



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ- REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL**

**VIVIANNE FERREIRA ARAÚJO**

**TÍTULO**

**SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA POR MICRORGANISMOS  
FILAMENTOSOS (Fungos e Actinomicetos) ISOLADOS DA CAATINGA E AVALIAÇÃO DAS  
PROPRIEDADES BIOLÓGICAS APLICADAS À AGROPECUÁRIA**

Recife, março de 2024



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**PRÓ- REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL**

**VIVIANNE FERREIRA ARAÚJO**

**SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA POR MICRORGANISMOS**  
**FILAMENTOSOS (Fungos e Actinomicetos) ISOLADOS DA CAATINGA E AVALIAÇÃO**  
**DAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS APLICADAS À AGROPECUÁRIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Biociência Animal. Área de concentração: Biotecnologia.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>.Dr<sup>ª</sup>. Ana Lúcia F Porto

Recife, março de 2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE  
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

A663s Araújo, Vivianne Ferreira.

Síntese verde de nanopartículas de prata por microorganismos filamentosos (Fungos e Actinomicetos) isolados da caatinga e avaliação das propriedades biológicas aplicadas à agropecuária / Vivianne Ferreira Araújo. – Recife, 2024.  
87 f.

Orientador(a): Ana Lúcia F. Porto.

Co-orientador(a): Juanize M. S. Batista.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Recife, BR-PE, 2024.

Inclui referências.

1. Síntese verde.
2. Nanopartículas de prata.
3. *Streptomyces*
4. Fungos filamentosos I. Porto, Ana Lúcia F., orient. II. Batista, Juanize M. S., coorient. III. Título

CDD 796

**VIVIANNE FERREIRA ARAÚJO**

**SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA POR MICRORGANISMOS  
FILAMENTOSOS (Fungos e Actinomicetos) ISOLADOS DA CAATINGA E AVALIAÇÃO  
DAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS APLICADAS À AGROPECUÁRIA**

Dissertação apresentada ao Programa de  
Biotecnologia Animal da Universidade Federal  
Rural de Pernambuco, como requisito para  
obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia  
Animal. Área de concentração: Biotecnologia.  
Orientadora: Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup>. Ana Lúcia F Porto  
Co-Orientação: Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup>. Juanize M. S. Batista

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Lúcia Figueiredo Porto (Presidente)  
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal - DMFA

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Raquel Pedrosa Bezerra (membro interno)  
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – DMFA

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia Nieves Carneiro da Cunha (membro externo)  
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal - DMFA

---

Prof. Dr. Thiago Pajeú Nascimento (membro externo)  
Universidade Federal do Piauí

Recife, março de 2024

## **DEDICATÓRIA**

**"Dedico à minha família, cujo amor e apoio incondicional foram a luz que guiou cada passo desta jornada, e à minha Orientadora Professora Ana Porto, cuja sabedoria e incentivo foram fundamentais para este trabalho, dedico esta dissertação com profunda gratidão."**

## AGRADECIMENTOS

Queridos amigos, familiares e membros da banca,

É com grande emoção e gratidão que dedico esta dissertação aos incríveis indivíduos que me acompanharam nesta jornada acadêmica. Cada página escrita foi impulsionada pelo apoio, incentivo e compreensão daqueles que estiveram ao meu lado durante este desafiador percurso.

À minha família, as minhas princesas Marias Júlia e Carol, em especial ao meu companheiro de vida, Romero, por seu amor incondicional, paciência e encorajamento constante, vocês são a minha força motriz. À minha orientadora Prof<sup>ª</sup> Ana Porto, cuja sabedoria, orientação e apoio foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho, sou imensamente grata. Incluo também nessas palavras, Juanize Matias, minha Co-orientadora, por todo o apoio ao longo do projeto de mestrado, e a Kethylen Cardoso pela dedicação e auxílio na descrição dos trabalhos.

Aos meus amigos e colegas de curso, ao Professor Leucio Duarte, obrigada por compartilharem comigo as alegrias e os desafios desta jornada acadêmica.

À banca examinadora, agradeço o tempo e dedicação em analisar este trabalho e contribuir com valiosas sugestões e críticas construtivas, e que juntamente com o Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da UFRPE fazem parte da história que escreve a minha vida.

Por fim, agradeço a todas as fontes de inspiração que tornaram possível este estudo. Que esta dissertação possa contribuir de forma significativa para o avanço do conhecimento em nossa área de estudo.

Com sincera gratidão,

## RESUMO

As nanopartículas metálicas (NPM) tem despertado grande interesse da comunidade científica nos últimos anos devido ao seu grande número de aplicações em diversas áreas da ciência. O presente trabalho teve como objetivo sintetizar nanopartículas de prata utilizando fungos filamentosos e Actinomicetos (Gênero *Streptomyces*), e caracterizá-las quanto a sua natureza físico-química, bem como avaliar seu potencial biológico. Para a produção e biossíntese extracelular das nanopartículas de prata (AgNPs) foram utilizados os fungos: *Aspergillus tamarii*, *Mucor subtilissimus*, *Aspergillus terreus* e 4 linhagens de Actinomicetos (*Streptomyces* sp. DPUA 1542, *S.* sp. DPUA 1557, *S. malasyensis* DPUA 1571, *S. parvulus* DPUA 1573). Após a síntese verde, as AgNPs foram caracterizadas através de espectrofotometria UV-Vis, espectroscopia FTIR, Difração de raios-X (DRX), tamanho de partícula (DLS) e potencial ZETA, bem como a avaliação da atividade carrapaticida e cupinicida. Os resultados obtidos quanto a síntese de AgNPs demonstraram que os fungos filamentosos testados não foram capazes de produzir AgNPs. Porém, duas das linhagens de *Streptomyces* (*Streptomyces* sp. DPUA 1542 e *Streptomyces* sp. DPUA 1557) apresentaram produção significativa, e estas foram utilizadas para os ensaios de caracterização. A linhagem *Streptomyces* sp. DPUA 1542 (cultivada no meio ISP-2) obteve AgNPs com alterações na propriedade de Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR) na região próxima ao comprimento 420nm. Enquanto, as AgNPs oriundas do *Streptomyces* sp. DPUA 1557, utilizando farinha de soja, apresentou variação SPR na região próxima ao comprimento 400nm. Análise do potencial zeta evidenciou picos de -26,46 mV (para as AgNPs de *Streptomyces* sp. DPUA 1557) e -26,9 mV (para as AgNPs de *Streptomyces* sp. DPUA 1542), indicando um bom estado de estabilidade das partículas. Quando submetidas aos ensaios biológicos visando avaliar atividade carrapaticida e atividade termicida, as nanopartículas não apresentaram efeito frente ao carrapato *Dermaceter nitens*. No entanto, foram observados excelentes resultados, 100% de eficácia quando testadas frente ao cupim *Nasutitermes corniger* e, principalmente quando associadas ao Extrato aquoso de *Cassia grandis*, planta largamente encontrada no Sertão Pernambucano. Os processos de síntese utilizados apresentaram alta reprodutibilidade, e estão de acordo com os princípios da química verde e da sustentabilidade, apresentando-se como uma alternativa de baixo custo e biocompatível na síntese de AgNPs.

**Palavras-chaves:** Síntese verde, nanopartículas de prata, *Streptomyces*, fungos filamentosos.

## ABSTRACT

Metallic nanoparticles (MNPs) have aroused significant interest within the scientific community in recent years due to their wide range of applications across various scientific fields. The present study aimed to synthesize silver nanoparticles using filamentous fungi and Actinomycetes (Genus Streptomyces), and to characterize them regarding their physicochemical nature, as well as to evaluate their biological potential. Brief, for the production and extracellular biosynthesis of silver nanoparticles (AgNPs), the fungi *Aspergillus tamarii*, *Mucor subtilissimus*, *Aspergillus terreus*, and 4 strains of Actinomycetes (*Streptomyces* sp. DPUA 1542, *S.* sp. DPUA 1557, *S. malasyensis* DPUA 1571, *S. parvulus* DPUA 1573) were utilized. Following green synthesis, the AgNPs were characterized using UV-Vis spectrophotometry, FTIR spectroscopy, X-ray diffraction (XRD), dynamic light scattering (DLS), and Zeta potential, as well as the evaluation of acaricidal and termiticidal activity. The results obtained regarding the synthesis of AgNPs demonstrated that the tested filamentous fungi were not capable of producing AgNPs. However, two of the Streptomyces strains (*Streptomyces* sp. DPUA 1542 and *Streptomyces* sp. DPUA 1557) exhibited significant production, and these were utilized for characterization assays. The strain *Streptomyces* sp. DPUA 1542 (cultivated in ISP-2 medium) obtained AgNPs with alterations in the Surface Plasmon Resonance (SPR) property in the region near the 420nm length. Meanwhile, the AgNPs derived from *Streptomyces* sp. DPUA 1557, using soy flour, showed SPR variation in the region near the 400nm length. Zeta potential analysis revealed peaks of -26.46 mV (for AgNPs from *Streptomyces* sp. DPUA 1557) and -26.9 mV (for AgNPs from *Streptomyces* sp. DPUA 1542), indicating a good state of particle stability. When subjected to biological assays aimed at evaluating acaricidal and termiticidal activity, the nanoparticles showed no effect against the *Dermaceter nitens* tick. However, excellent results were observed, with 100% efficacy when tested against the termite *Nasutitermes corniger*, particularly when associated with the aqueous extract of *Cassia grandis*, a plant widely found in the Pernambuco hinterland. The synthesis processes used showed high reproducibility and are in accordance with the principles of green chemistry and sustainability, presenting themselves as a low-cost and biocompatible alternative in AgNPs synthesis.

**Keywords:** Green synthesis, silver nanoparticles, Streptomyces, filamentous fungi.

## SUMÁRIO

### Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>14</b>
<b>2.1. BIOSÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA</b> .....	<b>14</b>
<b>2.1.1 NANOTECNOLOGIA</b> .....	<b>14</b>
<b>2.1.2 NANOPARTÍCULAS METÁLICAS (NPM) / NANOPARTÍCULAS DE PRATA</b> .....	<b>15</b>
<b>2.1.3 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS</b> .....	<b>16</b>
<b>2.1.4 SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS</b> .....	<b>17</b>
<b>2.2 SÍNTESE BIOLÓGICA DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS POR MICRORGANISMOS</b> .....	<b>18</b>
<b>2.3 ACTINOBACTÉRIAS E SUAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS</b> .....	<b>20</b>
<b>2.4 BIOSÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS POR FUNGOS</b> .....	<b>20</b>
<b>2.5 PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA</b> .....	<b>21</b>
<b>2.6 ATIVIDADE CARRAPATICIDA</b> .....	<b>23</b>
<b>2.7 ATIVIDADE CUPINICIDA (TERMICIDA)</b> .....	<b>24</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>27</b>
<b>3.1 OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>27</b>
<b>4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>28</b>
<b>CAPÍTULO I – ARTIGO CIENTÍFICO</b> .....	<b>33</b>
<b>CAPÍTULO II - PATENTE</b> .....	<b>53</b>
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>61</b>

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** A figura A apresenta a abordagem top-down de síntese de nanopartículas a partir da redução do tamanho de uma (B) macropartícula a uma (C) nanopartícula. O rearranjo dos seus átomos revela uma maior energia superficial das nanopartículas (CAO, 2021 / Adaptada pelo Autor).

**Figura 2.** Análise do tamanho entre nanomateriais e moléculas em nanoescala. Avaliação modificada por YOKEL E MACPHAIL, 2022.

**Figura 3.** Ressonância Plasmônica de Superfície (Surface Plasmon Resonance) de nanopartículas. A - Força restauradora e a indução do dipolo, quando acopladas, geram a ressonância plasmônica. B- Superfície plasmônica. (Adaptado de Rycenga et al., 2011)

**Figura 4.** Síntese biológica de nanopartículas de prata utilizando *Streptomyces*. Fatores que influenciam a reação: pH, concentração de prata, concentração de biomoléculas, temperatura, tempo de reação.

**Figura 5.** Fases do processo de formação de nanopartículas.

**Figura 6.** Morfologia da colônia de *Streptomyces parvulus* através de Microscopia eletrônica de varredura (Figura obtida e ajustada por BAYGAR et al., 2015).

**Figura 7.** Microscopia eletrônica de Varredura apresentando nanopartículas de prata sintetizadas por *Streptomyces griseoporubes* (Figura obtida e modificada por BAYGAR et al., 2015).

**Figura 8** – Aplicações usuais das AgNPs.

## **LISTA DE TABELAS**

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**AgNO<sub>3</sub>** – Nitrato de Prata

**NP** – Nanopartículas

**AgNP** – Nanopartículas de Prata

**ECg-AgNP** – Nanopartículas de Prata e Extrato Aquoso de *Cassia grandis*

**RPS** - Ressonância Plasmônica de Superfície

**APA** – Área de Preservação Ambiental

**CCTM** – Centro de Ciência e Tecnologia de Materiais

**CNNPA** – Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos

**DH** – Diâmetro Hidrodinâmico

**DLS** – Espalhamento de Luz Dinâmico

**FTIR** – Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

**IPEN** – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares

**IR** – Infravermelho

**MAPA** – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

*coriacea*

**MET** – Microscopia Eletrônica de Transmissão

**MIC** – Concentração Mínima Inibitória

**NPM** – Nanopartículas Metálicas

**PdI** - Polidispersividade

**SPR** – Ressonância Plasmônica de Superfície

**UV** – Ultravioleta

**UV-vis** – Ultravioleta-visível

**Xe** – Xenônio

## 1. INTRODUÇÃO

A nanotecnologia é uma ciência que está revolucionando vários aspectos da vida. É uma tecnologia que vem despertando o interesse da indústria especialmente pela síntese biológica rentável e não tóxica para meio ambiente, como a síntese de nanopartículas (NPs). Estas NPs podem ser sintetizadas por diferentes métodos incluindo químico, fotoquímico, físico ou biológico. No entanto, as NPs produzidas por meios físicos e químicos possuem custos altos e toxicidade elevada (SILVA et al., 2020). A síntese verde apresenta mais vantagens, pois não possui alta demanda de energia e são processos considerados de baixo custo (GUPTA et al., 2019).

Os microrganismos se destacam nessa Síntese verde, por ter a capacidade de secretar para o meio extracelular as nanopartículas, não necessitando realizar nenhum procedimento mais oneroso. Bactérias, fungos, leveduras, actinobactérias e plantas são relatados como fontes para síntese de NPs e tem muitas vantagens como a alta reprodutibilidade, biocompatibilidade e não envolvem produtos químicos tóxicos ou solventes orgânicos, sendo então considerada como uma técnica *eco-friendly* ou de química verde (KALIMUTHU et al., 2019; SINGH et al., 2020).

Nanopartículas de prata são pequenas partículas de prata com dimensões na escala nanométrica, geralmente variando de 1 a 100 nanômetros. Elas têm despertado grande interesse devido às suas propriedades únicas, que as tornam úteis em uma variedade de aplicações. Sobre o potencial das AgNPs, a literatura aborda diferentes trabalhos relacionados à atividade antimicrobiana das AgNPs, principalmente, devido a sua facilidade em se ligar a superfície bacteriana e romper a parede celular levando a morte celular (SINGH et al. 2020). Além disso, relata-se que é muito difícil para as bactérias desenvolverem resistência às AgNPs, pois essas têm várias vias celulares como alvo, logo, as NPs podem ser uma alternativa para tratamento de infecções bacterianas multirresistentes.

O sistema agropecuário é de extrema importância para a economia do Brasil, conforme destacado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e pelo Ministério do Meio Ambiente (MMA). A área que envolve o sistema agropecuário é um dos setores mais importantes na Economia do Brasil, e estima-se que em 2022 ocorreu um crescimento de 16,4%.

Nesse contexto, uma ação direta sobre dois tipos de agentes causadores de reduções econômicas nesse Sistema: 1- as parasitoses causadas por carrapatos, e 2- as perdas na agricultura causadas por cupins, ambas utilizando uma técnica inovadora na área da nanobiotecnologia, apresentam viés de importância científica.

Entretanto, ainda não existe nenhum estudo relacionado à síntese microbiana de nanometais com atividade carrapaticida e cupinicida, especialmente por linhagens isoladas do bioma da Caatinga. Assim, o presente trabalho apresenta o potencial biotecnológico de nanopartículas de prata sintetizadas por microrganismos filamentosos com atividades voltadas ao Setor Agropecuário.

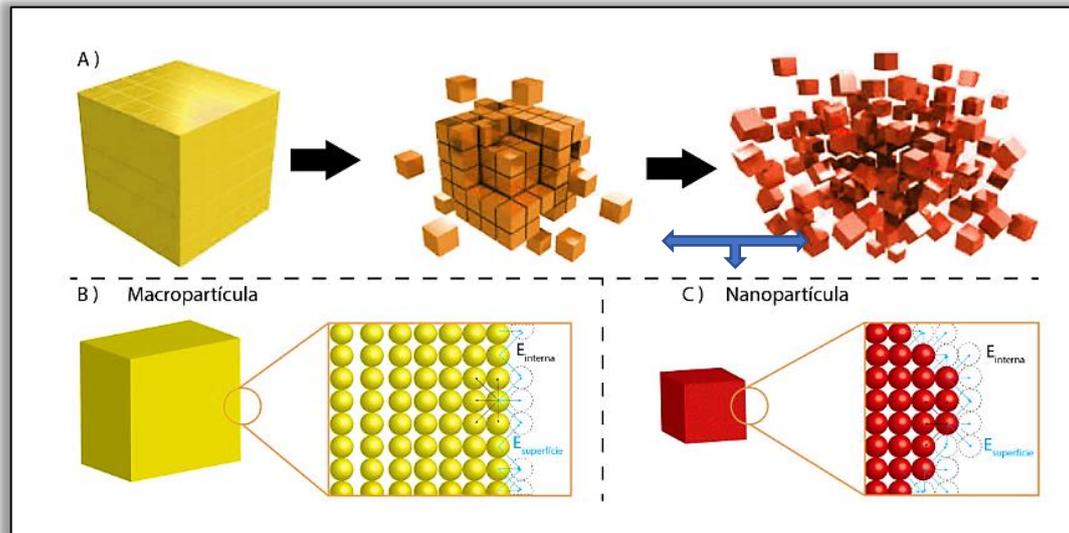
## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. BIOSÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA**

#### **2.1.1 NANOTECNOLOGIA**

Aplicação de estruturas com dimensões entre 1 e 100nm em dispositivos nanoescalares utilizáveis. Nessa escala, as propriedades das nanopartículas diferem do material em escalas maiores, pois se baseiam no fato de que as superfícies envolvidas são muito maiores em comparação aos volumes, propiciando maiores áreas de contato, ou seja, quando uma partícula decresce em tamanho, uma grande proporção de seus átomos encontra-se na superfície, e uma vez que reações químicas ocorrem nas superfícies, nanopartículas são mais reativas do que uma massa de material feito de partículas maiores (ISHAVA, 2024).

**Figura 1.** A figura A apresenta a abordagem top-down de síntese de nanopartículas a partir da redução do tamanho de uma (B) macropartícula a uma (C) nanopartícula. O rearranjo dos seus átomos revela uma maior energia superficial das nanopartículas (CAO, 2021 / Adaptada pelo Autor).



Esse processo, mostrando a macropartícula inicial e o subsequente processo de redução de tamanho para formar a nanopartícula, onde o rearranjo dos átomos na macropartícula à medida que ela é reduzida resulta em uma estrutura com uma maior proporção de átomos na superfície em comparação com o volume interno da partícula, o que leva a uma maior energia superficial (ISHAVA, 2024).

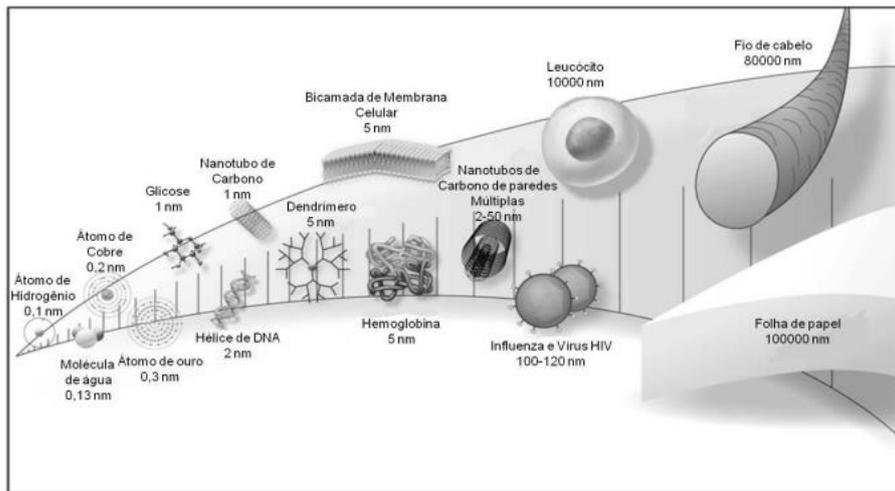
Essa maior energia superficial das nanopartículas tem implicações importantes em suas propriedades físicas e químicas, tornando-as úteis em uma variedade de aplicações, como catalisadores, materiais de revestimento, eletrocatalise, biossensores, entre outras (MEWS, 2007). Apenas com a redução do tamanho, materiais podem apresentar diferentes características e novas propriedades, tais como: elasticidade, tenacidade, resistência, condutividade elétrica, propriedades magnéticas, acumulação de carga elétrica, diferentes cores, entre outras, todas resultado da maior área de contato (LAI et al., 2024).

