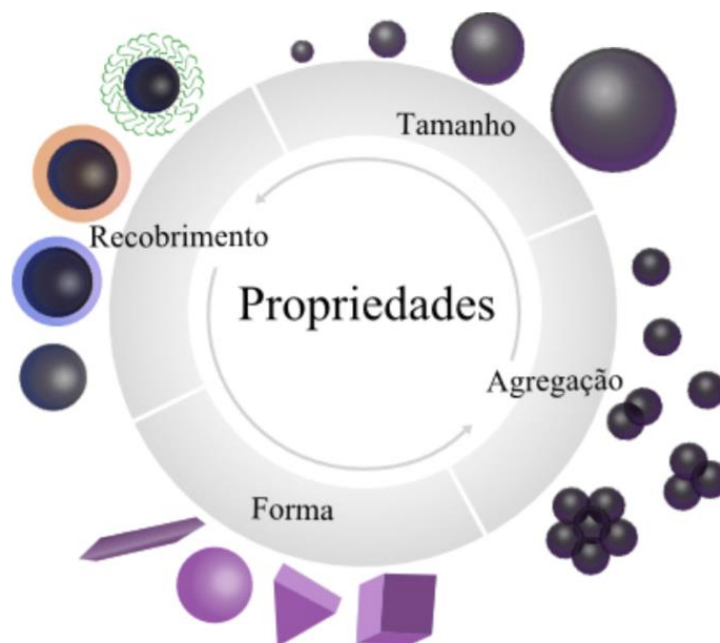


Figura 3 - As propriedades das nanopartículas dependem de alguns fatores como: tamanho, agregação, forma e recobrimento. Fonte: ALBERNAZ, 2014.

Muitos parâmetros são importantes para a determinação das propriedades dos materiais em escala nano, especialmente com relação às nanopartículas: tamanho e distribuição de tamanho; forma; aglomeração, durabilidade e solubilidade (em água e em gordura); área superficial, porosidade (porosos possuem área superficial muito maior do que os não

porosos); química da superfície, incluindo sua: composição, energia superficial, carga, reatividade, espécies adsorvidas, contaminação; possível modificação na cobertura da partícula; contaminantes ou traços de impurezas; composição química, incluindo dispersão da composição; propriedades físicas: densidade, condutividade, dureza, deformabilidade; estrutura cristalina (GRASSIAN, 2008). Somado a isso, podem surgir comportamentos eletrônicos e ópticos diferenciados, devido ao confinamento eletrônico, característica proeminente nas nanopartículas metálicas.

As reações químicas envolvendo sólidos muitas vezes acontecem na superfície, por isso a área superficial é tão importante. Analisando a relação entre a área superficial e o volume gerado pelo tamanho em nanoescala, é possível fazer com que as nanopartículas se tornem menos ou mais reativas, por exemplo: a área superficial de um cubo de 1 cm de lado é de 6 cm^2 para um volume de 1 cm^3 . A aresta do cubo diminui para 1 mm, o volume passa a valer 1 cm^3 e existem 1000 cubos cuja área superficial totaliza 60 cm^2 . Agora se o cubo passa a ter 1 nm de lado, existem 10^{21} cubos por 1 cm^3 de volume total, e a área superficial resultante é agora de $60.000.000 \text{ cm}^2$.

A maior reatividade devido a grande área superficial e aos efeitos quânticos pode provocar conseqüências quando elas entram em contato com o organismo humano ou mesmo outros sistemas biológicos.

3.2. Nanopartícula de Ouro

As nanopartículas de ouro têm elevada importância entre as nanopartículas metálicas devido a sua alta biocompatibilidade, elas têm sido utilizadas em várias aplicações médicas. Nanopartículas de ouro têm atraído interesse significativo nos últimos dez anos como material medicinal no tratamento e diagnóstico de tumores, sendo um importante material teranóstico (terapêutico e diagnóstico). Por exemplo, nanopartículas de ouro têm a capacidade de se acumular de forma passiva em tumores devido ao seu tamanho e por causa das suas propriedades ópticas e químicas singulares podem ser utilizadas em procedimentos de tratamento térmico (HIRSCH et al., 2003; ZHENG, 2009). Além disso, muitos estudos têm demonstrado que as nanopartículas de ouro biocompatíveis podem ser utilizadas de modo efetivo como plataformas transportadoras para a administração orientada de medicamentos anticâncer melhorando assim a entrega e minimizando a duração do tratamento e os efeitos colaterais (PACIOTTI et al., 2006; CAI et al.,

2008; CHENG et al., 2010). Alguns estudos também demonstraram que as nanopartículas de ouro são agentes antibacterianos eficazes (CHALOUPKA, 2010).

As nanopartículas de ouro em particular, apresentam um intenso pico de absorção de radiação eletromagnética nos comprimentos de onda de 500-600nm, e observa uma variação de cor característica em uma dispersão e AuNP de vermelho a roxo, de acordo com o tamanho das nanopartículas produzidas e com a composição do meio em que elas estão dispersas (PISSUWAN et al., 2010; PETRYAYEVA, 2011).

3.3. Síntese de Nanopartícula

Há dois métodos para a preparação de nanopartículas conhecido por: a) *top-down* (métodos de cima para baixo) onde parte de uma estrutura grande para se fazer uma estrutura pequena, onde as estruturas nanométricas são produzidas através da moagem de matérias macroscópicas; e b) *bottom-up* (métodos de baixo para cima) nos quais a formação de nanoestruturas é feita a partir de átomos e moléculas individuais, fazendo uma estrutura maior (auto-organização). As estruturas são formadas de átomos ou moléculas capazes de se autorreajustar, sendo disponível somente com avanço e aperfeiçoamentos tecnológicos, pois exigem controle rigoroso na produção dos materiais utilizados, que devem gerar estruturas bem finas. (MARCONI, 2009). A Tabela 3 apresenta algumas modalidades de métodos *top-down* e *bottom-up*.

Tabela 3 - Técnicas utilizadas nas abordagens de fabricação de compostos nanoestruturados. Fonte: ALBERNAZ, 2014.

Métodos <i>bottom-up</i>	Métodos <i>top-down</i>
Redução química	Nanolitografia
Processo Sol-gel	Ablação a laser/térmica
Deposição química em fase vapor	Abrasão (<i>i.e.</i> moagem de alta energia)
Pirólise por spray ou laser	Pulverização catódica
Condensação atômica ou molecular	Cauterização química

É possível controlar o tamanho das nanopartículas a partir da razão entre o agente redutor/estabilizante e o substrato. A forma também pode ser controlada, através da monitorização dos parâmetros da reação.

As sínteses de nanopartículas mais utilizadas pode envolver processos químicos e físicos de alto custo que costumam usar materiais tóxicos com potenciais riscos tais como toxicidade ambiental, citotoxicidade e

carcinogenicidade (Al et al., 2011). A toxicidade surge a partir das substâncias como solventes orgânicos, agentes redutores e estabilizadores que são usados para evitar a aglomeração não desejada dos coloides. Além disso, nanopartículas têm sido verificadas como tóxicas devido a fatores como a composição, tamanho, forma e química da superfície. Como resultado, a presença destes agentes de toxicidade sobre as nanopartículas sintetizadas pode impedir sua aplicação biomédica. A nanotoxicologia tem crescido e pesquisado os efeitos dos nanomateriais para os seres vivos e meio ambiente.

3.4. Biossíntese de Nanopartículas

Os métodos e as técnicas fisicoquímicas mais utilizadas na síntese de nanopartículas envolvem solventes tóxicos e a geração de resíduos potencialmente nocivos à saúde e ao meio ambiente, limitando em diversas circunstâncias o amplo uso dessas nanopartículas no campo farmacêutico e clínico (SALAM et al., 2012; CAUERHFF et al., 2013).

Diante desse quadro, surge acentuado interesse na busca por rotas alternativas de síntese mais seguras e com menor impacto ao meio ambiente e, dentre elas, a síntese verde é uma abordagem promissora.

Há três fatores-chaves na síntese das nanopartículas metálicas: o agente redutor, o meio de reação e o agente estabilizador (MAHENDRA, 2014).

E é aí que a via de síntese biológica tem sido efetuada e possui crescente valor e importância, sobretudo, através do uso de bactérias, fungos, plantas, cianobactérias e actinomicetos (KIEMLE et al., 2007) etc. Espécies de bactérias *Escherichia coli* (ZHANG et al., 2013) *Magnetospirillum gryphiswaldense* (MONRAS et al., 2012) foram empregados como fontes de na produção de nanopartículas. A presença da enzima redutase em algumas sínteses torna-a possível (ALI et al., 2018). Na figura 5 vemos a comparação entre os métodos de síntese de nanopartículas: químico (*bottom-up*) e físico (*top-down*) A, e biossíntese B.

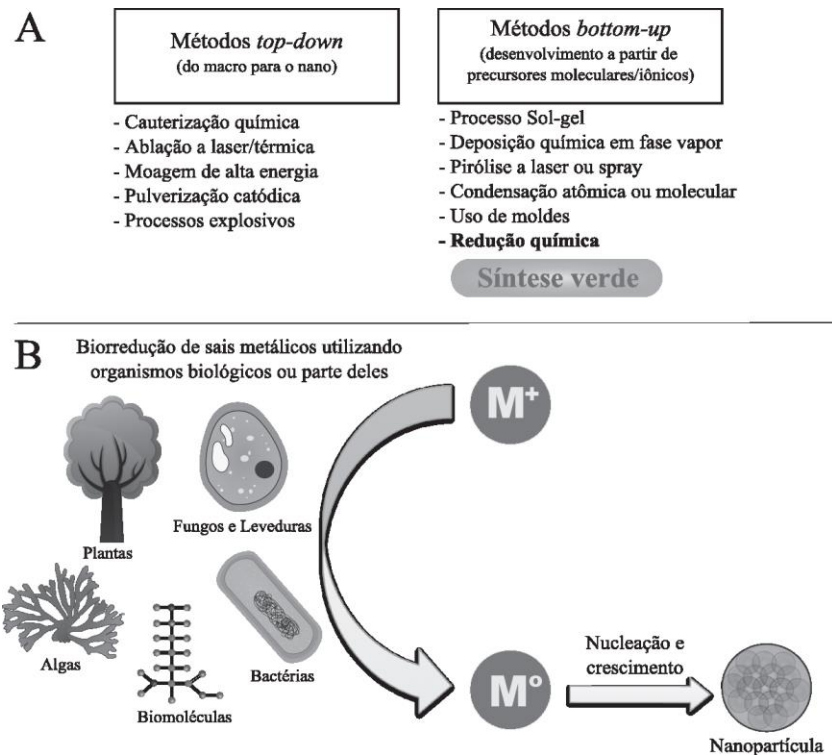


Figura 4 - Comparação entre os tipos de síntese de nanopartículas (SILVA et al., 2017).

Muitos estudos têm evidenciado o potencial dos microrganismos endofíticos na produção de substâncias antibacterianas (CASTILLO et al., 2007; DEVI et al., 2012; GUIMARAES et al., 2008; HAZALIN et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2010; RATTI et al., 2008; SERRANO, 2009; SUPAPHON et al., 2013) e antitumorais (GUIMARAES et al., 2008; HAZALIN et al., 2009).

Tabela 3 - Resumo dos prós e contras dos métodos de síntese de nanopartículas (baseado em SILVA et al., 2017).

<i>Top down</i>	<i>Buttom up</i>
Produção em larga escala	Controla a distribuição de tamanho e forma
Dificuldade em obter homogeneidade	Maioria solventes e resíduos tóxicos
	Grande consumo de energia
	Rotas complexas e com múltiplos passos

3.4.1 Rotas de síntese: extratos de plantas, bactérias e fungos

Dentre os insumos utilizados na síntese verde de nanopartículas, extratos

provenientes de tecidos e órgãos de plantas têm sido os mais reportados na literatura (IRANI, 2011; BAKER et al., 2013; INGALE, 2013). Plantas podem atuar como agentes químicos redutores de sais metálicos devido aos seus numerosos componentes (MITALL et al., 2013). Dentre estes, destacam-se: aminoácidos, flavonoides, compostos fenólicos, terpenoides, ácido cítrico, grupos funcionais (álcoois, aldeídos, amins), compostos heterocíclicos, desidrogenases, CO₂ intracelular, proteínas de membrana, NADP redutases, peptídeos, polissacarídeos, saponinas e ácido tânico (AKTHAR et al., 2013). Alguns desses compostos também podem atuar como agentes estabilizantes das nanopartículas, recobrando a superfície das partículas, limitando o seu crescimento e evitando que se agreguem (INGALE, 2013).

O número de publicações nessa área tem crescido e, embora os compostos da planta que atuam na redução e/ou estabilização das nanopartículas muitas vezes sejam conhecidos, o mecanismo específico da síntese verde mediada por plantas ainda não foi estabelecido (DURAN et al., 2011; NARAYANAN e SAKTHIVEL, 2011; AKHTAR et al., 2013).

