



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOTECNOLOGIA - PPG-BIOTEC



NANOPARTÍCULAS DE PRATA COM EFEITO MEDICINAL
BIOLOGICAMENTE SINTETIZADAS POR ACTINOMICETOS DE UM
FRAGMENTO DE FLORESTA TROPICAL

MANAUS - AM

2015



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOTECNOLOGIA - PPG-BIOTEC**



NÉLLY MARA VINHOTE MARINHO

**NANOPARTÍCULAS DE PRATA COM EFEITO MEDICINAL
BIOLOGICAMENTE SINTETIZADAS POR ACTINOMICETOS DE UM
FRAGMENTO DE FLORESTA TROPICAL**

Tese apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia (Área de Concentração em Saúde).

Orientadora: Profa. Doutora Maria Francisca Simas Teixeira

MANAUS - AM

2015

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

V784n Vinhote Marinho, Nély Mara
Nanopartículas de prata com efeito medicinal biologicamente
sintetizadas por actinomicetos de um fragmento de floresta tropical
/ Nély Mara Vinhote Marinho. 2015
137 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Maria Francisca Simas Teixeira
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do
Amazonas.

1. Bactérias Filamentosas. 2. Nanobiotecnologia. 3.
Antimicrobianos. 4. Amazônia. I. Teixeira, Maria Francisca Simas II.
Universidade Federal do Amazonas III. Título

NÉLLY MARA VINHOTE MARINHO

**NANOPARTÍCULAS DE PRATA COM EFEITO MEDICINAL
BIOLOGICAMENTE SINTETIZADAS POR ACTINOMICETOS DE UM
FRAGMENTO DE FLORESTA TROPICAL**

Tese apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia (Área de Concentração em Saúde).

Aprovada em 19 de novembro de 2015.

BANCA EXAMINADORA:

Dra. Maria Francisca Simas Teixeira

Dra. Valéria de Carvalho Santos Ebinuma

Dra. Rosana Antunes Palheta

Dr. Raimundo Felipe da Cruz Filho

Dr. Jamal da Silva Chaar

Dedico *in memoriam* a meu pai,

Moysés Cirilo da Silva

AGRADECIMENTOS

A Deus, por seu amor incondicional, que vai além de minha concepção natural, por sua graça e misericórdia que se renovam dia após dia!

À minha família, mãe Nelma Vinhote por seu amor e cuidado, aos meus manos Marcelo, Murilo e Nellyane Vinhote e meus sobrinhos lindos, por me darem o suporte de que necessito, João Miguel, Davi César e Murilo Gabriel, amo vocês!

A Thiago Marinho Pereira e sua família, que é o amor da minha vida, amor este que vai além da razão, e que me faz a cada dia compreender o sentido das palavras: perdão, compreensão, superação, dedicação, amizade e ternura.

A Professora Doutora Maria Francisca Simas Teixeira, minha orientadora, por ser uma mulher incrível, exemplo de dedicação e amor à ciência.

Ao Professor Doutor Nelson Durán e toda equipe do Laboratório de Química Biológica da Universidade Estadual de Campinas - Unicamp, pela receptividade e disponibilidade em colaborar sempre com a pesquisa.

A toda equipe do laboratório de Biotecnologia da Universidade Federal do Piauí – Campus Parnaíba, principalmente ao Prof. Doutor José Roberto Leite, Profa. Dra. Durcilene Alves e aos doutorandos Alyne Rodrigues e Patrick Quelemes pela amizade e auxílio no desenvolvimento da pesquisa.

A equipe do laboratório de Genética e Morfologia da Universidade de Brasília-UNB, na pessoa do Professor Doutor João Paulo Longo, pelas contribuições no trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento a Pesquisa do Ensino Superior – CAPES, a Universidade Federal do Amazonas – UFAM e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM, pelo apoio e auxílio financeiro para o desenvolvimento da pesquisa.

Aos amigos do Laboratório de Micologia, Mircella Marialva, Taciana Amorim, Salomão Martim, Lorisa Simas, Ana Rita Machado, Bianca Cordeiro, Rosimar Palheta, Annie Silva, Larissa Svetlana, Larissa Paiva, Tamiris Fonseca, Raiane Áila, Jéssica Barroncas, Rosilane Graça, Fabiano Brito e ao Doutor Felipe Cruz, obrigada por todos os momentos de descontração e aprendizado!

Enfim, a todos aqueles que colaboraram direta ou indiretamente para realização deste trabalho, o mais sincero sentimento de gratidão!!!

“Por amor, subimos montanhas, atravessamos mares,
cruzamos desertos e enfrentamos todo tipo de adversidade.
Sem amor, montanhas tornam-se insuperáveis, mares
intransponíveis, desertos insuportáveis e dificuldades
avolumam-se pela vida afora.”

Gary Chapman

RESUMO

A Nanotecnologia é uma ciência de sistemas de tamanho nano, compreendida em uma escala de 10^{-9} m, que propõe criar uma nova organização estrutural capaz de apresentar comportamentos e propriedades diferentes dos materiais atualmente conhecidos e disponibilizados. Por meio da integração com a biotecnologia, o termo “nanobiotecnologia” pode ser empregado para definir o uso de micro-organismos em estudos voltados as indústrias médica, farmacêutica, cosmética, dentre outras. Em virtude do seu potencial biotecnológico por sintetizarem compostos antibacterianos, antifúngicos, antitumorais, antiparasitários, além de outras substâncias de interesse industrial, as bactérias filamentosas (actinomicetos) apresentam potencial para o desenvolvimento de medicamentos por meio da síntese biológica de Nanopartículas de Prata (AgNPs). Este estudo teve como objetivo avaliar o potencial de síntese de AgNPs com atividade antimicrobiana sobre bactérias patogênicas e fungos oportunistas, utilizando como fonte biomoléculas de espécies de actinomicetos. Dez amostras de actinobactérias foram selecionadas do acervo da Coleção de Cultura-DPUA e foram subcultivadas e autenticadas em ISP-2A (extrato de levedura-extrato de malte, agar), com base nas características morfológicas. A identificação em nível de espécie foi realizada pela técnica da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). Para síntese biogênica de AgNPs, os actinomicetos foram submetidos a fermentação submersa. O extrato bruto recuperado e as nanopartículas biossintetizadas foram utilizados na determinação da atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar. As AgNPs que apresentaram ação antagônica significativa foram utilizadas para determinação do MIC (Concentração Inibitória Mínima), Citotoxicidade e caracterizadas por diferentes técnicas, como: espectroscopia de UV-Vis, DLS (Espalhamento Dinâmico de Luz), DRX (Difratometria de Raios X), FTIR (Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier), ICP-OES (Espectroscopia Óptica de Emissão por Plasma Indutivamente Acoplado) e TEM (Microscopia Eletrônica de Transmissão). Dos actinomicetos avaliados, 100% expressaram as características morfológicas viáveis de *Streptomyces*. Pelo teste da PCR foram identificadas as seguintes espécies, *Streptomyces parvulus* (40%), *Streptomyces bullii* (10%), *Streptomyces seoulensis* (10%), *Streptomyces owasiensis* (10%), *Streptomyces malasyensis* (20%), *Streptomyces lavendulae* (10%). Pelo método bloco de gelose a atividade antimicrobiana foi confirmada e, 80% das bactérias inibiram *S. aureus*; 30% *M. smegmatis* e 40% as *Candidas* (*albicans*, *atlantica* e *valderwaltii*). Apenas 10% dos actinomicetos inibiram o crescimento de *E. coli*. Quando testado o extrato bruto frente aos micro-organismos teste, 50% das amostras inibiram *S. aureus*; 30% *M. smegmatis* e 20% mostrou-se eficiente contra *C. albicans*, *C. atlantica* e *C. valderwaltii*. Nestes testes o diâmetro do halo variou, em média, de 12 e 29 mm. Já para as AgNPs, 100% inibiram o crescimento de *S. aureus* e *E. coli*, com halos variando de 12 a 34 mm. Dados que indicam o amplo espectro destes compostos bioativos. As AgNPs de *Streptomyces* DPUA 1549, *Streptomyces* DPUA 1747 e *Streptomyces* DPUA 1748 apresentaram ação antagônica de maior eficiência. As AgNPs promissoras apresentaram forma esférica e tamanhos variando entre 1-40 nm. Contudo, nanopartículas produzidas por *Streptomyces* sp. DPUA 1549 foram as mais eficientes, apresentando MIC frente a *S. aureus*, em baixas concentrações (1,95 μ M). Por meio das imagens visualizadas em AFM foi possível observar os danos estruturais da membrana celular de *S. aureus*. Nos testes de toxicidade, as AgNPs reduziram a proliferação de células NIH-3T3. Além disso, a atividade citotóxica deste nanomaterial é dependente do tempo. Estas evidências científicas demonstram a potencial aplicação de nanopartículas biossintetizadas por *Streptomyces* sp. DPUA 1549 na elaboração de produtos para utilização nas indústrias médicas, cosméticas e farmacêuticas.

Palavras-chave: Bactérias Filamentosas, Nanobiotecnologia, Antimicrobianos, Amazônia.

ABSTRACT

Nanotechnology is a science of nano-sized systems, comprised in a range of 10^{-9} m, which proposes to create a new organizational structure able to show different behaviors and properties of materials currently known and available. Through integration with biotechnology, the term "nanobiotechnology" may be used to define the use of microorganisms in studies concerning medical, pharmaceutical and cosmetics industries, among others. By virtue of their biotechnological potential for synthesizing antibacterial compounds, antifungal, antitumor, and antiparasitic compounds, beyond other substances of industrial interest, filamentous bacteria (actinomycetes) has potential for the development of drugs through biological synthesis of silver nanoparticles (AgNPs). This study aimed to evaluate the potential of AgNPs synthesis with antimicrobial activity against pathogenic bacteria and opportunistic fungi using as source of biomolecules species of actinomycetes. Ten samples of actinomycetes were selected from the collection Collection of Culture-DPUA and were subcultured and authenticated in ISP-2A (malt extract-yeast extract agar), based on morphological characteristics. The identification at the species level was performed by the technique of PCR (Polymerase Chain Reaction). For biogenic synthesis AgNPs, actinomycetes underwent submerged fermentation. The recovered crude extract and biosynthesized nanoparticles were used to determine the antimicrobial activity by agar diffusion method. The AgNPs that showed significant antagonistic action have been used to determine the MIC (Minimum Inhibitory Concentration), Cytotoxicity and characterized by different techniques, such as UV-Vis, DLS (Dynamic Light Scattering), XRD (diffraction X-ray) FTIR (Infrared Spectroscopy Fourier Transform), ICP-OES (Optical Emission Spectroscopy by Inductively Coupled Plasma) and TEM (Transmission Electron Microscopy). From these actinomycetes, 100% viable expressed morphological characteristics of *Streptomyces*. For the test of PCR the following species were identified *Streptomyces parvulus* (40%), *Streptomyces bullii* (10%), *Streptomyces seoulensis* (10%), *Streptomyces owasiensis* (10%), *Streptomyces malasyensis* (20%), *Streptomyces lavendulae* (10%). By the method agar block antimicrobial activity was confirmed and 80% of the bacteria inhibited *S. aureus*; 30% *M. smegmatis* and 40% the *Candidas* (*albicans*, *atlantica* and *valderwaltii*). Only 10% of actinomycetes inhibited the growth of *E. coli*. When tested across the crude extract to microorganisms test, 50% of the samples inhibited *S. aureus*; 30% *M. smegmatis* and 20% proved to be effective against *C. albicans*, *C. atlantica* and *C. valderwaltii*. In these tests the halo diameters varied on average 12 to 29 mm. As for the AgNPs, 100% inhibited the growth of *S. aureus* and *E. coli* with halos ranging from 12 to 34 mm. Data indicating the broad spectrum of these bioactive compounds. The AgNPs *Streptomyces* DPUA 1549, *Streptomyces* DPUA 1747 and *Streptomyces* DPUA 1748 showed antagonistic action for greater efficiency. Promising AgNPs showed spherical shape and sizes ranging from 1-40 nm. However, nanoparticles produced by *Streptomyces* sp. DPUA 1549 were the most efficient with MIC against *S. aureus* at low concentrations (1.95 μ M). Through the images displayed in AFM was observed structural damage on cell membrane of *S. aureus*. In toxicity tests the AgNPs reduced the proliferation of NIH-3T3 cells. In addition, the cytotoxic activity of this nanomaterial is time dependent. These scientific evidences show the potential application of nanoparticles biosynthesized by *Streptomyces* DPUA 1549 on preparation of products for use in medical, cosmetic and pharmaceutical industries.