### 2.1.2 NANOPARTÍCULAS METÁLICAS (NPM) / NANOPARTÍCULAS DE PRATA

Nanopartículas metálicas (NPM) são partículas formadas por elementos metálicos, por exemplo: ferro; níquel; prata; ouro; entre outros. Se destacam por apresentar características físico-químicas diferentes das observadas macroscopicamente, como modificações na reatividade química

e em propriedades mecânicas, ópticas, elétricas e magnéticas. resulta em propriedades físico-químicas diferenciadas. As diferenças nas propriedades observadas nas NPM são decorrentes, principalmente, do efeito de área superficial (TALEB -SAFA E KOOHESTANI, 2024).

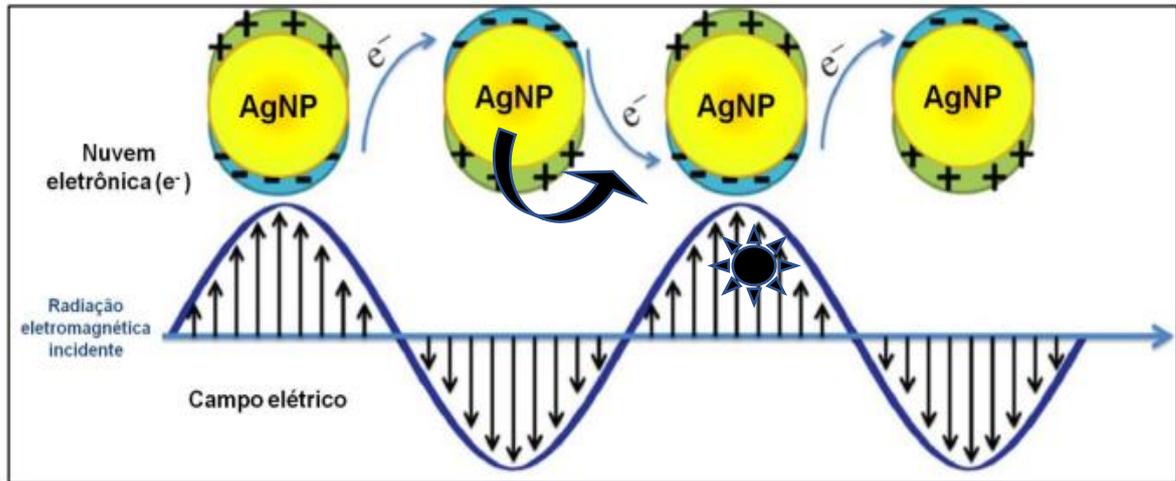
**Figura 2.** Análise do tamanho entre nanomateriais e moléculas em nanoescala. Avaliação modificada por YOKEL E MACPHAIL, 2022.



As NPM possuem uma característica físico-química em especial, a Ressonância Plasmônica de Superfície, em inglês *Surface Plasmon Resonance (SPR)*, que consiste na oscilação conjunta de elétrons livres na superfície metálica (JEEVANANDAM et al., 2018). Ao incidir uma radiação eletromagnética sobre uma nanopartícula metálica, se esta radiação apresentar frequência igual à frequência da oscilação conjunta de elétrons da superfície do metal, há a absorção desta radiação por ressonância (TALEB -SAFA E KOOHESTANI, 2024). Essas nanopartículas, ditas plasmônicas, apresentam propriedades diferenciadas que demonstram um grande potencial para diversas aplicações, como medicina, eletrônica, energia e catálise.

O plasmon polarizado ocorre quando os fótons da luz incidem em filmes finos metálicos e são confinados nessa superfície. Já o plasmon localizado ocorre quando o diâmetro da nanopartícula metálica é muito menor que o comprimento de onda incidente. Em ambos os casos é possível atingir ressonância.

**Figura 3.** Ressonância Plasmônica de Superfície (*Surface Plasmon Resonance*) de nanopartículas. A - Força restauradora e a indução do dipolo, quando acopladas, geram a ressonância plasmônica. B- Superfície plasmônica. (Adaptado de RYCENGA et al., 2011)



Não apenas as nanopartículas de ouro possuem essa propriedade, como também as de outros metais que possuem sua constante dielétrica alta (-) na parte real e baixa (+) na parte imaginária. Desta maneira, as nanopartículas de metais nobres, como prata e ouro, exibem essa propriedade, e outros metais como o cobre e o cobalto também, sendo referidas como nanopartículas plasmônicas (MOURDIKOU DIS, 2018)

Nanopartículas de prata quando em meio líquido, encontram-se em suspensão, pois se tratam de pequenos sólidos insolúveis em um meio dispersante. A prata é um metal de transição, com número atômico 47 e massa molar 107,86g/mol. Quando em escala nanométrica, conferem propriedades ópticas únicas possibilitando aplicações como biosensores e biomarcadores (QIAN et al., 2024). A propriedade da Ressonância Plasmônica de Superfície confere cor característica e absorvância por ressonância em comprimentos de onda específicos, sendo que nanopartículas esféricas de 10nm de diâmetro aproximadamente apresentam banda plasmônica  $\lambda 420\text{nm}$  para AgNP.

### 2.1.3 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS

A obtenção de nanopartículas, processo chamado de síntese, ocorre por meio de dois métodos: o primeiro denominado Top-down (de cima para baixo), utiliza técnicas de fabricação para cortar, moer e moldar materiais até atingir a nanoescala. O segundo, chamado de Bottom-up (de baixo para cima), baseia-se nas propriedades químicas de moléculas/átomos, fazendo com que se organizem formando estruturas em escala nanométrica (OKKA et al., 2023).

Para a obtenção de uma NPM, é necessária a redução do íon metálico, seguido da nucleação e crescimento do cristal. Também é necessário garantir sua estabilidade (não aglomeração), podendo ser pela repulsão das nanopartículas com carga de mesmo sinal (eletrostática), ou pela adição de um agente capeante, geralmente uma molécula grande/polímero que envolve as nanopartículas impedindo seu contato (OKKA et al., 2023).

#### **2.1.4 SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS**

Conceituando-se as técnicas tradicionalmente utilizadas para a obtenção de nanopartículas, várias delas envolvem a utilização de redutores químicos fortes (ex. borohidreto de sódio, citrato de sódio) e a utilização de moléculas tóxicas como agente capeante (ex. polivinil álcool – PVA, polietetrólito cloreto de polialilamina - PAH), limitando sua utilização principalmente no campo clínico e farmacêutico, além da possibilidade da geração de resíduos potencialmente nocivos ao meio ambiente e à saúde humana (ALBERNAZ, 2014). Diante deste cenário, a busca por rotas de síntese de nanopartículas sob um aspecto mais seguro e com menor impacto ao meio ambiente tem se mostrado cada vez preponderante dentre às técnicas.

Existem na literatura estudos sobre a síntese de nanopartículas metálicas empregando microrganismos (BAI et al., 2011; MISHRA et al., 2011), polissacarídeos (SHARMA; YNGARD; LIN, 2009), líquido-iônico (SINGH et al., 2009) irradiação (LIN, 2009), polímeros naturais, clara de ovo (LU et al., 2012) e até saliva humana (DE MATOS; COURROL, 2014).

A tecnologia verde visa, mais precisamente, ao desenvolvimento de metodologias e/ou processos que usem e gerem a menor quantidade possível de materiais tóxicos e/ou inflamáveis

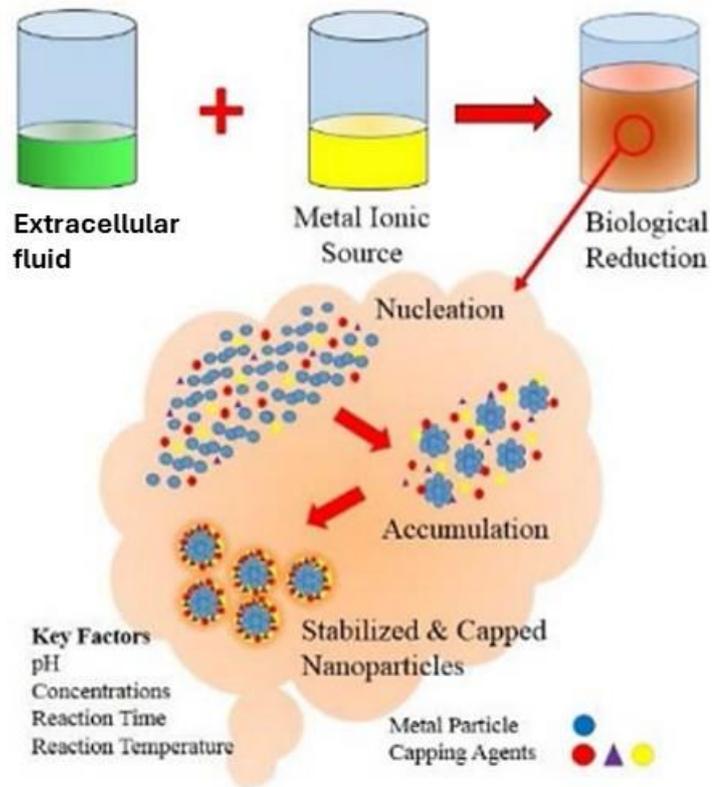
(ANASTAS; EGHBALI, 2010). Neste caso, os riscos seriam minimizados e, uma vez que o processo fosse implementado, os gastos com tratamento de resíduos seriam reduzidos. A síntese verde de NPs propõe a utilização de organismos biológicos, ou partes deles, em substituição aos reagentes químicos tóxicos para obtenção de nanomateriais, apresentando-se como uma alternativa sustentável (IRAVANI, 2011). Este método de síntese geralmente utiliza solventes com baixa toxicidade (ex. água), reduzindo os impactos ambientais relacionados a estes processos. Adicionalmente, nanopartículas obtidas através destas rotas apresentam biocompatibilidade e biodegradabilidade, custo de produção baixo e alto rendimento do produto. Além de ser caracterizada pela substituição de reagentes químicos tóxicos, a síntese verde deve seguir os princípios da sustentabilidade e da química verde.

A sustentabilidade se baseia em três pilares: ambiental, econômico e social, isto é, pode ser considerado sustentável um processo que seja ambientalmente seguro (ecologicamente correto), economicamente viável e socialmente justo.

## **2.2 SÍNTESE BIOLÓGICA DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS POR MICRORGANISMOS**

A síntese biológica de nanopartículas pode utilizar fungos, leveduras, bactérias, actinobactérias, enzimas e algas para formar as nanopartículas em meio extra ou intracelular (BANACH; PULIT-PROCIAK, 2016). A quinona extracelular e a enzima redutase presentes nos organismos são os possíveis responsáveis pela síntese, ou seja, apenas os micro-organismos que possuem essas substâncias são capazes de sintetizar as nanopartículas (PRADO, 2014). O processo é vantajoso por consumir baixa quantidade de energia e reagentes, além de ser ambientalmente correto (KUPPUSAMY et al., 2016). Nessa abordagem, a adição de agentes estabilizantes não é necessária, visto que as proteínas produzidas pelo micro-organismo atuam na manutenção da suspensão na forma coloidal (PRADO, 2014).

**Figura 4.** Síntese biológica de nanopartículas de prata utilizando *Streptomyces*. Fatores que influenciam a reação: pH, concentração de prata, concentração de biomoléculas, temperatura, tempo de reação.



Fonte: Próprio autor

Diversos pesquisadores têm voltado a sua atenção para a síntese verde em função da facilidade e da versatilidade, utilizando os mais diversos extratos vegetais como fonte de compostos redutores. Podem ser utilizados desde raízes até folhas, mesmo após processamento industrial (BARBOSA, 2018). O único pré-requisito é a presença de compostos com atividade redutora, tais como flavonoides, terpenóides, taninos, compostos fenólicos, antocianinas e ácidos orgânicos (ALBERNAZ, 2014). Devido à composição única de cada extrato, é possível variar as condições de síntese para ajustar o processo de formação das partículas, visando à obtenção de diferentes características das nanopartículas.

## Processo de formação de nanopartículas

O processo de formação de nanopartículas pelo método “*bottom-up*” ocorre em três fases principais: a nucleação, o crescimento e a estabilização.

**Figura 5.** Fases do processo de formação de nanopartículas.



Fonte: adaptado de THANH, MACLEAN e MAHIDDINE (2014).

A nucleação ocorre pela aglomeração oligomérica de partículas metálicas recém-formadas, constituindo um núcleo organizado de forma definida e periódica (EL-NOUR et al., 2010). Simultaneamente, ocorre o seu crescimento pela deposição de mais partículas sobre os núcleos já existentes, até o momento que ocorre a sua estabilização (CRUZ, 2010). A elevada relação entre a área e o volume é responsável pela estabilidade das nanopartículas (CAMARGO et al., 2015).

Com o objetivo de impedir a agregação das nanopartículas e garantir a estabilidade, utilizam-se duas abordagens de estabilização: a eletrostática e a estérica. A primeira se baseia na repulsão elétrica causada por cargas de mesmo sinal de que circundam as partículas, enquanto a segunda consiste no uso de moléculas aderidas à superfície para impedir a agregação com nanopartículas vizinhas (CAMARGO et al., 2015).

Os extratos de origem vegetal são uma opção interessante para a síntese de nanopartículas metálicas, pois desempenham a função de agentes redutores e estabilizantes, além de apresentarem a vantagem de proporcionarem uma síntese nos moldes da Química Verde (GALPOUR et al., 2024).

Após o processo de síntese, as propriedades ópticas exibidas pelas AgNPs tornam-as atrativas para a funcionalização de biomoléculas em suas superfícies para o delineamento de sistemas de detecção (SHIVANANDA, 2023). Essa combinação é possível pela correspondência da escala de tamanho entre as nanopartículas e as macromoléculas orgânicas, como os polímeros, anticorpos, proteínas, peptídeos, micelas e vesículas (SINGH et al., 2023). Assim como as biomoléculas sofrem mudanças estruturais, as nanopartículas dentro dessa dimensão de tamanho também sofrem alterações quando em interação com íons e biomoléculas, dentre elas a aglomeração, efeito importante para avaliar a detecção de um evento de ligação específica entre a molécula-alvo e a nanopartícula (RAULT et al., 2024).

A funcionalização das nanopartículas com ligantes e biomoléculas altera as propriedades físico-químicas da superfície, para a organização das moléculas, a fim de possibilitar a interação com o analito-alvo. Em geral, esse processo resulta em uma maior solubilidade, o que otimiza a sua interação com o meio, visto que a presença de biomoléculas hidrofílicas melhora a biocompatibilidade das nanopartículas. Essa hibridização pode resultar em um nanobiossensor reativo para diversas aplicações de biossensoriamento.

### **2.2.1 CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS**

O delineamento de sistemas nanoestruturados em associação com biomoléculas depende da caracterização apropriada das propriedades físico-químicas dos nanomateriais, principalmente o tamanho, a carga superficial, morfologia e as etapas de funcionalização, para que ocorra a correta integração com sistemas biológicos (ISHNAVA, 2024).

A interação entre esses sistemas ocorre por uma variedade de forças físicas e químicas, como forças eletrostáticas, ligação de hidrogênio, forças hidrofóbicas e por propriedades inerentes às biomoléculas, como as múltiplas conformações que elas podem assumir. Para compreender essas interações, são necessárias diversas estratégias de caracterização experimental e computacional (LAI et al., 2024).

A primeira propriedade a ser considerada no desenvolvimento de um nanomaterial é o tamanho da estrutura, pois determina sua entrada nas células e nos órgãos e a travessia de barreiras fisiológicas, quando desenvolvido para liberação controlada de fármacos e, também determina as suas propriedades físico-químicas. Ainda, estas propriedades estão relacionadas com a composição da superfície, com os grupos funcionais envolvidos na interação molecular e com o ambiente local que, somadas, determinam a estabilidade da suspensão, a aglomeração e a dissolução (SARMIN et al., 2024).

As técnicas analíticas mais utilizadas para caracterizar e avaliar as propriedades físico-químicas e biológicas desses sistemas são a espectroscopia de absorção no UV-Vis, Difratomia de Raios-X (DRX), Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR, do inglês Fourier Transform Infrared Spectroscopy), espalhamento de luz dinâmico (DLS, do inglês Dynamic Light Scattering), Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e microscopia de força atômica (AFM, do inglês Atomic Force Microscopy) (SHAMAEIZADEH et al., 2023; KHAN et al., 2024; ALATTAR, 2024).

A espectroscopia UV-Vis é utilizada para monitorar o processo de síntese e estabilidade das AgNPs que, devido suas características ópticas, interagem fortemente com a luz visível. O comprimento de onda de absorção das AgNPs depende do tamanho, da morfologia e de seu ambiente local, que alteram a ressonância plasmônica, facilmente observada pelos deslocamentos de bandas plasmônicas na região do UV-Vis (SABZEVAR et al., 2024).

A técnica de DRX é aplicada na caracterização microestrutural das nanopartículas. Ela permite caracterizar a cristalinidade do nanomaterial, bem como a identificação da fase cristalina formada durante o método sintético e o tamanho da partícula, sendo estes dados obtidos a partir da posição dos picos de difração (MWENZE et al., 2023).

A técnica de DLS é um método de análise *in situ* e não destrutivo, relevante para analisar a distribuição de tamanho das nanopartículas em suspensão, sua dispersão, estabilidade coloidal e carga superficial das nanopartículas. Outras técnicas podem ser aplicadas para análise de tamanho das

nanopartículas, porém a vantagem do DLS é que este não demanda secagem, nem métodos de imageamento da amostra (FAZLI et al., 2024). Essa técnica realiza uma relação teórica entre o tamanho das nanopartículas e coeficientes de difusão rotacional e translacional. O tamanho obtido por esta técnica é geralmente maior do que o obtido por MET e AFM, devido à influência do movimento Browniano e da camada de solvatação das nanopartículas em suspensão (STOIAN et al., 2023).

A técnica de AFM é utilizada para caracterizar a morfologia e o diâmetro das nanopartículas por imageamento em modo contato intermitente "tapping mode". Pelo modo contato intermitente é possível realizar análises de amostras não rígidas sem danificá-las, pois, a ponta não permanece em contato com a amostra durante a varredura. Neste modo de operação, a haste (cantilever) sofre uma vibração gerada por um sistema piezoelétrico e a ponta localizada na extremidade da haste oscila numa amplitude que varia de 20 a 100 nm e toca amostra de forma intermitente durante essa vibração (IRFAN et al., 2023).

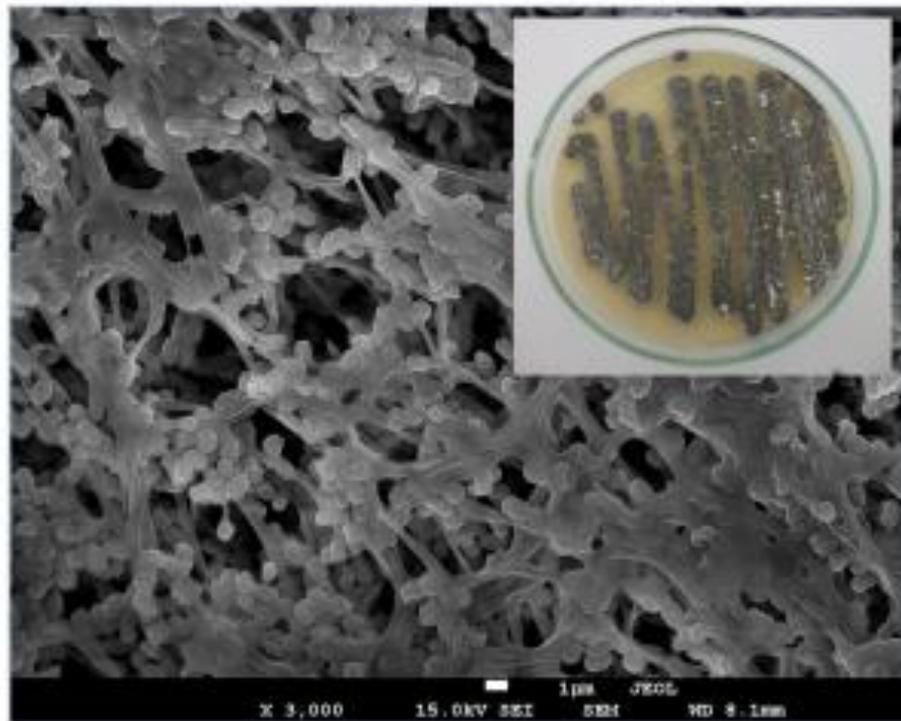
A vantagem da técnica é que não demanda métodos específicos para a preparação da amostra. A análise de MET também é empregada nas medidas quantitativas do diâmetro e distribuição do tamanho das nanopartículas e para obtenção da imagem de morfologia do material (HAZARIKA et al., 2023).