Nas rotas de síntese, organismos biológicos ou partes deles, como biomoléculas, apresentam potencial redutor e, portanto, são utilizados para obtenção de nanopartículas. A biossíntese é uma reação de redução química de um sal metálico na presença de um reagente redutor, o qual pode também, atuar como agente estabilizante, revestindo as nanopartículas. Os agentes redutores podem ser: polissacarídeos, as proteínas, peptídeos, aminoácidos, ácidos nucleicos e vitaminas.

Através da variação das características de nanopartículas obtidas por diferentes extratos, pode-se variar as condições da síntese, como o tempo de reação, a concentração dos reagentes, a temperatura e o pH, visando a um aumento do rendimento e da velocidade da reação para que ela seja comparável com os padrões de síntese química por rotas convencionais. A alteração dessas condições também pode levar à síntese de nanopartículas com características morfológicas distintas (AKHTAR et al., 2013). Alguns exemplos de biossíntese por extratos plantas são apresentados na tabela 3.

Tabela 4 - Biossíntese de nanopartículas metálicas por extratos de plantas Fonte: SILVA, 2017.

ORGANISMO	ÍON METÁLICO	DIÂMETRO	FORMA
<i>Aloe vera</i> (babosa)	Prata	15,2 nm	Esférica
<i>Aloe vera</i>	Ouro	–	Triangular
<i>Aloe vera</i>	Índio	5 nm a 50 nm	Cúbica
<i>Acalypha indica</i>	Prata	20 nm a 30 nm	–
<i>Anacardium occidentale</i> L. (caju)	Prata	4 nm	Esférica
<i>Callicarpa maingayi</i>	Prata	12,4 nm	–
<i>Capsicum annuum</i> L. (pimentão)	Prata	10 nm a 40 nm	Esférica
<i>Cinnamomum camphora</i> (cânfora)	Paládio	3,2 nm a 6 nm	–
<i>Cinnamomum camphora</i>	Prata	64,8 nm	–
<i>Cinnamomum camphora</i>	Ouro	21,5 nm a 23,4 nm	Triangular/ esférica
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> (canela)	Ouro	25 nm	Esférica/ prismática
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> (canela)	Prata	31 nm a 40 nm	Cúbica

ORGANISMO	ÍON METÁLICO	DIÂMETRO	FORMA
<i>Cocos nucifera</i> L. (coco)	Ouro	10 nm	Esférica
<i>Coriandum sativum</i> (coentro)	Ouro	6,7 nm a 57,9 nm	Variada
<i>Cuminum cyminum</i> (cominho)	Ouro	1 nm a 10 nm	Esférica
<i>Diospyros kaki</i> (caqui)	Platina	2 nm a 12 nm	Cristalina
<i>Gardenia jasminoides</i> (gardênia)	Paládio	3 nm a 5 nm	–
<i>Glycine max</i> (soja)	Paládio	15 nm	Esférica
<i>Helianthus annuus</i>	Ouro	30 nm a 50 nm	–
<i>Medicago sativa</i> (alfafa)	Prata	5 nm a 51 nm	Esférica
<i>Mentha piperita</i> (hortelã)	Prata	90 nm	Esférica
<i>Mentha piperita</i>	Ouro	150 nm	Esférica
<i>Nyctanthes arborescens</i>	Ouro	19 nm	Esférica
<i>Ocimum tenuiflorum</i> (manjeriço-pequeno)	Prata	25 nm a 40 nm	Esférica
<i>Ocimum sanctum</i> (manjeriço-sagrado)	Prata	5 nm e 10 nm	Esférica
<i>Papaver somniferum</i>	Prata	3,2 µm a 7,6 µm	Esférica
<i>Prosopis juliflora</i>	Prata	–	Cúbica
<i>Rhododendron dauricum</i>	Prata	25 nm a 40 nm	Esférica
<i>Sebasnia grandiflora</i>	Prata	10 nm a 25nm	Esférica
<i>Sorbus aucuparia</i>	Prata	16 nm	Esférica
<i>Sorbus aucuparia</i>	Ouro	18 nm	Triangular/ hexagonal
<i>Tamarindus indica</i> L. (tamarindo)	Ouro	20 nm a 40 nm	Cristalina
<i>Tephrosia purpurea</i> (indigo-selvagem)	Prata	20 nm	Esférica
<i>Trachyspermum ammi</i>	Prata	87 nm a 998 nm	Triangular

As nanopartículas de ouro formadas pelos extratos de plantas da figura acima respectivamente variam de 6,7 a 150 nm de diâmetro.

Uma outra técnica de biossíntese ocorre por meio de bactérias. Nesse mecanismo a síntese ocorre por meios distintos, podendo envolver a internalização de alguns íons, que sofrem redução no meio citoplasmático (ou periplasmático, em alguns casos), ou também podem ser reduzidos no exterior

da célula, seja pela ação de metabólitos secretados pela bactéria ou pela ação de moléculas existentes na superfície da membrana da bactéria.

Na tabela 4 estão listados alguns organismos (bactérias) e as nanopartículas metálicas geradas por cada biossíntese com seu diâmetro e forma.

Tabela 5 - Biossíntese de nanopartículas metálicas por bactérias. Fonte: SILVA, 2017.

ORGANISMO	ÍON METÁLICO	DIÂMETRO (NM)	FORMA
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Prata	8 a 12	Esférica
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Titânio	40,5	Esférica
<i>Anabaena flos-aquae</i>	Ferro	103 × 20	Bastão
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Prata	14,6	Circular/triangular
<i>Bacillus funiculus</i>	Prata	10 a 20	Esférica
<i>Bacillus</i> sp.	Prata	5 a 15	Esférica
<i>Bacillus subtilis</i>	Níquel	–	Folha
<i>Brevibacterium casei</i>	Cádmio	10 a 30	Esférica
<i>Brevibacterium casei</i>	Prata	10 a 50	Esférica
<i>Brevibacterium casei</i>	Ouro	10 a 50	Esférica
<i>Calothrix pulvinata</i>	Ferro	128 × 11	Bastão

ORGANISMO	ÍON METÁLICO	DIÂMETRO (NM)	FORMA
<i>Escherichia coli</i>	Ouro	50	Circular
<i>Escherichia coli</i>	Cádmio/Telúrio	3 a 6	Cúbica
<i>Geobacillus</i> sp. (ID17)	Ouro	10 a 20	Hexagonal
<i>Geobacter sulfurreducens</i>	Paládio	< 5	–
<i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i>	Ouro	10 a 40	Esférica
<i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i>	Telúrio	15 × 200	Alongada
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Prata	6,3±4,9	Esférica/discoide
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Paládio	22,1±6,2	Poligonal
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ferro	20,5±5,3	Laminar
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ródio	2,1±0,9	Irregular
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Níquel	2,9±1,2	Discreta
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Rutênio	8,3±5,4	Esférica/discoide
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Platina	450	Discoide
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cobalto	550	Laminar
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Lítio	750	Circular
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Cobre	8 a 15	Esférica
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Prata	93	Cúbica
<i>Streptomyces albidoflavus</i>	Prata	10 a 40	Esférica
<i>Streptomyces coelicolor</i>	Prata	50	Irregular

As nanopartículas de ouro formadas pelas quatro bactérias da figura 9 respectivamente variam de 10 a 50 nm (PUGAZHENTHIRAN et al., 2009; ZHANG et al., 2013; KALISHWARALAL et al., 2010; MONRAS et al., 2012).

Algumas bactérias podem produzir nanopartículas que apresentam aminoácidos e peptídeos em sua superfície (substâncias adsorvidas), formadas tanto em meio extracelular como intracelular.

A síntese verde de nanopartículas utilizando de microrganismos é de produção escalonável, benigna ao meio ambiente e muitas vezes ideal para aplicações biomédicas por oferecer biocompatibilidade.

Comparando as biossínteses por extrato de planta e a por extrato de bactéria (organismo em cultura) filtrando o extrato (extrato sem a cultura das células bacterianas), a última apresenta ainda diversas vantagens adicionais sobre outros organismos em rotas de síntese verde. Esse fato está relacionado à facilidade de crescimento *in vitro*, multiplicação rápida, manuseio fácil e controle das condições experimentais, os quais acarretam em um aumento na reprodutibilidade na síntese das nanopartículas (JAIN et al., 2013). Porém, a produção por microrganismos têm um custo financeiro muito mais alto do que a síntese mediada por extratos de plantas.

O uso do extrato de plantas para promover a biossíntese de nanopartículas se caracteriza por ser um método mais rápido e de alta eficiência, especialmente quando metais nobres, como prata e ouro, são utilizados (IRAVANI, 2011). Adicionalmente, há a oportunidade de realizar a síntese em apenas um passo, além do fato de que a planta pode prover agentes estabilizantes que podem até mesmo atuar como bioativos (INGALE et al., 2013). Entretanto, um aspecto ainda desafiante da síntese verde com plantas é a homogeneidade na produção dos extratos e, conseqüentemente, a reprodutibilidade das nanopartículas sintetizadas, os quais a síntese por extratos de bactérias (sem a cultura de célula) provê e nos quais se destaca.

Um outro exemplo na síntese é através de fungos, os quais produzem principalmente proteínas (enzimas secretadas) como potenciais formadores de nanopartículas, e a formação de nanopartículas pode ser intra ou extracelular (Tabela 6).

Tabela 6 - Biossíntese de nanopartículas metálicas através de fungos. Fonte: SILVA et al., 2017.

ORGANISMO	ÍON METÁLICO	DIÂMETRO (NM)	FORMA
<i>Candida glabrata</i>	Cádmio	2	Esférica
Levedura MKY3	Prata	2 a 5	Hexagonal
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Antimônio	2 a 10	Esférica
<i>Schizosaccharomyces</i>	Cádmio	1 a 1,5	Hexagonal
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Ouro	15	Hexagonal/triangular
<i>Fusarium oxysporum</i>	Zinco	42	–
<i>Fusarium oxysporum</i>	Silício	5 a 15	Quase esférica
<i>Fusarium oxysporum</i>	Titânio	6 a 13	Esférica
<i>Fusarium oxysporum</i>	Platina	10 a 100	Variada
<i>Fusarium oxysporum</i>	Prata	16 a 30	–
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Prata	5 a 25	Esférica/triangular
<i>Trichoderma harzianum</i>	Prata	5	Quase esférica
<i>Coriolus versicolor</i>	Prata	25 a 75	Esférica
<i>Volvariella volvacea</i>	Ouro/Prata/Ouro-Prata	15 a 150	Triangular/quase esférica/hexagonal

Podemos observar que a nanopartícula de ouro biossintetizada por fungo (Tabela 6) possui 15 nm.

A maioria das biossínteses de nanopartículas encontradas na literatura ocorrem através de extratos de plantas (parte da planta), e culturas com as bactérias ou fungos (síntese intracelular ou extracelular). Foram encontrados poucos casos através de extrato bruto de bactérias ou fungos (sem a cultura celular), os quais contêm os metabólitos gerados por cada microrganismo em solução. A biossíntese de nanopartículas de ouro analisada mais próxima do trabalho desenvolvido foi através do fungo endofítico *Penicillium citrinum*, o extrato bruto (sem a cultura celular) gerou nanopartículas de 100 nm (HULIKERE, 2016).

Em geral, nanopartículas utilizadas no campo de biotecnologia variam em diâmetro entre 5 nm a 500 nm, enquanto aquelas mais utilizadas em aplicações biomédicas variam em diâmetro de 5 nm a 20 nm. As nanopartículas obtidas por meio de rotas de síntese verde satisfazem essas condições em sua maioria, além de apresentarem revestimentos moleculares como agentes estabilizantes ou poderem até mesmo ser conjugadas com outras moléculas

biológicas que confirmam biocompatibilidade e seletividade, para que possam ser utilizadas em aplicações biológicas e biomédicas.

Há a necessidade na área da saúde pública do controle de vetores/patógenos que causam danos à saúde humana. Nesse caso, o uso de nanopartículas sintetizadas via nanotecnologia verde demonstram um grande potencial para o controle de microrganismos (SAWONG et al.; SONG et al., 2010). Além disso, o diagnóstico de doenças também pode ser contemplado pelo uso das nanopartículas como nanobiossensores para detecção de células tumorais, entre outros (RAGHUNANDAN et al.; PRASAD et al., 2011).

Tabela 7 - Comparação entre os tipos de biossíntese de nanopartículas, através de bactérias (intra e extracelular) e através de extratos de plantas (parte da planta). Baseado em SILVA *et al.*, 2017.

Microrganismos (Bactérias)	Plantas
Produção escalonável Síntese não-tóxica ao meio ambiente Biocompatibilidade (ideal para aplicações biomédicas) Facilidade de crescimento <i>in vitro</i> Controle das condições experimentais: reprodutibilidade Custo financeiro mais alto	Agentes estabilizantes, bioativos Síntese não-tóxica ao meio ambiente Heterogeneidade Baixa reprodutibilidade

3.5. *Paenibacillus polymyxa* e *Paenibacillus terrae*

A biodiversidade do Cerrado com o potencial para o uso em biotecnologia possui alto destaque, cerca de 151 espécies foram encontradas na literatura, oriundas principalmente de plantas e microrganismos. Existe um amplo campo na geração de conhecimento quanto a biodiversidade do Cerrado, visto a reduzida quantidade de espécies avaliadas pela comunidade científica em relação ao total da biodiversidade estimada. Esse conhecimento e material vivo têm alto potencial para serem utilizados em biotecnologia e assim estimular a inovação nesta área do conhecimento e possível benefícios a sociedade.