Keywords: Filamentous bacteria, nanobiotechnology, antimicrobials, Amazon.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Nanotecnologia e sua interação multi e interdisciplinar.....	24
Figura 2. Possível mecanismo de ação e função das proteínas extracelulares na síntese de nanopartículas de prata.....	27
Figura 3. A utilização da prata como ferramenta para produção de nanopartículas metálicas com propriedades antimicrobianas.....	28
Figura 4. Esquema do possível mecanismo de ação na atividade antimicrobiana utilizando as AgNPs biossintetizadas extracelularmente por micro-organismos. DNA.....	29
Figura 5. <i>Streptomyces</i> sp. preservados na Coleção de Cultura Micoteca-DPUA	33

CAPÍTULO II

Figura 1. Técnica lâmina de contato.....	47
---	----

CAPÍTULO III

Figura 1. (A) Amostras de actinomicetos preservados na Coleção de Cultura - Micoteca DPUA.....	68
Figura 2. Actinomicetos em meio ISP2A: (A) Colônia de <i>Streptomyces</i> sp.; (B) aspecto das bordas com leves ondulações; (C) Colônia de <i>Streptomyces</i> sp.; (D) aspecto das colônias em formas esféricas.....	74
Figura 3. (A e B) Aspectos das colônias de actinomicetos em meio ISP-2A, coloração variando de branca, cinza a creme; (C) Colônias sem ramificações de micélio; (D) Colônia com a coloração levemente acinzentada com produção de pigmento.....	75
Figura 4. <i>Streptomyces</i> : micélio vegetativo (5 dias de crescimento), com leves ondulações em sua estrutura final.....	76

Figura 5. (A) Aspecto das características microscópicas de <i>Streptomyces</i> sp., com hifas em espiral e (B) <i>Streptomyces</i> sp. observado em cultura mantida em ISP2A por 15 dias.....	76
Figura 6. (A) Tipos de formação de esporos de actinomicetos do gênero <i>Streptomyces</i> sp. e (B) <i>Streptomyces</i> sp. apresentando conjunto de hifas em espirais sobrepostas entre si.....	77
Figura 7. <i>Streptomyces</i> sp.: aspecto macroscópico da colônia de coloração cinza sem produção de pigmento (A); (B) apresentando conjunto de hifas em espirais sobrepostas entre si.....	78
Figura 8. (A) aspecto do gênero <i>Streptomyces</i> sp.: colônia de coloração creme sem difusão de pigmento; (B) apresenta hifas emaranhadas e septadas.....	79
Figura 9. (A) aspecto do gênero <i>Streptomyces</i> sp.: colônias brancas sem produção de pigmentos; (B) hifas septadas.....	79
Figura 10. (A e C) aspecto de colônias de <i>Streptomyces</i> variando a coloração do micélio de branco ao cinza claro com produção de pigmento; (B e D) aspecto da hifa em pequenos espirais.....	79
Figura 11. (A, C, E e G) Aspecto de colônias de <i>Streptomyces</i> com variação na tonalidade do micélio de branco para marrom; (B, D, F e H) Conjuntos de hifas em pequenas ondulações formando espirais.....	80
Figura 12. Gel de agarose de 1% mostrando a purificação do DNA dos amplificadores utilizando o par de oligonucleotídeos iniciadores 235F e 878R para actinomicetos.....	81
Figura 13. Gel de agarose de 1% mostrando a amplificação do DNA dos isolados utilizando par de oligonucleotídeos iniciadores 094 e 095 para bactérias.	81
Figura 14. (A) Atividade Antimicrobiana das amostras DPUA 1750 e 1747 demonstrando os halos de inibição frente ao micro-organismo teste <i>S. aureus</i>	83
Figura 15. Atividade Antimicrobiana de AgNPs de actinomicetos frente a <i>Staphylococcus aureus</i>	84
Figura 16. (A) Comparação entre o filtrado sem o AgNO ₃ e após a reação demonstrando a mudança de coloração e formação das AgNPs. (B) Variação da coloração característica para formação das AgNPs (amarelo claro a marrom escuro).	84
Figura 17. AgNPs das amostras de actinomicetos confirmadas pela banda de absorção de plamon na região do UV-Vis em torno de ~430 nm.	85

Figura 18. UV-vis das AgNPs de <i>Streptomyces</i> DPUA 1549, <i>Streptomyces</i> DPUA 1747 e <i>Streptomyces</i> DPUA 1748 que apresentaram ação antagônica de maior eficiência.	86
Figura 19 – Halos de inibição medidos em mm: (A) Inibição do crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i> pelos extratos aquosos contendo a nanopartícula; (B) Halo formado frente à <i>Escherichia coli</i>	88

CAPÍTULO IV

Figure 1. Macroscopic aspects of <i>Streptomyces parvulus</i> DPUA 1549 (A), <i>Streptomyces seoulensis</i> DPUA 1747, and <i>Streptomyces owasiensis</i> DPUA 1748 (C) colonies, respectively.....	126
Figure 2. UV-vis absorption spectra of silver nanoparticles biosynthesized by <i>Streptomyces</i> (DPUA 1549, DPUA 1747 and DPUA 1748) with peaks at 444 nm, 431 nm and 430 nm, respectively.	127
Figure 3. TEM images of AgNPs from <i>Streptomyces parvulus</i> DPUA 1549 (A), <i>Streptomyces seoulensis</i> DPUA 1747 (B) and <i>Streptomyces owasiensis</i> DPUA 1748 (C). (Scale bar=200 nm). (D) Particle size distribution of AgNPs: DPUA 1549 (d, 100.34±0.7 nm), DPUA 1747 (d, 121.20±1.7 nm), DPUA 1748 (d, 160.77±1.65 nm) by DLS.....	128
Figure 4. Size distribution graphics by NTA method of AgNPs. <i>Streptomyces parvulus</i> DPUA 1549 (A); <i>Streptomyces seoulensis</i> DPUA 1747 (B) and <i>Streptomyces owasiensis</i> DPUA 1748 (C).....	129
Figure 5. Effect of AgNPs from <i>Streptomyces parvulus</i> DPUA 1549 against <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 cells. (A) Cells control and (B) <i>S. aureus</i> cells after 24 hours of treatment with AgNPs (1.95 µM) at the Minimal Inhibition Concentration (MIC).....	130
Figure 6. Murine Fibroblast (NIH-3T3) proliferation after treatment with different concentrations of silver nanoparticles from <i>Streptomyces parvulus</i> DPUA 1549. NIH-3T3 cell proliferation (Cell Index) after different treatments (A); Area Under Curve (cell index vs hours) of the different treatments. *Denotes statistically significant difference (p<0.05) compared to control (B). A correlation between LC50% and time of exposure (C).....	131

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Biossíntese de nanopartículas por actinomicetos.....	34
---	----

CAPÍTULO II

Tabela 1. Actinomicetos cedidos pela Coleção de Cultura-Micoteca DPUA.....	46
Tabela 2. Micro-organismos patogênicos ou oportunistas testados na avaliação da atividade antimicrobiana.....	50

CAPÍTULO III

Tabela 1. Micro-organismos patogênicos testados na avaliação da atividade antimicrobiana.....	71
Tabela 2. Determinação das características macroscópicas e microscópicas dos actinomicetos.....	77
Tabela 3. Identificação molecular das amostras de actinomicetos.	82
Tabela 4. Diâmetro dos halos de inibição dos micro-organismos testados com os extratos de nanopartícula de prata.	87

CAPÍTULO IV

Table 1. Physical chemistry parameters of AgNPs Diameter calculated (mean $\pm$ standard deviation) by DLS, Zeta Potential, and PDI of AgNPs biosynthesized by <i>Streptomyces</i> sp...	123
Table 2. Qualitative antimicrobial activity assay against micro-organisms test.....	124
Table 3. Quantitative Antimicrobial Assays. Minimum Inhibitory Concentrations (MIC's) of AgNPs and AgNO ₃ on <i>S. aureus</i> MRSA ATCC 43300, <i>S. aureus</i> ATCC 25923, <i>E. coli</i> CBAM 001.....	125

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AgNPs – Nanopartículas de Prata

AFM – Microscopia de Força Atômica

BLAST - Basic Local Alignment Search Tool

DLS - Espalhamento Dinâmico de Luz e Potencial Zeta

DRX - Difractometria de Raios X

EDX - Energia Dispersiva de Raios X

FTIR - Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

ICP-OES - Espectrometria Óptica de Emissão por Plasma Indutivamente Acoplado

MIC - Concentração Mínima Inibitória

NCBI - National Center for Biotechnology Information

NTA - Análise de Rastreamento de Nanopartículas

RTCA - Cell Real-Time Analyzer - Ensaio de proliferação em células de mamíferos

TEM - Microscopia Eletrônica de Transmissão

SPR - Banda Plasmônica Superficial

U-Vis - Espectroscopia Eletrônica na Região Ultravioleta e Visível

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	19
------------------------	-----------

2 OBJETIVOS

2.1 Geral.....	19
2.2 Específicos.....	19

CAPÍTULO I

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Nanotecnologia.....	24
1.2 Nanobiotecnologia.....	25
1.3 As Nanopartículas Metálicas.....	27
1.4 Bactérias Multirresistentes - Antimicrobianos.....	29
1.5 Actinomicetos – Bactérias Filamentosas.....	30
1.6 Potencial Nanobiotecnológico dos actinomicetos.....	33
2. REFERÊNCIAS.....	36

CAPÍTULO II

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Micro-organismos.....	46
2.2 Subcutivo dos Micro-organismos.....	46
2.3 Autenticação Taxonômica dos Micro-organismos.....	47
2.4 Caracterização Molecular dos actinomicetos.....	48
2.5 Autenticação da Viabilidade Antagônica.....	49
2.6 Fermentação Submersa.....	50
2.7 Biossíntese de Nanopartículas de Prata.....	51
2.8 Determinação da Atividade Antimicrobiana das Nanopartículas de Prata e Seleção do Actinomiceto Promissor.....	51
2.9 Caracterização das Nanopartículas de Prata do Actinomiceto Promissor.....	52
2.10 Espectrometria Óptica de emissão por Plasma Indutivamente Acoplado – ICP-OES.....	54
2.11 Determinação da Concentração Inibitória Mínima.....	54
2.12 Análise Morfológica e Estrutural do Mecanismo de Ação entre o Micro-organismo teste e a Nanopartícula de Prata – Microscopia de Força Atômica (AFM).....	55

2.13 Avaliação da Citotoxicidade das Nanopartículas de Prata	55
2.14 Análise Estatística.....	56
REFERÊNCIAS.....	57

CAPÍTULO III

Artigo I - Actinomicetos da Amazônia: uma fonte potencial de nanopartícula de prata com aplicação na indústria farmacêutica

Introdução.....	66
2 Material e Métodos.....	68
2.2. Subcultivo dos Micro-organismos.....	68
2.3 Autenticação Taxonômica dos Micro-organismos.....	68
2.4 Caracterização Molecular dos Micro-organismos.....	69
2.5 Determinação da Atividade Antimicrobiana.....	71
2.6 Fermentação Submersa.....	71
2.7 Biossíntese de Nanopartícula de Prata.....	72
2.8 Determinação da Atividade Antimicrobiana das AgNPs e Seleção do actinomiceto Promissor.....	73
2.9 Espectroscopia de UV-Vis.....	73
2.10 Expectrometria Óptica de emissão por Plasma Indutivamente Acoplado – ICP-OES.....	73
2.11 Análise Estatística.....	73
3 Resultados e Discussão.....	74
4 Conclusão.....	89
Agradecimentos.....	89
Divulgação.....	90
Referencias.....	90

CAPÍTULO IV

Artigo II - Actinomycetes from Amazon Region: Biogenic Synthesis of Silver Nanoparticles as Source Promising Antimicrobial Agents

Introduction.....	101
2 Materials and Methods.....	102
2.1 Micro-organisms.....	102

2.2 Identification of the microorganisms.....	103
2.3 Synthesis of silver nanoparticles.....	104
2.4 Characterization of silver nanoparticles.....	104
2.4.1 UV-Visible spectroscopy analysis.....	104
2.4.2 Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy analysis.....	105
2.4.3 Characterization of AgNPs by XRD.....	105
2.4.4 Particle size (DLS) analysis e Potencial Zeta.....	105
2.4.5 Nanoparticle Tracking Analysis (NTA).....	105
2.4.6 Characterization of AgNPs by Transmission Electron Microscopy (TEM).....	106
2.5 Antimicrobial Activity.....	106
2.5.1 Qualitative Assay.....	106
2.5.2 Minimum Inhibitory Concentration (MIC) determination.....	106
2.6 Atomic Force Microscopy Analysis (AFM).....	107
2.7 Mammalian Cell Proliferation Assay – Real-Time Cell Analyzer (RTCA).....	107
3 Results and Discussion.....	108
3.1 Characterization of cultures.....	108
3.2 Identification of the microorganisms.....	109
3.3 Synthesis and Characterization of Nanoparticles.....	109
3.4 Antimicrobial Activity.....	112
3.5 Citotoxic Effects.....	114
4 Conclusions.....	114
Acknowledgements	
References	
Tables	
Figures	

CONCLUSÃO GERAL.....	132
-----------------------------	------------

ANEXOS

Produção Científica Complementar

INTRODUÇÃO

A Nanotecnologia é uma ciência de sistemas de tamanho nano, compreendida em uma escala de 10^{-9} m, que vem revolucionando o mundo da ciência e tecnologia, trazendo grandes expectativas para o desenvolvimento tecnológico, pois propõe criar uma nova organização estrutural, capaz de apresentar comportamentos e propriedades diferentes dos materiais atualmente conhecidos e disponibilizados (CADIOLI e SALLA, 2012; DURÁN et al., 2006).

A palavra "nano" é de origem grega que significa anão ou extremamente pequeno. O conceito de nanotecnologia foi dado pelo físico Richard Feynman na década de 50, embora a definição de nanotecnologia tenha sido apresentada pelo professor da Universidade de Ciência de Tóquio, Norio Taniguchi na década de 70, no entanto, foi popularizada na década de 80 por Eric Drexler, o primeiro cientista a doutorar-se em nanotecnologia (CADIOLI e SALLA, 2012; RAI et al., 2011).

Atualmente a nanotecnologia é mundialmente reconhecida, e por ser uma ciência multidisciplinar, tem recebido novos conceitos, como o termo “Nanobiotecnologia” que envolve pesquisa e desenvolvimento de tecnologias por meio da interação com outras ciências como a biotecnologia, biologia, química, física, engenharia computacional, entre outras (CADIOLI e SALLA, 2012).

A Nanobiotecnologia vem se mostrando muito promissora e suas aplicações podem ser visualizadas em diversas áreas como na medicina, na agricultura e nas indústrias (alimentícia, cosmética, farmacêutica). As principais aplicações na indústria de alimentos estão relacionadas principalmente com o desenvolvimento de novos materiais para embalagens. As aplicações com finalidades terapêuticas estão em expansão e têm sido evidenciadas em diferentes campos como engenharia de tecidos, implante de dispositivos médicos e órgãos artificiais, próteses e na odontologia. Destaca-se também, estudos relacionados à nanomedicina para diagnósticos antecipados, podendo levar a melhores tratamentos às doenças emergentes/re-emergentes, que são doenças cuja incidência em humanos vem aumentando nas últimas duas décadas ou ameaçam aumentar num futuro próximo (BIGLARI, SHARIFI e SHARIFI, 2014; DE LIMA et al., 2012; DURÁN et al., 2007; GADE et al., 2010; INGLE, DURÁN e RAI, 2014; KASHYAP et al., 2013; MARCATO e DURÁN, 2011; SANTOS e FIALHO, 2007, 2008; RAI et al., 2013; TRAN et al., 2013).