O FTIR é utilizado para determinar os grupos funcionais presentes nas amostras em análise, sendo possível observar se as biomoléculas foram efetivamente integradas às nanopartículas, de forma a validar o processo de funcionalização. Devido à complexidade dos nanomateriais bioconjugados são, então, necessárias diversas técnicas analíticas, que permitam a caracterização precisa das propriedades físico-químicas dos sistemas, para que sejam devidamente desenvolvidos para as aplicações biomédicas, com a preservação da atividade biológica das moléculas envolvidas (AHMED et al., 2024).

### **2.3 ACTINOBACTÉRIAS E SUAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS**

Os Actinomicetos representam um grupo de micróbios atraente para nanomateriais, principalmente devido a sua capacidade única de produzir diferentes compostos bioativos e enzimas que atuam como fortes redutores. NPs sintetizadas a partir de actinomicetos têm sido extensivamente avaliadas para alcançar inúmeras aplicações (SUMAN et al, 2020).

**Figura 6.** Morfologia da colônia de *Streptomyces parvulus* através de Microscopia eletrônica de varredura (Figura obtida e ajustada por BAYGAR et al., 2015).



Fonte: Adaptada de BAYGAR et al., 2015.

As actinobactérias constituem um grupo bem-sucedido de organismos quanto ao habitat, ocorrendo em uma multiplicidade de ambientes, tanto naturais quanto nos modificados pela ação humana. Estão extensivamente distribuídas no solo e em outros ambientes terrestres. A maioria das espécies é saprofítica, contudo, existem aquelas que formam associações mutualísticas e parasíticas com outros organismos.

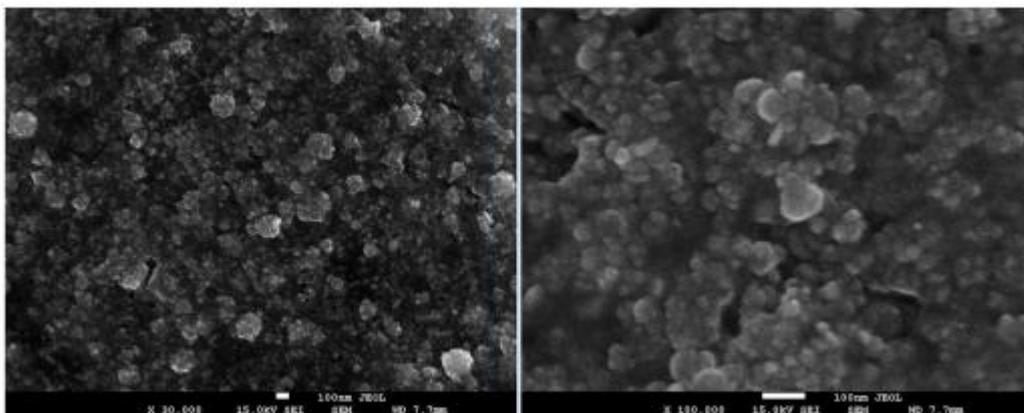
Assim, diferentes estilos de vida podem ser encontrados, incluindo habitantes do solo (*Streptomyces* spp.), comensais de plantas (*Leifsonia* spp.), simbiontes fixadores de nitrogênio

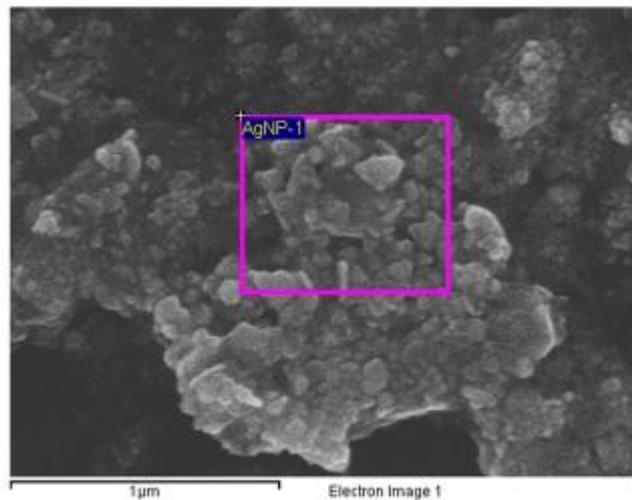
(Frankia), residentes do trato gastrintestinal (*Bifidobacterium* spp.) e patógenos (*Mycobacterium* spp., *Nocardia* spp., *Tropheryma* spp., *Corynebacterium* spp., *Propionibacterium* spp.) (WOSTEN et al., 2000). Estudos confirmam sua natureza procariótica retirando-os completamente do Reino Fungi (Flärd; BUTTNER et al., 2009).

Entre estes microrganismos, os actinomicetos estão sendo explorados como verdadeiras nanomáquinas distintas para a síntese de ouro, prata e vários tipos de NPs metálicas por meios extra e intracelulares.

*Streptomyces* é um gênero de bactérias aeróbias Gram-positivas que cresce em diversos ambientes, com uma forma filamentosa semelhante a fungos. As espécies de *Streptomyces*, membros da ordem bacteriana Actinomycetales, são encontradas no solo em todo o mundo. Organismos do gênero *Streptomyces* produzem compostos bioativos eficazes e são intensamente utilizados nas indústrias agrícola, farmacêutica e de enzimas. Portanto, eles são bem conhecidos para fins de fabricação industrial.

**Figura 7.** Microscopia eletrônica de Varredura apresentando nanopartículas de prata sintetizadas por *Streptomyces griseorubres*.





Fonte: Adaptada de BAYGAR et al., 2015.

## 2.4 BIOSSÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS POR FUNGOS

Os fungos são organismos eucarióticos, heterotróficos, constituídos por uma rígida parede celular. A parede celular fúngica é uma estrutura dinâmica que fornece células com resistência mecânica para suportar alterações na pressão osmótica e estresse ambiental (DURAN; NOMBELA, 2004; BOWNMAN; FREE 2011). Entre os agentes biológicos, fungos, são aproveitados para a síntese de nanopartículas de metal devido a sua alta tolerância a metais e capacidade de bioacumulação de metais (HEMATH et al., 2010).

Os fungos são fáceis de cultivar e devido à manipulação de sua biomassa ser simples são candidatos potenciais para a síntese de nanopartículas (CHAN; MASHITAH, 2012; HONARY et al., 2013). Os micélios fúngicos podem suportar a pressão de alta vazão, agitação e outras condições presentes em biorreatores o que não se observa para outros microrganismos e plantas (SONI; PRAKASH, 2012). Além disso, a viabilidade econômica de síntese em grande escala é obtida com uma pequena quantidade de biomassa (INGLE et al., 2008; VALA et al., 2014). Os fungos secretam uma grande quantidade de enzimas extracelulares necessárias para síntese e geram maior rendimento de nanopartículas por massa (ALANI et al., 2012; BIRLA et al., 2009; KUMAR et al., 2007; NARAYANAN; SAKTHIVEL, 2010).

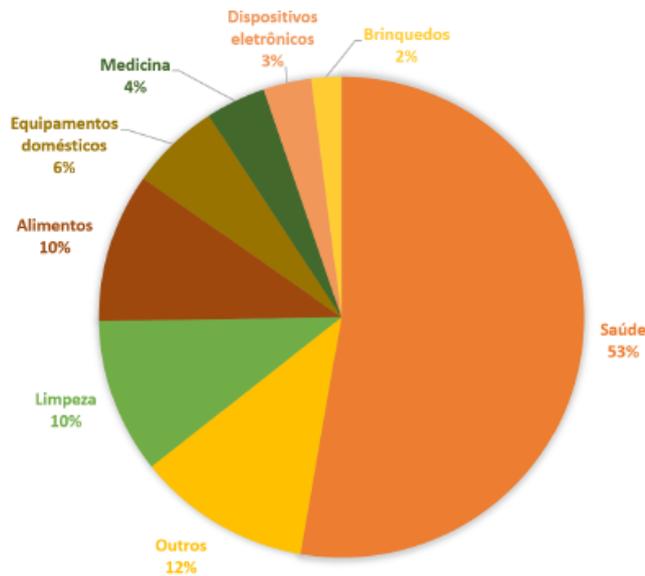
Além disso, as NPs precipitadas para fora da célula são desprovidas dos componentes celulares e, portanto, podem ser usadas diretamente para diferentes aplicações (NARAYANAN; SAKTHIVEL, 2010). Espécies como *Fusarium oxysporum* (DIAS et al., 2002; BANSAL et al., 2004) e *Aspergillus niger* (KUMAR et al., 2008) são relatadas como sintetizadoras de NPs de prata (AgNPs).

## 2.5 PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA

Recentemente, estudos tem reportado o uso de nanopartículas de prata e ouro nas mais diferentes aplicações: AgNP tem sido estudada principalmente quanto ao seu potencial antimicrobiano no tratamento de água e na inibição do crescimento de bactérias super-resistentes, além da quantificação de poluentes e uso na medicina terapêutica e diagnóstica (LIN et al., 2013; MONGE, 2009; SHARMA; YNGARD; LIN, 2009; ZHANG et al., 2016). AuNP têm suas principais aplicações na medicina, com crescente número de estudos sobre o transporte de drogas (drug delivery) e biomarcadores para diagnóstico de tumores (CAI, 2008; DREADEN et al., 2012; VIGDERMAN; ZUBAREV, 2013).

O potencial de nanopartículas de prata e ouro em aplicações nos mais diversos campos da ciência têm resultado no aumento de publicações sobre o tema nos últimos anos. As AgNPs podem ser utilizadas também na área ambiental, como no tratamento de efluentes, através de sua incorporação em lodos ativados (SHENG et al., 2018). Já na agricultura, estudos apontam que a aplicação de soluções de AgNPs resulta no crescimento mais rápido de diversas espécies vegetais, como nas culturas de algumas frutas e cereais. Além disso, no caso do cultivo de tubérculos, as AgNPs inibem o desenvolvimento de doenças e promovem o crescimento acentuado das raízes (BANACH e PULIT-PROCIAK, 2016).

**Figura 8** – Aplicações usuais das AgNPs.



Fonte: adaptado de BANACH E PULIT-PROCIAK (2016).

Diversos estudos relatam aplicabilidade das AgNPs em variados campos, como na medicina, através da construção de novos dispositivos para detecção de biomoléculas e superfícies inibidoras de crescimento bacteriano (biossensores de alta eficiência, imagem e diagnóstico e atividade microbica) (YUN et al., 2019). Na área farmacêutica, podem ser usadas na administração de medicamentos, na terapia contra o câncer (sistemas de entrega de fármacos) e cosméticos (MATHUR et al., 2018). Já na indústria alimentícia e têxtil podem ser usadas no armazenamento de alimentos, em embalagens e processamentos, aumentando seu tempo de prateleira (materiais com propriedades antimicrobianas) (VERMA; MAHESHWARI, 2019). Por fim, no setor de energia, por ser um metal condutor, possui uma boa eficiência para aplicação em coletores de energia solar (MAHESHWARI, 2019).

## 2.6 ATIVIDADE CARRAPATICIDA

O *Dermacentor nitens*, tem distribuição cosmopolita, mas ocorre principalmente em áreas tropicais e subtropicais, causando prejuízos econômicos pra bovinocultura e equinocultura (HOLDSWORTH et al. 2006). Devido ao uso indiscriminado de acaricidas comerciais, os carrapatos vêm desenvolvendo mecanismos de resistência aos produtos químicos, relatados em diversos países.

Carrapaticidas contendo substâncias vegetais e novas tecnologias são formas alternativas ao controle químico-biológico dos carrapatos, que usualmente são utilizados no controle integrado desta parasitose (ZAMAN et al. 2012).

Dentre os agentes utilizados no controle, os piretróides aparecem no mercado como amplamente utilizados. Estes são divididos em duas subclasses (tipo I e tipo II) em decorrência da estrutura química e da síndrome de intoxicação que podem causar em insetos e, também, em mamíferos. Piretróides tipo I são ésteres do ácido crisantemonocarboxílico e produzem hiperexcitabilidade e tremores. Piretróides tipo II são ésteres do ácido crisantemonodicarboxílico e causam salivação, incoordenação motora, hiperexcitabilidade e reflexo de apreensão. Piretróides tipo II atuam nos canais de íons de sódio e também nos canais de íons de cloro (RAY e FORSHAW, 2000; SODERLUND et al., 2002).

A cipermetrina é um piretróide tipo II (WOLANSKY et al., 2006). É uma molécula de terceira geração do grupamento fenoxibenzílico, na qual foi introduzido um grupo ciano no fenoxibenzilester com substituição do átomo de hidrogênio pelo átomo de cloro, tornando-a mais fotoestável e com potencialidade biológica maior que os piretróides de primeira e segunda geração (Fulgêncio e CORDOVÉS, 1997). Os piretróides são metabolizados por oxidação, hidrólise ou conjugação (MILLER, 1988), mecanismos que podem variar de acordo com a estrutura química da molécula (RAY, 1991).

## **2.7 ATIVIDADE CUPINICIDA (TERMICIDA)**

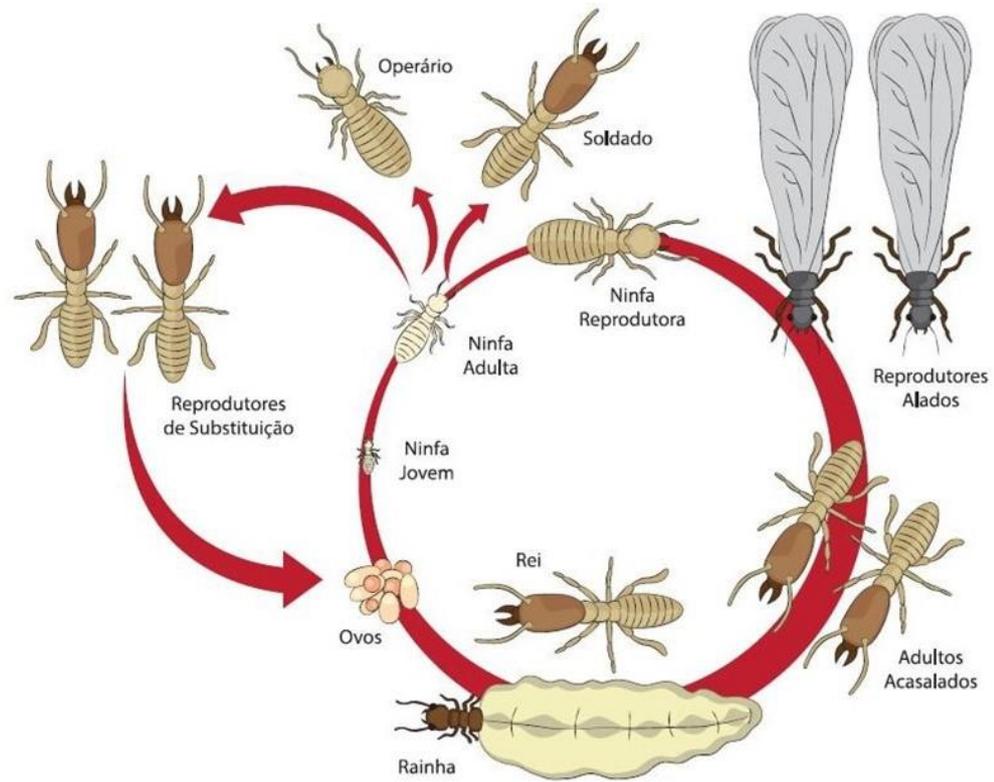
No ano de 2018, o Brasil produziu cerca de 11 616 m<sup>3</sup> de madeira em toras por meio do extrativismo vegetal, para emprego em diversos fins, assim foi gerada uma produção com receita na taxa de BRL 1,8 bilhão (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [IBGE], 2019). Com base nisso, é necessário para o mercado madeireiro conhecer a qualidade do produto ofertado, visando o emprego eficiente da madeira em destino adequado, seja para construção civil, estruturas permanentes, indústria de móveis e afins. A madeira de certas espécies florestais são importantes produtos

econômicos nacional, devido a sua vasta utilização, como a *Manilkara elata* e *Hymenaea courbaril* em vigas estruturais e telhados, *Cedrella* sp. em peças de acabamento e móveis (GONZAGA, 2006), *Myracrodruon urundeuva* em obras externas e na construção civil, *Carapa guianensis* e *Nectandra* sp. para mobiliário e construção civil leve (Instituto de Pesquisas Tecnológicas [IPT], 2019).

Para diversas aplicações da madeira, a durabilidade natural é uma característica primordial, pois em espécies florestais que possuem alta resistência à biodeterioração, é desnecessário a utilização de produtos químicos com a finalidade de aumentar seu tempo em serviço, diminuindo os impactos ambientais e os gastos desnecessários com a substituição de peças, garantindo, assim, por maior período de tempo a integridade nas construções civis e na segurança das pessoas que dela fazem uso (STALLBAUN et al., 2017). Porém, apesar do uso intensivo, a madeira é vulnerável à ação de organismos xilófagos, conforme as condições de temperatura, umidade, aeração e insolação que é exposta, capaz de proporcionar menor ou maior deterioração ao material madeireiro (RIBEIRO et al., 2014).

**Figura 09.** Ciclo de vida do Cupim *Nasutiterms corniger*.





Fonte: Adaptada de RIBEIRO et al., 2014.

Dentre os organismos xilófagos, os cupins são os mais conhecidos por serem frequentemente visualizados e combatidos, pois são considerados pragas por humanos e apresentarem ampla distribuição nos meios urbano e rural. São insetos da subordem Isoptera (Ordem Blattodea), que contêm cerca de 3166 espécies catalogadas no mundo, com 661 delas ocorrendo na Região Neotropical (KRISHNA et al, 2013; CONSTANTINO, 2017). São conhecidos por sua importância econômica como pragas da madeira e de materiais lignocelulósicos afins, no qual têm atraído à atenção de muitos pesquisadores por serem insetos sociais (eussociais) (CONSTANTINO, 2015, 2017).

**Figura 10. Colônias arborícolas de *N. corniger*.**



Os cupins do gênero *Nasutitermes* (Termitidae: Nasutitermitinae) constroem normalmente suas colônias em locais acima da superfície do solo, em troncos, ou galhos ou ramos das árvores. A construção dos ninhos geralmente ocorre durante a estação chuvosa, sendo e estruturados a partir de madeira digerida e certos componentes, como areia cimentada com fluidos fecais e salivares (CRUZ et al., 2014). Os cupins do gênero *Nasutitermes* são os mais diversificados contendo 254 espécies catalogadas, 114 delas na Região Neotropical, alimentam-se de madeira seca, úmida ou parcialmente decomposta (HE et al., 2013; KRISHNA et al., 2013). Dentre as espécies desse gênero, os cupins da espécie *Nasutitermes corniger* é habitualmente encontrada em várias regiões do Brasil, com ataque às estruturas de madeira empregadas nos meios urbano e rural (Paes et al., 2016).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Biossintetizar nanopartículas de prata utilizando microrganismos filamentosos (fungos filamentosos e Actinomicetos) e avaliar suas atividades biológicas.

#### **3.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS**

- Selecionar linhagens de microrganismos (*Aspergillus tamarii* Kita UCP 1279, *Mucor subtilissimus* UCP 1262, *Aspergillus terreus* UCP 1276 e 4 linhagens de actinomicetos (*Streptomyces* sp. DPUA 1542, *Streptomyces* sp. DPUA 1557, *Streptomyces malasyensis* DPUA 1571, *Streptomyces parvulus* DPUA 1573) capazes de realizar biossíntese verde de nanopartículas de prata (AgNPs) através de técnica de fermentação submersa;
- Caracterizar as nanopartículas de prata (AgNPs) sintetizadas através de análises físico-químicas por meio da técnica de espectroscopia de absorção molecular na região do ultravioleta e visível (UV-Vis);
- Avaliar a estabilidade das AgNPs por meio da análise de potencial zeta (PZ) e pelo monitoramento da banda plasmônica por espectroscopia de absorção molecular na região do UV-Vis;
- Avaliar o potencial carrapaticida das nanopartículas de prata biossintetizadas frente ao carrapato *Dermacentor nitens*;
- Estudar o efeito antibacteriano das nanopartículas de prata biossintetizadas frente à bactérias resistentes aos antibióticos betalactâmicos
- Avaliar o efeito cupinicida das nanopartículas de prata biossintetizadas frente ao cupim da espécie *Nasutitermes corniger* e estudar o efeito sinergismo com extratos de plantas

#### 4. REFERÊNCIAS

Abdelghany, T.M.; Al-Rajhi, A.M.H.; Abboud, M.A.A.; Alawlaqi, M.M.; Magdah, A.G.; Helmy, E.A.N.; Mabrouk, A.S. Recent Advances in Green Synthesis of Silver Nanoparticles and Their Applications: About Future Directions. A Review. *BioNanoScience*, v. 8, n. 1, p. 5-16, 2018.