O Cerrado é caracterizado como um excelente mosaico de biomas para pesquisas endofíticas. Os endófitos encontrados em seu ambiente

apresentaram grande potencial biotecnológico, produzindo novos compostos com atividades antimicrobiana, antitumoral, antiinflamatória, analgésica e cicatrizante (CAVICCHIOLI, 2017). Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial biotecnológico das cepas *Paenibacillus polymyxa* RNC-D isolada da espécie vegetal *Prunus sp* e *Paenibacillus terrae* isolada da espécie vegetal *Tabebuia spp*.

Microrganismos endofíticos são definidos como fungos ou bactérias que colonizam o interior dos tecidos de plantas, sem apresentar efeito patogênico ao hospedeiro (AZEVEDO, 2007). Claus e Berkeley (1986) atribuíram a bactérias em forma de bastonete, o gênero *Bacillus*. Em 1993 a partir de informações genotípicas, o *Bacillus polymyxa* foi denominado em um novo gênero *Paenibacillus polymyxa* (ASH, et al., 1993). A bactéria endofítica *Paenibacillus polymyxa*, é geralmente encontrada na rizosfera das plantas *Prunus sp*, e possui capacidade para produzir enzimas hidrolíticas (NIELSEN, 1997).

Serrano et al., (2014) observou que o caldo de fermentação de *P. polymyxa* possuía propriedade bioativa, com espectro de atividade que abrangeu bactérias Gram-negativas, Gram-positivas e fungo, também detectou a presença de um novo lipopeptídeo denominado então como policerradina. Nesse estudo, os autores indicaram a presença de diferentes substâncias bioativas produzidas por *P. polymyxa* RNC-D. A fitobactéria *P. polymyxa*, tem atraído considerável interesse devido ao seu grande potencial biotecnológico em diversos processos industriais assim como na agricultura sustentável (KIRAN, et al., 2016).

A fitobactéria *Paenibacillus terrae* foi isolada de *Tabebuia spp*, popularmente conhecida como Ipê. De acordo com estudo (ROMANO, 2009), provou produzir metabólitos bioativos contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*, além da nova atividade citotóxica contra células tumorais. Essa bactéria também mostrou atividade anti-Leishimania sem precedentes.

A produção de substâncias bioativas está diretamente relacionada aos meios de cultura associados às fontes de carbono e nitrogênio, pH, temperatura e agitação que influenciam diretamente reações metabólicas e nas trocas gasosas (ROMANO, 2009).

Tabela 8 - Resumo entre as propriedades de *Paenibacillus polymyxa* e *Paenibacillus terrae* (produzido pelo autor).

<i>Paenibacillus polymyxa</i>	<i>Paenibacillus terrae</i>
<p><i>Prunus sp</i></p> <p>Produz enzimas hidrolíticas</p> <p>Caldo propriedade bioativa, com atividade para bactérias Gram-negativas, Gram-positivas e fungos</p>	<p><i>Tabebuia spp</i> (Ipê)</p> <p>Atividade citotóxica contra células tumorais (acima de 85%)</p>

3.6 Caracterização Estrutural e Físico Química

3.6.1 Espectroscopia UV-Vis

A espectroscopia no ultravioleta visível (UV-Vis) baseia-se na absorção de radiação, por uma amostra, na região do espectro eletromagnético cujos comprimentos variam entre o ultravioleta e o visível, chegando ao infravermelho próximo (entre aproximadamente 200 a 780 nm).

O conhecimento da absorção de luz pela matéria é a forma mais usual de determinar a concentração de compostos presentes em uma solução. (PADILHA, 2010). A radiação eletromagnética de comprimento de onda menor que a luz visível e mais longo que os raios X é chamada de luz ou radiação ultravioleta (UV). A luz ultravioleta é geralmente dividida em regiões denominadas de ultravioleta próximo (300-400 nm), afastado (200-300 nm) e no vácuo (4-200 nm) e é produzida em alguns processos que geram transição da luz visível em átomos, no qual, um elétron de um estado energético de alta energia retorna para um estado energético de menor energia, emitindo a energia excedente em forma de luz (CIENFUEGOS, 2000).

Quando um feixe de luz monocromática atravessa uma solução com moléculas absorvedoras, parte da luz é absorvida pela solução e o restante é transmitido. A absorção de luz depende basicamente da concentração das moléculas absorvedoras e da espessura da solução – caminho óptico (SKOOG; HOLLER, 1992).

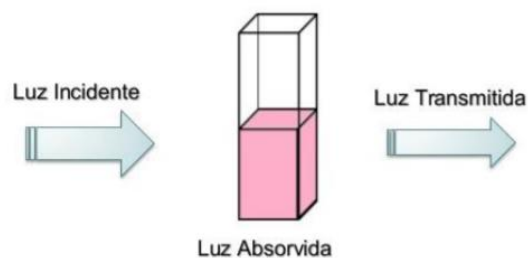


Figura 5 - Esquema do caminho óptico UV-Vis. Fonte: JULIANO, 2013.

Nos átomos e nas moléculas os elétrons giram ao redor de seus núcleos em níveis definidos de energia. Sendo a energia dos elétrons mínima, os elétrons se encontram no menor estado energético, ou seja, no chamado estado fundamental. Neste estado eles podem absorver energia radiante, passando então a um estado energético superior ou excitado. A absorção de energia UV-Vis modifica a estrutura eletrônica da molécula em consequência de transições eletrônicas (ROCHA, 2010).

O espectro obtido é registrado como comprimento de onda versus transmitância. Como a absorbância (A) é proporcional a $\log 1/T$, onde T é a transmitância, o uso de uma resistência que varia de modo logarítmico com o comprimento de onda permite a obtenção de espectros.

Para medir a quantidade de luz que é absorvida por uma amostra, deve-se comparar a quantidade de luz inicial que é aplicada com a quantidade que é transmitida através de uma relação denominada lei de Beer (HARRIS, 2001). A lei de Beer, que é o cerne da espectrofotometria aplicada à química, fornece uma relação linear entre a absorbância medida (A) de um analito e a sua concentração C que é a concentração molar da espécie absorvente em M ou mol.L^{-1} . O caminho óptico ou a distância que a luz deve percorrer através da amostra (em cm) é dado por b . O termo ϵ (épsilon) é a absorvidade molar (L/ml.cm) e é uma constante de proporcionalidade, seu valor é dependente do comprimento de luz usado, da identidade e do meio da espécie absorvente (Equação 1) (HAGE, 2011).

$$A = \epsilon bc \quad (1)$$

Portanto, saber a absorbância é muito importante, pois ela é diretamente proporcional à concentração. As nanopartículas possuem diversas colorações que podem ser atribuídas ao efeito plasmônico ressonante de superfície, que é a excitação coletiva dos elétrons na interface entre um condutor e um isolante. A ressonância plasmônica de superfície localizada é

uma propriedade óptica de metais nobres, tal como o ouro, que se manifesta na região do visível (400-700 nm) do espectro eletromagnético (PEREIRA, 2009). A interação dos elétrons com a radiação eletromagnética causa oscilação coletiva dos elétrons livres nas nanopartículas metálicas, dando origem a uma densidade de carga em sua superfície (PETRYAYEVA; KRULL, 2011).

Essa absorbância é muito sensível à natureza do material, dimensão, forma e grau de agregação das nanopartículas (SCOTT; SMITH; THOMPSON, 1953). O pico de absorção máxima para nanopartículas de ouro está entre 500-600 nm, de maneira que se desloca para a direita com o aumento do tamanho (SONG; JANG; KIM, 2009; PISSUWAN et al., 2010; PETRYAYEVA; KRULL, 2011). Quando há formação de agregados são geradas ressonâncias em energia menores ocasionando picos por volta de 650 nm (WANG, 2006). Nanopartículas com diâmetros médios em torno de 14 nm tem pico máximo em 530 nm e as com 99 nm, o pico ocorre em 575 nm (LINK, 1999).

3.6.2 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

É um método para medições de tamanho que utiliza um processo chamado de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS do inglês *Dynamic Light Scattering*) que mede o movimento browniano (movimento de partículas devido à colisão aleatória com as moléculas do líquido ao seu redor) e relaciona isto ao tamanho das partículas. Um laser ilumina as partículas e analisa as flutuações de intensidade de luz dispersa. O padrão de manchas será composto de áreas claras brilhantes e escuras, onde nenhuma luz é detectada. As áreas de luz brilhantes são o lugar onde a luz dispersa pelas partículas chega à tela com a mesma fase e interfere construtivamente para formar uma mancha clara. As áreas escuras são onde as adições de fase são mutuamente destrutivas e se anulam mutuamente (figura 10). As partículas em suspensão num líquido não são estacionárias devido ao movimento browniano. Como as partículas estão constantemente em movimento um padrão de manchas aparecerá. O sistema do medidor mede a taxa da variação de intensidade de luz e, em seguida, usa isso para calcular o tamanho das partículas (MANO, 2004).

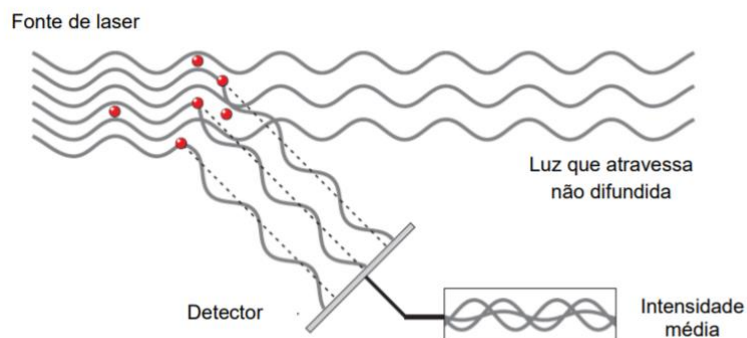


Figura 6 - Diagrama das ondas propagadas a partir da luz dispersa pelas partículas. Fonte: MANO, 2004.

A metodologia de espalhamento de luz dinâmico (DLS) permite determinar o diâmetro hidrodinâmico (DH) das partículas em suspensão pelo espalhamento de luz decorrido do movimento Browniano das partículas. Quando uma partícula é dispersa em um meio líquido, forma-se uma camada de solvatação em sua superfície. O DH inclui essa camada de solvatação, o que faz com que esse dado possa ser superestimado quando comparado, por exemplo, com técnicas de microscopia, que medem o diâmetro das partículas secas. Percebe-se também que esse dado é representativo apenas para partículas de forma esférica. Essa metodologia também oferece informações sobre a distribuição das populações de tamanho das partículas analisadas por meio da determinação do índice de polidispersividade (Pdl). O Pdl se refere à variedade do tamanho da amostra relativo à sua distribuição por intensidade (MALVERN, 2004). Esse valor varia de 0 a 1 e, quanto menor, mais monodispersa e, conseqüentemente, menos heterogênea é a amostra.

4. Objetivo

Este trabalho teve como objetivo a produção de nanopartículas de ouro (AuNps) através do método de biossíntese de nanopartículas por *Paenibacillus polymyxa* (PP) e *Paenibacillus terrae* (PT), bactérias endofíticas isoladas do cerrado da UFSCar (Campus São Carlos).

4.1 Objetivos Específicos

- Comprovar a biossíntese das AuNps
- Otimizar a biossíntese em relação ao tempo, comprimento de onda e diluições
- Analisar para diferentes diluição de extratos bruto

- Encontrar o diâmetro médio e analisar a homogeneidade das AuNps para diferentes diluições.

5. Materiais e Métodos

5.1. Produção dos extratos brutos PP e PT

Os microrganismos estudados no presente trabalho pertencem à coleção de culturas depositadas no Laboratório de Microbiologia e Biomoléculas (LaMiB), da UFSCar, sob a Coordenação da Prof. Cristina Paiva de Sousa.

Os microrganismos *Paenibacillus polymyxa* e *Paenibacillus terrae* foram retirados do freezer a -80°C e submetidos ao crescimento inicial e reativação em Caldo e Ágar TSB 28°C por 48 horas. Meios de cultura: Caldo TSB, ágar nutriente, caldo nutriente, ágar Mueller Hinton. Foi preparada a solução de ácido cloroáurico (HAuCl_4) a 2 mM; Massa Molecular (MM) = 339,785 g/mol: Molaridade (M) = mM = 0,002 M = 0,002 mol/L, Volume (V) = 100 mL = 0,1 L, conforme discriminado:

$$M = m / MM \cdot V \rightarrow m = M \cdot MM \cdot V$$

$$m = 0,002 \cdot 339,785 \cdot 0,1$$

$$m = 0,0339785 \text{ g}$$

Foi pesado 0,067957 g de HAuCl_4 e dissolvido em 100 mL de água (em balão volumétrico). Após reativação, *P. polymyxa* RNC-D e *P. terrae* foram cultivados em meio ISP2 composto por (g.L⁻¹): glicose (6), extrato de levedura (2,5), peptona (10) e extrato de malte (10), sendo suplementado com ágar bacteriológico (20) para os cultivos em placa de Petri. O pH do meio foi ajustado em 7,0 adicionando-se volume suficiente de solução KOH 1 Molar. Para esterilização do meio, todos os componentes foram autoclavados a 121°C durante 15 minutos. Para estocagem a longo prazo, os microrganismos foram cultivados em caldo ISP2 a 30°C durante 16 a 24 horas e congelados a -80°C em microtubos cônicos de 2 mL com 20% (v/v) glicerol.