Em função desta crescente preocupação e pelo surgimento de patógenos como bactérias, fungos e parasitas multirresistentes, o desenvolvimento de novos compostos

antimicrobianos para melhorar a atividade antimicrobiana em terapias, antissépticos ou desinfecção, é atualmente uma área de alta prioridade nas novas pesquisas. Neste panorama, a Nanobiotecnologia promove um meio para modificar aspectos importantes de diferentes materiais, incluindo nanopartículas metálicas. Estas são amplamente reconhecidas como eficientes antibacterianos e com outras atividades biológicas (RAI e DURÁN, 2011).

O efeito antagonico da prata é conhecido desde os tempos mais antigos, obtendo seu auge na utilização como antimicrobiano na Primeira Guerra Mundial, sendo utilizado nos soldados feridos para minimizar infecções (CLEMENT e JARRET, 1994).

Nanopartículas metálicas podem ser obtidas por métodos químicos, físicos e biológicos. Entretanto, os métodos biológicos têm recebido atenção especial por possuírem uma abordagem ambientalmente correta, ou seja, favoráveis ao meio ambiente, já que nenhum produto químico tóxico está envolvido na sua biossíntese, além disso, há uma ampla distribuição e disponibilidade dos recursos biológicos em ambientes naturais, e em condições *in vitro* são fáceis de manipular. Estudos têm demonstrado que um grande número de diferentes espécies de bactérias e fungos pode reduzir íons metálicos a nanopartículas metálicas com propriedades antimicrobianas (ABDEEN et al., 2014; EVELYNE e SUBBIAYH, 2014; DURÁN et al., 2010a,b; GUPTA et al., 2011; MARCATO e DURÁN, 2011; NARASIMHA et al., 2013; RAI et al., 2011).

Actinomicetos são bactérias Gram-positivas com grande interesse na biotecnologia, principalmente por produzirem metabólitos secundários, como antibióticos. Estes micro-organismos são ubíquos, encontrados principalmente no solo, no entanto, podem também estar presentes em ambientes aquáticos e em associação com líquens e plantas (GONZÁLES et. al., 2005; SILVA-VINHOTE et. al., 2011).

Na síntese biológica de nanopartículas os actinomicetos se destacam como nanofábricas de compostos bioativos, a exemplo de *Streptomyces hygroscopicus*, micro-organismo produtor de antibióticos e enzimas de valor comercial. As nanopartículas de prata biossintetizadas por essa espécie apresentaram atividade antimicrobiana evidente contra diferentes micro-organismos patogênicos de importância clínica (SADHASIVAM, SHANMUGAM e YUN, 2010).

Pesquisas com actinomicetos, como *Corynebacterium* sp., *Streptomyces aureofaciens*, *Streptomyces hygroscopicus*, *Streptomyces olivaceus* sp-1392, *Rhodococcus* sp., *Rothia* sp., *Actinomadura* sp., *Nocardiopsis* sp. MBRC-1, e *Streptomyces* sp., relatam a biossíntese nanopartículas de prata com ação antimicrobiana contra os micro-organismos teste *Escherichia*

coli, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus hirae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flesneri*, *Monascus purpurea*, *Aspergillus brasiliensis*, *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus niger*, *Candida albicans* (ABDEEN et al., 2014; EVELYNE e SUBBIAYH, 2014; MANIVASAGAN et al., 2013; SADHASIVAM, SHANMUGAM e YUN, 2010; SHIRLEY et al., 2010; SUNDARAMOORTHY et al., 2011; USHA, 2010; VENGADESH et al., 2011; ZHANG et al., 2005).

Sugere-se que a eficiência da atividade antimicrobiana das nanopartículas metálicas seja devido ao seu tamanho minúsculo e a alta relação superfície/volume, ou seja, uma grande área de superfície aumenta a interação das nanopartículas com os micro-organismos patogênicos para realizar a ação antagonista de amplo espectro (INGLE, DURÁN e RAI, 2014).

A Nanobiotecnologia representa uma abordagem moderna e inovadora para desenvolver e testar novas formulações à base de nanopartículas metálicas com propriedades antimicrobianas. A caracterização das nanopartículas de prata, tais como tamanho e forma são importantes, não apenas para aumentar a ação antagonista, mas também para minimizar ou evitar que sejam tóxicas as células de eucariontes. Sendo assim, mais estudos são necessários para caracterizar plenamente os mecanismos de ação envolvidos com a atividade antimicrobiana e a toxicidade dessas partículas (RAI et al., 2009; DURÁN et al., 2010; RAJAKUMAR e RAHUMAN, 2011).

Nesse sentido, este trabalho tem como objetivo verificar o potencial de síntese de nanopartículas prata de compostos produzidos por actinomicetos do acervo da Coleção de Cultura Micoteca-DPUA, da Universidade Federal do Amazonas-UFAM, oriundos da biodiversidade amazônica, com atividade antimicrobiana.

OBJETIVOS

2.1 Geral

Esta pesquisa teve como objetivo avaliar a diversidade de actinomicetos do acervo da Coleção de Cultura – Micoteca DPUA, do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal do Amazonas, como fonte de nanopartículas de prata para o tratamento de doenças causadas por bactérias patogênicas e fungos oportunistas e parasitas.

2.2 Específicos

- Examinar 10 actinomicetos do acervo da Coleção de Cultura - Micoteca DPUA, da Universidade Federal do Amazonas-UFAM, quanto ao potencial de síntese de nanopartículas de prata;
- Avaliar a atividade antimicrobiana das nanopartículas de prata biossintetizadas pelos actinomiceto frente a bactérias patogênicas e fungos parasitas ou oportunistas, para selecionar um táxon como fonte promissora com atividade antimicrobiana;
- Caracterizar as nanopartículas de prata biossintetizadas pelo actinomiceto promissor;
- Avaliar a citotoxicidade das nanopartículas de prata da solução aquosa do actinomiceto promissor.

CAPÍTULO I

Este capítulo aborda dados da literatura, sobre os temas apresentados neste trabalho, os quais possibilitarão discutir posteriormente os resultados nos demais capítulos. Nele é possível encontrar os tópicos como: Nanotecnologia e Nanobiotecnologia, Nanopartículas Metálicas com ênfase às Nanopartículas de Prata, Antimicrobianos e Bactérias Multirresistentes, além do estudo dos actinomicetos, com destaque ao gênero *Streptomyces* e sua potencial aplicação nanobiotecnológica.

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Nanotecnologia

A palavra nanotecnologia deriva do prefixo grego *nano*, que significa anão, *techne* se refere à capacidade de produzir um objeto e *logos* que expressa conhecimento. A nanotecnologia, técnica de manipular a matéria na dimensão do átomo devido à amplitude de suas aplicações e ao potencial de inovação, pode ser considerada um dos pilares da revolução tecnológica do século atual. Esta ciência desponta como uma nova estratégia tecnológica, devido à abrangência de sua aplicação, da velocidade em que gera resultados e das características absolutamente inovadoras de seu uso. A nanotecnologia está sendo utilizada em diversas áreas, como na medicina, química, farmácia, engenharia, dentre outras (Figura 1). As perspectivas propostas pela nanotecnologia e a convergência tecnológica que ela impulsiona são extraordinárias, tanto no plano científico-tecnológico, quanto no plano socioeconômico (ENGELMANN e FILHO, 2010; DE LIMA et al., 2012; KASHYAP et al., 2013; TRAN et al., 2013; BIGLARI, SHARIFI e SHARIFI, 2014; INGLE, DURÁN e RAI, 2014).

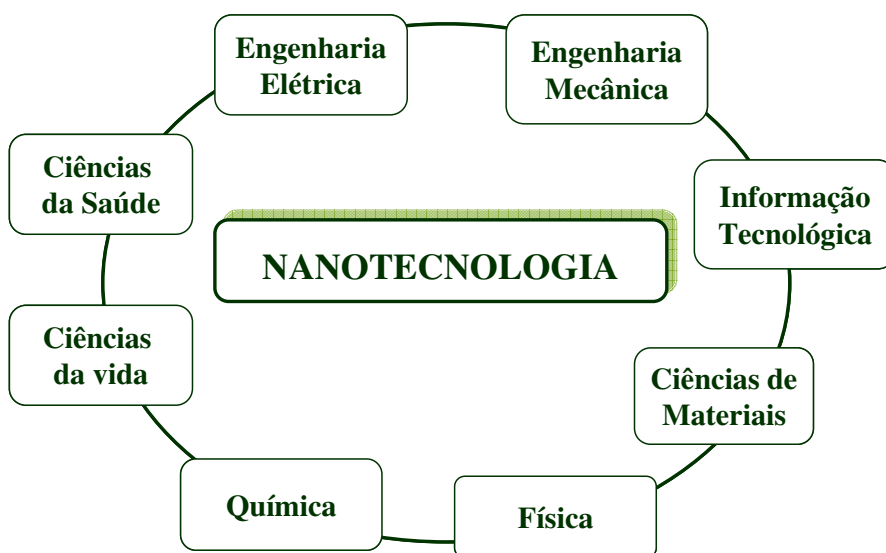


Figura 1. Nanotecnologia e sua interação multi e interdisciplinar.

A nanotecnologia é considerada uma área estratégica para o desenvolvimento industrial e para o fornecimento de soluções que vão desde a produção de medicamentos até vestuários. Nos últimos anos, o Brasil tem desenvolvido ações importantes em Ciência, Tecnologia e

Inovação (C,T&I), com resultados concretos na produção científica, tecnológica e formação de recursos humanos em áreas consideradas estratégicas, particularmente em determinados campos das tecnologias (DURÁN et al., 2010; CADIOLI E SALLA, 2012).

Esta tecnologia baseada em dimensões nanométricas, cujas aplicações visam ampliar a capacidade de manipulação da matéria até os limites do átomo, necessita, contudo, para o seu sucesso que sejam levados em consideração os seus aspectos científicos, até o seu desenvolvimento tecnológico, e para isso o domínio de algumas etapas é fundamental, dentre estas: a síntese dos materiais, com as dimensões, formas e precisão desejadas; a caracterização e análise dos nanomateriais, conhecendo as propriedades intrínsecas, como composição, estrutura e morfologia, com vista à geração de materiais com propriedades pré-estabelecidas; e a manipulação dos nanomateriais que possibilitará a integração destas partículas de tamanho nano ao mundo macroscópico, para realizar funções complexas (CADIOLI E SALLA, 2012).

Neste contexto, tem destaque a nanomedicina, com aplicações nas áreas biomédicas, que consiste em prover meios para auxiliar métodos de diagnóstico (*in vivo* ou *in vitro*) de doenças, induzindo a novos tratamentos, no sistema de liberação controlada de fármacos além de mostrar-se promissora no aumento a eficiência do processo de desenvolvimento de novos fármacos e na engenharia de tecidos e órgãos (DURÁN et al., 2010a).

1.2 Nanobiotecnologia

A nanobiotecnologia refere-se à aplicação da nanotecnologia na área biológica ou ciência da vida. Segundo Cadioli e Salla (2012), a nanobiotecnologia propõe-se a combinar a engenharia, por meio de tecnologias ambientalmente sustentáveis, com a biologia, em escala nanométrica, para manipular sistemas vivos ou construir/reconstruir materiais biologicamente inspirados a nível molecular.

A síntese de nanopartículas é realizada por métodos físicos e químicos, no entanto, sistemas biológicos têm chamado a atenção por utilizarem técnicas eficazes e ambientalmente corretas, pois reduzem ou eliminam o uso de solventes e reagentes ou a geração de produtos tóxicos, que são nocivos a saúde humana e ao meio ambiente (SASTRY et al., 2003; AJITHA et al., 2013).

Dessa forma, a síntese verde associada à nanotecnologia apresenta grande importância no desenvolvimento de tecnologias sustentáveis, possibilitando à nanociência explorar os

recursos naturais, como micro-organismos (bactérias e fungos), extratos de plantas, dentre outros, ricos em biocompostos e substâncias de enorme valor para a ciência.

A síntese biogênica de nanopartículas metálicas pode oferecer diversas vantagens, dentre elas, a relação custo-benefício, por ser um método simples, de baixo valor e apropriada para aplicações inclusive na área médica (RAI e DURÁN et al., 2011). Neste contexto, a nanobiotecnologia vem revolucionando o campo da medicina, contribuindo nos processos e sistemas de tamanhos nanométricos que podem desempenhar funções específicas, como no combate a doenças emergentes e re-emergentes, como a AIDS, dengue, cólera, salmoneloses, leptospirose, o ressurgimento da tuberculose e infecções por *E.coli* 0157:H7 (DURÁN et al., 2006; 2010). Além disso, vem se mostrando muito promissora nos sistemas de entrega de drogas, que auxiliarão no diagnóstico precoce de doenças, no desenvolvimento de novos fármacos e nanorobôs utilizados no combate a doenças atacando células alvos ou em cirurgias (JAIN, 2012).

Na indústria de alimentos, as principais aplicações comerciais da nanobiotecnologia estão relacionadas, principalmente, ao desenvolvimento de novos materiais para embalagens de produtos visando estabelecer maior tempo de prateleira e, conseqüentemente, proporcionar melhor qualidade ao consumo humano (SANTOS e FIALHO, 2007, 2008; DURÁN et al., 2005a).

Diversos estudos têm demonstrado que um grande número de diferentes espécies de micro-organismos (bactéria e fungos) podem reduzir ou estabilizar íons metálicos a nanopartículas metálicas com propriedades antimicrobianas (DURÁN et al., 2010a, b; MARCATO e DURÁN, 2011; DURÁN e MARCATO, 2011; GUPTA et al., 2011; RAI e DURÁN, 2011).

Os micro-organismos são considerados como uma biofábrica potencial para a síntese de nanopartículas, como o ouro, a prata, entre outros. A redução dos íons de Ag por conjuntos de moléculas encontradas nos extratos como enzimas, proteínas, amoniácidos, polissacarídeos e vitaminas é aceitável por ser benigna, e pode ocorrer de forma intra ou extracelular, dependendo do micro-organismo utilizado, dos íons metálicos e da concentração. A síntese intracelular implica na lise das células para recuperação do produto, enquanto que a síntese extracelular requer apenas a extração das nanopartículas do meio de crescimento (SHARMA, 2009; PRATHNA et al., 2010).