Abdelrahim, K.; Mahmoud, S.Y.; Ali, A.M.; Almaary, K.S.; Mustafa, A.E.M.A.; Husseiny, S.M. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using *Rhizopus stolonifer*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, v. 24, p. 208-216, 2017.

Abou El-Nour, K.M.; Eftaiha, A.; Al-Warthan, A.; Ammar, R.A. Synthesis and applications of silver nanoparticles. *Arabian Journal of Chemistry*, v. 3, p. 135-140, 2010.

Al-Dhabi, N.A.; Ghilan, A.M.; Esmail, G.A.; Arasu, M.V.; Duraipandiyan, V.; Ponmurugan, K. Environmental friendly synthesis of silver nanomaterials from the promising *Streptomyces parvus* strain Al-Dhabi-91 recovered from the Saudi Arabian marine regions for antimicrobial and antioxidant properties. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*. (2019), <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.111529>.

Akther T., Khan M.S., Hemalatha S. Biosynthesis of silver nanoparticles via fungal cell filtrate and their anti-quorum sensing against *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 8, 104365, 2020.

Aslani MK, Hamid KM, Nazer NH, Mirshafiey A. The Role of Autoantibodies in Diagnosis of Multiple Sclerosis. *Int Trends Immun*. 2014;2(1):29–35.

Bai S, Jiang J, Zhang Q, Xiong Y. Steering charge kinetics in photocatalysis: intersection of materials syntheses, characterization techniques and theoretical simulations. *Chem Soc Rev*. 2015;44(10):2893-2939. doi:10.1039/C5CS00064E

Cao G, Wang Y. *Nanostructures and Nanomaterials*. Vol 2. WORLD SCIENTIFIC; 2011. doi:10.1142/7885

Cruz P.B., Barbosa A.F., Melo D., Novato T., Fidelis Q. C, Monteiro Q.M.O. Acaricidal activity of methanol extract of *Acmella oleracea* L. (Asteraceae) and spilanthol on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*, 228, 137-143, 2016.

Drummond, R. O.; Ernst S. E.; Trevino, J. L.; Gladn'ey, W. J.; Graham, O. H. *Boophilus annulatu/* and *B. microplus/* Laboratory Tests of Insecticides. *Journal of Economic Entomology*. 66 (1), 1973

Gupta, A.; Singh, D.; Singh, S.K.; Singh, V.K.; Singh, V.K.; Kumar, A. Role of actinomycetes in bioactive and nanoparticle synthesis in: *Role of Plant Growth Promoting Microorganisms in*

Sustainable Agriculture and Nanotechnology. (2019) DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817004-5.00010-5>.

Hoa XD, Kirk AG, Tabrizian M. Towards integrated and sensitive surface plasmon resonance biosensors: A review of recent progress. *Biosens Bioelectron.* 2007;23(2):151-160. doi: 10.1016/j.bios.2007.07.001

Hou W, Cronin SB. A Review of Surface Plasmon Resonance-Enhanced Photocatalysis. *Adv Funct Mater.* 2013;23(13):1612-1619. doi:10.1002/adfm.201202148

Jeevanandam J, Barhoum A, Chan YS, Dufresne A, Danquah MK. Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations. *Beilstein J Nanotechnol.* 2018; 9:1050-1074. doi:10.3762/bjnano.9.98

Kalimuthu, K.; Cha, B.S.; Kim, S.; Park, K.S. Eco-friendly synthesis and biomedical applications of gold nanoparticles: A review, *Microchemical Journal* (2019), doi: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104296>

Koo OM, Rubinstein I, Onyuksel H. Role of nanotechnology in targeted drug delivery and imaging: a concise review. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med.* 2005;1(3):193-212. doi: 10.1016/j.nano.2005.06.004

Mourdikoudis S, Pallares RM, Thanh NTK. Characterization techniques for nanoparticles: comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties. *Nanoscale.* 2018;10(27):12871-12934. doi:10.1039/C8NR02278J

Naveen K.S. H.; Kumar, G.;Karthik L.; Rao K.V.B. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the filamentous fungus *Penicillium* sp. *Archives of Applied Science Research*, v 2 (6) p. 161-167, 2010.

Petryayeva E, Krull UJ. Localized surface plasmon resonance: Nanostructures, bioassays and biosensing—A review. *Anal Chim Acta.* 2011;706(1):8-24. doi: 10.1016/j.aca.2011.08.020

Rycenga M, Cobley CM, Zeng J, et al. Controlling the Synthesis and Assembly of Silver Nanostructures for Plasmonic Applications. *Chem Rev.* 2011;111(6):3669-3712. doi:10.1021/cr100275d

Santos, N.P.; Nascimento, S.C.; Silva, J.F.; Pereira, E.C.G., Silva, N.H.; Honda, N.K., Magalhães, N.S.S. Usnic Acid - Loaded Nanocapsules: An Evaluation of Cytotoxicity. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, v. 15, p.355-361, 2005.

Silva-Vinhote, N.M.; Caballero, N. E. D.; Silva, T.A.; Quelemes, P.V.; Silva, T.A.; Quelemes, P.V.; Araújo, A.R.; Moraes, A.C.M.; Câmara, A.L.V.; Longo, J.P.F.; Azevedo,

Silva, D.A.; Leite, J.R.S.A.; Teixeira, M.F.S. Extracellular biogenic synthesis of silver nanoparticles by Actinomycetes from amazonic biome and its antimicrobial efficiency. *African Journal of Biotechnology*, v,16(43), pp. 2072-2082, 2017.

Silva, J.M; Clementino, E.L; Cunha, M.N.C.; Porfírio, K.P.S.; Mota; R.A.; Teixeira, M.F.S.; Porto, T.S.; Porto, A.L.F.; Porto, C.S. Atividade antimicrobiana de moléculas bioativas produzidas por *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 frente a *Staphylococcus* spp. multirresistentes de mastite bubalina. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 36(9):805-810, 2016.

Singh, A.; Gautam, P.K.; Verma, A.; Singh, V.; Priya, P.M.S.; Shivalkar, S.; Sahoo, A.K.; Samanta, S.K. Green synthesis of metallic nanoparticles as effective alternatives to treat antibiotics resistant bacterial infections: A review, *Biotechnology Reports* (2020), <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00427>. Silva AGM, Rodrigues TS, Wang J, et al. The Fault in Their Shapes: Investigating the Surface-Plasmon-Resonance-Mediated Catalytic Activities of Silver Quasi-Spheres, Cubes, Triangular Prisms, and Wires. *Langmuir.* 2015;31(37):10272-10278. doi: 10.1021/acs.langmuir.5b02838

Soni N.; Prakash S. Synthesis of gold nanoparticles by the fungus *Aspergillus niger* and its efficacy against mosquito larvae. *Reports in Parasitology*, v. 2, p. 1-7, 2012.

Stone, J.K. Fine structure of latent infections by *Rhabdoclineparkeri* on Douglasfir, with observations on uninfected epidermal cells. *Canadian Journal of Botany*, p. 45-

54, 1988.

Strobel, G.; Daisy, B.; Castillo, U.; Harper, J. Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural Products*, v. 67, p. 257-268, 2004.

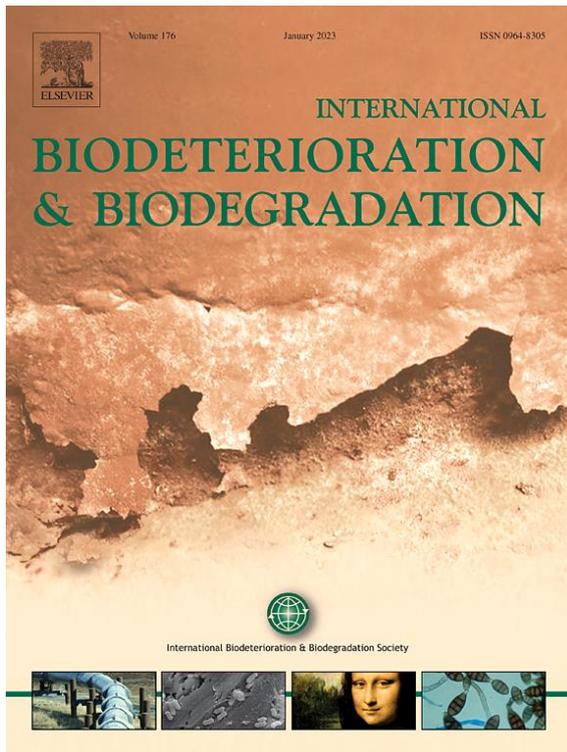
Sudarenikov, V. Nanotechnology: balancing benefits and risks to public health and the environment. Committee on Social Affairs, Health and Sustainable Development, 2013.

Sukirtha, R.; Priyanka, K.M.; Antony, J.J.; Kamalakkannan, S.; Thangam, R.; Gunasekaran, P.; Krishnan, M.; Achiraman, S. Cytotoxic effect of green synthesized silver nanoparticles using *Melia azedarach* against in vitro HeLa cell lines and lymphoma mice model. *Process Biochemistry*, v. 47, n. 2, p. 273–279, 2012.

Sunkar, S.; Nachiyar, V. Endophytes as potential nanofactories. *International Journal of Chemical, Environmental & Biological Sciences*, v. 1, p. 488-491, 2013.

## CAPÍTULO I

Artigo a ser submetido ao



International Biodeterioration & Biodegradation

**Título: Síntese verde de nanopartículas de prata utilizando *Streptomyces* sp. DPUA 1542 isolada de líquens da Amazônia: Caracterização e Aplicações Biológicas**

**Síntese verde de nanopartículas de prata utilizando *Streptomyces* sp. DPUA 1542 isolada de  
líquens da Amazônia: Caracterização e Aplicações Biológicas**

Vivianne Ferreira Araújo<sup>1</sup>, Juanize Matias Batista<sup>1</sup>, Thiago Pajeú Nascimento<sup>3</sup>, Kethylen Barbara  
Barbara Cardoso<sup>1</sup>, Raquel Pedrosa Bezerra<sup>1</sup>, Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa<sup>2</sup>, Ana Lúcia  
Figueiredo Porto<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal Rural de Pernambuco/UFRPE, Laboratório de Tecnologia de Bioativos (LABTECBIO), Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, 52171-900 Recife, PE, Brazil

<sup>2</sup>Universidade de Pernambuco (UPE), Instituto de Ciências Biológicas, Campus Recife, Av. Governador Agamenon Magalhães, s/n, Santo Amaro 50100-010, Recife, PE, Brazil.

<sup>3</sup>Universidade Federal do Piauí, Laboratório de Genética.

Corresponding author:

Ana Lúcia Figueiredo Porto, Universidade Federal Rural de Pernambuco/UFRPE, Laboratório de Tecnologia de Bioativos (LABTECBIO), Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, 52171-900 Recife, PE, Brazil.

**RESUMO**

Nanopartículas de Prata (AgNPs) são estruturas metálicas em escala nanométrica. AgNPs apresentam diversas atividades biológicas como antimicrobianas contra fungos e bactérias; no entanto, a síntese de AgNPs pode gerar resíduos tóxicos e devido a isso novas rotas utilizando compostos atóxicos têm sido alvo. Desse modo, o objetivo desse estudo foi sintetizar AgNPs utilizando uma técnica eco-friendly através de método biológico por meio do gênero *Streptomyces* como agente produtor e realizar atividade carrapaticida e cupinicida. Foram sintetizadas nanopartículas estáveis com  $12,5 \pm 0,2$  nm (média  $\pm$  DP) que apresentaram elevada atividade contra *Nasutitermes corniger* e podem representar boa alternativa no tratamento de danos gerados ao sistema agropecuário. As linhagens *Streptomyces* sp. DPUA 1542 e *Streptomyces* sp. DPUA 1557 apresentaram os melhores resultados em biossintetizar AgNP. A caracterização das AgNPs usando técnicas espectroscópicas na região do ultravioleta/visível (UV/VIS) e infravermelho (FTIR) indicaram a formação de AgNPs com banda na região de 400nm, característica de bandas plasmônicas de prata. A espectroscopia por FTIR indicou o desaparecimento ou redução significativa de diferentes grupos funcionais presentes no espectro das amostras contendo as AgNPs, como em  $3500\text{ cm}^{-1}$  (grupo hidroxila OH), presente em álcoois e compostos fenólicos), região próxima a  $1.700\text{ cm}^{-1}$  (grupo carbonila (C=O), possivelmente aos polifenóis ou carboidratos),  $1.070$  e  $1.118\text{ cm}^{-1}$  (C O C e C O em compostos fenólicos). Os resultados da análise de potencial Zeta apresentaram tamanho de partículas de AgNPs com diâmetros de 12,5nm. O potencial Zeta fornece dados a respeito da estabilidade das NPs. Valores de PZ inferiores à 30 mV ou superior à +30 mV estão relacionados à alta estabilidade, enquanto as regiões intermediárias a esses valores indicam condições instáveis. As nanopartículas sintetizadas nesse trabalho apresentaram cargas negativas para o PZ com valores entre  $48,10 \pm 1,56$  e  $54,37 \pm 1,80$ , para AgNPs de *Streptomyces* 1542 e *Streptomyces* 1557. Conclui se que os resultados são favoráveis para às ações e efeitos biológicos, e evidenciaram um alta taxa de morte nos ensaios de atividade cupinicida.

**Palavras-chaves:** Nanopartículas, síntese verde, Actinobactérias, produção, atividade biológica.

## 1. INTRODUÇÃO

Os protocolos de síntese de nanopartículas podem envolver combinações dos métodos físicos, químicos, fotoquímicos e biológicos (ZHANG et al., 2016; LOPES, 2017). Ainda assim, é importante o conhecimento acerca dos princípios básicos de cada um dos métodos de aquisição destas partículas. A síntese biológica pode ser influenciada por fatores abióticos como: temperatura de cultivo, pH, substratos, osmolaridade, etc. Vários microrganismos são capazes de sintetizar as nanopartículas no meio intracelular, ou, no meio extracelular após excreção de enzimas redutoras; outros, ainda, podem realizar ambos os processos.

Entre os agentes biológicos, fungos, bactérias e actinobactérias, são aproveitados para a síntese de nanopartículas de metal devido a sua alta tolerância a metais e capacidade de bioacumulação de metais (HEMATH et al., 2010). As Actinobactérias são fáceis de cultivar e devido à manipulação de sua biomassa ser simples são candidatos potenciais para a síntese de nanopartículas e além disso, a viabilidade econômica de síntese em grande escala é obtida com uma pequena quantidade de biomassa (MASHITAH, 2012).

As actinobactérias são fontes importantes de novos compostos bioativos, como por exemplo, antibióticos e proteases. Actinobacterias exibem uma grande variedade de morfologias, como cocóide (*Micrococcus*) ou cocobacilo (por exemplo, *Arthrobacter*), ocorre fragmentação de hifas (por exemplo, *Nocardia* spp.) e podem ser altamente diferenciadas em micélio ramificado (por exemplo, *Streptomyces* spp.). Também, exibem diversas propriedades fisiológicas e metabólicas, tais como a produção de enzimas extracelulares e a formação de uma ampla variedade de metabólitos secundários.

Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo sintetizar nanopartículas de prata utilizando *Streptomyces* e avaliar sua atividade carrapaticida e cupinicida.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

## 2.1.Reagentes

Os reagentes nitrato de prata, fosfato bibásico e fostafo monobásico foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Os meios de cultura utilizados foram comprados da HIMEDIA. OS outros reagentes apresentam grau analítico.

## 2.2 Microrganismos, Meios de manutenção e esporulação

Para o experimento foram utilizados os fungos: *Aspergillus tamaritii* Kita UCP 1279, *Mucor subtilissimus* UCP 1262, *Aspergillus terreus* UCP 1276, e 4 linhagens de actinomicetos (*Streptomyces* sp. DPUA 1542, *Streptomyces* sp. DPUA 1557, *Streptomyces malasyensis* DPUA 1571, *Streptomyces parvulus* DPUA 1573). Todas essas linhagens foram isoladas do solo da Caatinga (Região Nordeste do Brasil) e obtidas através do Projeto RENNORFUN/CNPq/FACEPE) e estão depositados na coleção de culturas da Universidade Católica de Pernambuco (UCP).

## 2.3 Condições de cultivo

Após o período de esporulação, os esporos foram suspensos com solução de NaCl 0,15M em Tween 80 (NaCl a 0,9% (p/v), previamente esterilizada a 121°C/ 1 atm de pressão, durante 20 minutos. Para a produção, os esporos foram colocados no meio MS-2 (Porto et al., 1996) e a fermentação ocorreu em 72 h a 120 rpm em 30°C.

## 2.4 Biossíntese extracelular de nanopartículas de prata por microrganismos

Após o cultivo submerso, ao sobrenadante extracelular (100 mL), após filtração e centrifugação, foram adicionados 100 mL de solução de nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) 1mM, e submetido à agitação orbital, 150 rpm por 72 horas, 30°C. A formação de nanopartículas de prata foi observada pela redução da prata e detectada por Espectroscopia UV-visível na faixa de 400 a 500 nm (Naveen et al. 2010).

## **2.5 Caracterização das Nanopartículas de prata (AgNPs) através de espectrofotometria UV-Vis**

A biorredução de íons de prata foi monitorada pela mudança de cor de amarelo pálido para marrom. Além disso, foi confirmada por altos picos observados pelo espectro de absorção utilizando UV-visível no *range* de comprimento de onda de 200-800 nm (Akther et al., 2020) através da ressonância plasmônica de superfície.

## **2.6 Análise por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)**

Os AgNPs foram avaliadas quanto à presença de biomoléculas responsáveis pela biorredução usando a análise espectral por infravermelho por transformada de Fourier em um espectrômetro (Akther et al., 2020).

## **2.7 Caracterização de AgNPs por Difração de raios-X (DRX)**

Os diâmetros dos AgNPs foram determinados pela equação de Scherrer ( $D = 0,9 \lambda / \beta \cos\theta$ ), sendo:  $D$  = média do diâmetro das partículas;  $\lambda$  = comprimento de onda da radiação eletromagnética;  $\theta$  = ângulo de difração;  $\beta$  ( $2\theta$ ) = largura a meia altura do pico de difração (Silva et al., 2017).

## **2.8 Análise de tamanho de partícula (DLS) e Potencial Zeta**

A medição do diâmetro hidrodinâmico seguiu-se de acordo com Silva et al. (2017), o qual foi medido por espalhamento dinâmico de luz com laser de comprimento de onda 633 nm e um ângulo de espalhamento fixo de 173°. O tamanho das partículas foi medido considerando a partícula como esférica. Cada amostra foi avaliada (medida) três vezes para duas amostras replicadas a uma temperatura constante de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ .

## **2.9 Microscopia eletrônica de Transmissão (MET)**

Foi realizada para determinar o tamanho e a forma das nanopartículas de prata utilizando imagens de MET executadas em microscópio JEM-1011 (JEOL, Peabody, MA, EUA), operado em tensão acelerada de 120 kV.

### **2.10 Microscopia eletrônica de varredura com espectroscopia de energia dispersiva (SEM-EDX)**

A morfologia e a composição elementar das nanopartículas de prata foram identificadas por SEM-EDX, em que as AgNPs foram secas a 60°C e em seguida submetidas ao SEM equipado com EDX (JEOL, JSM-IT 500LA), sendo as imagens obtidas utilizando SEM, e os picos obtidos através da espectroscopia de energia dispersiva.

### **2.11 Atividades Biológicas: Atividade carrapaticida e Atividade termicida (cupinicida)**

Os carrapatos da espécie *Dermacentor nitens* foram coletados manualmente de Equinos infestados localizados no Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE. As fêmeas foram selecionadas de acordo com a sua integridade, motilidade e ingurgitamento máximo. Logo após, foram lavadas em água destilada, secas em papel absorvente, separadas em grupos homogêneos contendo 10 fêmeas cada, e em seguida, pesadas em balança analítica. O bioensaio carrapaticida foi realizado de acordo com o teste de imersão de adultos descrito por Drummond et al. (1973) modificado por Cruz et al (2016). A eficácia das amostras foi determinada como o valor mínimo de 95%, conforme legislação para carrapaticidas no país (Brasil, 1990).