Alíquotas de 50 µl de cultura estoque de *P. polymyxa* RNC-D e *P. terrae* foram semeadas em placas de Petri contendo ágar ISP2, as quais foram mantidas a 30 °C durante 48 h. O inóculo foi preparado transferindo-se 1 colônia bem isolada, a partir do crescimento em placa de Petri para um Erlenmeyer de 250 ml contendo 20 ml de caldo ISP2. O frasco foi incubado em shaker orbital a 30 °C/180 rpm/24 h. A cultura foi centrifugada (10.000 g/30 min) e as células lavadas duas vezes em água deionizada esterilizada. Posteriormente o inóculo foi preparado ajustando-se a densidade óptica ao valor de 1,0 (λ 600 nm) e as células ressuspensas em água deionizada esterilizada foram transferidas para o meio de produção. O volume celular de inóculo utilizado foi de 10% (v/v). As fermentações foram realizadas em Erlenmeyers de 1000 ml contendo 400 ml de caldo YPM. Os frascos foram incubados 30 °C/180 rpm/24 h. Uma alíquota de 100 µL foi retirada dos meios de produção com o inóculo no tempo zero, sendo realizadas diluições seriadas em microtubos contendo 900 µL e posteriormente plaqueadas em ágar ISP2 por 24 a 48 horas (em triplicata) para realização da contagem do número de UFC.mL⁻¹. O pH do meio não foi monitorado no decorrer da fermentação. Após o período de incubação, o caldo fermentado foi centrifugado (10.000 g/30 min) e o sobrenadante foi aliqotado em tubos cônicos esterilizados de 10 e 50 mL e congelados a -80 °C até a posterior utilização nos testes de biossíntese, sendo filtrados em membrana de poro 0,22 µm antes da aplicação.

5.2. Fase 1 e 2

Os extratos bruto da *P. polymyxa* e da *P. terrae* foram descongelados e utilizados para a biossíntese.

Reações em microplaca

O esquema abaixo (fig.1) representa o desenho das reações em placa de 96 poços e os padrões de cores:

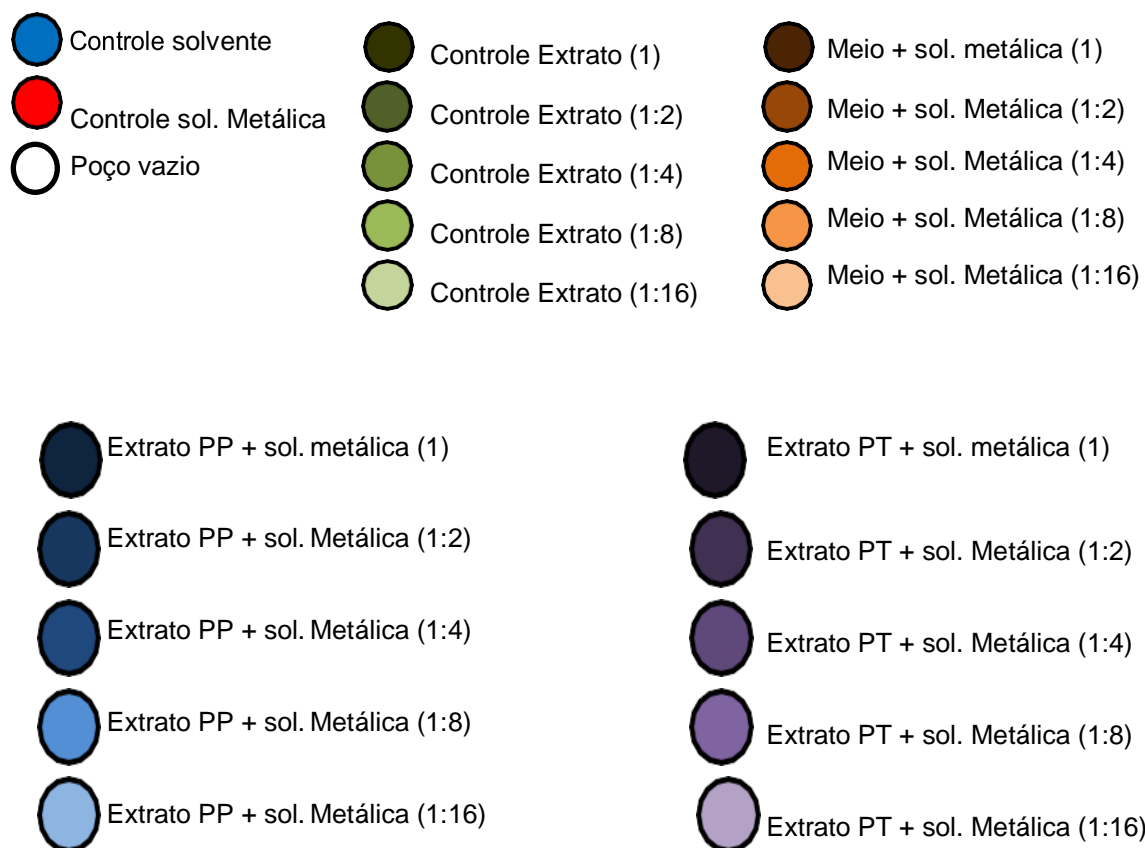


Figura 7 - Esquema de cores indicando as reações para a microplaca com 96 poços.

Os experimentos da fase 2 foram realizados em quadruplicada. Controle do solvente: 200 μL de água deionizada esterilizada; Controle da solução metálica: 100 μL de solução metálica 0,002 M + 100 μL de água deionizada esterilizada; Controle do extrato: 100 μL do meio de cultura foi diluído duplo-serialmente e em 100 μL água deionizada e acrescido de 100 μL de água deionizada, resultando nas diluições finais de 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16; Controle do meio de cultura: 100 μL do meio de cultura foi diluído duplo-serialmente e em 100 μL água deionizada e acrescido de 100 μL de solução metálica 0,002 M, resultando nas diluições finais (Figura 7) de 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16. Reações de biossíntese: o extrato bruto fresco empregado foi diluído duplo-serialmente (1:2, 1:4, 1:8 e 1:16) e adicionado após, 100 μL de solução metálica 0,002 M. A solução 1 é a solução “mãe” onde o extrato bruto fresco não está diluído em água, logo possui 100 μL de extrato bruto inicialmente.

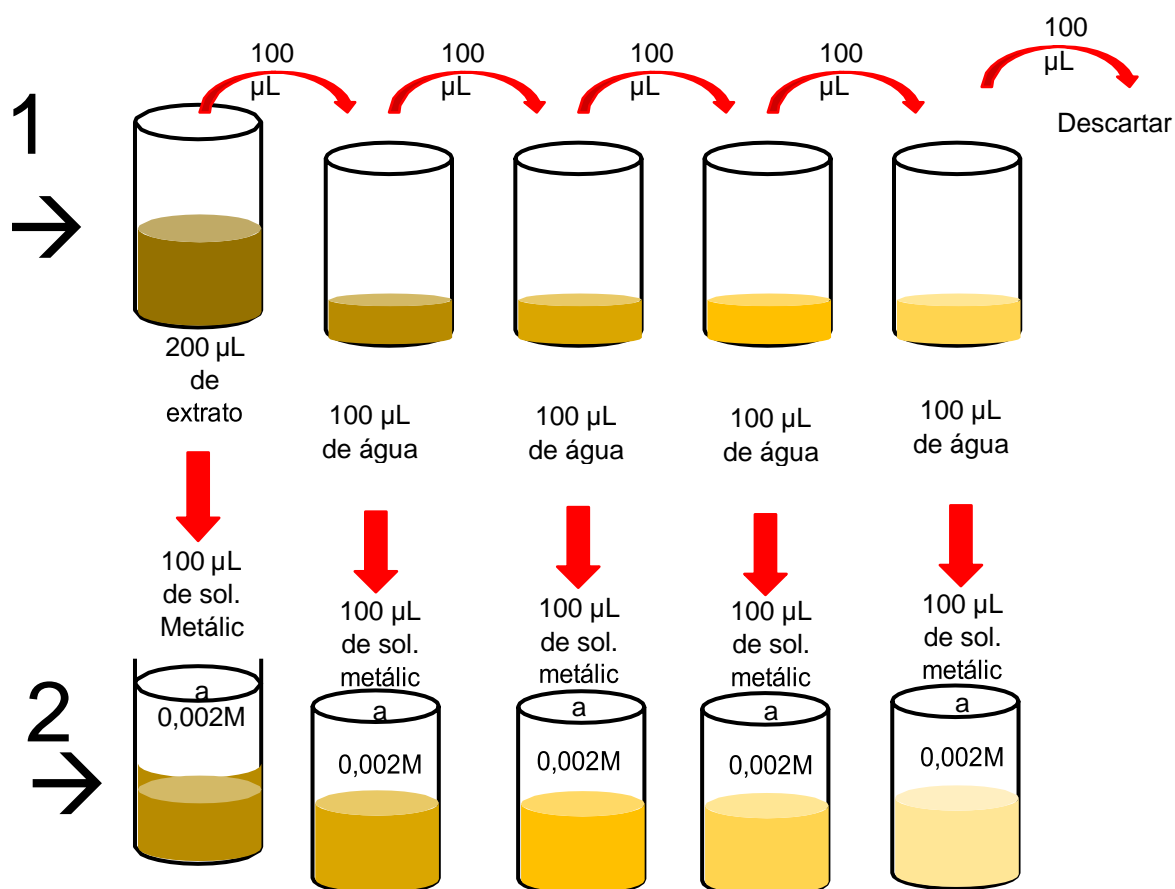


Figura 8 - Esquema das reações para as diluições 1, 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16.

As microplacas de reações foram identificadas da seguinte forma: nos poços esquematizados para as reações 1:2, pipetados 200 μL de extrato bruto fresco e 100 μL de água deionizada esterilizada nos poços das reações 1, 1:4, 1:8 e 1:16. Posteriormente foram adicionados 100 μL de solução metálica 0,002M em todos os poços de reação. As reações incubadas a 30°C com agitação de 50 rpm por 72 horas.

Fase 1

Foram feitas leituras de absorvância em relação ao tempo (12 em 12 horas por 72 horas) para o PP e PT para diferentes diluições de extrato bruto no comprimento de onda de 540nm (absorção da AuNp), o leitor de microplacas utilizado foi o SpectraMax i3 do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de São Carlos (campus Sede) para cada reação. Foram construídos os gráficos no software Origin® 8 para a apresentação da absorvância para diferentes tempos de síntese para cada concentração.

Fase 2

Foram realizadas leituras a cada 12 horas em leitora de microplacas SpectraMax® i3 a 540 nm (comprimento de onda do ouro). A leitura foi repetida para os tempos de 0 a 12 horas e 12 a 24 horas, realizando a leitura de 1 em 1 hora (após do teste anterior). Foi padronizado o melhor tempo para produção das nanopartículas no tempo de 12 horas. Foram preparadas as reações de biossíntese em volume de 100 mL.

5.3. Fase 3

Os Extratos brutos com diluição (1:2) PP e PT foram descongelados e filtrados em membrana 22mm esterilizada. A solução pura dos extratos bruto (1) e as diluições 1:2 e 1:4 foram analisadas através da técnica de Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) Zetasizer, da Malvern Instruments Ltda. do Grupo de Nanomedicina e Nanotoxicologia (Gnano) do IFSC-USP em São Carlos. Foram gerados gráficos da Intensidade, Volume e Número de partículas.

Os valores medidos no DLS são sensíveis a variação dos fatores de temperatura, pH e concentração de eletrólitos na solução. Por esse motivo, no presente trabalho, todas as medidas foram executadas da mesma maneira. As medidas foram realizadas no instrumento ZetaSizer Nano ZS no Laboratório de Nanomedicina e Nanotoxicologia (GNano), no IFSC-USP. Para cada análise,

utilizou-se a diluição das amostras em água ultrapura na proporção de 1:20 . As amostras foram analisadas em triplicata, com número de medidas no automático, ângulo fixado em 173° e temperatura a 25 °C, permitido 1 minuto de estabilização da temperatura antes das medições. Os dados foram analisados utilizando o software do equipamento (ZetaSizer 10.11.1, Malvern). Os dados obtidos são referentes à média das triplicatas \pm desvio padrão da média e os gráficos foram plotados no programa Origin® 8.

