

**Biossíntese e caracterização de nanopartículas de prata (AgNPs) por *Bacillus licheniformis*<sup>1</sup>**

**Mikaely Sousa Marins<sup>2</sup>, Christiane Abreu de Oliveira Paiva<sup>3</sup>, Ivanildo Evódio Marriel<sup>3</sup>,  
Marcos de Oliveira Pinto<sup>4</sup>, Ricardo Augusto Moreira de Souza Corrêa<sup>5</sup>**

<sup>1</sup>Trabalho financiado pelo CNPq

<sup>2</sup> Estudante do Curso de Biotecnologia da Faculdade Ciências da Vida, Bolsista PIBIC do Convênio CNPq

<sup>3</sup> Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo

<sup>4</sup> Analista da Embrapa Milho e Sorgo

<sup>5</sup> Docente na Faculdade Ciências da Vida, Mestre em Química pela Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

## **1. Introdução**

A nanotecnologia é uma ciência interdisciplinar que tem se expandido pela ampla gama de propriedades disponíveis na escala nanométrica. O avanço da tecnologia ampliou o interesse industrial pelo desenvolvimento de abordagens biológicas que viabilizem sínteses rentáveis e não tóxicas ao ambiente, como a síntese de nanopartículas (NPs). Dentre as diversas metodologias de biossíntese propostas, a utilização de microrganismos apresenta privilégios como: facilidade em manipular as estirpes geneticamente a fim de favorecer o processo, não exigência de grande grau de pureza do substrato, fácil aplicação em larga escala, não geração de substâncias tóxicas ao ambiente e menor custo de manutenção dos catalisadores (Kalimuthu et al., 2010; Edmundson et al., 2014; Hulkoti; Taranath, 2014; Thomas et al., 2015).

A biossíntese através de microrganismos pode ocorrer de forma intracelular ou extracelular. No método intracelular há uma interação eletrostática entre a carga positiva dos íons em solução e a carga negativa da membrana celular do microrganismo, gerando transporte dos íons para o interior da célula que irão se agrupar formando NPs. A grande desvantagem da metodologia é devida à necessidade de tratamentos adicionais como ultrassom ou reações com detergentes específicos para liberar as NPs sintetizadas (Srivastava et al., 2013; Das et al., 2014; Hulkoti; Taranath, 2014; Thomas et al., 2015).

O processo extracelular utiliza células, sobrenadantes de culturas ou extrato celular aquoso para a biossíntese. A principal vantagem do método é a facilidade em recuperar o produto em solução que, geralmente, é feito por centrifugação em alta velocidade (10.000 a 20.000 rpm) da solução contendo as NPs. A principal rota de síntese ocorre através de biomoléculas secretadas pelas células no meio. Elbeshehy et al. (2015) demonstraram

biossíntese extracelular de AgNPs por diferentes cepas de *Bacillus* com dimensões de 77 a 92 nanômetros (nm).

Sistemas de foto indução estão sendo empregados no processo de biossíntese de NPs para favorecer a oxidação ou redução catalítica. Em particular a radiação solar destaca-se entre as demais por ser um método não tóxico, rentável, renovável, rápido e que possibilita controlar o tamanho das NPs (Prathna et al., 2014; Mathew et al., 2017).

Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial biotecnológico do sobrenadante da cepa de *Bacillus licheniformis* 29/C3 em biossintetizar nanopartículas de prata, bem como analisar a atribuição da luz solar durante a reação e promover biocontrole *in vitro* do patógeno *Pantoea ananatis*.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1. Reativação da estirpe**

Selecionou-se a estirpe de *B. licheniformis* 29/C3 proveniente da Coleção de Microrganismos Multifuncionais e Fitopatogênicos da Embrapa Milho e Sorgo (CMMF) pré-classificada como termoresistentes. Esta foi reativada em meio Trypticase Soy Agar (TSA) pelo método de estrias múltiplas para obtenção de colônias isoladas. O crescimento ocorreu a 45 °C por 48 horas.

### **2.2. Biossíntese de AgNPs**

Um repique da colônia pura foi inoculado em 300 mL de meio Nutriente Broth (NB) e incubado a 37 °C com agitação constante de 110 rpm por 24 horas. Após o período de incubação, a amostra foi centrifugada a 8.000 rpm por 10 minutos utilizando-se uma centrífuga Hettich Zentrifugen – Universal 320 para obtenção do sobrenadante da cultura.

Solução aquosa contendo 5% de sobrenadante de cultura e nitrato de prata na concentração de 1,0 mM foi preparada. A solução foi incubada por 105 min a 37 °C, com agitação de 110 rpm sob presença de luz solar direta. Solução com 5% de sobrenadante de cultura sem nitrato de prata foi mantida nas mesmas condições e utilizada como controle. Alíquotas das soluções foram retiradas a cada 15 minutos e analisadas por varredura espectrofotométrica na faixa de 300 a 700 nm.