Para a realização dos bioensaios em condições laboratoriais foram utilizados soldados forrageiros de *N. corniger* provenientes de colônias localizadas na cidade de Recife. Os cupins foram coletados por meio de armadilhas confeccionadas com papelão corrugado de 2,5 m de comprimento por 16 cm de largura, enrolado e envolvido por embalagens plásticas descartáveis de refrigerantes de 2 litros. As armadilhas foram dispostas nos territórios de forrageamento de 3 colônias (CASARIN, 2007). A cada 10 dias as armadilhas eram retiradas do campo, levadas para o laboratório e os cupins

foram separados e mantidos em potes plásticos contendo novo papelão corrugado umedecido e armazenados em temperatura ambiente até a montagem dos bioensaios.

A metodologia utilizada nos bioensaios foi modificada de Casarin (2007). Na montagem dos bioensaios, foram utilizadas placas de petri descartáveis 150mm x 15mm. Foram colocados 20 soldados e papelão para o forrageio dos cupins (recipiente alimentação). Previamente, os recipientes receberam areia esterilizada e umedecida com água destilada, que serviu como substrato para os forrageiros. O recipiente ninho recebeu 2 gramas de areia com 2,5 mL de água.

Para avaliar a toxicidade, discos de papel filtro (80g) foram impregnados com nanopartículas de prata, nanopartículas de prata e extrato vegetal obtido de *Cassia grandis*, solubilizadas em solução salina nas concentrações finais de 0 a 2mg/mL de AgNPS e 0 a 2mg/mL de extrato. A cada dia, houve contagem dos soldados vivos/mortos. Água foi utilizada como controle negativo.

**2.12 Análises estatísticas:** Todos os valores serão apresentados como médias  $\pm$  desvios-padrão. Estes dados serão analisados estatisticamente por ANOVA, seguida do teste Tukey, quando indicado. Diferenças entre os grupos serão aceitos como significativos ao nível de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ).

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1 Seleção da melhor linhagem microbiana com capacidade de sintetizar nanopartículas de prata em fermentação submersa**

A diversidade de biomoléculas produzidas por microrganismos já é conhecida e amplamente relatada da literatura científica, e entende-se que a síntese verde de nanopartículas é realizada por diferentes metabólicos primários e/ou secundários, logo, foram estudadas 12 linhagens fúngicas e 4 linhagens de actinomicetos, visto que são microrganismos já constatados na produção de biomoléculas de interesse biotecnológico, como, proteases, lacases, substâncias antimicrobianas e ácido clavulânico (Alves et al., 2021; Costa et al., 2020, Batista et al., 2020; Oliveira, et al., 2020; .Silva et al., 2017; Silva et al., 2016; Silva et al., 2016; Nascimento et al., 2014).

## Fungos

Das doze linhagens estudadas não foi observada síntese de nanopartículas (Tabela 1), visto que só foi analisado quando o mecanismo é extracelular, pois, a síntese de AgNPs pode ser também intracelular, porém, o custo de produção aumenta e muitas vezes não se torna viável.

Tabela 1. Fungos filamentosos analisados para a síntese verde de AgNPs.

<b>Microrganismo</b>	<b>Meio de produção</b>	<b>Síntese de AgNPs extracelular</b>
<i>Aspergillus terreus</i> UCP 1276	MS-2*	NÃO
	CZ**	NÃO
<i>Aspergillus tamaraii</i> Kita UCP 1279	MS-2*	NÃO
	CZ**	NÃO
<i>Aspergillus ochraceus</i> URM 604	MS-2*	NÃO
	CZ**	NÃO
<i>Aspergillus sclerotiorum</i> URM 5792	MS-2*	NÃO
	CZ**	NÃO
<i>Rhizopus arrhizus</i> URM 7651	MS-2*	NÃO
	CZ**	NÃO
<i>Rhizopus microsporus</i> URM 7652	MS-2*	NÃO
	CZ**	NÃO
<i>Rhizopus</i> spp. SIS V295	MS-2*	NÃO
	CZ**	NÃO
<i>Rhizopus microsporus</i> URM 7656	MS-2*	NÃO
	CZ**	NÃO
<i>Mucor subtilissimus</i> UCP 1262	MS-2*	NÃO
	CZ**	NÃO
<i>Absidia cylindrospora</i> UCP 1301	MS-2*	NÃO
	CZ**	NÃO
<i>Aspergillus serratalhadensis</i> URM:7866	MS-2*	NÃO
	CZ**	NÃO
<i>Rhodotorula glutinis</i> URM 6692	MS-2*	NÃO
	YPD***	NÃO

\*MS-2 - Meio de Soja 2%; \*\*Caldo Czapek – CZ; \*\*\*YPD (Yeast extract – Peptone – Dextrose)

## Actinomicetos

Os critérios indicadores de formação de AgNP foram a mudança de coloração da solução (Figura 1) e a presença na banda de ressonância plasmônica superficial (RPS) nos comprimentos de onda entre 410-450 nm por espectroscopia ultravioleta-visível (UV-Vis). Logo, dentre as quatro

linhagens estudadas (Tabela 2), duas linhagens (*Streptomyces* sp. DPUA 1542 e *Streptomyces* sp. DPUA 1557) apresentaram capacidade em biossintetizar extracelularmente AgNP.

**Tabela 2.** Linhagens de actinomicetos estudadas em relação a capacidade de síntese extracelular de AgNPs.

Microrganismos	Meios de produção	Síntese de AgNPs extracelular
<i>Streptomyces</i> spp. DPUA 1542	MS-2*	SIM
	ISP-2**	SIM
<i>Streptomyces</i> spp. DPUA 1557	MS-2*	SIM
	HT***	NÃO
<i>Streptomyces malasyensis</i> DPUA 1571	MS-2*	NÃO
	HT***	NÃO
<i>Streptomyces parvulus</i> DPUA 1573	MS-2*	NÃO
	ISP-2**	NÃO

\*MS-2 - Meio de Soja 2%; \*\*ISP-2 - International Streptomyces Project-2 Medium; \*\*\*HT - meio Hickey Tresner.

A linhagem *Streptomyces* spp. DPUA 1542 cultivada no meio ISP-2 realizou biossíntese de AgNP e a banda de RPS apresentou um pico evidente no comprimento 420nm, enquanto *Streptomyces* spp. DPUA 1557 utilizando no meio de produção a farinha de soja como subproduto apresentou uma forte ressonância plasmônica superficial na região próxima ao comprimento 400nm.

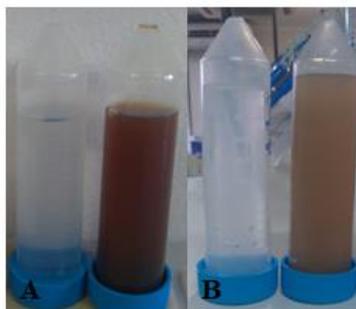


Figura 1. Amostras obtidas pelas biossíntese de AgNPs pela actinobactéria *Streptomyces* sp. DPUA 1542 no meio IPS-2 por 72h a 30°C em 120 rpm. (A: Padrão Solução AgNP; B: Síntese). 4B: *Streptomyces* sp. DPUA 1557 no meio MS-2 por 72h a 30°C em 120 rpm.

### 3.2 Planejamento fatorial 2<sup>3</sup> para biossíntese de AgNP por *Streptomyces* sp. DPUA 1557

Na área da biotecnologia, as nanopartículas têm sido cada vez mais utilizadas na análise biomédica, na fabricação de biossensores/biointerfaces, no diagnóstico clínico e na terapia, na administração de fármacos e outros. O interesse particular tem sido focado em partículas de metais nobres nanoestruturados para aplicação em biotecnologia devido à sua biocompatibilidade, menor toxicidade e maior afinidade com ampla gama de biomoléculas (Freire et al., 2017).

Além da seleção do microrganismo, um estudo sobre quais as vertentes podem influenciar na síntese de AgNPs é necessário, visto que esses fatores físicos e fisiológicos podem interferir no tamanho, forma e composição químicas da AgNPs (Tabela 3). Condições com pH diferentes pode-se observar uma forte influência na dinâmica molecular e na cinética das reações, o pH contribui muito para aumentar ou diminuir o número de  $H^+$  íons na reação química (Figura 2). O pH ácido pode aumentar a concentração de  $H^+$  e não afetar diretamente as mudanças conformacionais de proteínas e enzimas, mas a alteração na concentração de íons  $H^+$  pode moldar e alterar as propriedades eletronegativas do substrato que podem afetar sua ligação com o sítio ativo enzimático, isto é, o pH pode influenciar diretamente na formação do sistema coloidal (Figura 3) e também contribuir para sua formação ou não (Javed et al., 2021).

Tabela 3. Resultados do planejamento fatorial  $2^3$  na síntese de nanopartículas de prata por *Streptomyces* spp. DPUA 1557

Ensaio	Concentração de líquido fermentado	Concentração de solução de prata (mM)	pH	Síntese de AgNPs
<b>1</b>	12,5	1	6	Não
<b>2</b>	50	1	6	Não
<b>3</b>	12,5	10	6	Não
<b>4</b>	<b>50</b>	<b>10</b>	<b>6</b>	<b>Sim</b>
<b>5</b>	12,5	1	8	Não
<b>6</b>	50	1	8	Não
<b>7</b>	12,5	10	8	Não
<b>8</b>	50	10	8	Não
<b>9 (C)</b>	25	5,5	7	Sim
<b>10 (C)</b>	25	5,5	7	Sim
<b>11 (C)</b>	25	5,5	7	Sim

Portanto, de acordo com as análises realizadas o ensaio 4 apresentou a síntese de nanopartículas de prata (Figura 2).

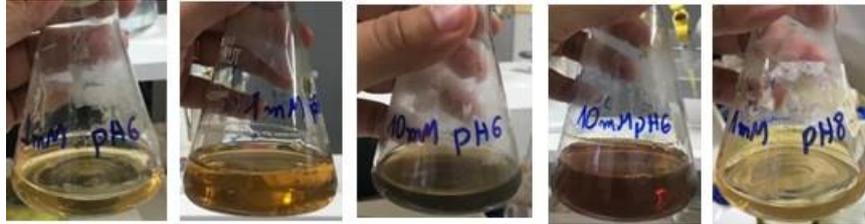


Figura 2. Fotos referente ao planejamento fatorial de síntese verde de nanopartículas de prata por *Streptomyces* spp. DPUA1557.

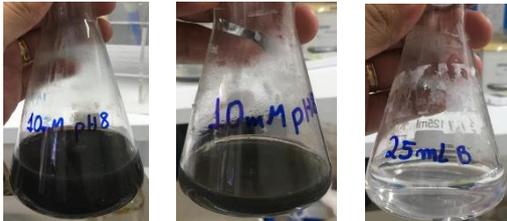
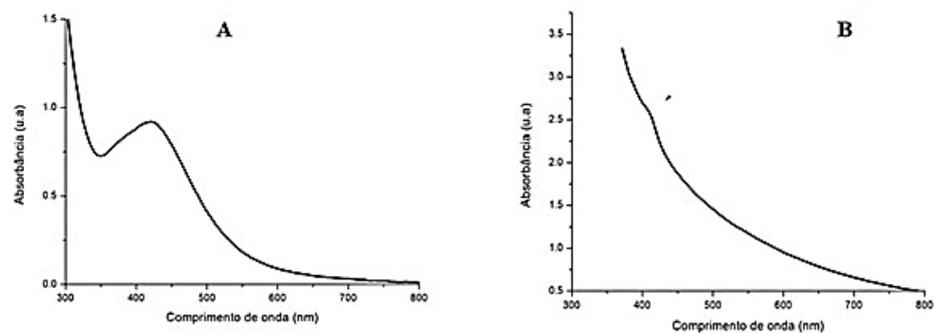


Figura 3. Ensaio 4 do planejamento fatorial  $2^3$  nas condições de 50% de líquido fermentado, 10mM de solução prata e pH 6, líquido fermentado (A); Controle (B) e Síntese verde (C).

Superfície de ressonância plasmônica (SPR) pode ser conceitualmente compreendida como a oscilação coletiva dos elétrons de condução em fase com a radiação eletromagnética incidente.

Sanjivkumar e colaboradores ao estudar o potencial de síntese de AgNPs pela linhagem *Streptomyces olivaceus* (MSU3) observaram o pico máximo de absorção no comprimento de 450 nm (Figura 4). Já no trabalho de Vijayabharathi & Gopalakrishnan, 2018 observou o pico máximo de absorção nas faixas 413-417 nm, valores próximos ao que também observado nessa pesquisa. Visto que essa variação pode ocorrer devido a diferente espécie microbiana, porém, entende-se que as nanopartículas sintetizadas por bactérias apresentam o pico de absorção nas faixas 400 a 450 nm.



**Figura 4.** (A) *Streptomyces* sp. DPUA 1542 cultivada no meio ISP-2 realizou biossíntese de AgNP e a banda de RPS apresentou um pico evidente no comprimento 420nm (B) *Streptomyces* sp. DPUA 1557 utilizando MS-2 apresentou uma forte ressonância plasmônica superficial na região próxima ao comprimento 400nm.

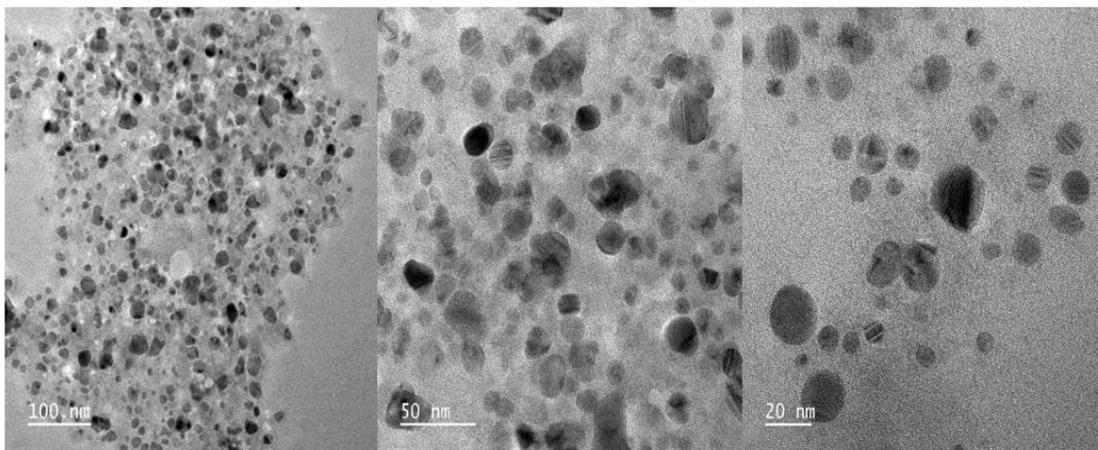
A variação da razão PVP/Ag resultou, para todas as amostras, aumentos na banda de absorção e na largura à meia altura destas bandas indicando a variação do raio das nanopartículas sintetizadas. O aparecimento de uma nova banda UV, caracteriza o surgimento de uma mistura de nanoestruturas com tamanhos e formas diferentes.

### 3.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

Na presente investigação a morfologia e o tamanho da AgNPs sintetizadas por *Streptomyces* sp. DPUA 1542 foram revelados pela análise TEM com um microscópio JEM-1011 (JEOL, Peabody,

MA, EUA), operado em tensão acelerada de 120 kV. Sendo as nanopartículas com morfologia monodispersa de formato esférico com tamanho aproximadamente de 20 nm (Figura 5). Corroborando com os nossos resultados, estudos anteriores mostraram que a forma esférica das nanopartículas de prata contribui para as bandas de absorção em torno 400–420 nm nos espectros UV-vis (Manivasagan et al., 2015).

**Figura 5:** Imagens TEM de nanopartículas de prata sintetizadas por *Streptomyces* sp. DPUA 1542



Resultados semelhantes foram encontrados com a caracterização de AgNPs obtidas pela síntese de *Streptomyces thinghirensis* sp. em que as imagens obtidas por TEM indicaram que as partículas são esféricas, uniformes e altamente monodispersas, com tamanho médio ~ 20nm. Já a síntese verde do extrato de *Sideritis* também resultou em AgNPs esférica e monodispersa com tamanho médio de partícula de 22–26 nm (Ceylan et al., 2021).

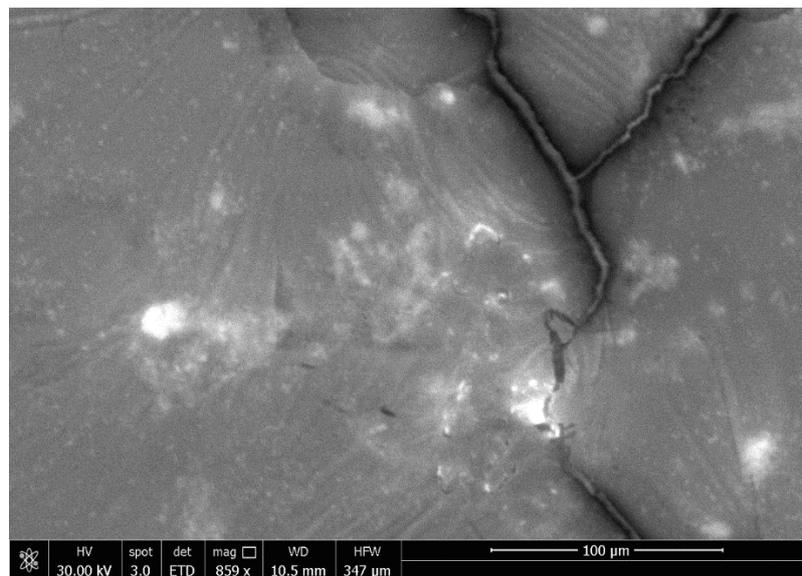
### 3.4 Microscopia eletrônica de varredura com espectroscopia de energia dispersiva (SEM-EDX)

Foi realizado para determinar a morfologia e as características da análise elementar de AgNPs (Fig 4 e 5) com a ajuda de SEM equipado com EDX (JEOL, JSM-IT 500LA). Observa-se na figura 4 que a imagem obtida por SEM confirma o resultado do MET em que as partículas têm formato esférico, já a composição elementar obtida pelo EDX mostra a presença da Ag distribuída em três picos no espectro, confirmando que a prata é o constituinte principal das nanopartículas, visto que o Au presente é devido ao preparo da amostra para a análise, além disso aparecem também C e O

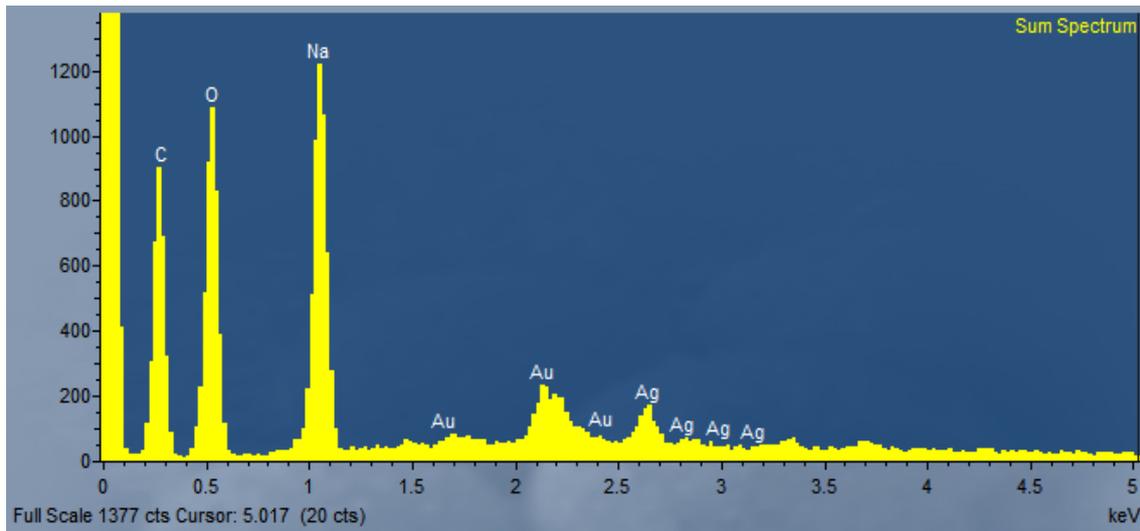
naturalmente presente em compostos orgânico, bem como em proteínas e aminoácidos fundamentais para a estabilização e redução da prata como apresentado no gráfico do FT-IR, a ausência de N confirma a redução de  $\text{AgNO}_3$  a molécula de prata.

No estudo de Sanjivkumar *et al.* (2019) os autores também comprovaram a formação de prata elementar por meio da redução de íons de prata, visto que a análise EDX nas AgNPs biossintetizadas de *Streptomyces olivaceus* indicou a presença dos grupos Ag, Cu e C apresentando o padrão EDX de AgNPs que confirma a existência de elementos Ag com sinal forte (3keV) na região da prata, assim como foi visto no presente trabalho.