6. Resultados e Discussão

Fase 1

Absorção da luz: 5 diluições cada (PP e PT)

Os extratos bruto da *P. polymyxa* e da *P. terrae* foram descongelados e utilizados para a biossíntese. As reações foram lidas na leitora de microplacas ou espectrofotômetro com comprimentos de onda variáveis no UV-Vis para monitoramento da formação de nanopartículas. Foram feitas leituras de 1 em 1 h por 24 horas em leitora de microplacas SpectraMax® i3 (Lab de Bioquímica e Biologia Molecular da UFSCar) a 540 nm (absorção da AuNp). Foram construídos gráficos de absorbância por comprimento de onda, para o PP e o PT para as diluições 1:2 e 1:4. As sínteses foram analisadas para as cinco diluições (1, 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16) a cada 12 horas por 72 horas.

A figura 9 apresenta as amplitudes de absorção em 540 nm para as diferentes diluições de extrato bruto do *P. polymyxa* (PP).

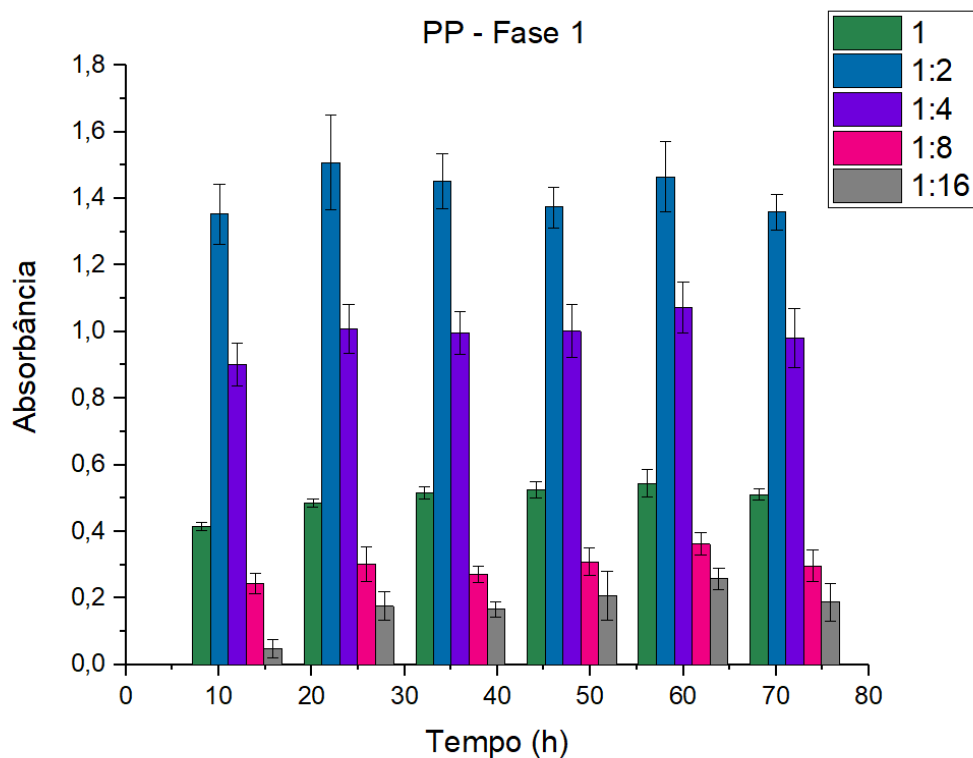


Figura 9 - Gráfico de absorbância pelo tempo das soluções de biossíntese para as diferentes diluições (1, 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16) do extrato bruto PP por 72 horas, com o intervalo de 12 em 12 horas no comprimento de onda de 540nm (absorção da AuNp).

Foi observada a produção de AuNps em todas as diluições testadas e as 1:2 e 1:4 se mostraram mais promissoras devido à maior concentração comparativa de Nps, identificada pela absorbância. O pico máximo para a diluição 1:2 ocorreu antes de 24 horas. Antes de 10 horas o seu valor observado foi interessante, podendo-se não necessitar de mais tempo, uma vez que cresce relativamente pouco até 24 horas. A absorbância máxima detectada foi de 1,5. O crescimento da diluição 1:4 foi menos que a 1:2, seu pico foi observado em 60 horas, mas a partir das 10 horas cresceu relativamente pouco até 10 horas. Sua absorbância máxima foi menor que 1,1 Detectou-se assim que nas diluições 1:2 e 1:4 a melhor relação crescimento tempo foi em 10 horas, pois depois, cresceram pouco ao longo do tempo (fig. 10).

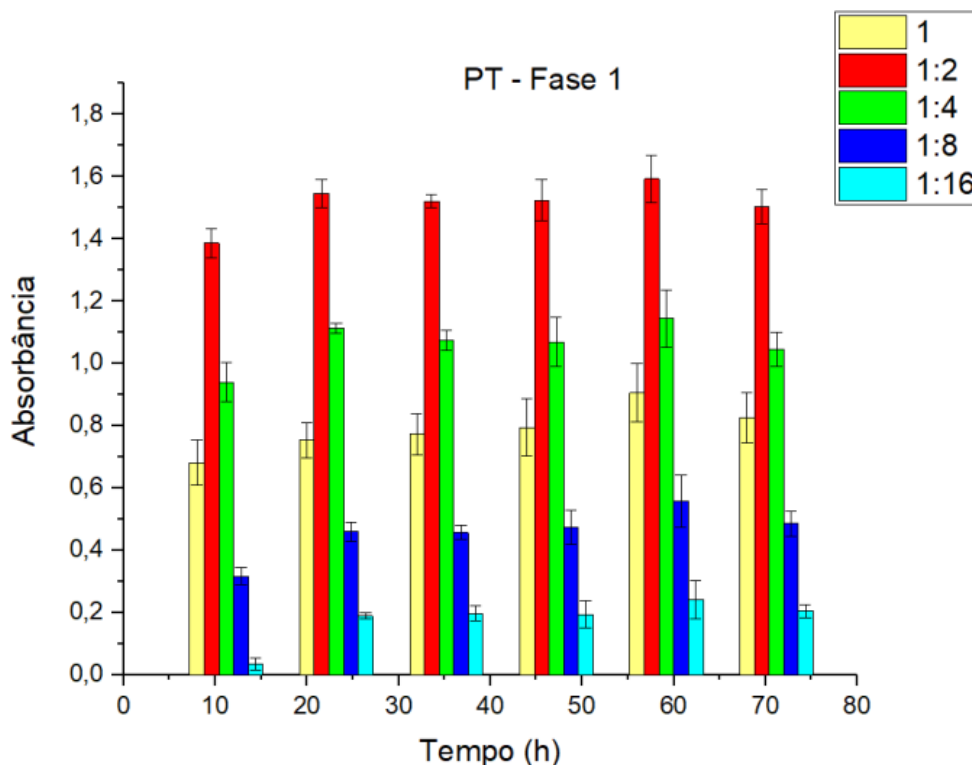


Figura 10 - Gráfico de absorbância pelo tempo das soluções de biossíntese para as diferentes diluições (1, 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16) do extrato bruto PT por 72 horas, com o intervalo de 12 em 12 horas no comprimento de onda de 540nm (absorção da AuNp).

A figura 2 apresenta a comparação entre as diversas diluições do extrato bruto sintetizado. Foi observado que houve produção de AuNps em todas as diluições e diluições 1:2 e 1:4 foram mais promissoras devido ao maior número de Nps. O pico máximo para a diluição 1:2 ocorreu antes das 24 horas, sendo que antes das 10 horas o seu valor já é interessante, não possuindo a necessidade de esperar mais tempo, já que cresce relativamente pouco até as 24 horas. E sua absorbância máxima é 1,6. O crescimento da diluição 1:4 é menor que a 1:2, seu pico é em 60 horas, mas a partir das 10 horas cresce relativamente pouco até 72 horas. Sua absorbância máxima é 1,1. Ou seja, nas diluições 1:2 e 1:4 a melhor relação crescimento tempo é em 10 horas.

Analisando apenas a informação referente à absorbância em 540 nm das AuNp para PP e PT, a produção de AuNps por PP é maior, portanto mais promissora que PT.

Fase 2

Absorção da luz: 2 diluições cada (PP e PT)

Os extratos bruto da *P. polymyxa* e da *P. terrae* foram descongelados e

utilizados para a biossíntese. As reações foram lidas na leitora de microplacas ou espectrofotômetro com comprimentos de onda variáveis no UV-Vis para monitoramento da formação de nanopartículas. Foram feitas leituras de 1 em 1 h por 24 horas em leitora de microplacas SpectraMax® i3 (Lab de Bioquímica e Biologia Molecular da UFSCar) a 540 nm (Absorção da AuNp). Foram construídos gráficos de absorbância por comprimento de onda, para o PP e PT para as diluições 1:2 e 1:4 (fig. 11).

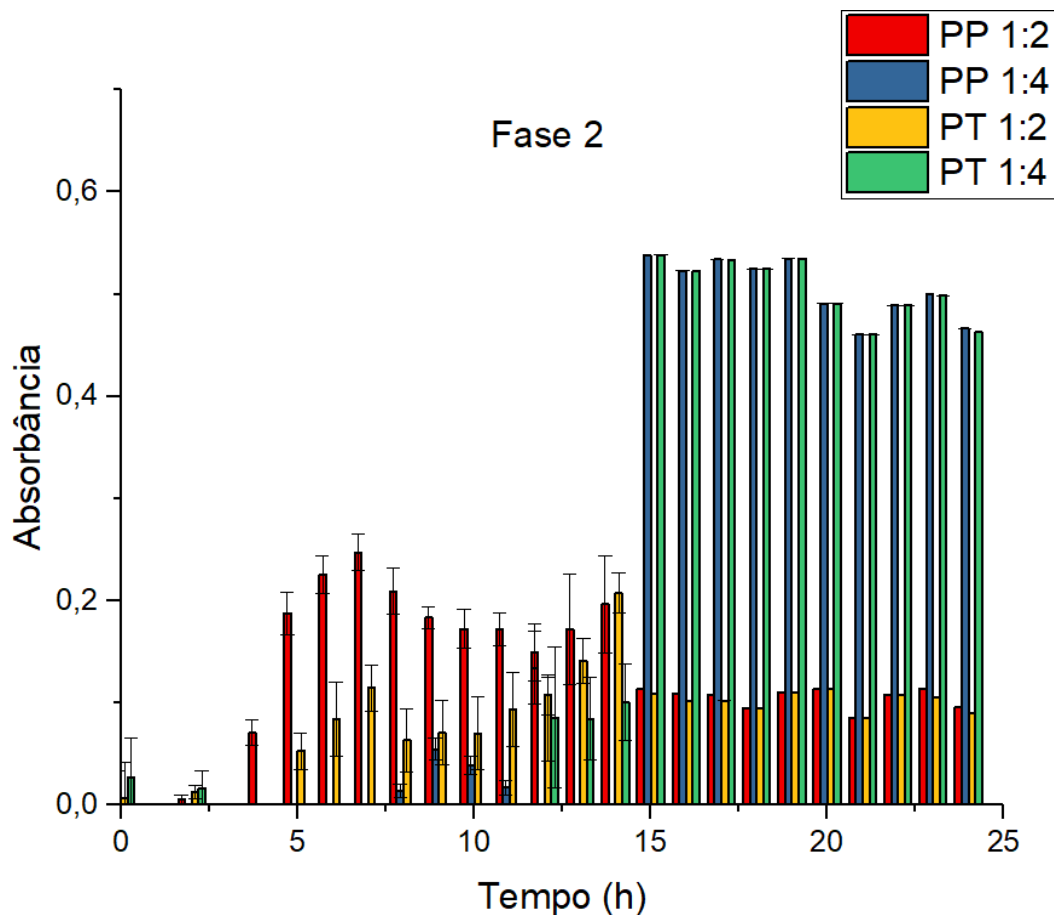


Figura 11 – Gráfico de absorvância pelo tempo das soluções de biossíntese para as diferentes diluições (1, 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16) do extrato bruto PP e PT por 24 horas, com o intervalo de 1 em 1 horas no comprimento de onda de 540nm (absorção da AuNp).

Foi observado o crescimento das Nps formadas através dos extratos PP e PT por 24 horas de 1 em 1 hora. Até 15 horas temos a predominância de PP 1:2, e PT 1:2 em relação a PP 1:4 e PT 1:4. A partir das 15 horas PP 1:4 e PT 1:4 crescem muito se comparadas as outras, permanecendo constantes até 24 horas enquanto que PP 1:2 e PT 1:2 caem significativamente depois das 15 horas, permanecendo constantes até as 24 horas.

A figura 11 apresentou comportamento diferente das figuras 9 e 10 até as 24 horas, pois houve contaminação nas culturas utilizadas havendo a necessidade de refazer os extratos PP e PT. Como há muitas variáveis nesse experimento e eles influem diretamente no resultado das nanopartículas produzidas, há a necessidade de utilizar o mesmo cultivo e protocolos bem definidos a fim de gerar nanopartículas parecidas em cada síntese.

Análise do gráfico 11 até as 12 horas (figura 12).