### **2.3. Caracterização por espectrofotometria**

A caracterização das AgNPs foi conduzida em espectrofotômetro UV-Vis (The FLUOstar® Omega – BMG labtech) utilizando-se placas COSTAR 3799 (Corning

Incorporated – USA), 96 poços de 0,64 cm de caminho óptico e 300  $\mu$ L de capacidade total. Espectros foram obtidos a cada 15 minutos de reação. As leituras foram realizadas em triplicata (n=3).

## 2.4. Atividade antimicrobiana

Uma cepa de *P. ananatis* (2008) da Coleção de Microrganismos Multifuncionais e Fitopatogênicos da Embrapa Milho e Sorgo (CMMF) foi selecionada para teste de antagonismo em placa pelo método de Kirby-Bauer (Bauer et al., 1966). Uma alíquota de suspensão bacteriana foi inoculada em placa de Petri contendo meio Batata Dextrose Ágar (BDA) e espalhada por toda a superfície do meio utilizando alça de Drigalski. Discos de papel (6 mm) embebidos na solução concentrada de AgNPs foram aderidos ao meio de cultura. As placas foram incubadas a 37 °C por 48 horas.

## 3. Resultados e Discussão

### 3.1. Espectrofotometria da biossíntese de AgNPs

Para determinar a progressão da síntese de AgNPs, alíquotas da reação foram analisadas por espectroscopia UV-vis com intervalo de 15 minutos até atingir a estabilidade da reação, que ocorreu entre 1 hora e 1 hora e 15 minutos (Figura 1).

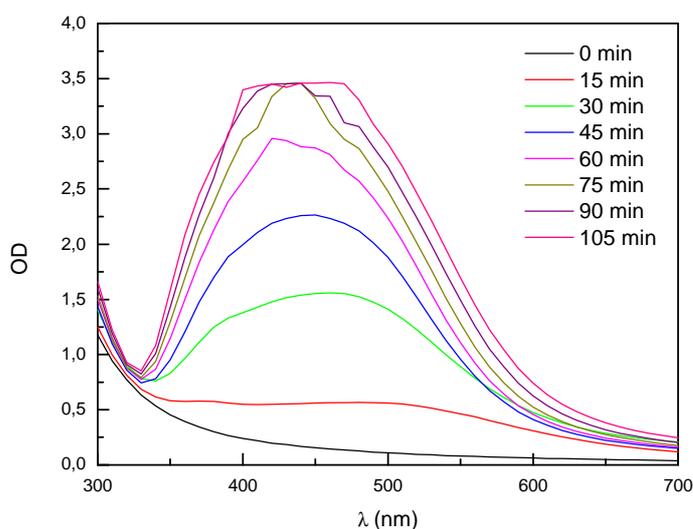


FIGURA 1 - Espectros da progressão da biossíntese de AgNPs a partir de sobrenadante de cultura exposto a luz solar direta.

Christopher et al. (2011) enfatizam que nanoestruturas de prata podem utilizar luz de intensidade solar para favorecer a oxidação catalítica. Em um delineamento experimental

proposto por Srikar et al. (2016), uma comparação entre luz ambiente, luz solar e ausência de luz foi feita para determinar a influência da luz no processo. Como resultado, demonstraram que a catálise pela luz solar com incidência direta aumentou a velocidade da reação 60 vezes quando comparada à luz ambiente e que não houve redução da prata na ausência de luz.

### 3.2. Atividade antimicrobiana

Após 48 horas de incubação foi possível identificar a atividade antimicrobiana das AgNPs contra *P. ananatis* através do halo de inibição médio de 2,45 cm (n=3) como demonstrado na Figura 2. A *P. ananatis* é uma bactéria gram-negativa, anaeróbica facultativa considerada um dos principais fitopatógenos do milho, responsável por causar a doença conhecida como mancha-branca-do-milho (MBM). Através da alta incidência do patógeno, a doença promove perda na produtividade que gera danos significativos para agricultura (Mamede, 2018). Mamede (2018) inibiu *in vitro* o crescimento de *P. ananatis* (halo inibitório = 1,10 cm) utilizando nanopartículas de ZnO dopadas com prata.