**Figura 6.** Imagem micrográfica SEM de AgNPs sintetizada por *Streptomyces* sp. DPUA 1542



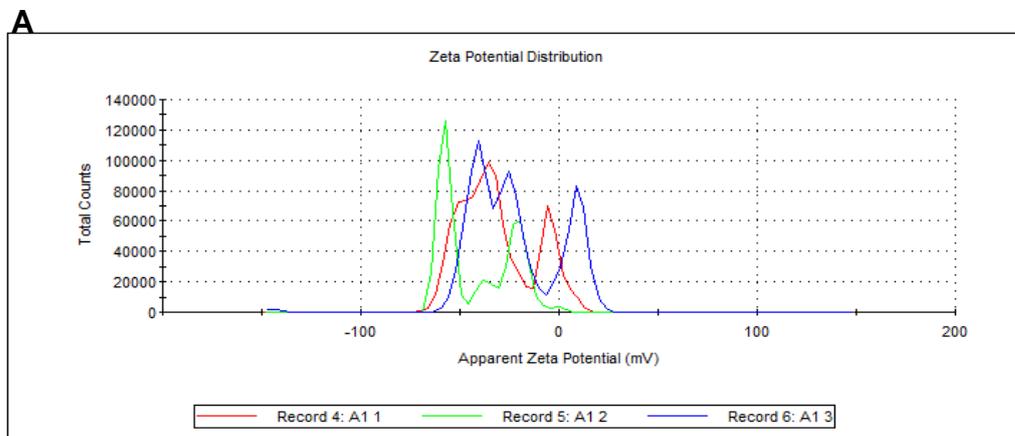
**Figura 7.** SEM com análise EDX de AgNPs sintetizados por *Streptomyces* sp. DPUA 1542 espectro EDX mostrando composição elementar.



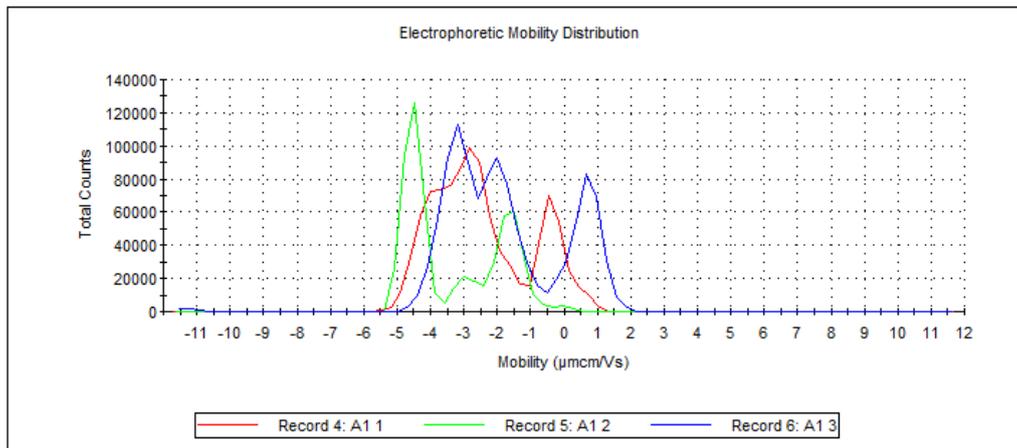
### 3.5 Potencial Zeta e DLS

O tamanho médio das partículas e a estabilidade das AgNPs biossintetizadas foram estimados por um analisador de tamanho de partículas. A análise dinâmica de espalhamento de luz (DLS) foi utilizada para prever o tamanho das partículas em soluções coloidais de acordo com a interação entre luz e nanopartículas, enquanto sua estabilidade foi detectada de acordo com a carga superficial da partícula que é medida pela análise do potencial zeta. Os dados mostraram que o potencial zeta e o tamanho das partículas AgNPs foram respectivamente  $-26,9$  mV e  $1534.667$  nm (Fig 6 A e B), indicando que as AgNPs sintetizadas extracelularmente por *Streptomyces* sp. são altamente estáveis devido a forças repulsivas eletrostáticas.

**Figura 8.** Potencial Zeta de AgNPs sintetizadas por *Streptomyces* sp. DPUA 1542 (A e B).



**B**



Sabe-se que o tamanho determinado pela análise DLS é geralmente maior que o tamanho relacionado calculado a partir de SEM/TEM, porque o DLS reflete o tamanho hidrodinâmico. No entanto, a aglomeração ou a baixa dispersão aumentam dramaticamente o valor médio e, portanto, geralmente contradizem os resultados do SEM/TEM (Ceylan et al., 2021). Em seu estudo Loqman *et al.* (2022) ressaltou que o tamanho das partículas dos AgNPs foi maior no experimento DLS do que nas imagens TEM. Visto que, o TEM permite a medição do tamanho no estado seco das nanopartículas, resultando em imagens de partícula única, enquanto o DLS faz isso no estado hidratado da amostra, resultando numa estimativa de tamanho médio que ainda por cima é influenciada em direção ao extremo maior da distribuição da população (Das et al., 2017).

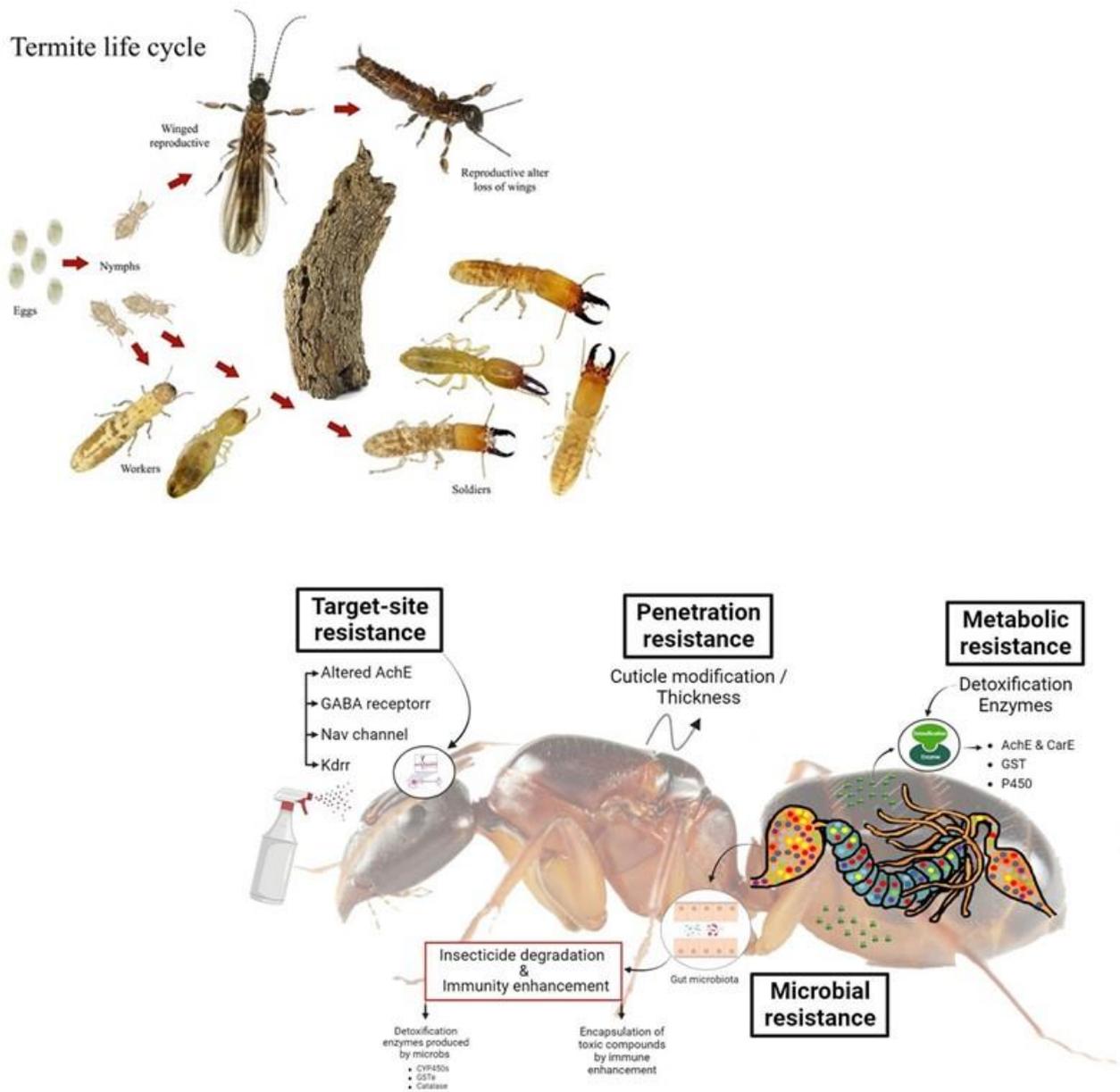
### 3.6 Atividade carrapaticida de AgNPs frente ao carrapato *Dermacentor nitens*

As nanopartículas de prata sintetizadas por todas as espécies de *Streptomyces*, incluindo as que apresentaram maior rendimento na síntese de AgNPs, *Streptomyces* sp. DPUA 1557 e *Streptomyces* sp. DPUA 1542 não apresentaram atividade carrapaticida em nenhuma das concentrações estudadas.

### 3.7 Atividade cupinicida

A atividade cupinicida de nanopartículas de prata é um campo de pesquisa emergente que tem despertado grande interesse devido às propriedades únicas dessas nanopartículas. A prata é conhecida

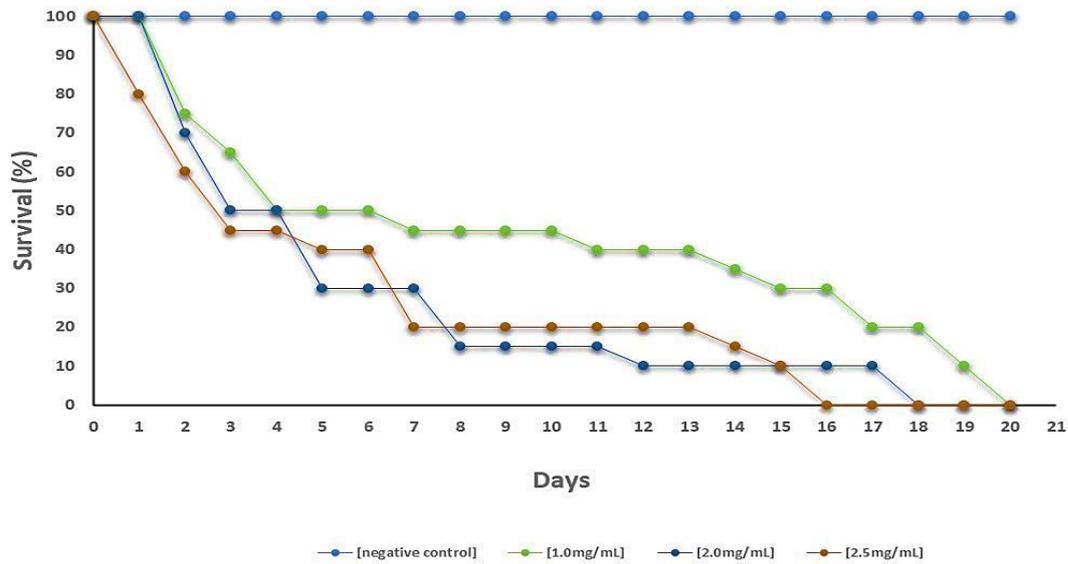
por suas propriedades antimicrobianas e tem sido amplamente utilizada em diversas aplicações, incluindo na medicina e na indústria. Recentemente, tem havido um interesse crescente em explorar o potencial das nanopartículas de prata como agentes cupinícidias para o controle de térmitas e outros insetos nocivos. Os inseticidas do tipo cupinícida em geral pertencentes a classe dos fenilpirazóis, são aplicados no solo, cuja ação é extremamente ativa. Atua no sistema nervoso central do inseto inibindo o receptor do ácido gama aminobutírico (GABA), ou seja, quando a função desse sistema regulador é bloqueada pela ação do fipronil, ocorre então hiperexcitação neural e conseqüentemente a morte do inseto (COUTINHO et al., 2005). Estudos realizados em animais demonstraram que o fipronil possui uma toxicidade seletiva maior para os insetos em relação aos mamíferos, em função da afinidade seletiva para os canais de GABA dos insetos em comparação com os canais GABA de vertebrados (ROBERTS; REIGRT, 2013).



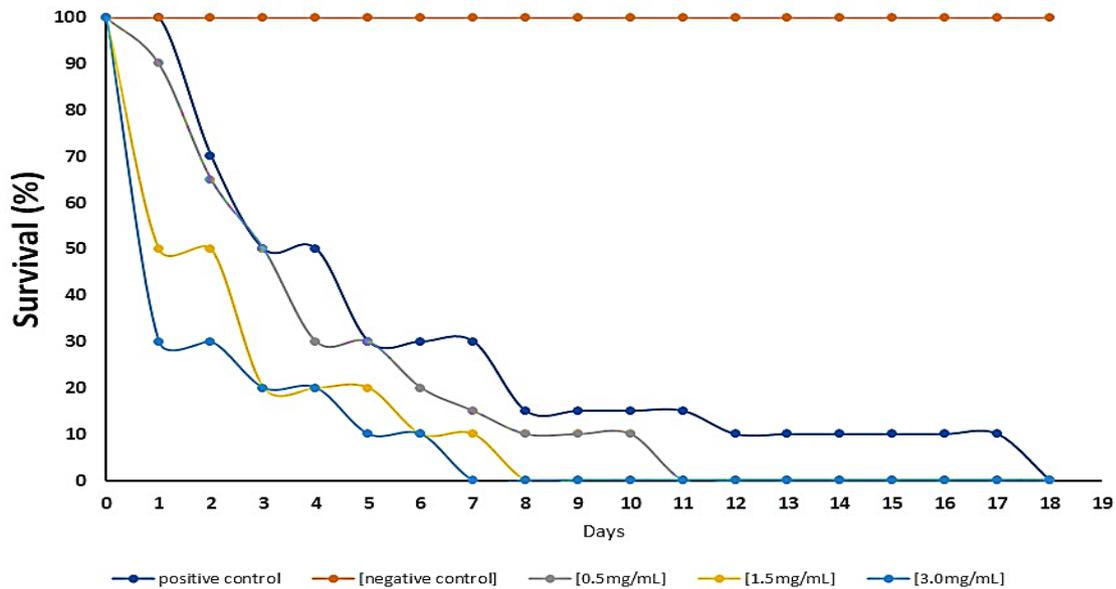
Durante a análise dos bioensaios foi possível observar nas duas concentrações maiores uma taxa de morte acima de 80% após 13 dias. Diante dos resultados obtidos, a toxicidade das AgNPs foi relativamente alta nos diferentes períodos para todas as concentrações testadas, revelando uma boa eficiência. Além disso, houve diminuição no consumo com o aumento das concentrações. Alta mortalidade e aumento do consumo sugere que a substância não apresenta repelência aos cupins.

**Figura 9.** Atividade termicida (cupinicida) de nanopartículas de prata sintetizadas por *Streptomyces* sp. DPUA 1557. A- Nanopartículas de prata. B- Nanopartículas de prata associadas com extrato aquoso de *Cassia grandis*.

**A.**



**B.**



A procura por novos ingredientes ativos envolve a fitoquímica, área prospectiva de novas moléculas químicas presentes nos vegetais. A partir da identificação dos constituintes químicos, alterações moleculares podem ser necessárias para aumentar a toxicidade. Desta forma, efeitos tóxicos e fungistáticos foram observados para vários grupos de insetos, cujas moléculas serviram de base para a síntese das amidas e compostos piperonílicos (PAGNOCCA et al., 1996; PAULA et al., 2000; VICTOR et al., 2001; BUENO et al., 2004; MORINI et al., 2005). No presente trabalho, a alta mortalidade observada durante o período estipulado nos bioensaios, foi possível identificar a intoxicação dos cupins ao longo do tempo. Os indivíduos apresentaram sintomas como dificuldade de ficar em posição correta, abdome achatado e letargia semelhante aos observados por Paula et al. (2000) para *Cornitermes cumulans* em bioensaios de aplicação tópica com amidas derivadas da piperina.

## 6. Conclusão

O gênero *Streptomyces* se mostrou eficiente na síntese de nanopartículas de prata com elevado grau de produção e com potencial biotecnológico. Os compostos AgNPS associados ao extrato aquoso de *Cassia grandis* apresentaram atividade cupinicida quando incorporados em discos de celulose. No entanto, o mesmo não foi observado nos ensaios com carrapatos.

## 7. Referências

Al-Dhabi, N.A.; Ghilan, A.M.; Esmail, G.A.; Arasu, M.V.; Duraipandiyar, V.; Ponmurugan, K. Environmental friendly synthesis of silver nanomaterials from the promising *Streptomyces parvus* strain Al-Dhabi-91 recovered from the Saudi Arabian marine regions for antimicrobial and antioxidant properties. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**. (2019), <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.111529>.

Akther T., Khan M.S., Hemalatha S. Biosynthesis of silver nanoparticles via fungal cell filtrate and their anti-quorum sensing against *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, 8, 104365, 2020.

Cruz P.B., Barbosa A.F., Melo D., Novato T., Fidelis Q. C, Monteiro Q.M.O. Acaricidal activity of methanol extract of *Acmella oleracea* L. (Asteraceae) and spilanthol on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*, 228, 137-143, 2016.

Drummond, R. O.; Ernst S. E.; Trevino, J. L.; Gladn'ey, W. J.; Graham, O. H. *Boophilus annulatu/* and *B. microplus/* Laboratory Tests of Insecticides. *Journal of Economic Entomology*. 66 (1), 1973

Gupta, A.; Singh, D.; Singh, S.K.; Singh, V.K.; Singh, V.K.; Kumar, A. Role of actinomycetes in bioactive and nanoparticle synthesis in: *Role of Plant Growth Promoting Microorganisms in Sustainable Agriculture and Nanotechnology*. (2019) DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817004-5.00010-5>.

Kalimuthu, K.; Cha, B.S.; Kim, S.; Park, K.S. Eco-friendly synthesis and biomedical applications of gold nanoparticles: A review, **Microchemical Journal** (2019), doi: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104296>

Naveen K.S. H.; Kumar, G.;Karthik L.; Rao K.V.B. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the filamentous fungus *Penicillium* sp. *Archives of Applied Science Research*, v 2 (6) p. 161-167, 2010.

PORTO, A.L.F.; CAMPOS-TAKAKI, G.M.; LIMA FILHO, J.L. Effects of culture conditions on protease production by *Streptomyces clavuligerus* growing on the soy bean flour medium. **Appl. Biochem. Biotechnol.** v.60, p.115-122, 1996.

Santos, N.P.; Nascimento, S.C.; Silva, J.F.; Pereira, E.C.G., Silva, N.H.; Honda, N.K., Magalhães, N.S.S. Usnic Acid - Loaded Nanocapsules: An Evaluation of Cytotoxicity. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 15, p.355-361, 2005.

- Silva-Vinhote, N.M.; Caballero, N. E. D.; Silva, T.A.; Quelemes, P.V.; Silva, T.A.; Quelemes, P.V.; Araújo, A.R.; Moraes, A.C.M.; Câmara, A.L.V.; Longo, J.P.F.; Azevedo, Silva, D.A.; Leite, J.R.S.A.; Teixeira, M.F.S. Extracellular biogenic synthesis of silver nanoparticles by Actinomycetes from amazonic biome and its antimicrobial efficiency. **African Journal of Biotechnology**, v,16(43), pp. 2072-2082, 2017.
- Silva, J.M; Clementino, E.L; Cunha, M.N.C.; Porfírio, K.P.S.; Mota; R.A.; Teixeira, M.F.S.; Porto, T.S.; Porto, A.L.F.; Porto, C.S. Atividade antimicrobiana de moléculas bioativas produzidas por *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 frente a *Staphylococcus* spp. multirresistentes de mastite bubalina. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 36(9):805-810, 2016.
- Singh, A.; Gautam, P.K.; Verma, A.; Singh, V.; Priya, P.M.S.; Shivalkar, S.; Sahoo, A.K.; Samanta, S.K. Green synthesis of metallic nanoparticles as effective alternatives to treat antibiotics resistant bacterial infections: A review, **Biotechnology Reports** (2020), <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00427>.