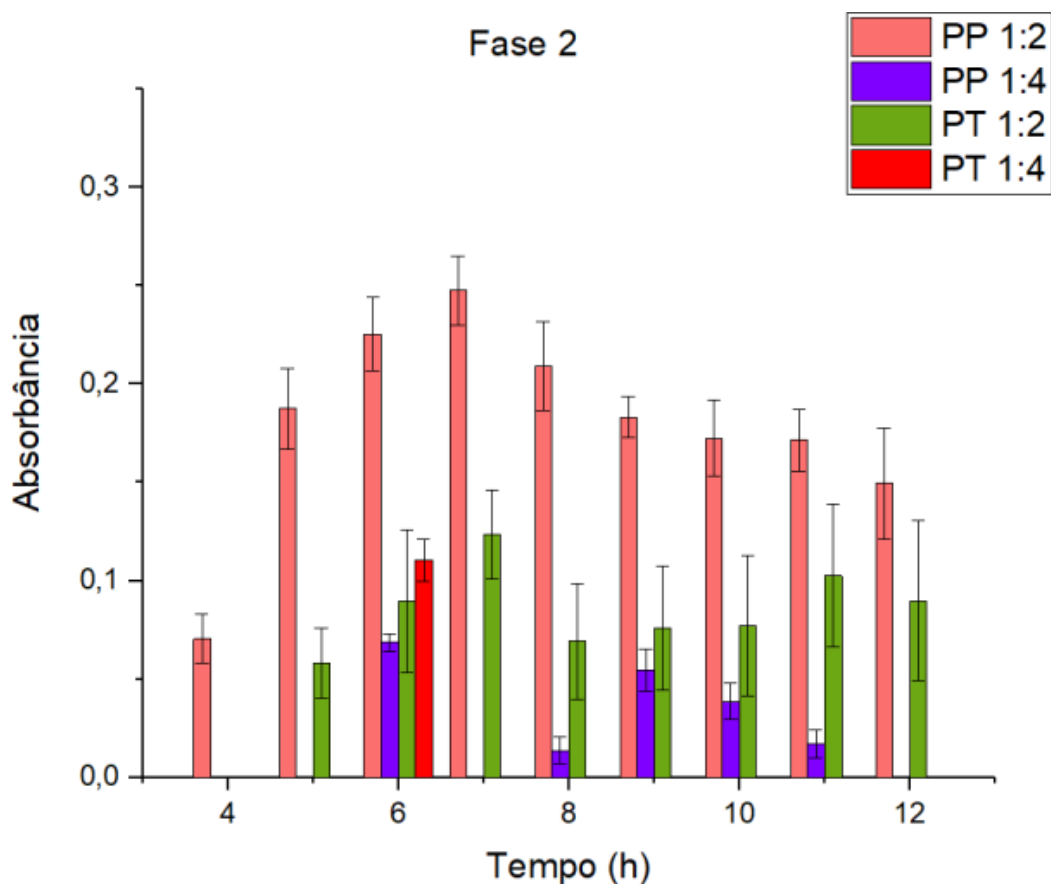


Figura 12 – Gráfico da absorbância pelo tempo das soluções de biossíntese sintetizadas pelos extratos bruto PP e PT para as diluições (1:2 e 1:4) analisadas por 12 horas, de 1 em 1 hora.

Foi observado o crescimento das Nps formadas através dos extratos PP e PT por 12 horas de 1 em 1 hora. A diluição PP 1:2 é a melhor, possuindo pico antes das 7 horas, a diluição PT 1:2 é segunda melhor e possui pico após as 7 horas.

A figura 13 apresenta a absorbância da solução PP 1:2 em relação ao comprimento de onda (300 a 800 nm) para cada hora por 24 horas, há 25 curvas (0 a 24 horas).

Apresentaram comprimentos de onda em torno de 540 nm comprovando a formação de AuNPs. A partir de uma diluição houve a presença de agregados, motivo mais provável do deslocamento de banda.

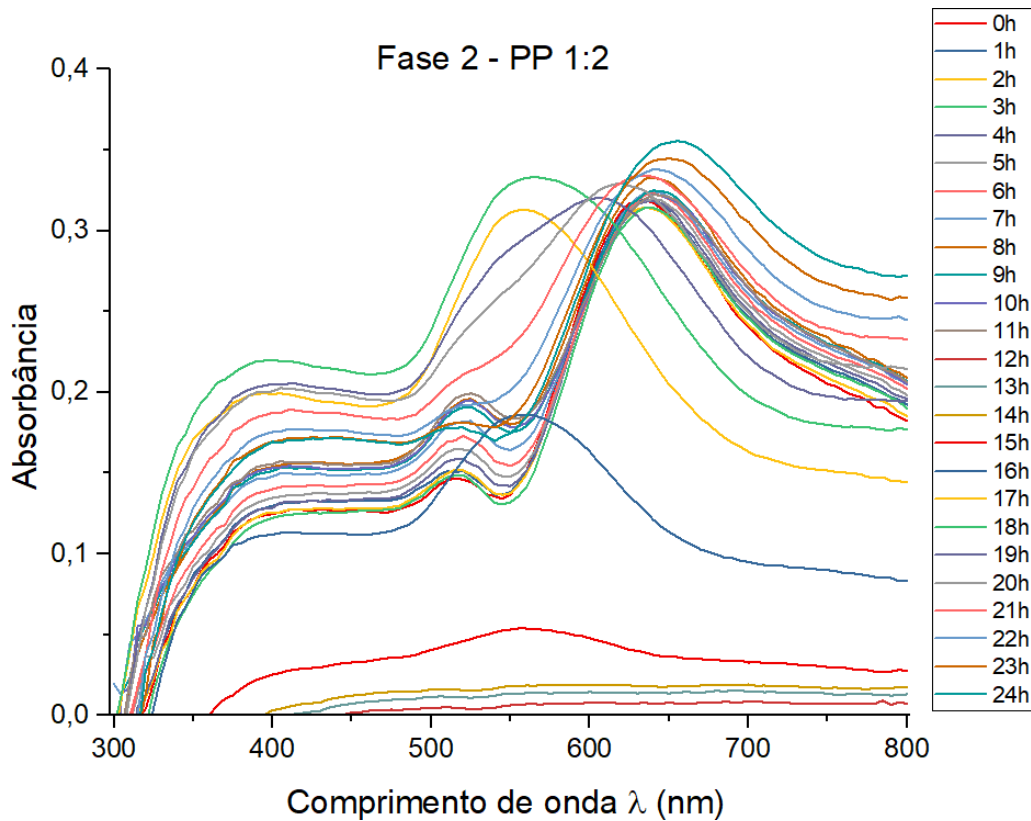


Figura 13 - Gráfico da absorvância pelo comprimento de onda para a solução de biossíntese PP (1:2), apresentando o comportamento em relação a absorvância e seu comprimento de onda correspondente para cada curva em um tempo específico, foi analisado por 24 horas, onde cada curva corresponde a 1 hora.

Analisando o gráfico gerado vemos que apresentam picos onde os comprimentos de onda giram em torno de 540 nm, comprovando a formação de AuNPs, há outros picos a diante possivelmente de agregados (já que a solução de AuNPs não possui agente limitante de tamanho), e é o mais provável ser o motivo do deslocamento de banda.

Foram analisados os comprimentos de onda das AuNps para a solução PP 1:2, de acordo com a hora da sua síntese até as 12 horas (figura 14).

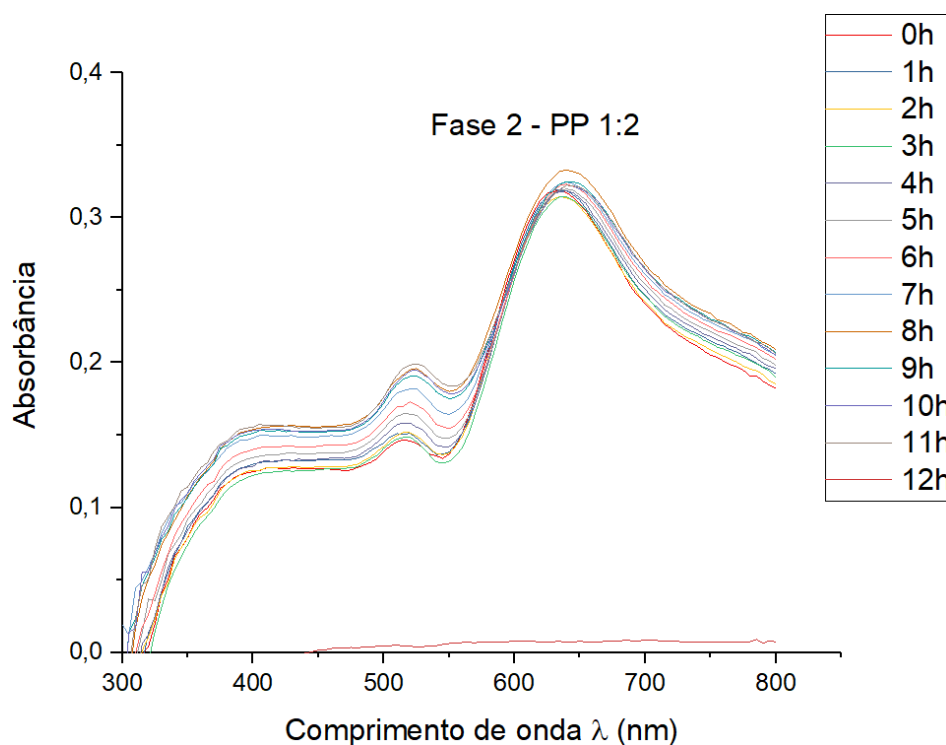


Figura 14 - Gráfico da absorvância pelo comprimento de onda para a solução de biossíntese PP (1:2), apresentando o comportamento em relação a absorvância e seu comprimento de onda correspondente para cada curva em um tempo específico, foi analisado por 12 horas.

Apresentaram comprimentos de onda em torno de 540 nm comprovando a formação de AuNPs. Notamos que até as 12 h o comportamento das curvas é parecido.

Os comprimentos de onda das AuNps foram analisados de acordo com a hora da sua síntese até as 12 horas, para a solução de PT 1:2 (figura 14).

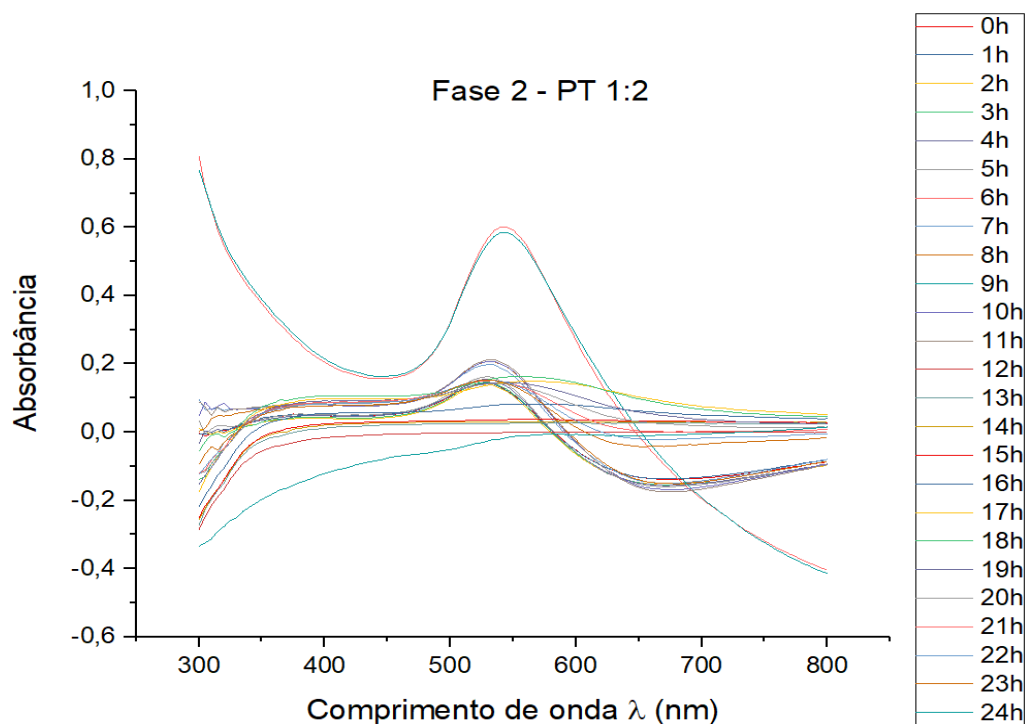


Figura 15 - Absorbância por comprimento de onda para o PT 1:2 por tempo (1 em 1 hora por 24 horas) para a faixa de comprimento de onda de 300 a 800nm.

Apresentaram comprimentos de onda em torno de 540 nm comprovando a formação de AuNPs, há menos compostos que a PP pois o espectro está mais limpo.

Ambas as sínteses de AuNps ocorrem a partir das 7 horas da reação de biossíntese, obtendo maior resultado entre 12 e 24 horas.

Tanto PP 1:4 quanto PT 1:4 não obtiveram bons resultados.