Acredita-se que a redução dos íons metálicos ocorre por um processo enzimático envolvendo NADH-redutase, possivelmente liberada em solução (Figura 2). De acordo com o

trabalho de Jain et al. (2012), perfis de SDS-PAGE de proteínas extracelulares revelaram a presença de duas bandas intensas de 32 e 35 kDa, responsáveis pela síntese e estabilidade das nanopartículas prata, respectivamente, estudos mais aprofundados estão sendo realizados, visando confirmar esta ação.

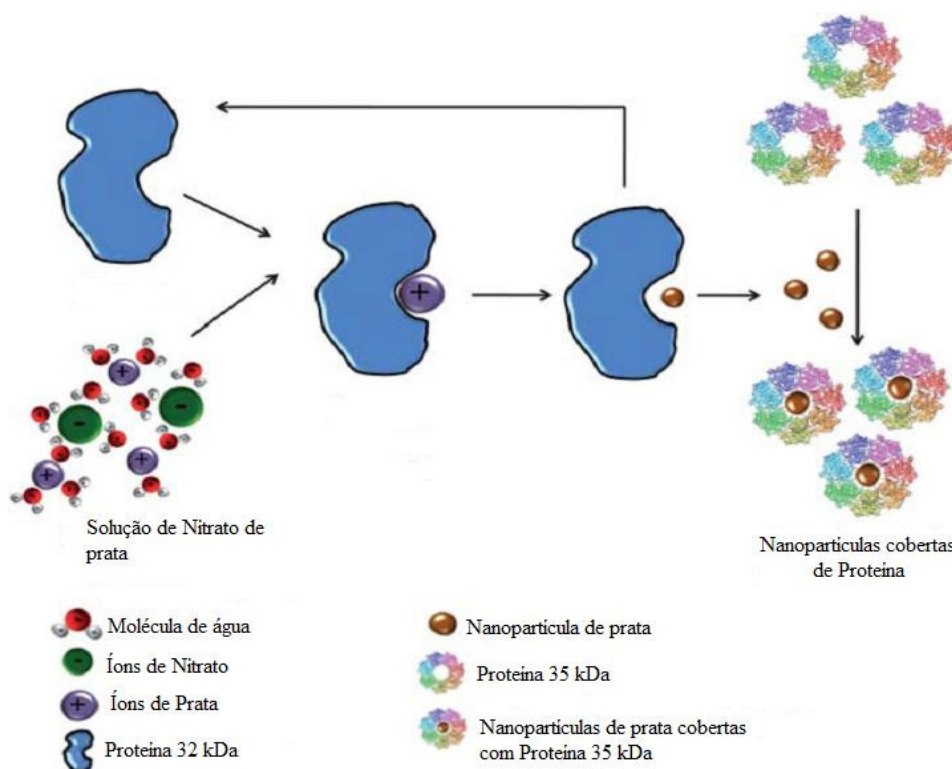


Figura 2. Possível mecanismo de ação e função das proteínas extracelulares na síntese de nanopartículas de prata. Fonte: Jain et al. (2012).

Estudos estão sendo realizados tentando elucidar o mecanismo de ação envolvidos na biossíntese, bem como, para controlar o processo de funcionalização das AgNPs, o que pode representar uma poderosa via para aplicação e fabricação de nanobioprodutos.

1.3 As Nanopartículas Metálicas

As nanopartículas não são algo totalmente novo, estão presentes no ambiente e ocorrem naturalmente em erupções vulcânicas, queimadas, incêndios e na fuligem, oriunda de emissão veicular. Nanopartículas metálicas de metais como ouro, prata, ferro, bronze e cobre, apresentam características únicas, as quais têm sido objeto de estudo de diversos grupos de

pesquisa. Esse interesse vem sendo impulsionado pelo avanço significativo nos métodos de síntese e caracterização, que possibilitam o controle sobre as propriedades das nanopartículas.

A prata é um dos mais poderosos materiais antisséptico disponíveis naturalmente e possuem baixa toxicidade para tecidos de mamíferos. Porém, apresentam forte toxicidade a uma quantidade expressiva de micro-organismos, por esta razão, os compostos à base de prata têm sido amplamente utilizados em aplicações com atividade antimicrobiana. Em função disso, a diversidade e importância de suas aplicações têm gerado um grande interesse no desenvolvimento de métodos versáteis para sintetizar nanopartículas de prata com propriedades bem definidas e controladas (SHIRLEY et al., 2010; DURÁN et al., 2010, 2011).

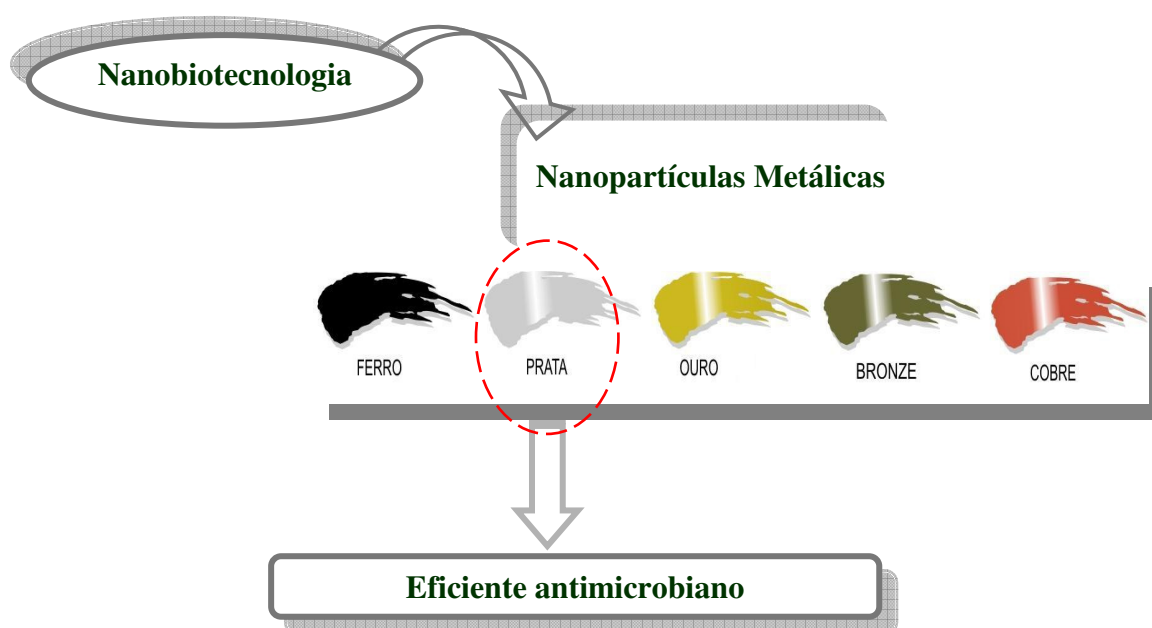


Figura 3. A utilização da prata como ferramenta para produção de nanopartículas metálicas com propriedades antimicrobianas. Fonte: A autora.

As nanopartículas de prata vêm surgindo como nova alternativa terapêutica em diversas patologias, pois apresentam forte efeito antimicrobiano (Figura 3). Acredita-se que íons prata (Ag^+) interagem com grupos sulfúricos nas membranas dos micro-organismos, causando desregulação de sua permeabilidade e a morte da célula microbiana. Os Ag^+ também podem interagir com o DNA impedindo a reprodução celular (DAMM, MÜNSTEDT, RÖSCH, 2008; TAMBOLI e LEE, 2013) (Figura 4).

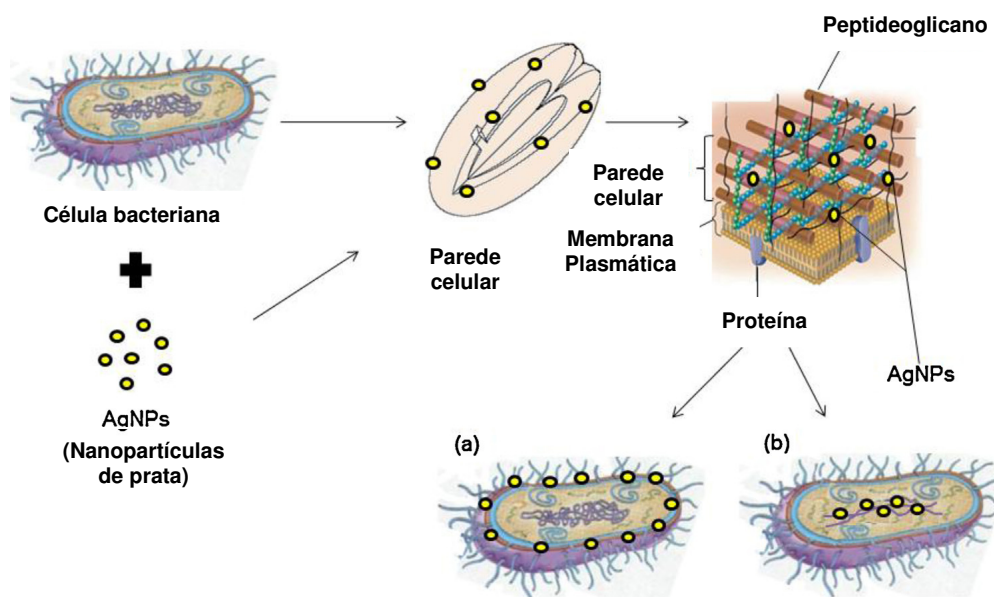


Figura 4. Esquema do possível mecanismo de ação na atividade antimicrobiana utilizando as AgNPs biossintetizadas extracelularmente por micro-organismos. (A) morte celular devido à lise da membrana. (B) morte celular devido o rompimento da cadeia dupla do DNA. Fonte: Tamboli e Lee (2013).

Em virtude da necessidade de disponibilização de novos compostos com atividade antimicrobiana, com função de eliminar bactérias e fungos patogênicos para aumentar a expectativa de vida humana, torna-se de fundamental importância estudos com diversos organismos (plantas, fungos, bactérias, algas) que biossintetizem nanopartículas metálicas, ressaltando as nanopartículas de prata para futura aplicação na indústria médica ou farmacêutica.

1.4 Bactérias Multirresistentes - Antimicrobianos

Os micro-organismos multirresistentes são aqueles que resistem a diferentes classes de antimicrobianos testados em exames microbiológicos. Esses isolados surgem devido a diferentes fatores, sendo que o principal deles está associado à utilização empírica e inadequada de medicamentos por parte da população (MCGEER, 2004; GAITE, SÁENZ e VIDAL, 2008; QUEIROZ et al., 2012).

Dentre os grupos de micro-organismos relacionados a infecções são citados *Staphylococcus aureus* resistente à metilina e *Enterococcus* sp. à vancomicina, *Streptococcus pneumoniae*, a diferentes classes de antimicrobianos, *Klebsiella pneumoniae carbapenemase*,

Pseudomonas aeruginosa à penicilina e, *Acinetobacter baumannii* resistentes aos carbapenêmicos e ainda as enterobactérias produtoras de β -lactamases de espectro ampliado, dentre outros (ESBL) (QUEIROZ et al., 2012).

Overbye e Barret (2005) enfatizam que atualmente, mais de 70% das espécies das bactérias que causam infecções, são resistentes a pelo menos um dos antibióticos comumente utilizados na terapêutica. Além disso, Ujikawa (2003) afirma que está se tornando cada vez mais raro a descoberta de novos tipos de antibióticos, encontrando-se apenas variações de classes conhecidas (OMURA, 1992).

Como solução às resistências dos micro-organismos aos antimicrobianos, estudos estão sendo realizados, tendo em vista a descoberta de novos antibióticos ou a modificação química de antimicrobianos existentes. Infelizmente, esta ação não está assegurando o desenvolvimento de novas drogas em tempo hábil para inibir o desenvolvimento da frequente resistência microbiana (HUH e KWON, 2011).

Para contornar esta situação, a biossoproecção de metabólitos bioativos precisa ser melhorada por meio da utilização de novas tecnologias, como a Nanobiotecnologia, além de alternativas como: engenharia genética; biossíntese mutacional; triagem de alta produtividade; e a maior eficiência na identificação de moléculas de forma a viabilizar economicamente os processos (BULL et al., 2000; PAREKH et al., 2000; HIGGS et al., 2001; FLOSS, 2001; BOGGS; MILLER, 2004; BUTLER, 2004; GULLO; HUGHES, 2005; SAMIULLA et al., 2005; WEIST; SUSSMUTH, 2005; CONTI, 2007).

A possibilidade de utilização da nanobiotecnologia tendo em vista a elaboração de novas moléculas antimicrobianas nanoparticuladas, no intuito de diminuir a dosagem e consequentemente, diminuir possíveis efeitos tóxicos otimizando a atividade é uma realidade que pode e deve ser considerada para melhoria do tratamento de diversas infecções causadas por micro-organismos multirresistentes.

1.5 Actinomicetos – Bactérias Filamentosas

Dentre a biodiversidade de micro-organismos, destacam-se os actinomicetos, que são um grupo de bactérias de organização filamentosa. Essas bactérias são na grande maioria aeróbias estritas, Gram-positivas com alto (>55%) conteúdo de Guanina e Citosina (G + C), formam filamentos ramificados ou hifas, que podem persistir como micélio estável ou podem se quebrar em elementos na forma de bacilos ou cocos (HOLT et al., 1994; McCARTHY e

WILLIAMS, 1990). As características essenciais da natureza procariótica dos actinomicetos são a ausência de membrana nuclear, a ausência de organelas citoplasmáticas e a presença de ribossomos 70S (STANIER et al., 1980; WOESE, 1992).

Os actinomicetos são responsáveis pela produção de uma gama diversificada de metabólitos secundários com aplicação industrial e com propriedades medicinais, incluindo antibióticos, antitumorais, enzimas, inibidores enzimáticos, agentes imunomoduladores, agentes imunossupressores e hormônios de crescimento (SASAKI et al., 1988; STROBEL et al., 2003; STROBEL et al., 2004; FIEDLER et al., 2005; NASCIMENTO et al., 2008; ZHOU et al., 2009; SILVA-VINHOTE et. al., 2011).

O conhecimento da biodiversidade, assim como, da bioprospecção de micro-organismos tornou-se foco principal na atualidade, principalmente em função do advento das tecnologias, na engenharia genética, biotecnologia, bioinformática e da nanobiotecnologia, visto que, a utilização destes organismos na busca de soluções nas áreas da saúde, meio ambiente e indústrias de alimento e farmacêutica vêm crescendo de forma acelerada no atual cenário mundial (OLIVEIRA et al., 2006).