## CAPÍTULO II



06/12/2023 17:06 870230107796  
  
29409162308160361

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2023 025661 9

Dados do Depositante (71)

---

Depositante 1 de 3

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24416174000106

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: AVENIDA DOM MANOEL DE MEDEIROS, S/N

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 52171-900

País: Brasil

Telefone: (81) 332 06104

Fax: (81) 332 06001

Email: inovacao@ufrpe.br

---

**PETICIONAMENTO  
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em  
06/12/2023 às 17:06, Petição 870230107796

## Depositante 2 de 3

**Nome ou Razão Social:** UNIVERSIDADE DE PERNAMBUCO

**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica

**CPF/CNPJ:** 11022597000191

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Jurídica:** Instituição de Ensino e Pesquisa

**Endereço:** AV. AGAMENON MAGALHÃES,S/N ,SANTO AMARO

**Cidade:** RECIFE

**Estado:** PE

**CEP:** 50100-010

**País:** BRASIL

**Telefone:** (81) 318 41248

**Fax:**

**Email:**

## Depositante 3 de 3

**Nome ou Razão Social:** UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUI

**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica

**CPF/CNPJ:** 06517387000134

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Jurídica:** Instituição de Ensino e Pesquisa

**Endereço:** BR 135, Km 3, Planalto Horizonte,

**Cidade:** Bom Jesus

**Estado:** PI

**CEP:** 64900-000

**País:** BRASIL

**Telefone:** (86) 323 72332

**Fax:**

**Email:**

**PETICIONAMENTO  
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em  
06/12/2023 às 17:06, Petição 870230107796

**Dados do Pedido**

---

**Natureza Patente:** 10 - Patente de Invenção (PI)

**Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):** DISCOS DE CELULOSE IMPREGNADOS COM NANOPARTÍCULA DE PRATA ASSOCIADA A EXTRATO VEGETAL PARA ATIVIDADE CUPINICIDA

**Resumo:** DISCOS DE CELULOSE IMPREGNADOS COM NANOPARTÍCULA DE PRATA ASSOCIADA A EXTRATO VEGETAL PARA ATIVIDADE CUPINICIDA.

A presente invenção propõe um agente cupinicida a partir de discos de celulose impregnados com nanopartículas de prata associadas a extrato vegetal para o controle de cupim do gênero *Nasutitermes* (Termitidae: *Nasutitermitinae*), insetos da subordem Isoptera (Ordem Blattodea), que contém cerca de 3166 espécies catalogadas no mundo, com 661 delas ocorrendo na Região Neotropical, onde a sociedade dos cupins é dividida em três castas: 1- soldados; 2- operários e 3- rainhas e reis. Para a avaliação da atividade cupinicida, foram utilizados soldados, e os discos de celulosos contendo a formulação permaneceram expostos por um período de 20 dias sob a ação de cupins *Nasutitermes* corniger em ensaio de preferência alimentar, com determinação da densidade, percentual de perda de massa, índice de deterioração e o índice de susceptibilidade. A formulação foi composta de 0 a 2.0mg/mL de nanopartículas e 0 a 1,5mg/mL de extrato aquoso vegetal. Após 72h, para a concentração 2.0mg/mL de nanopartículas e 1,5mg/mL de extrato aquoso vegetal associados, houve 80% de mortalidade dos soldados, e não foram observados mortalidade nos grupos controle contendo apenas água. Diante disso, o produto cupinicida a base de nanopartículas prata e extrato vegetal pode ser utilizado no controle de *Nasutitermes* corniger.

**Figura a publicar:** 1

---

**PETICIONAMENTO  
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 06/12/2023 às 17:06, Petição 870230107796

**Dados do Inventor (72)**

---

**Inventor 1 de 10****Nome:** ANA LUCIA FIGUEIREDO PORTO**CPF:** 25514776468**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Física:** Professor do ensino superior**Endereço:** Rua José Paraíso, n. 25, Apto 1701,Boa viagem**Cidade:** Recife**Estado:** PE**CEP:** 51030-390**País:** BRASIL**Telefone:** (81) 991 051528**Fax:****Email:** analuporto@yahoo.com.br**Inventor 2 de 10****Nome:** ROMERO MARCOS PEDROSA BRANDÃO COSTA**CPF:** 04399311428**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Física:** Professor do ensino superior**Endereço:** Rua Padre Antônio Fernandes, 66, Cordeiro**Cidade:** Recife**Estado:** PE**CEP:** 50630-010**País:** BRASIL**Telefone:** (81) 999 172610**Fax:****Email:** romero\_brandao@yahoo.com.br**Inventor 3 de 10**

---

**PETICIONAMENTO  
ELETRÔNICO**Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em  
06/12/2023 às 17:06, Petição 870230107796

**Nome:** KETHYLEN BARBARA BARBOSA CARDOSO

**CPF:** 11157415431

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Doutorando

**Endereço:** Rua Gregório de Matos Guerra, 100, Zumbi do Pacheco

**Cidade:** Recife

**Estado:** PE

**CEP:** 54230-422

**País:** BRASIL

**Telefone:** (81) 996 696930

**Fax:**

**Email:** kethybarbara@gmail.com

**Inventor 4 de 10**

**Nome:** VIVIANNE FERREIRA ARAUJO BRANDAO

**CPF:** 05245807408

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Mestrando

**Endereço:** Rua Padre Rodrigues Campelo, 398, Rua Padre Rodrigues  
Campelo, 398

**Cidade:** Recife

**Estado:** PE

**CEP:** 50730-050

**País:** BRASIL

**Telefone:** (81) 986 001428

**Fax:**

**Email:** vivianne.araujo@ufrpe.br

**Inventor 5 de 10**

---

**PETICIONAMENTO  
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em  
06/12/2023 às 17:06, Petição 870230107796

**Nome:** JUANIZE MATIAS DA SILVA BATISTA

**CPF:** 06743387401

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Pesquisador

**Endereço:** Avenida José Francisco dos Santos, 668 casa 03, Pau Amarelo

**Cidade:** Paulista

**Estado:** PE

**CEP:** 53435-590

**País:** BRASIL

**Telefone:** (81) 997 103851

**Fax:**

**Email:** juanizematias@yahoo.com.br

**Inventor 6 de 10**

**Nome:** MICHELINE THAIS DOS SANTOS

**CPF:** 09591072406

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Doutorando

**Endereço:** Rua Elpídio Branco, Nº225, Varzea

**Cidade:** Recife

**Estado:** PE

**CEP:** 50740-250

**País:** BRASIL

**Telefone:** (81) 997 103851

**Fax:**

**Email:** michelinesantos@live.com

**Inventor 7 de 10**

**PETICIONAMENTO  
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em  
06/12/2023 às 17:06, Petição 870230107796

**Nome:** RAQUEL PEDROSA BEZERRA

**CPF:** 03304394486

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Professor do ensino superior

**Endereço:** 1º Travessa Bezerra de Menezes,54, Jardim Primavera

**Cidade:** Camaragibe

**Estado:** PE

**CEP:** 54753-181

**País:** BRASIL

**Telefone:** (81) 996 467466

**Fax:**

**Email:** rpbezerra@yahoo.com.br

**Inventor 8 de 10**

**Nome:** THIAGO PAJEU NASCIMENTO

**CPF:** 07290171411

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Professor do ensino superior

**Endereço:** Planalto Horizonte, Bom Jesus, Planalto Horizonte

**Cidade:** Bom Jesus

**Estado:** PI

**CEP:** 64900-000

**País:** BRASIL

**Telefone:** (81) 984 438125

**Fax:**

**Email:** thiagopajeu@ufpi.edu.br

**Inventor 9 de 10**

**PETICIONAMENTO  
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em  
06/12/2023 às 17:06, Petição 870230107796

**Documentos anexados**


---

<b>Tipo Anexo</b>	<b>Nome</b>
Comprovante de pagamento de GRU 200	Pc._23661.pdf
Procuração	06. procuração UFPI.pdf
Procuração	07. Procuração_Patente_Discos_Cupim_UPE_.pdf
Relatório Descritivo	1 - Relatório Descritivo.pdf
Reivindicação	2 - Quadro Reivindicatório.pdf
Resumo	3 - Resumo da Patente.pdf
Desenho	4- Desenhos.pdf

**Acesso ao Patrimônio Genético**


---

- Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

**Declaração de veracidade**


---

- Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

**PETICIONAMENTO  
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 06/12/2023 às 17:06, Petição 870230107796

## **DISCOS DE CELULOSE IMPREGNADOS COM NANOPARTÍCULA DE PRATA ASSOCIADA A EXTRATO VEGETAL PARA ATIVIDADE CUPINICIDA**

### **Campo da invenção**

[001] A presente patente, descrita a seguir, propõe composição de agente com atividade cupinicida composto por extrato vegetal imobilizado em nanopartícula metálica utilizando discos de celulose como veículo para procedimento, bem como sua metodologia de obtenção e preparação. Esta invenção está situada no campo da biotecnologia, associada a agricultura e indústrias agropecuárias, de papel e celulose e química.

### **Fundamentos da invenção**

[002] A madeira é o polímero natural mais abundante no planeta, e é utilizada como um dos principais elementos em construções humanas desde os princípios das civilizações. (Makarona *et al.*, Nat. resist. of six wood sp. to *N. corniger* Motsch. in field condition. Nano-Structures & Nano-Objects. v.10. 2017). Exercendo importante papel na economia devido a sua vasta utilização em vigas estruturais e telhados, em peças de acabamento e móveis, em obras externas e na construção civil para mobiliário e construção civil leve (Instituto de Pesquisas Tecnológicas [IPT], 2019). Uma das características mais importantes da madeira, devido a seu uso comum é sua durabilidade natural, pois em espécies florestais que possuem alta resistência à biodeterioração, é desnecessário a utilização de produtos químicos com a finalidade de aumentar seu tempo em serviço, diminuindo os impactos ambientais e os gastos desnecessários com a substituição de peças (Stallbaun *et al.*, Resist. nat. da madeira de *S. paniculatum* Vogel a cupins em cond. de lab. Floresta e Amb. V. 24. 2017).

[003] Apesar de sua durabilidade, a madeira é vulnerável à ação de organismos xilófagos, conforme as condições de temperatura, umidade, aeração e insolação que é exposta, capaz de proporcionar menor ou maior deterioração de sua estrutura física. Dentre os organismos xilófagos, os cupins estão em destaque, pois apresentam ampla distribuição nos meios urbano e rural. São insetos da subordem Isoptera (Ordem Blattodea), que contêm cerca de 3166 espécies catalogadas no mundo, com 661 delas

ocorrendo na Região Neotropical. São conhecidos por sua importância econômica como pragas da madeira e de materiais lignocelulósicos afins (Lima e Costa-Leonardo. Rec. aliment. exp. pelos cupins (Insecta: Isoptera). Biota Neotrop. V. 7. 2007).

[004] Os cupins do gênero *Nasutitermes* (Termitidae: Nasutitermitinae) tendem a construir colônias em locais acima da superfície do solo, em troncos, ou galhos ou ramos das árvores durante a época chuvosa e utilizando de areia, fluidos fecais e salivares (Paes et al., Efeito do teor de ext.s na resist. nat. de cinco mad. ao ataque de cupins xilófagos. Ciência Florestal, v. 26, 2016).

[005] Os cupins do gênero *Nasutitermes* são os mais diversificados contendo 254 espécies catalogadas, 114 delas na Região Neotropical, alimentam-se de madeira seca, úmida ou parcialmente decomposta. Dentre as espécies desse gênero, a espécie de cupim *Nasutitermes corniger* é habitualmente encontrada em várias regiões do Brasil, com ataque às estruturas de madeira empregadas nos meios urbano e rural (Paes et al., Efeito do teor de ext.s na resist. nat. de cinco mad. ao ataque de cupins xilófagos. Ciência Florestal, v. 26, 2016).

[006] Naturalmente, para o controle destas pragas e manutenção da agroindústria são aplicados pesticidas. Estas são substâncias compostas de ingredientes quimicamente ou biologicamente ativos que previnem, repelem, destroem ou controlam pragas, ou regulam o crescimento das plantas, sendo os agrotóxicos uma das principais ferramentas utilizadas para o manejo de pragas na produção agrícola em todo o mundo (Wu *et al.* Trends and persp. general Pest. analytical chem. Adv. Agrochem, 2023). A aplicação excessiva e indiscriminada de pesticidas para fomentar a produção de alimentos e insumos derivados da celulose, no entanto, leva à sua deposição exorbitante nos solos.

[007] Em abundância, os pesticidas afetam negativamente a diversidade e composição do solo e de organismos vivos. Além disso, o custo dos pesticidas e o surgimento de resistência entre os insetos-praga contra os agrotóxicos exigem atenção (Shahid e Khan, Ecotoxic. imp. of resid. pest. to benef. soil bact: A review. Pest. Biochem. and Phys., 188. 2022)

[008] Além disso, evidências apontam que a exposição de um organismo a determinados agrotóxicos é prejudicial à saúde. Compostos genotóxicos, como pesticidas, podem provocar danos genéticos, propiciando o desenvolvimento de neoplasias. Estudos também apontam efeitos da exposição a pesticidas no crescimento e neurodesenvolvimento em crianças (Buralli, Marques e Dórea.. Pest. eff. on child. growth and neurodev. Environmental Science & Health. V1, 2023). Sendo assim necessário o desenvolvimento de estratégias mais eficazes e menos nocivas para o controle de pestes.

[009] Com a finalidade de reduzir os impactos causados por esses agentes, o uso de compostos de origem natural é destacado. (Afzal *et al.*, Bioc. act. of silv. oak leaf ext. on the term.*H. indicola* Wasmann., Int. Biodeter. & Biodeg., 139, 2019). pontua a eficiência de extrato vegetal de *Grevillea robusta* A. Cunn. como termicida, onde 20 mg/mL do extrato vegetal inoculado em papel filtro atingiu 90% dos cupins. O cupim-de-formosa ou Cupim-subterrâneo, *Coptotermes formosanus*, também não mostraram resistência a ação de extratos derivados de plantas diferentes como *Andrographis lineata*, *Datura metel* e *Eclipta prostrata* (Elango *et al.*, Eff. of med. plant ext. against Formosan subterranean termite, *Coptotermes formosanus*., Ind. Crops and Prod. 36, 2012).

[0010] Lectinas de sementes de *Cratylia mollis* também são utilizadas por sua ação termicida, contra *Nasutitermes corniger*, reduzindo a taxa de eclosão de ovos e atingindo a população operária e militar (Bezerra *et al.*, Pestic. act. of *Cratylia mollis* seed lectin prep. against the termite *Nasutitermes corniger* and mite *Tetranychus bastosi*. Crop Protection. 163. 2023).

[0011] A presente invenção difere do atual estado da técnica por apresentar à indústria produto com ação termicida produzido a partir de extrato bruto vegetal associado a nanopartículas de prata em disco de celulose, promovendo o óbito de cupins adultos. Esse produto se destaca devido a sua eficácia, facilidade e baixos custos de produção, uma vez que não necessita de técnicas de purificação e refinamento para obtenção do bioativo presente em extrato vegetal e utiliza microrganismos para produção de nanopartículas de prata.



[0012] O estado da arte e os documentos patentários que precedem a presente invenção descreve pesticidas e agentes com ação termicida de eficácia inferior, voltados para redução da taxa de eclosão de ovos ou compostos químicos capazes de acúmulo e danos ambientais.

[0013] A patente US9006212B2 descreve formulação à base de carboidratos para inibição da atividade de  $\beta(1,3)$ -glucanase conjugados a nanopartículas para tratamento de pestes. A presente patente difere de US9006212B2 por utilizar extrato vegetal de *Cassia grandis*, sem necessidade de purificação, reduzindo etapas do processo e tornando-o mais acessível economicamente.

[0014] A patente US20030032669A1 trata da utilização de Fenoxycarb e Flufenoxuron como agentes pesticidas contra insetos e ácaros, podendo ser utilizado para proteção de seres vivos e não vivos, sendo aplicados por spray ou por grânulos depositados ao solo. A presente patente apresenta solução composta por biomateriais, de degradação natural composto por celulose e com atividade e duração ampliada pela associação do extrato com atividade cupinicida à nanopartícula de prata.

[0015] A patente WO2013089925A1 relata o aumento da atividade de biopesticida a partir de seu encapsulamento em alginato, bem como aumento da resistência à radiação UV pela adição de revestimento com pigmento. A presente patente difere de WO2013089925A1 por apresentar molécula com atividade cupinicida encapsulada em nanopartículas de prata e dispostas sobre discos de papel, aumentando a afinidade e predisposição dos insetos consumirem o pesticida, apresentando um produto biodegradável e com especificidade a pragas de relevância agroindustrial e urbana.

[0016] A patente BR1120150231187A2 descreve espuma para controle de insetos, inclusive cupins à base de Fenilprazol e Neonicotinóide em meio aquoso emulsificável com aplicação por meio de spray ou aerosol. A presente patente difere da citada uma vez que propõe a utilização de discos de celulose agregados a composto de extrato vegetal com ação cupinicida de nanopartícula de prata, oferecendo uma solução biodegradável e de aplicação adjacente, oferecendo menos riscos ao meio ambiente e populações vizinhas.

[0017] A patente PIO9005889A2 descreve resina aglutinante composta por melamina, uréia e formaldeído e impregnada com agente cupinicida do grupo químico piretróides sintéticos (cipermetrina ou ciflutrina). A presente patente difere de PIO9005889A2 por ser composta por materiais biodegradáveis com alto apelo a população de cupins (celulose) e alta atividade cupinicida.

[0018] PI07049374A2 descreve a utilização do Ácido Bórico como formicida e cupinicida na agricultura, alegando não afetar a saúde dos aplicadores e a natureza, além de reduzir os custos das produções agrícolas. A presente patente difere da descrita acima por apresentar bioativo de extrato vegetal encapsulado em nanopartícula de prata dispersos em discos de celulose, permitindo aplicação local e especificidade.

[0019] US11517013B2 apresenta pesticida com composição de fertilizante, dispersante, nanopartículas poliméricas com uma área polar e uma área apolar, água e três compostos ativos (sendo estes: estrobilurina, piretróide, neonicotinoide, fenilamida, mectina). A presente patente difere de US11517013B2 por propor extrato vegetal associado a nanopartícula de prata em discos de celulose, apresentando solução biodegradável e específica para o problema de pragas na indústria agrícola e em áreas urbanas.

#### **Breve descrição dos desenhos**

[0020] As figuras descritas a seguir descrevem e comprovam a atividade cupinicida exercida pelos discos de celulose impregnados com nanopartículas de prata.

A figura 1 apresenta os resultados do teste de atividade cupinicida utilizando discos de celulose impregnados com nanopartículas de prata sintetizadas por fungos filamentosos isolados da caatinga através da técnica de síntese verde. [A] corresponde a taxa de sobrevivência (%) e [B] a quantidade de dias. Já [C] corresponde ao controle negativo, [D] a concentração de 1 mg/mL da solução de nanopartículas de prata com extrato vegetal, [E] a concentração de 2 mg/mL e [F] a concentração de 2,5 mg/mL.

A figura 2 apresenta os resultados da associação das nanopartículas de prata com extrato vegetal para avaliação da atividade cupinicida através de sinergismo biológico. [A] corresponde a taxa de sobrevivência (%) e [B] a quantidade de dias. Já [C] corresponde ao controle positivo, [D] controle negativo, [E] a concentração de 0,5 mg/mL da solução de nanopartículas de prata com extrato vegetal, [F] a concentração de 1,5 mg/mL e [G] a concentração de 3 mg/mL.

A figura 3 apresenta representação de disco de celulose impregnado com nanopartículas de prata associadas a extrato vegetal de *Cassia grandis*, sendo [A] a malha porosa de celulose em formato de disco, [B] a representação da nanopartícula impregnada na malha de celulose [C] o diâmetro dos discos, podendo variar de 0,5 à 10cm.

#### **Descrição da invenção**

[0021] A presente invenção propõe a formulação de um agente cupinicida gerado a partir de nanopartículas de prata sintetizadas por fungos filamentosos associados a extrato vegetal e impregnados em discos de celulose com características desejáveis como elevada atividade biológica, baixa toxicidade, estabilidade térmica e ampla faixa de pH de realização para aplicação no controle de *Nasutitermes corniger*.

[0022] A potencialidade deste invento está em conduzir ao mercado um produto de alta eficiência, economicamente viável, em decorrência da facilidade de obtenção dos materiais e das técnicas utilizadas em sua confecção e com alta eficiência. Apresenta vantagens por oferecer produto composto por materiais não tóxicos e biodegradáveis, e pela facilidade e baixos custos de produção, uma vez que não necessita de técnicas de purificação e refinamento para obtenção do bioativo presente em extrato vegetal e utiliza microrganismos para produção das nanopartículas de prata.

[0023] O produto proposto é obtido a partir das etapas de obtenção do extrato vegetal de *Cassia grandis*, obtenção das nanopartículas de prata, união de AgNP com extrato e fixação em discos de celulose. Estas etapas serão descritas a seguir.

[0024] Na primeira fase deve ser realizada a coleta e lavagem das sementes de *Cassia grandis* utilizando desinfetantes químicos como álcool, peróxido de hidrogênio,

## 7 / 10

clorexidina ou, preferencialmente, hipoclorito de sódio em baixas concentrações, preferencialmente 0,1% para remoção de impurezas e redução da contaminação microbiana. As sementes devem então passar pelo processo de secagem e trituração até a obtenção de farinha, que será então utilizada no processo de extração.