Fase 3

Diâmetro médio: 2 diluições cada (PP e PT)

Os extratos bruto da *P. polymyxa* e da *P. terrae* foram descongelados e utilizados para a biossíntese. A solução pura dos extratos bruto (EB "1") e as diluições 1:2 e 1:4 foram analisadas através da técnica de Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) Zetasizernano, da Malvern Instruments Ltda. do Grupo de Nanomedicina e Nanotoxicologia, GNano, do IFSC-USP. Foram gerados gráficos da Intensidade, Volume e Número de partículas. Somente os gráficos de Intensidade são apresentados. As figuras 16 e 17 apresentam os gráficos da distribuição do tamanho das Nps por intensidade para PP 1:2 e para PT 1:2.

- PP 1:2

Tabela 9 - Dados do DLS para PP 1:2.

Results				
	Size (d.nm)	% Intensity	St Dev (d.nm)	
Z-Average (d.nm): 231.0	Peak 1: 262.6	98.3	102.0	
Pdl: 0.225	Peak 2: 5171	1.7	489.8	
Intercept: 0.787	Peak 3: 0.000	0.0	0.000	
Result quality Good				

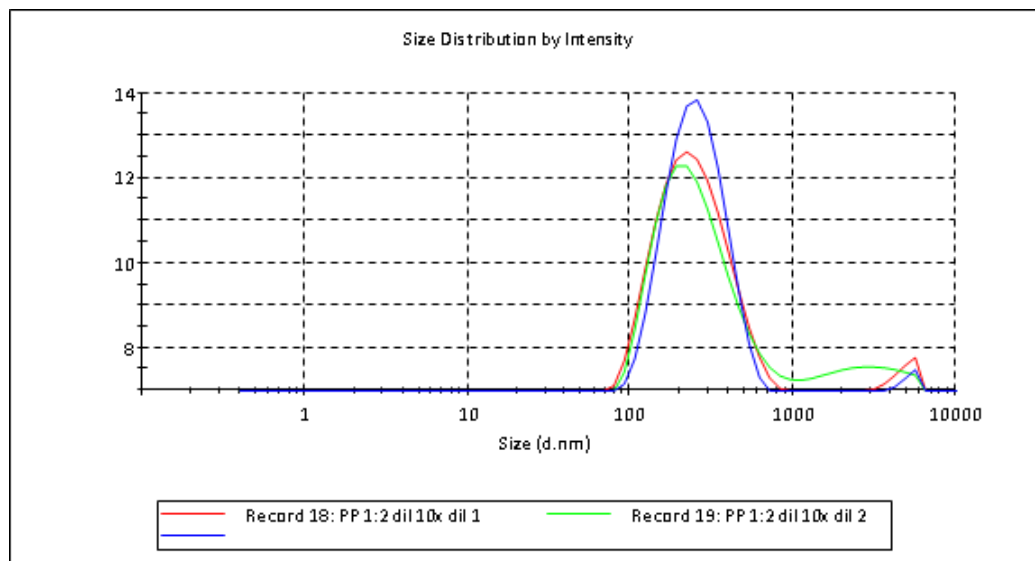


Figura 16 - Distribuição de tamanho por Intensidade.

Os dados de DLS do extrato PP 1:2 mostram três picos, sendo um deles das Nps de interesse e o outro indica a presença de aglomerados na solução. Sendo o primeiro pico, o diâmetro médio das AuNps é de 262,6 nm com desvio padrão de 102 nm, correspondendo a 98,3% da população mensurada, com tamanho médio de 231nm e Pdl (Índice de Polidispersão) de 0,225 demonstrando ser um sistema monodisperso.

- PT 1:2

Os dados de DLS do extrato PT 1:2 mostram três picos.

Results

	Size (d.nm...)	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm): 339.3	Peak 1: 372.1	91.4	197.6
Pdl: 0.380	Peak 2: 4533	8.6	880.8
Intercept: 0.859	Peak 3: 0.000	0.0	0.000

Result quality **Good**

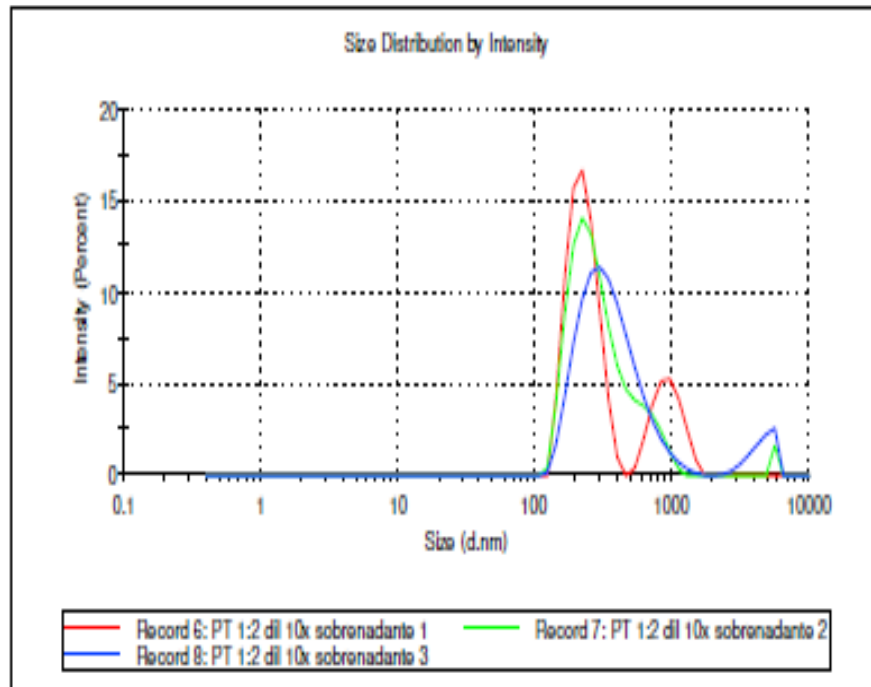


Figura 17 - Análise do Raio hidrodinâmico da AuNps para PT 1:2.

Vemos que o diâmetro médio das AuNps é de 339,3 nm, 91,4 % da Intensidade possui 262,6 nm desvio de 102. O Índice de Polidispersão (Pdl) é de 0,360, logo é homogênea a distribuição de tamanho da amostra, sendo um sistema monodisperso.

Os extratos bruto PP (1 e 1:4) e PT (1 e 1:4) não obtiveram boa leitura no DLS.

Comparando as AuNps sintetizadas no experimento com as AuNps da literatura (tabelas 4, 5 e 6), vemos que elas são muito maiores que as AuNps geradas por plantas (10 a 150 nm) de duas a três vezes maior que a maior delas, por bactérias (intra e extracelular: 10 a 50 nm) de cinco a sete vezes maior que a maior delas, e por fungos (intra e extracelular: 15 a 150 nm) cerca de duas vezes maior que a maior delas.

Através do extrato bruto do fungo, em no presente experimento, AuNps de (100 nm) cerca de duas a três vezes maior.

Futuramente mais análises e testes precisam ser feitas, afim de diminuir o diâmetro das AuNps para que sejam utilizadas na maioria das aplicações biomédicas (variam em diâmetro de 5 nm a 20 nm).

Já no campo da biotecnologia (variam em diâmetro entre 5 nm a 500 nm) as AuNps sintetizadas já possuem um tamanho interessante para serem empregadas.

7. Conclusão

Até o presente momento, foi possível sintetizar e otimizar a biossíntese de nanopartículas de ouro, em relação ao tempo, concentração e comprimento de onda e raio hidrodinâmico da partícula.

Pelo nosso conhecimento, esse se constitui no primeiro estudo a utilizar a biossíntese verde de nanopartículas de ouro empregando extrato bruto de *Paenibacillus polymyxa* e *P. terrae*, endofíticos isolados do cerrado de São Carlos.

Os microrganismos utilizados se mostraram boas biofábricas para síntese de nanopartículas.

A biossíntese otimizada não apresentou produtos tóxicos ao ambiente sendo uma importante ferramenta para obtenção de nanopartículas de ouro, com potencial uso na biotecnologia.

As soluções dos extratos bruto PP 1:2 e PT 1:2 foram as concentrações que obtiveram melhores resultados, com diâmetros médios de 262 nm e 372 nm, respectivamente.

Perspectivas Futuras

Diante da complexidade da formulação do material obtido, há a necessidade de realizar ainda mais análises que permitirão uma avaliação mais detalhada da qualidade deste material e potencial futuro.

A comparação entre as AuNps sintetizadas através de outros métodos se faz essencial, já que o diferencial dessa biossíntese de AuNps são também as substâncias adsorvidas pelas mesmas referente aos Extratos Bruto de PP e PT, já que esses extratos bruto possuem substâncias bioativas de interesse médico como agente bactericida e citotóxico para as células tumorais.

As AuNps necessitam de caracterização quanto aos grupos funcionais, pH, e sua atividade *in vitro* e *in vivo* como agente bactericida e antitumoral. A associação de técnicas também parece ser algo promissor já que essas Nps possuem ouro e substâncias de interesse farmacológicos adsorvidas em sua superfície.

Testar a biossíntese com a presença da fitobactéria pois pode gerar AuNps menores, já que pode ser sintetizada de forma intra celular ou extracelular através de alguma proteína da membrana da bactéria (hipótese), e assim ser mais aptas para ser utilizada em aplicações médicas devido ao seu tamanho.

Referências Bibliográficas

AKHTAR, M. S.; PANWAR, J.; YUN, Y.-S. Biogenic synthesis of metallic nanoparticles by plant extracts. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 1, n. 6, p. 591-602, 2013.

ALBERNAZ, V. **Síntese verde de nanopartículas de prata com extrato aquoso de folhas de *Brosimum gaudichaudii*, caracterização físico-química, morfológica e suas aplicações no desenvolvimento de um nanobiossensor eletroquímico.** [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DE BRASÍLIA, 2014.

ALI, S. A. Antibacterial properties and phytochemical screening of *Tamarix nilotica* leaves from Sudan. **GSC Biological and Pharmaceutical Sciences**, v. 03, n. 02, p. 006–010, 2018.

AMIRI, M; AMALI E; NEMATOLLAHZADEH A. Poly-dopamine thin film for voltammetric sensing of atenolol. **Sens Actuators B Chem**, v. 216, p.551–557, 2015.

ARAÚJO, W.L. Diversity of endophytic bacterial populations and their interection with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. In **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68, p. 4906-4914, 2002.

ASH, C., PRIEST, F. C.; COLLINS, M.D. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using PCR probe test. Proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 64, p. 253-260, 1993.

AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: GANGULI, B. N.; DESHMUKH, S. K. (Ed) *Fungi: multifaceted microbes*. **Boca Raton: CR Press**, p. 189-207, 2007.

FAUNGNAWAKIJ, K.; YOOSUK, B.; NAMUANGRUK, S.; KRASAE, P.; VIRIYA-EMPIKUL, N.; PUTTASAWAT, B. (2012). Sr–Mg mixed oxides as biodiesel production catalysts. **ChemCatChem**, 4(2), 209-216.

CAI, W.; GAO, T.; HONG, H.; SUN, J. Applications of gold nanoparticles in cancer nanotechnology. **Nanotechnology Science Applications**, n.1, p.17–32, 2008.

CAO, L.X. Isolation and characterization of endophytic *Streptomyces*

- antagonists of Fusarium wilt* pathogen from surface sterilized banana roots. **FEMS Microbiol Lett**, v. 247, p. 147-152, 2004.
- CASTILLO, U.F. Biologically active endophytic streptomycetes from *Nothofagus* spp. and other plants in Patagonia. **Microb Ecol**, v. 53, n. 1, p. 12-19, 2007.
- CAUERFF, A.; CASTRO G. R. Bionanoparticles, a green nanochemistry approach. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.16, p. 1-10, 2013.
- CAVICCHIOLI, R. (2017). Potencial biotecnológico do *Paenibacillus polymyxa* RNC-D, endófito isolado de *Prunus* sp.(Cerrado), para atividade antimicrobiana e inflamação aguda. UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, 2017.
- CLAUS, D.; BERKELEY, B. Manual of Systematic Bacteriology, **Baltimore, The Williams and Wilkins Co**, v. 2, p. 1105-1139, 1986.
- CHALOUKKA K.; MALAM. Y.; SEIFALIAN, A.M. Nanosilver as a new generation nanoparticle in biomedical applications. **Trends in Biotechnology**, v.28, p. 580-588, 2010.
- CHENG, J.; GU, Y-J.; CHENG, S. H.; WONG, W-T. Surface Functionalized Gold Nanoparticles for Drug Delivery. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 9, n. 8, p. 1362–1369, 2013.
- CIENFUEGOS, F.; VAITSMAN, D. **Análise instrumental**. Rio de Janeiro: Interciências, 2000.
- DASA, P.; GHOSALB, K.; JANA, N. K. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using belladonna mother tincture and its efficacy as a potential antibacterial and anti-inflammatory agent. **Material Chemistry and Physics**, v.228, pp. 310-317, 2019.
- DEMAIN, A.; SANCHEZ, S. Descoberta microbiana de medicamentos: 80 anos de progresso. **J Antibiot** **62**, 5-16 (2009).
- DEVI, H.S.; SINGH, T.D. Synthesis of copper oxide nanoparticles by a novel method and its application in the degradation of methyl orange. **Adv Electron Elect Eng**, v. 4, p. 83–88, 2014.
- GAO, J.H; XU, B. Applications of nanomaterials inside cells. **NanoToday**, v. 4, n. 1, p. 37-51, 2009.
- EUROPEAN COMMISSION. On the definition of a nanomaterial. **Official Journal**

of the European Union, v. 696, p. 38-40, 2011.