Segundo Kurtboke et al. (2004), as atividades dos micro-organismos estão baseadas em sua notável diversidade metabólica e adaptabilidade genética. O que os torna uma importante fonte de recursos naturais para o avanço nanobiotecnológico e o desenvolvimento sustentável.

A floresta amazônica é uma fonte expressiva de recursos genéticos com potencial uso em processos nanobiotecnológicos. Apesar da imensa diversidade biológica, as espécies que a compõem e suas relações filogenéticas ainda são pouco conhecidas, assim como, seus micro-organismos e suas interações com outros seres (SOUZA et al., 2004).

1.5.1 Ecologia

Os actinomicetos são encontrados em diversos habitats naturais e artificiais, crescendo em uma variedade de substratos. O solo é o ambiente mais comum para os actinomicetos, onde ocorrem em uma proporção de aproximadamente um milhão de células por grama de solo. Embora a maioria seja sapróbio estrito, alguns formam associações parasíticas ou simbióticas com líquens e plantas, podendo também ser encontrados em ambientes pouco explorados, como cavernas e em sedimentos marinhos (GOODFELLOW; WILLIAMS, 1983; GONZÁLES et. al., 2005; SILVA-VINHOTE et. al., 2011).

Esta característica ubíqua dos actinomicetos, em ambientes naturais é devido a dois fatores principais: diversidade metabólica e evolução de mecanismos específicos de dispersão (McCARTHY; WILLIAMS, 1990).

O estudo de habitats pouco explorados, buscando isolar actinomicetos produtores de novos compostos bioativos é uma estratégia que pode possibilitar a descoberta de princípios ativos ainda desconhecidos e com importantes aplicações nanobiotecnológicas (GONZÁLEZ et al., 2005; TERKINA et al., 2006; CHIN et al., 2006; CARDINALE et al., 2006; GUNATILAKA, 2006; SILVA-VINHOTE et al., 2011).

1.5.2 O gênero *Streptomyces*

Dentre os actinomicetos, um dos gêneros que mais desperta interesse científico é o gênero *Streptomyces*, pois inclui o maior número de espécies e linhagens dentre as actinobactérias, sendo responsável pela produção de aproximadamente 80% dos antibióticos atualmente utilizados (CHALIS; HOPWOOD, 2003; RATTI, 2007). Seguido pelos gêneros *Micromonospora*, *Nocardia*, *Streptosporangium* e *Actinoplanes* (CROSS, 1981).

Os *Streptomyces* pertencem a família Streptomycetaceae (ordem Actinomycetales) que compreende os gêneros *Streptomyces*, *Kitasatospora* e *Streptoverticillium*. O gênero *Streptomyces*, representado na Figura 5, apresenta grande variedade incluindo cerca de 500 espécies, as quais diferem na morfologia, na fisiologia e nas atividades bioquímicas (SHIRLING; GOTTLIEB, 1977; RATTI, 2007).

Esses micro-organismos apresentam ciclo de vida complexo, iniciando com a germinação de esporos, dando origem ao micélio vegetativo formado por hifas ramificadas (primárias) que penetram no substrato, metabolizando fontes inorgânicas, tais como proteínas, compostos aromáticos, polissacarídeos e lipídeos, pela ação de enzimas extracelulares (PAMBOUKIAN, 2003).

A partir do micélio vegetativo, origina-se o micélio aéreo (hifas aéreas), as quais passam por um processo de diferenciação morfológica que pode incluir septação e formação de esporos (MADIGAN, MARTINKO e PARKER, 2005).

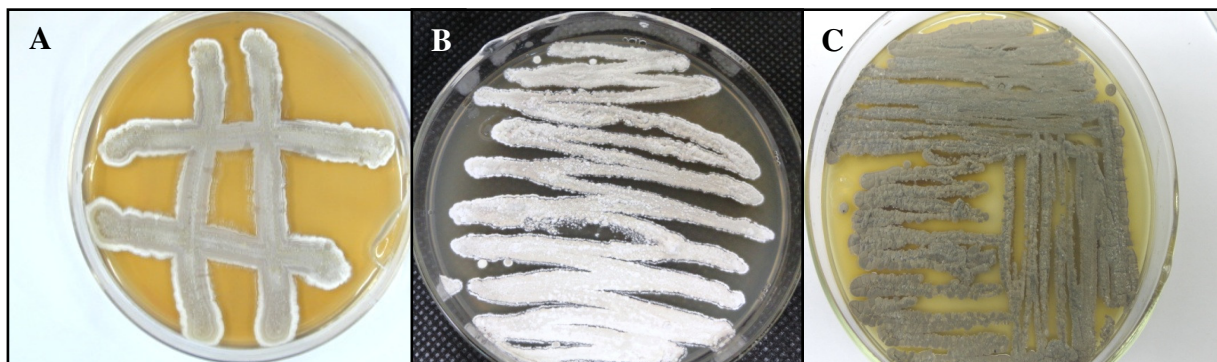


Figura 5. *Streptomyces* sp. preservados na Coleção de Cultura Micoteca-DPUA. (A) Semeadura em formato de intercessão para autenticação das colônias; (B) Semeadura por esgotamento; (C) Semeadura por esgotamento utilizando a técnica dos quadrantes para isolamento das colônias. Micélio aéreo variando de branco ao cinza escuro. Fonte: A autora.

Os *Streptomyces* são encontrados principalmente no solo (saprofíticos), apesar deste habitat ser o mais comum, no entanto, estes organismos podem ser encontrados em ambientes aquáticos, e em associações com líquens, colonizando a rizosfera de raízes e mesmo em tecidos vegetais (CASTILLO et al., 2002; GONZÁLES et al., 2006; SILVA-VINHOTE et al., 2011).

Estas bactérias são caracterizadas por apresentarem metabolismo secundário, por esse motivo, são capazes de produzir grande quantidade de compostos biológicos ativos (MADIGAN, MARTINKO e PARKER, 2005). A produção de antibióticos é a característica mais importante e estudada destes micro-organismos, produzindo a maioria dos antibióticos disponibilizados pela indústria farmacêutica (FGUIRA et al., 2005; CHATER, 2006).

1.6 Potencial Nanobiotecnológico dos actinomicetos

Na atualidade existe uma crescente busca por micro-organismos com potencial biotecnológico. A descoberta destes organismos, bem como sua preservação e classificação adequada, passa a ser imprescindível para que a biodiversidade seja convenientemente utilizada, mantida ou transformada em bioprodutos (AZEVEDO, 1998).

Os micro-organismos existentes possuem uma ampla diversidade biológica e bioquímica e representam um recurso ainda pouco explorado e de enorme valor para o futuro. A exploração dos micro-organismos pela indústria gera bilhões de dólares a cada ano. O valor destes está relacionado ao potencial de aplicação direta nos processos biotecnológicos ou ainda ao valor de mercado dos produtos derivado destes (KURTBÖKE et al., 2004).

Diversos trabalhos têm demonstrado que a segunda maior causa de morte no mundo é ocasionada por doenças infecciosas em decorrência da alta prevalência de micro-organismos patogênicos resistentes a diversos antibióticos, sendo necessário, portanto, a busca por novos antimicrobianos mais eficazes e de baixa toxicidade. Os actinomicetos, especialmente o gênero *Streptomyces* têm sido notadamente úteis na indústria farmacêutica por sua capacidade ilimitada de produzir metabólitos secundários, com diversas estruturas químicas e atividades biológicas. A produção de 2/3 dos antibióticos de ocorrência natural é por actinomicetos (LEVY; MARSHALL, 2004; BUTLER; BUSS, 2006; RATTI, 2007; CONTI, 2007).

O grupo dos actinomicetos também está sendo utilizado na síntese de nanopartículas metálicas, para diversas aplicações, principalmente na ação antagônica contra micro-organismos patogênicos.

Para isso, são estudadas as características morfológicas, assim como, a verificação do potencial destas nanoestruturas no controle dos micro-organismos patogênicos, sua toxicidade, além da identificação dos possíveis mecanismos de ação. Na Tabela 01 estão listados os actinomicetos relatados na literatura que biossintetizam nanopartículas metálicas, principalmente as AgNPs.

Tabela 1. Biossíntese de nanopartículas por actinomicetos.

Item	Micro-organismos	Origem	Tipo de Nanopartícula	Intra/ Extracelular	Tamanho (nm)	Referência
1	<i>Streptomyces</i> sp. 09PBT005	Solo de Agricultura (Índia)	Ag	Extracelular	198 e 595	Kumar et al., 2015
2	<i>Streptomyces albaduncus</i> MTCC-924	Coleção de Cultura (Índia)	Ag	Extracelular	40-60	Zarina e Nanda, 2014
3	<i>Streptomyces</i> sp., VITPKK1	-	Ag	Extracelular	20-45	Sanjenbam et al., 2014
4	<i>Actinomycetes</i> sp.	-	Ag	Extracelular	-	Sunitha et al., 2014
5	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	-	Au	Extracelular	-	Waghmare et al., 2014
6	<i>Streptomyces</i> sp.	Solo ambiente marinho (Índia)	Ag	Extracelular	50-76	Zarina e Nanda, 2014
7	<i>Streptomyces djkartensis</i> - 50 isolados de <i>Streptomyces</i>	Solo (Iran)	Au	Intracelular	2-25	Biglari, Sharifi e Sharifi, 2014
8	<i>Streptomyces</i> sp. LK3	Ambientes marinhos	Ag	Extracelular	5	Karthik et al., 2014
9	<i>Streptomyces microflavus</i> strain FSHJ31	Solo (Iran)	Se	Intracelular	28-123	Forootanfar et al., 2014
10	<i>Streptomyces olivaceus</i> sp-1392	Microbial Type Culture Collection, Chandigarh (Índia)	Ag	Extracelular	500 a 1µm	Evelyn e Subbiah, 2014
11	10 amostras de Actinomicetos, dentre eles: <i>Streptomyces</i> sp.	Solo não contaminado e contaminado com	Ag	Extracelular	10-20	Abdeen et al., 2014

	<i>Rhodococcus</i> sp. <i>Rothia</i> sp. e <i>Actinomadura</i> sp.	metais pesados				
12	<i>Nocardiosis</i> sp. MBRC-1	Sedimentos marinhos (Coréia do Sul)	Ag	Extracelular	30-90	Manivasagan et al., 2013
13	14 Actinobactérias	Solo	Ag	Extracelular	-	Priyaragini, Sathishkumar e Bhaskararao, 2013
14	<i>Streptomyces</i> sp.	Solo	Ag	Extracelular	20-70	Subashini e Kannabiran, 2013
15	Actinomicetos	Solo de mangue (Índia)	Ag	Extracelular	05-50	Narasimha et al., 2013
16	<i>Streptomyces bottropensis</i>	Solo	Ag	Extracelular	5 a 35	Al-Arfaj, 2013
17	Actinomicetos	Solo não contaminado e contaminado com metais pesados	Fe e Ag	Extracelular	10-20	Sunitha et al., 2013
18	<i>Thermoactinomyces</i> sp.	Sedimentos marinhos (Índia)	Ag	Extracelular	20-40	Deepa, Kanimozhi e Panneerselvam, 2013
19	<i>Streptomyces</i> sp. LK-3 (JF710608)	-	Au	Extracelular	05-50	Karthik et al., 2013
20	Actinomicetos (<i>Streptomyces</i> sp., <i>Arthrobacter</i> sp.)	Solo (Geórgia)	Au e Ag	Extracelular	05-80	Kalabegishvili et al., 2013
21	<i>Streptomyces coelicolor</i>	Solos (Índia)	Ag	Extracelular	28-50	Manikprabhu e Lingappa, 2013
22	<i>Streptomyces rochei</i>	Sedimentos marinhos (Índia)	Ag	Extracelular	-	Selvakumar et al., 2012
23	<i>Streptomyces</i> sp. ERI-3	-	Ag	Extracelular	10-100	Salouti e Zonooz, 2011
24	<i>Streptomyces aureofaciens</i> (MTCC 356)	Microbial Type Culture Collection, Chandigarh (Índia).	Ag	Extracelular	500	Sundaramoorthi, Devarasu e Prabhu, 2011
25	<i>Streptomyces glaucus</i> 71MD	Rizosfera de soja (Geórgia)	Ag	Extracelular	variado	Zinicovskaia, et al., 2011
26	<i>Streptomyces</i> sp.	-	Ag	Extracelular	-	Shirley et al., 2010
27	<i>Streptomyces</i> sp.	Solo de mangue	CuSO ₄ ZnNO ₃	Extracelular	100-150	Usha et al., 2010
28	<i>Streptomyces hygrosopicus</i>	-	Ag	Extracelular	20-30	Sadhasivam, Shanmugam e Yun, 2010
29	<i>Streptomyces</i> spp.	Solo (Geórgia)	Ag	Extracelular	-	Tsibakhashvili et al., 2010
30	<i>Corynebacterium</i> sp.	Solo (China)	Ag	Extracelular	10-15	Zhang et al., 2005

Os trabalhos citados relatam a utilização de actinomicetos como fontes promissoras na biossíntese de nanoestruturas com ação antagônica. Entretanto, as propriedades antimicrobianas das nanopartículas ainda são pouco conhecidas, a interação destas AgNPs e

seus efeitos nas células dos micro-organismos dependem, por exemplo, da estabilidade no meio de crescimento, uma vez que este confere um maior tempo de retenção para esta interação. Sendo assim, consiste aqui um dos desafios - a preparação das AgNPs mantendo-as estáveis o suficiente, para então restringir significativamente o crescimento do micro-organismo patogênico (DURÁN e MARCATO, 2011).

Dessa forma, o desenvolvimento de novos compostos antimicrobianos ou a modificação dos que estão disponíveis a fim de melhorar a ação antagônica, é uma área de alta prioridade de pesquisa. Neste esforço, a nanobiotecnologia, fornece subsídios para auxiliar o desenvolvimento de antimicrobianos com função de eliminar bactérias multirresistentes e fungos patogênicos.