[0025] O extrato vegetal deve ser obtido por meio de agitação de solução composta por solução salina, preferencialmente NaCl a 0,15 mol/L e da farinha de sementes de *Cassia grandis*. A agitação pode ser realizada por meio de agitador magnético, mecânico ou orbital, preferencialmente orbital, no período de 1h à 24h, preferencialmente 4h, em temperatura de 4°C a 16°C, preferencialmente 4°C. Após o período de agitação, o extrato deve ser centrifugado em velocidade média de 11.180xg entre 10 a 20 min, preferencialmente 15 min, para remoção de impurezas com densidade mais elevada.

[0026] Para obtenção das nanopartículas de prata de origem fúngica deve-se realizar processo de fermentação submersa utilizando microrganismos produtores, como *Aspergillus tamarii* Kita UCP 1279, *Mucor subtilissimus* UCP 1262, *Aspergillus terreus* UCP 1276 ou ainda actinomicetos (*Streptomyces* sp. DPUA 1542, *Streptomyces* sp. DPUA 1557, *Streptomyces malasyensis* DPUA 1571, *Streptomyces parvulus* DPUA 1573). Preferencialmente, deve-se usar *Streptomyces* sp. DPUA 1542, *Streptomyces* sp. DPUA 1557. A fermentação deve ocorrer utilizando meio de cultura próprio para microrganismos, preferencialmente MS-2, durante o período de 72h à 96h, em temperatura de 15°C à 30°C, preferencialmente 30°C e sob agitação constante, preferencialmente em agitador orbital a 120 rpm.

[0027] Após o cultivo, deve ser coletado o sobrenadante celular por meio de filtração e adicionado a este, a solução de nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) a 1mM na concentração de 1:1. e mantido sob agitação nas mesmas condições de fermentação descritas acima.

[0028] A combinação entre o extrato vegetal e as nanopartículas de prata (AgNP) devem ser realizadas em concentrações que podem variar entre 20% a 60% de extrato vegetal e 40 a 80% AgNP, preferencialmente 45% extrato vegetal e 55% AgNP. A combinação deve ser realizada sob agitação constante entre 30min a 3h.

[0029] Os discos de celulose devem ser produzidos utilizando molde, furador ou prensa para uniformização de forma e tamanho, que deve variar entre 0,5cm a 10cm, buscando abranger diversos mercados, podendo ser utilizados pela indústria agrônômica ou na produção de pesticidas para o mercado urbano. Para os discos de celulose deve ser utilizado preferencialmente papel filtro 80g, permitindo a incorporação das nanopartículas associadas ao extrato como representado na figura 3. Uma vez impregnados com a solução de AgNP e extrato vegetal, os discos devem ser secos em estufa, em temperatura de 20°C a 40°C, preferencialmente a 30°C, durante o período de 30 min a 4 horas, preferencialmente 2 horas.

#### **Exemplos de concretização da invenção**

[0030] A presente invenção é melhor descrita de acordo com os exemplos a seguir:

Exemplo 1: Obtenção de sementes de *Cassia grandis* e preparação de extrato vegetal

[0031] As sementes de *Cassia grandis* foram coletadas na zona rural do estado de Pernambuco, no município de Angelim (Brasil). O espécime botânico foi identificado no Herbário DÁRDANO DE ANDRADE LIMA do Instituto Agrônômico de Pernambuco (IPA), onde foi depositado um Voucher [Identificação Botânica N°32/2011; Código de identificação IPA-102.086; *C. grandis*. As sementes coletadas foram limpas com hipoclorito de sódio a 0,1% e trituradas até pó para obtenção de uma farinha fina e o extrato aquoso foi obtido utilizando pó seco (10:90, p/v) em solução de NaCl 0,15 mol/L, seguido de agitação em agitador orbital por 4h a 4°C. Em seguida, o extrato foi centrifugado a 11.180×g por 15min e o sobrenadante foi armazenado a -20°C.

Exemplo 2. Microrganismos

[0032] Foram utilizados os fungos: *Aspergillus tamarii* Kita UCP 1279, *Mucor subtilissimus* UCP 1262, *Aspergillus terreus* UCP 1276 e 4 linhagens de actinomicetos (*Streptomyces* sp. DPUA 1542, *Streptomyces* sp. DPUA 1557, *Streptomyces malaysiensis* DPUA 1571, *Streptomyces parvulus* DPUA 1573).

Exemplo 3. Condições de cultivo e manutenção

[0033] Após o período de esporulação, os esporos foram suspensos com solução salina de Tween 80 (NaCl a 0,9% (p/v) previamente esterilizada a 121°C/ 1 atm de pressão, durante 20 minutos. Para a produção, os esporos foram colocados no meio MS-2 e a fermentação ocorreu em 72 h a 120 rpm em 30°C.

#### Exemplo 3. Síntese verde de nanopartículas de prata

[0034] Biossíntese extracelular de nanopartículas de prata por microrganismos se deu após o cultivo submerso, onde foi utilizado o sobrenadante extracelular (100 mL), adicionados com 100 mL de solução de nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) a 1mM, e então foi encaminhado à agitador orbital a 150 rpm por 72 horas, 30°C. A formação de nanopartículas de prata foi observada pela redução de prata e detectada por Espectroscopia UV-visível na faixa de 400 a 500 nm (Naveen et al. 2010).

Exemplo 4. Confirmação da produção de nanopartículas através de caracterização física.

[0035] Caracterização das Nanopartículas de prata (AgNPs) ocorreu através de espectrofotometria UV-Vis. A biorredução de íons de prata foi monitorada pela mudança de cor de amarelo pálido para marrom. Além disso, foi confirmada por altos picos observados pelo espectro de absorção utilizando UV-visível no *range* de comprimento de onda de 200-800 nm (Akther et al., 2020).

#### Exemplo 6. Atividade termicida (cupinicida)

[0036] Para a realização dos bioensaios em condições laboratoriais foram utilizados soldados forrageiros de *Nasutitermes corniger*. Os cupins foram coletados por meio de armadilhas confeccionadas com papelão corrugado de 2,5 m de comprimento por 16 cm de largura, enrolado e envolvido por embalagens plásticas descartáveis de refrigerantes de 2 litros. As armadilhas foram dispostas nos territórios de forrageamento de 3 colônias e retiradas a cada 10 dias. Os cupins foram separados e mantidos em potes plásticos contendo novo papelão corrugado umedecido e armazenados em temperatura ambiente até a montagem dos bioensaios.

[0037] Na montagem dos bioensaios, foram utilizadas placas de petri descartáveis 150mm x 15mm. Foram colocados 20 soldados e papelão para o forrageio dos cupins (recipiente alimentação). Previamente, os recipientes receberam areia esterilizada e umedecida com água destilada, que serviu como substrato para os forrageiros. O recipiente ninho recebeu 2 gramas de areia com 2,5 mL de água.

[0038] Para avaliar a toxicidade, discos de papel filtro (80g) foram impregnados com nanopartículas de prata, nanopartículas de prata e extrato vegetal obtido de *Cassia grandis* nas concentrações finais de 2mg/mL de AgNPS e 1,5mg/mL de extrato, como pode ser observado na figura 1 e 2. Os discos foram secos em estufa a 30°C, por 2h. A cada dia, houve contagem dos soldados vivos/mortos. Água foi utilizada como controle negativo.

## REIVINDICAÇÕES

1. “DISCOS DE CELULOSE IMPREGNADOS COM NANOPARTÍCULA DE PRATA ASSOCIADA A EXTRATO VEGETAL PARA ATIVIDADE CUPINICIDA” caracterizado por um agente cupinicida impregnado em discos de celulose contendo nanopartículas de prata e extrato vegetal.
2. “DISCOS DE CELULOSE IMPREGNADOS COM NANOPARTÍCULA DE PRATA ASSOCIADA A EXTRATO VEGETAL PARA ATIVIDADE CUPINICIDA”, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo extrato vegetal ser oriundo de sementes de *Cassia grandis*.
3. “DISCOS DE CELULOSE IMPREGNADOS COM NANOPARTÍCULA DE PRATA ASSOCIADA A EXTRATO VEGETAL PARA ATIVIDADE CUPINICIDA” de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por nanopartículas de prata produzidas a partir de fermentação submersa de microrganismos.
4. “DISCOS DE CELULOSE IMPREGNADOS COM NANOPARTÍCULA DE PRATA ASSOCIADA A EXTRATO VEGETAL PARA ATIVIDADE CUPINICIDA” de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por discos de celulose poderem variar entre 0,5cm a 10cm.
5. “DISCOS DE CELULOSE IMPREGNADOS COM NANOPARTÍCULA DE PRATA ASSOCIADA A EXTRATO VEGETAL PARA ATIVIDADE CUPINICIDA” de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela associação entre a nanopartícula de prata e o extrato vegetal ser feita a priori de sua impregnação em discos de celulose.
6. “DISCOS DE CELULOSE IMPREGNADOS COM NANOPARTÍCULA DE PRATA ASSOCIADA A EXTRATO VEGETAL PARA ATIVIDADE CUPINICIDA” de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por discos de papel impregnados com solução de nanopartículas de prata e extrato vegetal de *Cassia grandis* ser seco em estufa a 30°C antes de sua aplicação.



**RESUMO****DISCOS DE CELULOSE IMPREGNADOS COM NANOPARTÍCULA DE PRATA ASSOCIADA A EXTRATO VEGETAL PARA ATIVIDADE CUPINICIDA**

A presente invenção propõe um agente cupinicida a partir de discos de celulose impregnados com nanopartículas de prata associadas a extrato vegetal para o controle de cupim do gênero *Nasutitermes* (Termitidae: Nasutitermitinae), insetos da subordem Isoptera (Ordem Blattodea), que contém cerca de 3166 espécies catalogadas no mundo, com 661 delas ocorrendo na Região Neotropical, onde a sociedade dos cupins é dividida em três castas: 1- soldados; 2- operários e 3- rainhas e reis. Para a avaliação da atividade cupinicida, foram utilizados soldados, e os discos de celuloses contendo a formulação permaneceram expostos por um período de 20 dias sob a ação de cupins *Nasutitermes corniger* em ensaio de preferência alimentar, com determinação da densidade, percentual de perda de massa, índice de deterioração e o índice de susceptibilidade. A formulação foi composta de 0 a 2.0mg/mL de nanopartículas e 0 a 1,5mg/mL de extrato aquoso vegetal. Após 72h, para a concentração 2.0mg/mL de nanopartículas e 1,5mg/mL de extrato aquoso vegetal associados, houve 80% de mortalidade dos soldados, e não foram observados mortalidade nos grupos controle contendo apenas água. Diante disso, o produto cupinicida a base de nanopartículas prata e extrato vegetal pode ser utilizado no controle de *Nasutitermes corniger*.

1/3

DESENHOS

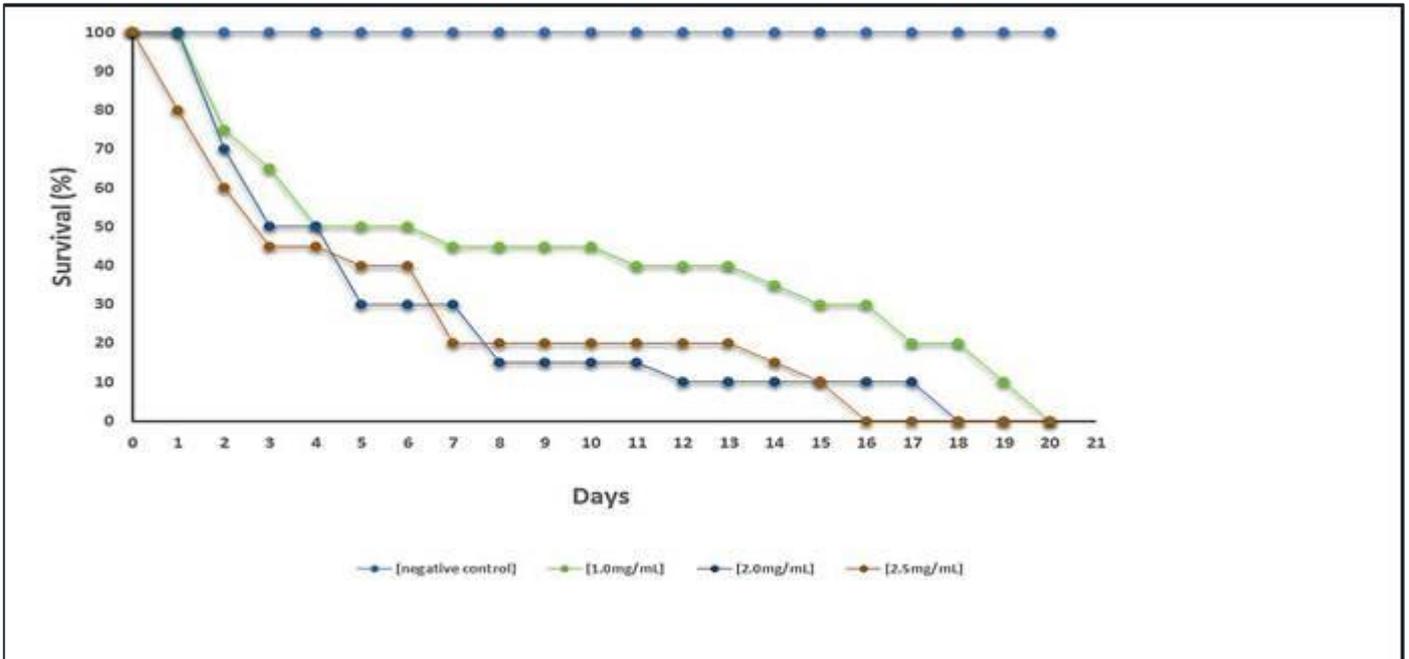
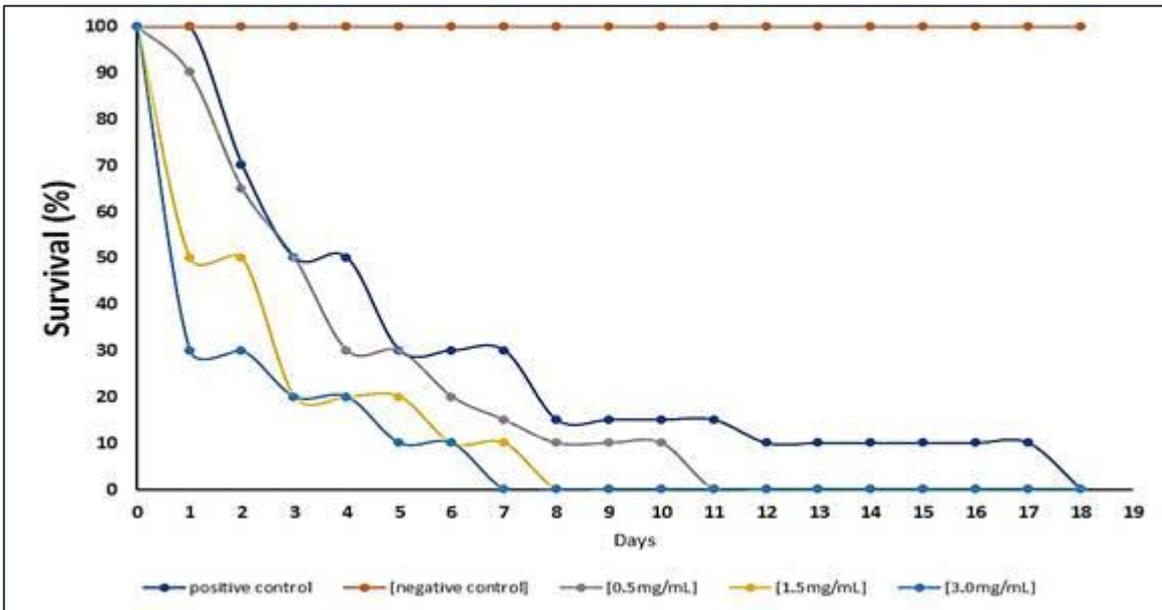


Figura 2





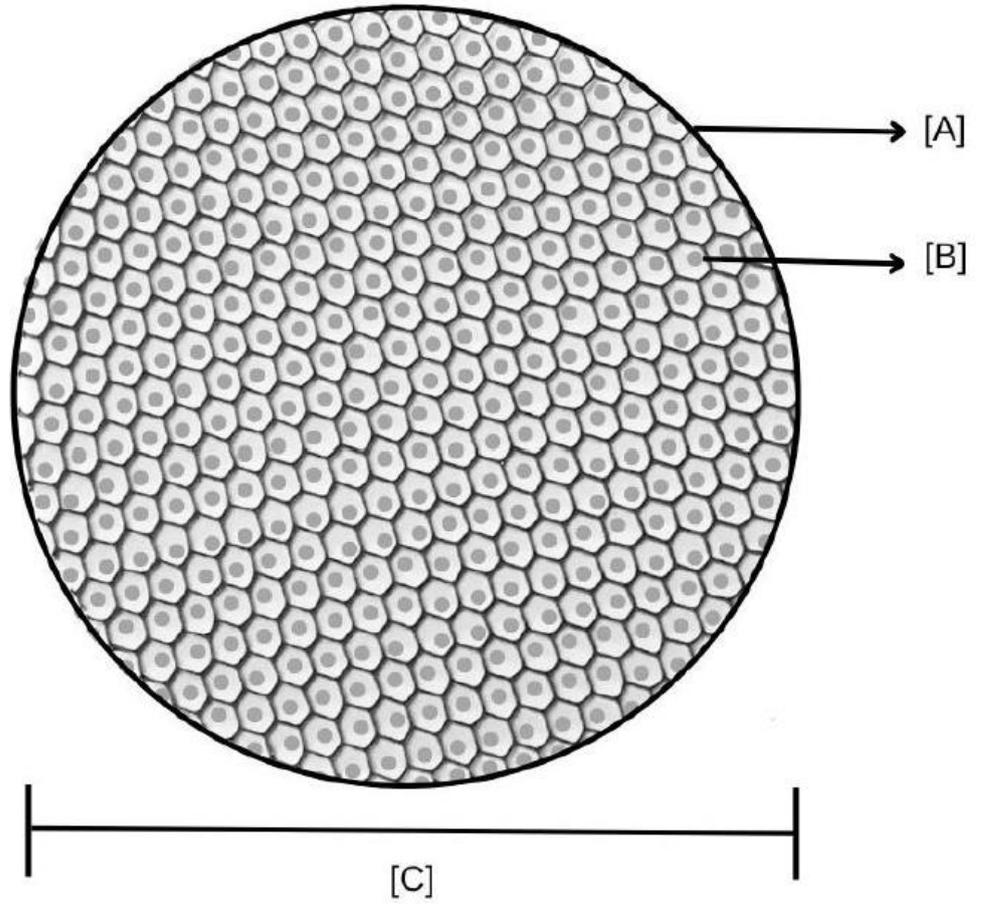


Figura 3

## CONSIDERAÇÕES GERAIS DA DISSERTAÇÃO

As descobertas realizadas nesta pesquisa representam um avanço significativo no campo da síntese de nanopartículas de prata, apresentando uma abordagem inovadora e sustentável através da utilização de linhagens bacterianas. A geração bem-sucedida de nanopartículas de prata a partir do material extracelular das bactérias *Streptomyces* sp. DPUA 1557 e *Streptomyces* sp. DPUA 1542 abre novas possibilidades para a aplicação dessas nanopartículas em diversas áreas, como a medicina, a indústria e a agricultura.

O fenômeno da biorredução do nitrato de prata pelas linhagens bacterianas, resultando na formação e estabilização das nanopartículas, foi cuidadosamente investigado e documentado, proporcionando insights valiosos sobre os processos bioquímicos subjacentes. A caracterização das nanopartículas sintetizadas, incluindo sua morfologia, tamanho e carga superficial, contribui para o entendimento aprofundado de suas propriedades físico-químicas, fundamentais para sua aplicação em diferentes contextos.

Um dos aspectos mais notáveis deste estudo é a demonstração do efeito cupinicida das nanopartículas de prata sintetizadas pela linhagem *Streptomyces* sp. DPUA 1557 contra o *Nasutitermes corniger*, representando uma nova estratégia potencial no controle de pragas na agricultura. Este é um resultado promissor que abre caminho para pesquisas adicionais sobre o uso de nanopartículas de prata como agentes biocidas contra insetos e outros organismos prejudiciais.

Em suma, esta dissertação contribui não apenas para o avanço científico no campo da nanotecnologia e da biotecnologia, mas também oferece insights valiosos para aplicações práticas em diversas áreas, desde a medicina até a agricultura. Os resultados obtidos fornecem uma base sólida para pesquisas futuras e destacam o potencial das linhagens bacterianas na síntese de nanopartículas e no desenvolvimento de soluções inovadoras para desafios contemporâneos.