FERREIRA, D. M. **BIOSSÍNTESE OTIMIZADA DE NANOPARTÍCULAS DE OURO COM EXTRATO DE *Virola oleífera***. 2016. Dissertação (mestrado em Biotecnologia) – UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO, 2016.

GRASSIAN, V.H. Quando o tamanho realmente importa: propriedades dependentes do tamanho e química da superfície de nanopartículas de metal e óxido de metal em ambientes de fase gasosa e líquida. **O Journal of Physical Chemistry C**, v. 112, n. 47, p. 18303-18313, 2008.

GUIMARAES, D.O. Biological activities from extracts of endophytic fungi isolated from *Viguiera arenaria* and *Tithonia diversifolia*. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 52, n. 1, p. 134-144, 2008.

HAGE, D. S.; CARR, J. D. **Química analítica e análise quantitativa**. 1ª ed. Editora Pearson Prentice Hall. São Paulo, 2012.

HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa**. 5ª ed. Editora LTC. Rio de Janeiro, 2001.

HAZALIN, N.A. Cytotoxic and antibacterial activities of endophytic fungi isolated from plants at the National Park, Pahang, Malaysia. **BMC Complement Altern Med**, v. 21, n.9, p. 46, 2009.

HIRSCH, L.R.; STAFFORD, R.J.; BANKSON, J.A.; SERSHEN, S.R.; RIVERA, B.; PRICE, R.E.; HAZLE, J.D.; HALAS, N.J.; WEST, J.L. Nanoshell-mediated nearinfrared thermal therapy of tumours under magnetic resonance guidance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, p.13549–13554, 2003.

HOLLER, J. E.; SCKOOG, A. D.; CROUCH, R. S. **Princípios de análise instrumental**. 6ª edição. Editora Bookman, São Paulo. 2009.

HUANG, J.; CHEN, C.; HE, N.; et al. Biosynthesis of silver and gold nanoparticles by novel sun-dried *Cinnamomum camphora* leaf. **Nanotechnology**, v.18, p. 105–06, 2007.

HULIKERE, M. M.; CHANDRASHEKHAR, G. J.; NARAYANAPPA, G. R. Biofabrication of gold nanoparticles using marine endophytic fungus *Penicillium citrinum*. **IET Nanobiotechnology**, 2016

INGALE, A. G. Biogenic synthesis of nanoparticles and potential applications: an ecofriendly approach. **Journal of Nanomedicine & Nanotechnology**, v. 04, n. 02, 2013.

IRAVANI, S. Green synthesis of metal nanoparticles using plants. **Green Chemistry**, v. 13, n. 10, p. 2638, 2011

JAIN N.; BHARGAVA A.; TARAFDAR, J.C.; SINGH, S.K.; PANWAR, J. A biomimetic approach towards synthesis of zinc oxide nanoparticles. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.02, n.97, p. 859-69, 2013.

JULIANO, F. V. **Introdução aos métodos espectroanalíticos II**. 2013.

KIEMLE, D. J., SILVERSTEIN, R. M., WEBSTER, F. X. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. **LTC**, 2007.

KIRAN P. P.; AKSHIT P.; CHRIS P. Plant growth promotion and nitrogen fixation in canola by an endophytic strain of *Paenibacillus polymyxa* and its GFP-tagged derivative in a long-ter study. **Université Laval Bibliotheque**. 2016.

KUMAR, V.; YADAV, S. K. Plant-mediated synthesis of silver and gold nanoparticles and their applications. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 84, n. 2, p. 151-157, 2009.

LINK, S.; EL-SAYED, M. A. Size and Temperature Dependence of the Plasmon Absorption of Colloidal Gold Nanoparticles. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 103, n. 21, p. 4212, 1999.

LUO X.; MORRIN A.; KILLARD A.J., SMYTH M.R. Application of nanoparticles in electrochemical sensors and biosensors. **Electroanalysis**, v. 18, p. 319–326, 2006.

MANO, J.F.; SOUZA, R.A.; BOESEL, L.F.; NEVES, N. M. Bioinert, biodegradable and injectable polymeric matrix composites for hard tissue replacement: state of the art and recent developments. **Compos. Sci. Technol.**, v. 64, n. 6, p. 789-817, 2004.

MIGUEZ, G. O. Atlas do Câncer. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 62, n. 1, p. 61-62, 2016.

MISHRA, A. Biocatalytic and antimicrobial activities of gold nanoparticles synthesized by *Trichoderma* sp. **Bioresource Technology**, v. 166, p. 235-242, 2014.

MITTAL, A. K.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. **Biotechnology advances**, v. 31, n. 2, p. 346-356, 2013.

MONRAS, J.P; DIAZ, V.; BRAVO, D.; MONTES, R.A.; CHASTEEN, T.G.; ROMAN, I.O.; VASQUES, C.C.; PEREZ, J.M. Enhanced Glutathione Content Allows the In Vivo Synthesis of Fluorescent CdTe Nanoparticles by *Escherichia coli*. **Plos One**, v. 7, p.11, 2012.

NISHAMINY, K.; PHARM, D., Tigecycline: Um novo agente antimicrobiano de glicilciclina, **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 63, Ed 13, p. 1235–1243, 2006.

OLIVEIRA, J.H.H.L. et al. Isolamento da cefamicina C e de novos metabólitos oriundos de caldos de *Streptomyces clavuligerus* e de novas linhagens de *Streptomyces*. In SEMINÁRIO DO PROJETO TEMÁTICO FAPESP (Proc. 05/55079-4), 1, 2007, São Carlos. Anais de Resumos Estendidos. São Carlos, UFSCar, 2007. p. 25.

OBERDÖRSTER, G. et al. Nanotoxicity: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. **Environ Health Persp**, v. 113, p. 823 – 839, 2005.

PACIOTTI, G.F.; MAYER, L.; WEINREICH, D.; GOIA, D.; PAVEL, N.; MCLAUGHLIN, R.E.; TAMARKIN, L. Colloidal gold: A novel nanoparticle vector

- for tumour directed drug delivery. *Drug Delivery*, n.11, p.169–183, 2006.
- RAGHUNANDAN, D.; RAVISHANKAR, B.; SHARANBASAVA, G.; MAHESH, D.B.; HARSOOR, V.; YALAGATTI, M.S.; BHAGAWANRAJU, M.; VENKATARAMAN, A. Anti-cancer studies of noble metal nanoparticles synthesized using different plant extracts. **Cancer Nanotechnology**, v. 2, n. 1-6, p. 57-65, 2011.
- PADILHA, F. A. – **Microscopia Eletrônica de Transmissão** – Dept^o de Engenharia Metalúrgica e de Materiais – EPUSP, 2010.
- PEREIRA, M. K. **Ressonância de Plasmon de Superfície Localizado e Espalhamento Raman em Soluções Coloidais de Ouro**. [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, 2009.
- PINTO, J. P. D. M. (2017). **COMPETÊNCIAS PARA INOVAR NA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA BRASILEIRA**.
- PRASAD, T.; ELUMALAI, E. Biofabrication of Ag nanoparticles using Moringa oleifera leaf extract and their antimicrobial activity. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 1, n. 6, p. 439-42, 2011.
- PETRYAYEVA, E.; KRULL, U. J. Localized surface plasmon resonance: Nanostructures, bioassays and biosensing-A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 706, n. 1, p. 8–24, 2011.
- PIERONI, J. P.; CAPANEMA, L. X. D. L.; REIS, C.; SOUZA, J. O. B. D.; SILVA, L. G. D. **Terceirização da P&D de medicamentos: panorama do setor de testes pré-clínicos no Brasil**, 2009.
- PISSUWAN, D. et al. **Functionalised gold nanoparticles for controlling pathogenic bacteria**. [s.l.] Elsevier Ltd, 2010.
- RATNER, B.; HOFFMAN, A.; SCHOEN, F. **An Introduction to Materials in Medicine**. **Biomaterials Science**, 3 ed, Academic Press, 2013.
- RATTI, R.P. et al. Antagonistic properties of some microorganisms isolated from Brazilian tropical savannah plants against *Staphylococcus coagulase-positive* strain. **J Venom Anim Tox incl. Trop Dis**, v. 14, n. 2, p. 294-302, 2008.
- RAVEENDRAN P., FU J., WALLEN S.L. Completely “green” synthesis and stabilization of metal nanoparticles. **J Am Chem Soc**, v. 125, p. 13940–13941, 2003.
- RAI, M.; GADE, A.; YADAV, A. “Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials”. **Biotechnol. Advan.**, v. 27, n. 1, p.76-83, 2009.

ROCHA, R. R. Química verde: Síntese de nanopartículas de prata utilizando extratos vegetais. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. 2010.

ROMANO, L. Bioprospecção de microrganismos endofíticos isolados da *Tabebuia spp* e *Hymenaea courbaril* e identificação da produção de metabólitos de interesse biotecnológico. **Tese de doutorado**. 2015.

SALAM, H. A. et al. Plants: Green Route for Nanoparticle Synthesis. *International Research Journal of Biological Sciences*, v. 1, n.5, p. 85-90, 2012.

SALATA, O. Applications of nanoparticles in biology and medicine. **J Nanobiotechnol**, v. 2, p.3, 2004.

SAWOSZ E.; CHWALIBOG A.; SZELIGA J.; SAWOSZ F.; GRODZIK M.; RUPIEWICZ M.; NIEMIEC T., KACPRZYK K. Visualization of gold and platinum nanoparticles interacting with *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Nanomedicine**, v. 5, p.631-7, 2010.

SERRANO, N. F. G. *et al.* Optimal glucose and inoculum concentrations for production of bioactive molecules by *Paenibacillus polymyxa* RNC-D. **Chem Papers**, v. 66, n. 12, p. 1111– 1117, 2012.

SERRANO, N. Produção de compostos antimicrobianos por *Paenibacillus polymyxa* RNC-D: otimização das condições de cultivo, purificação e caracterização dos bioprodutos. **Tese de doutorado**. 2014.

SILVA, L. P.; BONATTO, C. C.; PEREIRA, F. D. E. S.; SILVA, L. D.; ALBERNAZ, V. L.; POLEZ, V. L. P. Nanotecnologia verde para síntese de nanopartículas metálicas. **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria**, v. 4, p. 967 -1012, 2017.

SONG, J.Y.; KWON, E.Y.; KIM, B.S. Biological synthesis of platinum nanoparticles using *Diopyros kaki* leaf extract. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 33, n. 1, p.1 59-64, 2010.

SCOTT, A. B.; SMITH, W. A.; THOMPSON, M. A. Alkali Halides Colored By Colloidal Metal. **Journal of Physical Chemistry**, v. 57, n. 8, p. 757–761, 1953.

SINGH, A. K.; SRIVASTAVA, O.N. One-Step Green Synthesis of Gold Nanoparticles Using Black Cardamom and Effect of pH on Its Synthesis. **Nanoscale Research Letters**, n. 10, p.353, 2015.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F.; NIEMAN, T. A. Princípios de Análise Instrumental, 5o ed., Ed. Bookman, Porto Alegre, 2002.

TOMA, H.E.; ARAKI, K. Nanotecnologia Molecular. **Ciência Hoje USP**, v. 48, n. 284, 2011.

THOMPSON, J. A., Microbead-based biosensing in microfluidic devices. Disponível em <<http://repository.upenn.edu/edissertations/334>>. Acesso em: 15 de março de 2020.

XIU, Z.M, ZHANG, Q.B., PUPPALA, H.L., COLVIN L., ALVAREZ, P.J. Negligible particlespecific antibacterial activity of silver nanoparticles. **Nano Lett**, v. 12, p. 4271-5, 2012.

WANG, H.-B.et al. A label-free and ultrasensitive fluorescent sensor for dopamine detection based on double-stranded DNA templated copper nanoparticles. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 220, p. 146–153, 2015.

ZHANG A.; LIU M.; LIU M.; XIAO Y.; LI Z.; CHEN J.; SUN Y.; ZHAO J.; FANG S; JIA D. Homogeneous Pd nanoparticles produced in direct reactions: green synthesis, formation mechanism and catalysis properties. **J Am Mater Chem**, v. 2: p.1369–1374, 2014.

ZHANG H.; Y.U, X.; GUO, D.; QU, B.; ZHANG, M., LI, Q.; WANG, T. Synthesis of Bacteria Promoted Reduced Graphene Oxide-Nickel Sulfide Networks for Advanced Supercapacitors. **Acs Applied Materials & Interfaces**, v. 5, n. 5, p. 7335-40, 2013.

ZHENG, Y.; SACHE, L. Gold nanoparticles enhance dna damage induced by anticancer drugs and radiation. *Radiation Research*, v.172, p.114–119, 2009.

ZHOU, Y. et al. Biosynthesis of Gold Nanoparticles by Foliar Broths: Roles of Biocompounds and Other Attributes of the Extracts. *Nanoscale Research Letters*, n.5, p.1351–1359, 2010.