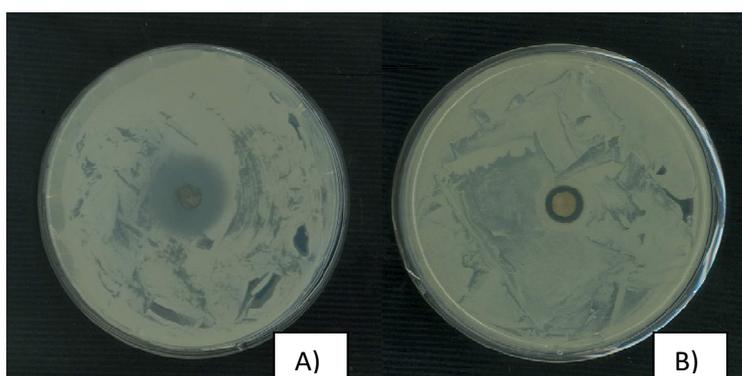


FIGURA 2 - Biocontrole de *Pantoea ananatis* em placa com disco de papel embebido na solução de AgNPs. (A) Halo de inibição de *P. ananatis* por disco de papel contendo as nanopartículas. (B) Disco de papel embebido em solução de nitrato de prata a 1mM (Controle).

### 4. Conclusão

O sobrenadante da cultura de *B. licheniformis* demonstrou-se eficiente no processo de biossíntese de AgNPs. A confirmação da síntese de AgNPs decorreu através de espectroscopia UV-vis obtendo absorção máxima da luz no comprimento de onda de aproximadamente 420 nm. O nanomaterial obtido demonstrou eficiência *in vitro* no biocontrole do patógeno do milho *P. ananatis*. Ademais, sugere-se que análises de caracterização do nanomaterial sejam feitas a fim de identificar especificidades e aplicabilidades do produto.

## 5. Referências

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, Oxford, v. 45, n. 4, p. 493-496, 1966.

CHRISTOPHER, P.; XIN, H.; LINIC, S. Visible-light-enhanced catalytic oxidation reactions on plasmonic silver nanostructures. **Nature Chemistry**, v. 3, p. 467-472, 2011.

DAS, V. L.; THOMAS, R.; VARGHESE, R. T.; SONIYA, E. V.; MATHEW, J.; RADHAKRISHNAN, E. K. Extracellular synthesis of silver nanoparticles by the *Bacillus* strain CS 11 isolated from industrialized area. **3 Biotech**, v. 4, n. 2, p. 121-126, 2014.

EDMUNDSON, M. C.; CAPENESS, M.; HORSFALL, L. Exploring the potential of metallic nanoparticles within synthetic biology. **New Biotechnology**, v. 31, n. 6, p. 572-578, 2014.

ELBESHEHY, E. K. F.; ELAZZAZY, A. M.; AGGELIS, G. Silver nanoparticles synthesis mediated by new isolates of *Bacillus* spp., nanoparticle characterization and their activity against Bean Yellow Mosaic Virus and human pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1-13, 2015.

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

MAMEDE, M. C. **Detecção de *Pantoea ananatis* em sementes de milho e nanopartículas no controle da bactéria *in vitro***. 2018. 77 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018.

MATHEW, S.; PRAKASH, A.; RADHAKRISHNAN, E. K. Sunlight mediated rapid synthesis of small size range silver nanoparticles using *Zingiber officinale* rhizome extract and its antibacterial activity analysis. **Inorganic and Nano-Metal Chemistry**, v. 48, n. 2, p. 139-145, 2017.

KALIMUTHU, K.; VENKATARAMAN, D.; SURESHBABURAM K. P.; MUNIASAMY, K.; SELVARAJ, B.; BOSE, K.; SANGILYANDI, G. Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using *Brevibacterium casei*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 77, n. 2, p. 257-262, 2010.

PRATHNA, T. C.; RAICHUR, A. M.; CHANDRASEKARAN, N.; MUKHERJEE, A. Sunlight irradiation induced green synthesis of stable silver nanoparticles using *Citrus limon* extract. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, India Section B: Biological Sciences, Allahabad, v. 84, n. 1, p. 65-70, 2014.

SRIKAR, S. K.; GIRI, D. D.; PAL, D. B.; MISHRA, P. K.; UPADHYAY, S. N. Light induced green synthesis of silver nanoparticles using aqueous extract of *Prunus mygdalus*. **Green and Sustainable Chemistry**, v. 6, n. 1, p. 26-33, 2016.

SRIVASTAVA, P.; BRAGANÇA, J.; RAMANAN, S.R.; KOWSHIK, M. Synthesis of silver nanoparticles using haloarchaeal isolate *Halococcus salifodinae* BK3. **Extremophiles**, Tokyo, v. 17, n. 5, p. 821-831, 2013.

THOMAS, R.; JANARDHANAN, A.; VARGHESE, R. T.; SONIYA, E. V.; MATHEW, J.; RADHAKRISHNAN, E. K. Antibacterial properties of silver nanoparticles synthesized by marine *Ochrobactrum* sp. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 45, n. 4, p. 121-1227, 2015.