2. REFERÊNCIAS

- Abdeen, S., Geo, S., Sukanya, Praseetha P.K., Dhanya R.P. Biosynthesis of Silver nanoparticles from *Actinomycetes* for therapeutic applications. *Int. J.Nano Dimens.* 5(2): 155-162, Spring. (2014).
- Ajitha, B.; Ashok Kumar Reddy, Y.; Reddy, P. S. Biogenic nano-scale silver particles by *Tephrosia purpurea* leaf extract and their inborn antimicrobial activity. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 121C, p. 164-172. (2013).
- Al-Arfaj, Abdullah Abdullaziz. Exploiting of *Streptomyces bottropensis* as creator for silver nanoparticles inhibiting growth of microbes. *Int.J. Curr. Microbiol. App. Sci* 2(9): 288-298. (2013).
- Azevedo, J.L. Microrganismos endofíticos. In: I.S. Melo e J.L. Ecologia Microbiana. Editora da EMBRAPA, Jaguariúna, SP. p. 117-137. (1998).
- Boggs, A.F.; Miller, G.H. Antibacterial drug discovery: is small pharma the solution? *Clinical Microbiology and Infection*.10 (suppl. 4): 32-36. (2004).
- Biglari, S., Gholam H., Sharifi; Gholam R., Sharifi. Production of gold nanoparticles by *Streptomyces djakartensis* isolate B-5. *Nanomed. J.*, Vol. 1, No. 4, Summer, page 229-237. (2014).
- Bull, A.T.; Ward, A.C.; Goodfellow, M. Search and discovery strategies for biotechnology: the Paradigm Shift. *Micrbiology and Molecular Biology Reviews.* 64 (3): 573-606. (2000).
- Butler, P.J. Butler, Metabolic regulation in diving birds and mammals, *Respir. Physiol. Neurobiol.* Summary Plus. Cited By in Scopus (18), p.297–315, 2004.
- Butler, M.S.; BUSS, A.D. Natural products – The future scaffolds for novel antibiotics? *Biochemical Pharmacology.* 71 (7): 919-929, 2006.

- Cadioli, L. P.; Salla, L. D. Nanotecnologia: um estudo sobre seu histórico, definição e principais aplicações desta inovadora tecnologia. 98-105. (2012).
- Cardinale, M., Pugcglial, A. M., Brube, M.: Molecular analysis of lichenassociated bacterial communities. Dipartimento di Biologia Cellulare e dello Sviluppo, Università degli Studi di Palermo, Palermo, Italy and Institute of Plant Sciences, Karl- Franzens-University Graz, Graz, Austria. Federation of European Microbiological Societies FEMS. Microbiol Ecol 57. 484–495. (2006).
- Castillo, U. F.; Strobel, G. A.; Ford, E. J.; Hess, W. M.; Porter, H.; Jensen, J. B.; Albert, H.; Robison, R.; Condrón, M. A. M.; Teplow, D. B.; Stevens, D.; Yaver, D. Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigricans*. Microbiology, v. 148, p. 2675-2685. (2002).
- Chalis, G.L.; Hopwood, D.A. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. PNAS, 100, p.14555-14561. (2003).
- Chater, K. F. *Streptomyces* inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics. Philosophical Transactions of Royal Society B, London, United Kingdom, v. 361, p. 761-798. (2006).
- Chin, Y-W.; Balunas, M.J.; Chai, H.B.; Kinghorn, A.D.; Drug discovery from natural sources. The AAPS Journal. 8(2): 239-253. (2006).
- Conti, R. Diversidade e atividade antimicrobiana de microrganismos endofíticos da planta medicinal *Borreria verticillata* (L.) G.F.W. Meyer. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Pernambuco. PE, Brasil, (2007).
- Damm, C.; Münstedt, H.; Rösch, A. The antimicrobial efficacy of polyamide 6/silver-nanoand microcomposites. Materials Chemistry and Physics, v. 108, n.1, p. 61-66, March (2008).
- Deepa, S.; Kanimozhi, K. and Panneerselvam, A.. Antimicrobial activity of extracellularly synthesized silver nanoparticles from marine derived actinomycetes. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci 2(9): 223-230. (2013).
- De Lima, R., Seabra, A.B., Durán, N. Silver nanoparticles: a brief review of cytotoxicity and genotoxicity of chemically and biogenically synthesized nanoparticles. J. Appl. Toxicol. 32, 867-879. (2012).
- Durán, N., Marcato, P.D., Teixeira, Z. Nanotecnologia e nanobiotecnologia: Conceitos básicos. Ciencia Viva. http://www.cienciaviva.org.br/arquivo/cdebate/012nano/Nanotecnologia_e_Nanobiotecnologia.pdf. (2005a).
- Durán, N., Mattoso, L.H.C., De Moraes, P.C. (Eds). Nanotecnologia: Introdução, preparação de nanomateriais e exemplos de aplicação. ArtLiber Ed. São Paulo, Brasil. (2006).
- Durán, N.; Marcato, P. D.; De Conti, R.; Alves, O. L; Fabio T. M. Costa and Marcelo Brocchi. Potential Use of Silver Nanoparticles on Pathogenic Bacteria, their Toxicity and Possible

- Mechanisms of Action. J. Braz. Chem. Soc., Vol. 21, No. 6, 949-959, 2010. Printed in Brazil – (2010).
- Durán, N., Marcato, P.D., De Conti, R., Alves, O.L., Costa, F.T.M., Brocchi, M. Potential use of silver nanoparticles on pathogenic bacteria, their toxicity and possible mechanisms of action. J. Braz. Chem. Soc., 21, 949-959. (2010a).
- Durán, N., Marcato, P.D., Ingle, A., Gade, A., RAI, M. Fungi-mediated synthesis of silver nanoparticles: Characterization processes and applications. In Progress in Mycology (Mahendra Rai e George Kövics, Eds), Scientific Publishers, Jodhpur, India, Ch 16, pp. 425-449. (2010b).
- Durán, N., Marcato, P.D. Biotechnological routes to metallic nanoparticles production: mechanistic aspects, antimicrobial activity, toxicity and industrial implications. In Nano-Antimicrobials: Progress and Prospects (M. Rai and N. Cioffi, Eds).Springer, Germany In press. (2011).
- Durán, N., Marcato, P.D., Durán, M., Yadav, A., Gade, A., Rai, M. Mechanistic aspects in the biogenic synthesis of extracellular metal nanoparticles by peptides, bacteria, fungi, and plants. Appl. Microbiol. Biotechnol. 90,1609–1624. (2011).
- Engelmann, W.; Berger-Filho, A. G. As Nanotecnologias e o Direito Ambiental: a mediação entre custos e benefícios na construção de marcos regulatórios. Rio Grande do Sul. (2010).
- Evelyn, R.J., Subbiah R. Biosynthesis of Silver Nanoparticles from *Streptomyces olivaceus* and its antimicrobial activity. International Journal of Pharma Research and Health Sciences. All rights reserved. Volume 2 (2), Page-166-172. (2014).
- Fguira, L.F.B.; Fotso, S.; Mehdi, R.B.A.; Mellouli, L.; Laatsch, H. Purifications and structure elucidations of antigungal and antibacterial activities of newly isolated *Streptomyces* sp. Strain US 80. Research in Microbiology, Paris, France, v. 156, p. 341-347. (2005).
- Fiedler, H.P. et al. Proximicin A, B and C, novel aminofuran antibiotic and anticancer compounds isolated from marine strains of the actinomycete *Verrucosispora*. J Antibiot. v.61, pág. 158–163. (2005).
- Floss, H.G. Antibiotic biosynthesis: from natural to unnatural compounds. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. 27(3): 183-194, 2001.
- Forootanfar, H.; Zareb, B.; Fasihi-Bamd, H.; Amirpour-Rostamia, S.; Ameria, A.; Shakibaiee, M. and Mohammad, T.N. Biosynthesis and Characterization of Selenium Nanoparticles Produced by Terrestrial Actinomycete *Streptomyces microflavus* Strain FSHJ31. RRJMB | Volume 3 | Issue 1 | January – March. (2014).
- Gaite F. B.; Sáenz A. J.; Vidal M. V. Nuevas opciones terapêuticas para el tratamiento de las bacterias multirresistentes en Unidades de Cuidados Intensivos. Rev Esp Quimioter; 21(1):9-13. (2008).
- Goodfellow, M.; Williams, S. T. Ecology of actinomycetes. Annual Review of Microbiology, v. 37, p. 189-216. (1983).

- González, I., Ayuso-Sacido, A. Anderson, A., Genilloud, O. Actinomycetes isolated from lichens: Evaluation of their diversity and detection of biosynthetic gene sequences. *FEMS Microbiol. Ecol.* 54, 401-15. (2005).
- Gullo, V.P.; Hughes, D.E. Exploiting new approaches for natural product drug discovery in the biotechnology industry. *Drug Discovery Today: Technologies.* 2(3): 281-286. (2005).
- Gunatilaka, A.A.L.; Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. *Journal of Natural Products.* 69(3): 509-526. (2006).
- Gupta, I., Durán, N., Rai, M. Nanosilver toxicity: Emerging concerns to human and environment. In *Nano-Antimicrobials: Progress and Prospects* (M. Rai and N. Cioffi, Eds).Springer, Germany In press. (2011).
- Higgs, R.E.; Zahn, J.A.; Gigi, J.D.; Hilton, M.D. Rapid method to estimate the presence of secondary metabolites in microbial extracts. *Applied and Environmental Microbiology.* 67(1): 371-376. (2001).
- Holt, J. G.; Krieg, N. R.; Sneath, P. H. A.; Staley, J. T.; Williams, S. T. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.* 9. ed. Baltimore: Williams & Wilkins. (1994).
- Huh J.; Kwon, Y. J. "Nanoantibiotics": A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant. *Journal of Controlled Release* 156, 128–145. (2011).
- Ingle, A. P., Durán, N., Rai, M. Bioactivity, mechanism of action, and cytotoxicity of copper-based nanoparticles: A review. *Appl Microbiol Biotechnol*, 98:1001–1009. (2014).
- Jain, K.K. Advances in the Field of nanooncology. *BMC Med* 8:83. (2012).
- Kalabegishvili, T.; Kirkesali, E.; Ginturi, A.; Rcheulishvili, I. Murusidze, D. Pataraya, M. Gurielidze, N. Bagdavadze, N. Kuchava, D. Gvarjaladze, L. Lomidze . Synthesis of gold nanoparticles by new strains of thermophilic actinomycetes. *Nano Studies*, 7, 255-260. (2013).
- Karthik, L., Kumar, G., Kirthi, A.V., Rahuman, A.A., Rao K.V.B. *Streptomyces* sp. LK3 mediated synthesis of silver nanoparticles and its biomedical application. *Bioprocess Biosyst. Eng.* (2013) DOI 10.1007/s00449-013-0994-3.
- Karthik, L.; Kumar, Gaurav; Kirthi, A. Vishnu; Rahuman, A.A.; Rao, K. V. Bhaskara. *Streptomyces* sp. LK3 mediated synthesis of silver nanoparticles and its biomedical application. *Bioprocess Biosyst Eng* 37:261–267. (2014).
- Kashyap, P.L., Kumar, S., Srivastava, A.K., Sharma, A.K., Myconanotechnology in agriculture: a perspective. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 29:191–207. (2013).

- Kumar, P. S., Balachandran, C., Duraipandiyan, V., Ramasamy, D., Ignacimuthu S., Al-Dhabi, N. A. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticle using *Streptomyces* sp. 09 PBT 005 and its antibacterial and cytotoxic properties Appl Nanosci. **5**: 169–180. (2015).
- Kurtboke, D.I.; Swings, J.; Storms, V. Biodiscovery from microbial resources: Actinomycetes leading the way. Official Journal of the Astralian Society for Microbiology Inc. Volume 31. Number 2p. 57. (2004).
- Labeda, D.P. Isolations of Biotechnological Organisms from Nature. New York: Mcgraw-Hill. (1990).
- Levy, S.B.; Marshall, B.; Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. Nature Medicine. 10 (suppl. 12): 122-129, (2004).
- Madigan, M.T.; Martinko, J.M. Parker, J. Brock biology of microorganisms. 8.ed. Upper Sadle River: Prentice Hall, p. 435, 442-445. (1997).
- Manivasagan, P., Venkatesan, J., Senthilkumar, K., Sivakumar, K., and Kim, S. Biosynthesis, Antimicrobial and Cytotoxic Effect of Silver Nanoparticles Using a Novel *Nocardiopsis* sp. MBRC-1. BioMed Research International. Article ID 287638, 9 pages. (2013).
- Marcato, P.D., Durán, N. Biogenic silver nanoparticles: Applications in medicines and textiles and their health implications, IN: Metal Nanoparticles in Microbiology (M.Rai and N Durán,Eds:), Springer verlag, Germany, Chap. 11, 249-267. (2011).
- McCarthy, A. J., Williams, S. T.: Methods for studying the ecology of actinomycetes. In: Grigorova, R. and Norris, J. R. Methods in Microbiology: techniques in microbial ecology. v. 22. London: Academic. (1990).
- Mcgeer, A. News in antimicrobial resistance: documenting the progress of pathogens. Infect Control Hosp Epidemiol; 25(2):97-8. (2004).
- Manikprabhu, D., Lingappa, K. Antibacterial activity of silver nanoparticles against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* synthesized using model *Streptomyces* sp. pigment by photo-irradiation method. Journal of Pharmacy Research, 255 e 260. (2013).
- Nascimento, R.P.; Coelho, R. R. R. Seleção de actinomicetos produtores de interesse biotecnológico. In: Bom, E.P. S.; Ferrara, M.A.; Corvo, M.L.; Vermelho, A.B.; Paiva, C.L.A.; Alencastro, R B.; Coelho, R.R.R (Org.). Enzimas em Biotecnologia. Produção, Aplicações em Mercado. Rio de Janeiro: Editora Interciência Ltda. p. 71-94. (2008).
- Narasimha, G., Janardhan. Alzohairy, M., Khadri, H., Mallikarjuna, K. Extracellular synthesis, characterization and antibacterial activity of Silver nanoparticles by Actinomycetes isolative. Int. J.Nano Dimens. 4(1): 77-83. (2013).
- Oliveira, V.M., Sette, L.D., Fantinatti-Garboggini, F. Preservação e Prospecção de Recursos Microbianos. Construindo a História dos Produtos Naturais. MultiCiência: DRM. (2006).
- Omura, S. Trends in the search for bioactive microbial metabolites. J. Industrial Microbiol. v. 10, p. 135-156. (1992).

- Overbye, K M, Barrett, J. F., Drug Discov. Today. 10-45. (2005).
- Pamboukian, C.R.D. Produção do antitumoral rentamicina por *Streptomyces olindensis* em processos descontínuos. São Paulo. 163p. Tese de Doutorado – Engenharia Química – Universidade de São Paulo. (2003).
- Parekh, D. B.; Ziegler, W.; Parker, P. J.; Multiple pathways control protein kinase C phosphorylation. EMBO J. 19, 496-503. (2000).
- Prathna T.C., Lazar Mathew, N. Chandrasekaran, Ashok M. Raichur and Amitava Mukherjee Biomimetic Synthesis of Nanoparticles: Science, Technology & Applicability. Biomimetics, Learning from Nature. (2010).
- Priyaragini S., Sathishkumar S.R., Bhaskararao K.V Biosynthesis of silver nanoparticles using actinobacteria and evaluating its antimicrobial and cytotoxicity activity. *Int J Pharm Pharm Sci*, Vol 5, Suppl 2, 709-712. (2013).
- Queiroz, G. M.; Silva, L. M.; Pietro, L. C. R; Salgado, H. R. N. Multirresistência microbiana e opções terapêuticas disponíveis. *Rev Bras Clin Med*. São Paulo, mar-abr;10(2):132-8. (2012).
- Rai, M., Durán, N. (Eds) Metal Nanoparticles in Microbiology. Springer-Verlag, Berlin Heidenberg, pp. 303. (2011).
- Ratti, R.; Serrano, N.F.G.; Hokka, C. O.; Sousa, C. P. Isolamento e atividade antimicrobiana de microrganismos endofíticos de “pêssego do cerrado”. Congresso de Pós-Graduação, 4. São Carlos. Anais de Eventos da UFSCar, v. 3, p. 1249. (2007).
- Sadhasivam, S., Shanmugam, P., Yun, K.S. Biosynthesis of silver nanoparticles by *Streptomyces hygroscopicus* and antimicrobial activity against medically important pathogenic microorganisms. *Colloids Surf. B: Biointerf*. 81, 358–362. (2010).
- Salouti, M.; Zonooz, F. N. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using cell filtrate of *Streptomyces* sp. ERI-3. *Scientia Iranica F*. 18 (6), 1631–1635. (2011).
- Samiulla, DS.; Vaidyanathan, V.V.; Arun, P.C.; Balan, G.; Blaze, M.; Bondre, S.; Chandrasekhar, G.; Gadakh, A.; Kumar, R.; Kharvi, G.; Kim, H.O.; Kumar, S.; Malikayil, J.A.; Moger, M.; Mone, M.K.; Nagarjuna, P.; Ogbu, C.; Pendhalkar, D.; Raja Rao, A.V.S.; Venkateshwar RAO, G.; Sarma, V.K.; V.K.; Shaik, S.; Sharma, G.V.R.; Singh, S.; Sreedhar, C.; Sonawane, R.; Timmanna, U.; Hardy, L.W. Rational selection of structurally diverse natural product scaffolds with favorable ADME properties for drug discovery. *Molecular Diversity*. 9(1-3): 131-139 (2005).
- Sanjenbam, P., Gopal, J.V., Kannabiran, K. Anticandidal activity of silver nanoparticles synthesized using *Streptomyces* sp. VITPK1. *J De Mycologie Médicale*, Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mycmed.2014.03.004>. (2014).
- Santos, R. M. M., Fialho, S. L. Nanopartículas. Uma alternativa para a administração de biofármacos. *Bio-Tecnol. Ciên. Tecnol*. 37, 52-59, (2007/2008).

- Sasaki, T., Yoshida, J., Itoh, M., Gomi, S., Shomura, T., and Sezaki, M. New antibiotics SF2315A and B produced by an *Excellospora* sp. I. Taxonomy of the strain, isolation and characterization of antibiotics. *J. Antibiot.* 41, 835–842. (1988).
- Selvakumar, P.; Viveka, S.; Prakash, S.; Jasminebeaula S. and Uloganathan, R. Antimicrobial activity of extracellularly synthesized silver nanoparticles from marine derived *Streptomyces rochei*. *Int J Pharm Bio Sci*; 3(3): (P) 188 – 197. (2012).
- Sharma, V. K., Yngard, R. A., Lin, Y. Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. *Advances in Colloid and Interface Science* 145 83–96. (2009).
- Silva-Vinhote, N. M., Marinho-Pereira, T., Astolfi-Filho, S., Matsuura, T. Taxonomic Characterization and Antimicrobial Activity of Actinomycetes Associated with Foliose Lichens from the Amazonian Ecosystems. *Australian J. Basic Appl. Sci.* 5, 910-918. (2011).
- Shirley, D.A., Sreedhar, B., Dastager, S.G. Antimicrobial activity of silver nanoparticles synthesized from novel *Streptomyces* species. *Digest J. Nanomat. Biostruct.* 5, 447 – 451. (2010).
- Shirling, E. B., Gottlieb, D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Inter. J. Syst. Bacteriol.* 16, 313-340. (1966).
- Souza, A. Q. L.; Souza, A. D. L.; Astolfi Filho, S.; Belém Pinheiro, M. L.; Sarquis, M. I. M.; Pereira, J. O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. *Acta Amazonica* vol. 34(2) 185 – 195. (2004).
- Stanier, R.Y.; Ingraham, J.L.; Wheelis, M.L.; Painter, P.R. *The Microbial World*. 5.ed. New Jersey: Prentice-Hall. (1980).
- Strobel, G.A. et al. Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes Infect.* v.5, pág. 535–544. (2003).
- Strobel, G. et al. Natural products from endophytic microorganisms. *J. Nat. Prod.* v.67, pág. 257–268. (2004).
- Subashini, J. and Kannabiran, K. Antimicrobial activity of *Streptomyces* sp. VITBT7 and its synthesized silver nanoparticles against medically important fungal and bacterial pathogens. *Der Pharmacia Lettre*, 5 (3):192-200. (2013).
- Sunitha, A. et al. Evaluation of antimicrobial activity of biosynthesized iron and silver Nanoparticles using the fungi *Fusarium oxysporum* and *Actinomycetes* sp. on human pathogens. *Nano Biomed. Eng.*, 5(1), 39-45. DOI: 10.5101/nbe.v5i1.p39-45. (2013).
- Sunitha A, Geo S, Sukanya S, Praseetha PK, Dhanya RP Biosynthesis of silver nanoparticles from actinomycetes for therapeutic applications. *Int J Nano Dimens* 5:155–162. (2014).

- Sundaramoorthi. C, Devarasu. S., Vengadesh Prabhu. K. Antimicrobial and wound healing activity of silver nanoparticles synthesized from *Streptomyces aureofaciens*. Inter. J. Pharm. Res. Develop. 2, 69-75. (2011).
- Tamboli, D. P., Lee, D. S. Lee. Mechanistic antimicrobial approach of extracellularly synthesized silver nanoparticles against gram positive and gram negative bacteria. Journal of Hazardous Materials 260 878– 884. (2013).
- Terkina, I. A.; Parfenova, V. V., Ahn, T. S. Antagonistic Activity of Actinomycetes of Lake Baikal. Applied Biochemistry and Microbiology, Vol 42, no.2, pp 173-176. (2006).
- Tran, Q.H., Nguyen, V.Q., Le A.T. Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives. Adv. Nat. Sci.: Nanosci. Nanotechnol. 4, 033001. (2013).
- Tsibakhashvili, N.; T. Kalabegishvili; V. Gabunia; E. Gintury; N. Kuchava; N. Bagdavadze; D. Pataraya; M. Gurielidze; Gvarjaladze; L. Lomidze. Synthesis of Silver Nanoparticles using bacteria. Nano Studies, 2, 179-182. (2010).
- Ujikawa, K.; Antibióticos antifúngicos produzidos por actinomicetos do Brasil e sua determinação preliminar nos meios experimentais. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. vol. 39, n. 2, abr.jun. (2003).
- Usha, R., Prabu, E., Palaniswamy, M., Venil, C.K., and Rajendran, R. Synthesis of Metal Oxide Nano Particles by *Streptomyces* sp. for Development of Antimicrobial Textiles. Global Journal of Biotechnology & Biochemistry 5 (3): 153-160. (2010).
- Waghmare, SS., Deshmukh, AM., Sadowski, Z. Biosynthesis, optimization, purification and characterization of gold nanoparticles. Afr J Microbiol Res 8:138–146. (2014).
- Weist, S.; Sussmuth, R.D. Mutation biosynthesis – a tool the generation of structural diversity in the biosynthesis of antibiotics. Applied Microbiology and Biotechnology. 68(2): 140-150. (2005).
- Woese, C. R. Prokaryotic systematics: The evolution of a science. In: Balows, A., Trüper, H. G.; Dworkin, M.; Harder, W.; Scheifer, K. M. The Prokaryotes. 2. ed. New York: Springer-Verlag. (1992).
- Zarina, A. and Nanda, A. Combined Efficacy of Antibiotics and Biosynthesised Silver Nanoparticles from *Streptomyces Albaduncus*. International Journal of PharmTech Research Vol.6, No.6, pp 1862-1869. (2014).
- Zarina, A. and Nanda, A. Green Approach for Synthesis of Silver Nanoparticles from Marine *Streptomyces*- MS 26 and Their Antibiotic Efficacy. J. Pharm. Sci. & Res. Vol. 6(10), 321-327. (2014).
- Zinikovskaia, I.I.; Nelly Y.; Tsibakhashvili, E.I.; Kirkesali, D.T.; Pataraya, M.A.; Gurielidze, T.L. Kalabegishvili, D.N.; Gvarjaladze, G.I.; Tsertsvadze, M.V.; Frontasyeva, M.S.; Wakstein, S.N. Khakhanov, N.V.; Shvindina, V. Y.; Shklover. Microbial Synthesis of Silver Nanoparticles by *Streptomyces glaucus* and *Spirulina Platensis*. Nanomaterials: Applications and Properties (NAP-2011). Vol. 2, Part II.

- Zhang, Li, Q., Lu, Y., Sun, D., Lin, X., Deng, X., He, N., Zheng, S. Biosorption and bioreduction of diamine silver complex by *Corynebacterium*. J. Chem. Technol. Biotechnol. 80, 285–290. (2005).
- Zhou, J.; Wang, Y-H.; Chu, J.; Luo, L-Z.; Zhuang, Y-P.; Zhang, S-L. Optimization of cellulase mixture for efficient hydrolysis of steam-exploded corn stover by statistically designed experiments. Bioresource Technology 100. 819–825. (2009).

CAPÍTULO II

Neste capítulo serão descritos todos os métodos e técnicas utilizados para caracterização taxonômica e molecular dos actinomicetos, a síntese biogênica para obtenção das nanopartículas de prata (AgNPs), a caracterização das AgNPs, a atividade antimicrobiana, além da MIC (Concentração Inibitória Mínima), verificação do potencial antimicrobiano das AgNPs por meio de imagens captadas a partir de Microscopia de Força Atômica (AFM), e citotoxicidade da amostra promissora.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Micro-organismos

Para realização deste estudo foram selecionadas previamente 10 amostras de actinomicetos da Coleção de Cultura DPUA, Manaus-Amazonas. Os actinomicetos preservados em água destilada esterilizada (Tabela 1) de conhecida atividade antagônica descrita por Silva-Vinhote et al. (2011) foram cultivados em meio líquido [extrato de ISP2 (amido, extrato de levedura, extrato de malte, dextrose)] recomendado por SHIRLEY et al. (2010)

Tabela 1. Actinomicetos cedidos pela Coleção de Cultura – Micoteca DPUA.

Identificação da amostra	Código da amostra
<i>Streptomyces</i> sp.	DPUA 1549
	DPUA 1571
	DPUA 1589
	DPUA 1591
	DPUA 1747
	DPUA 1748
	DPUA 1749
	DPUA 1750
	DPUA 1752
	DPUA 1755

2.2 Subcultivo dos Micro-organismos

Para a avaliação da viabilidade, de cada cultura dos actinomicetos obtida em meio líquido, alíquotas foram semeadas em ágar ISP2-A (amido, extrato de levedura, extrato de malte, dextrose, ágar), pH 7,3, esterilizado a 121 °C por 15 minutos. Os cultivos foram mantidos em placas de Petri (90 x 15 mm) a 30 °C e o desenvolvimento das colônias foram observados durante 15 dias (SILVA-VINHOTE et. al., 2011).

2.3 Autenticação taxonômica com base nas características morfofisiológicas dos actinomicetos

A autenticação dos actinomicetos foi realizada com base nas características morfofisiológicas e por meio do estudo da micromorfologia (WAKSMAN e WOODRUFF, 1941; SHIRLING e GOTTLIEB, 1966; LECHEVALIER e LECHEVALIER, 1989; CROSS, 1994). As características macromorfológicas das colônias (micélio aéreo, micélio vegetativo), determinação de cores, presença de pigmento, exsudato e aspecto das bordas de cada micro-organismo foram realizados com auxílio de um esteriomicroscópio modelo XR-X-3000-Leica. E as características micromorfológicas foram observadas nos cultivos obtidos pela Técnica Lâmina de Contato (Figura 1). Lamínulas foram inseridas (→) em posição parcialmente inclinada para o crescimento microbiano sobre a superfície das mesmas. Em intervalos de cinco dias, durante 15 dias, as lamínulas foram retiradas para o acompanhamento do crescimento micelial: observação de características como, presença ou ausência da cadeia de esporo e a forma da cadeia de esporo. A leitura foi realizada em microscópio óptico com aumento de 400 x (OLIVEIRA, 2004; SILVA-VINHOTE et. al., 2011).

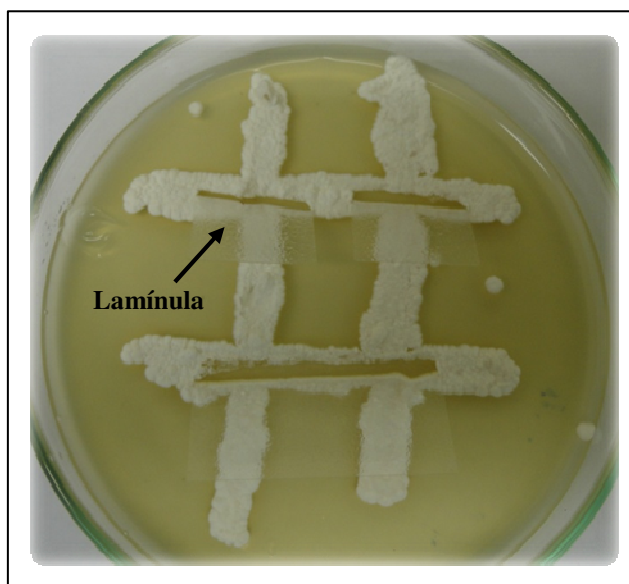


Figura 1. Técnica lâmina de contato.

2.4 Caracterização Molecular dos actinomicetos

2.4.1 Amplificação do gene 16S rDNA

Com uma alça de platina foi colocado um pequeno volume da colônia de actinomiceto em um microtubo de plástico com 150 μ L de água Milli-Q. A desnaturação das células foi realizada em termociclador a 90° C por 15 min e deste tubo, 1 μ L foram coletados para a reação de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase).

A PCR foi realizada em termociclador Eppendorf Master Cycle. Para uma reação com volume final de 25 μ L, foi utilizado 14,2 μ L de água Milli-Q; 1 μ L das células desnaturadas/DNA; 2,5 μ L de tampão da Taq DNA polimerase 10X (Tris-HCl 200 mM, KCl 500 mM); 2,5 μ L de $MgCl_2$ 25 mM; 2,5 μ L dNTP 2,5 mM; 1 μ L do oligonucleotídeo ACT235F 5'- CGCGGCCTATCAGCTTGTG - 3' 5 pmol; 1 μ L do oligonucleotídeo ACT878R 5' - CCGTACTCCCCAGGCGGGG - 3' 5 pmol e 0,3 μ L de Taq DNA polimerase 5 U.

A reação de amplificação foi realizada com os seguintes ciclos de temperaturas: 1) 95 °C por 5 min, 2) 95 °C por 45 s, 72 °C por 60 s, 72 °C por 60 s (40 vezes), 3) 72 °C por 5 min. Também foi utilizada a temperatura de anelamento a 68 °C. Para confirmação da amplificação, 2 μ L da reação foi submetida a uma eletroforese em gel de agarose a 1 % em tampão TBE (Tris-ácido bórico-EDTA) e corado com GelRedTM. A eletroforese foi desenvolvida a 80 V por 10 min e depois a 100 V por 50 min.

A PCR também foi realizada, utilizando os oligonucleotídeos universais para bactérias, em termociclador Bioneer My Genie 96 Thermal Block. Para uma reação com volume final de 25 μ L, foi utilizado 18,375 μ L de água Milli-Q; 1 μ L das células desnaturadas/DNA; 2,5 μ L de tampão da Taq DNA polimerase 10X (Tris-HCl 200 mM, KCl 500 mM); 1,5 μ L de $MgCl_2$ 25 mM; 0,5 μ L dNTP 2,5 mM; 0,5 μ L do oligonucleotídeo 094; 0,5 μ L do oligonucleotídeo 095 e 0,125 μ L de Taq DNA polimerase 5 U. A reação de amplificação foi realizada nas mesmas condições do ciclo anterior, entretanto, a eletroforese foi desenvolvida a 100 V por 30 min.

2.4.2 Purificação do produto amplificado

A purificação do produto amplificado pela PCR foi realizada com o protocolo PEG:

- 1 - Um microtubo de plástico foi colocado o volume de 10 µL de produto da PCR e 10µL de PEG e brevemente vortex;
- 2 - encubou-se em banho maria a 37° durante 15 min (ocasionalmente homogeneização 2 ou 3 vezes durante a incubação por inversão do tubo);
- 3 - centrifugou-se (PCR + PEG) a 2500 rcf durante 15 min;
- 4 - descartou-se o sobrenadante;
- 5 - adicionou-se 125 µL de álcool (ETOH) e centrifugou-se a 1450 rcf durante 2 min e descartar;
- 6 - Os tubos foram colocados invertidos na centrífuga a 100 cf durante 1 min;
- 7 - Posteriormente encubou-se em banho maria a 37° durante 15 min;
- 8 - E por fim, acrescentou-se um volume de água milli-q igual ao da PCR + 40% da PCR.

2.4.4 Sequenciamento do produto purificado

O sequenciamento foi realizado no Sequenciador Automático 3500 de marca Applied Biosystem. Após o sequenciamento, as amostras foram conferidas e editadas com o programa ClustalW (BioEdit). Todas as sequências foram submetidas ao banco NCBI [National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov)] usando o programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) com a ferramenta BLASTn (nucleotídeo-nucleotídeo).

2.5 Autenticação da Viabilidade Antagônica

2.5.1 Determinação da Atividade Antimicrobiana: Método de Difusão em Ágar (Bloco de Gelose)

O método de difusão em ágar consistiu na inoculação de 0,1 mL da suspensão do actinomiceto, pela técnica de *spread-plate*, em 15 mL de ágar ISP2-A. Após sete dias de incubação, a 25 °C, três blocos de gelose de 6 mm de diâmetro foram transferidos para placas contendo, previamente, os micro-organismos teste. As placas foram incubadas respeitando as características fisiológicas de cada micro-organismo teste (Tabela 2). Após o período de

incubação os resultados foram obtidos pela medição em milímetros dos diâmetros dos halos de inibição (ICHIKAWA, et al., 1971; SHIRLEY et al., 2010).

Tabela 2. Micro-organismos patogênicos ou oportunistas testados na avaliação da atividade antimicrobiana.

Código da amostra	Micro-organismos teste	Temperatura	Tempo de incubação
CBAM 0001	<i>Escherichia coli</i>	37 °C	24 h
ATCC 25923	<i>Staphylococcus aureus</i>	37 °C	24 h
INCQS 061	<i>Micobacterium smegmatis</i>	37 °C	24 h
DPUA 1706	<i>Candida albicans</i>	37 °C	48 h
DPUA 1323	<i>Candida atlantica</i>	37 °C	48 h
DPUA 1327	<i>Candida valderwaltii</i>	37 °C	48 h

2.6 Fermentação Submersa

Neste experimento os actinomicetos foram cultivados em 50 mL de meio de cultura líquido MPE (glicose 20 g/L; extrato de soja 20 g/L; NaCl 5 g/L; CaCO₃ 2 g/L e pH 6,7 – 7,0) em frasco de Erlenmeyer de 125 mL, a 25 °C por 72 horas, a 200 rpm (SASTRY et. al, 2003). Após este período o extrato bruto foi separado por meio de filtração a vácuo para análises posteriores (Atividade Antimicrobiana), e a biomassa foi utilizada na síntese de Nanopartículas de Prata (AgNPs).

2.6.1 Determinação da Atividade Antimicrobiana dos actinomicetos – Método Difusão em Agar - *Cup Plate*

Após o período de fermentação, 100 µL do extrato bruto recuperado foi inoculado em poços medindo 6,0 mm de diâmetro em placas de Petri contendo previamente os micro-organismos teste. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica respeitando as características fisiológicas de cada micro-organismo teste. Após o período de incubação o diâmetro dos halos de inibição foi determinado em milímetros (ICHIKAWA, et al., 1971; SHIRLEY et al., 2010).

2.6.2 Extração das Enzimas para Síntese de Nanopartículas

A biomassa separada após o período de fermentação foi lavada três vezes com água destilada esterilizada. Em seguida, foram adicionados 50 mL de água deionizada esterilizada em frascos de Erlenmeyer de 125 mL, contendo a biomassa. Posteriormente os frascos foram incubados e submetidos às seguintes condições, 25 °C por 72 h, a 200 rpm. Após o período de incubação a biomassa foi separada em papel de filtro Whatmann nº 1 e a solução aquosa recuperada utilizada para biossíntese de nanopartículas de prata (DURÁN, 2007; SUDARAMOORTHY et al., 2011).

2.7 Biossíntese de Nanopartícula de Prata

No extrato obtido da biomassa (item 2.6.2) foi adicionado o nitrato de prata (AgNO_3) 1 M, até obtenção de concentração final a 1 mM da mistura reacional. A reação foi conduzida em frascos de Erlenmeyer de 125 ml, a 25 °C, 200 rpm, por 72h, na ausência de luz. O controle positivo e o negativo foram mantidos em condições similares. A mudança de cor das amostras foi monitorada por espectrometria UV-Vis (Cary 50 Probe Agilent) de 350-900 nm. (DURÁN et al., 2007; VIGNESHWARAN et al., 2007; SADHASIVAM, SHANMUGAM e YUN, 2010; SUDARAMOORTHY et al., 2011).

2.8 Determinação da Atividade Antimicrobiana das Nanopartículas de Prata e Seleção do actinomiceto Promissor

Ao término da biossíntese das nanopartículas de prata foi realizada a determinação da atividade antibacteriana e antifúngica pelo Método de Difusão em ágar. Os micro-organismos testes foram semeados com auxílio de swab em placas de Petri contendo Ágar Müller Hinton para as bactérias e Ágar Sabouraud para os fungos. Após a semeadura dos micro-organismos teste, poços de 6 mm de diâmetro foram feitos no meio de cultura e com auxílio de uma micropipeta 100 µL das nanopartículas de prata foram inoculadas em cada poço. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica respeitando as características fisiológicas de cada micro-organismo teste. Ao término do período de incubação os halos de inibição foram medidos em milímetros (NANDA, SARAVANAN, 2009).

2.9 Caracterização das Nanopartículas de Prata do actinomiceto Promissor

As nanopartículas de prata foram caracterizadas utilizando técnicas específicas como: espectroscopia de UV-Vis, DLS (Espalhamento Dinâmico de Luz), DRX (Difratometria de Raios X), FTIR (Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier), ICP-OES (Espectroscopia Óptica de Emissão por Plasma Indutivamente Acoplado), NAT (Análise de Rastreamento de Nanopartículas) e TEM (Microscopia Eletrônica de Transmissão), de acordo com a literatura citada (ABDEEN et al., 2014; BIGLARI, SHARIFI e SHARIFI, 2014; EVELYNE e SUBBIAYH, 2014; FOROOTANFAR et al., 2014; KARTHIK et al., 2014; AL-ARFAJ, 2013; DEEPA, KANIMOZHI e PANNEERSELVAM, 2013; KARTHIK et al., 2013; KALABEGISHVILI et al., 2013; MANIKPRABHU e LINGAPPA, 2013; MANIVASAGAN et al., 2013; NARASIMHA et al., 2013; PRIYARAGINI, SATHISHKUMAR e BHASKARARAO, 2013; SUBASHINI e KANNABIRAN, 2013; ABDEEN et al., 2013; SELVAKUMAR et al., 2012; ZONOOZ e SALOUTI, 2011; PRABHU, SUNDARAMOORTHY e DEVARASU, 2011; SUNDARAMOORTHY, DEVARASU e PRABHU, 2011; ZINICOVSCAIA, et al., 2011; MARCATO e DURÁN, 2011; SHIRLEY et al., 2010; USHA et al., 2010; RAI et al., 2009; DURÁN et al., 2007, 2010, 2012).

2.9.1 Espectroscopia de UV-Visível

Nanopartículas de prata preliminares foram detectadas por meio de espectrofotometria de UV-Vis (Cary 50 Probe Agilent), a um comprimento de onda de 350-900 nm. Nesta análise 3 mL da amostra foram retirados dos frascos e visualizados dentro do intervalo de comprimentos de onda estipulado.

2.9.2 Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A caracterização das nanopartículas de prata foi realizada por FTIR (Bomem MB Series-B102) com alcance de 1000-2000 cm^{-1} , resolução de 4 cm^{-1} . A FTIR revela as biomoléculas responsáveis pela redução dos íons de prata e de estabilização das AgNPs na solução.

2.9.3 Difração de Raios-X (XRD)

Os espectros de XRD foram registrados em um Difratorômetro de Raios-X (Shimadzu XRD7000). O tamanho médio das AgNPs foi calculado usando a equação de Scherrer ($D = 0,9 \lambda / \beta \cos\theta$), onde D = diâmetro médio das partículas; λ = comprimento de onda da radiação eletromagnética; θ = ângulo de difração; β (2θ) = largura na metade da altura do pico de difração.

2.9.4 Espalhamento Dinâmico de Luz e Potencial Zeta (DLS)

O diâmetro hidrodinâmico e os valores do potencial zeta das AgNPs produzidos foram avaliados utilizando um Malvern Zetasizer Nanosystem (Worcestershire, UK). A suspensão aquosa das AgNPs sintetizados foi filtrada com seringas acopladas a filtros com $0,22 \mu\text{m}$ e o tamanho das AgNPs foram medidos utilizando o princípio da técnica de dispersão de luz dinâmica (DLS) feita em um Malvern Zetasizer Nano - série compacta espectrômetro espalhamento.

2.9.5 Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA)

Esta técnica utiliza as propriedades de espalhamento de luz e movimento browniano para obter a distribuição de tamanho das partículas nas amostras em suspensão líquida. As análises da intensidade das nanopartículas em suspensão aquosa foram visualizadas utilizando Nano Sight-Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) versão 2.0 Release, versão Build 0127.

2.9.6 Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) - Estudo de Energia Dispersiva Raios-X (EDX ou EDS)

As imagens de TEM das amostras foram obtidas usando um Microscópio Eletrônico de Transmissão (Zeiss Libra 120) a uma voltagem de 120 kv. A análise elementar foi realizada em espectro empregando a técnica de energia dispersiva de raios-X.

2.10 Espectrometria Óptica de Emissão por Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-OES)

A concentração da AgNPs foi determinada por Espectroscopia de Emissão Atômica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-OES) (Perkin Elmer - Optima 8300), nebulizador concêntrico (Meinhard), câmera de nebulização ciclônica, injetor de Alumina (2 mm i.d), tocha de quartzo 1 slot para amostras aquosas, modelo padrão (Perkin Elmer), amostrador automático (modelo S10). Condições: Vazão da amostra: 1 mL min^{-1} , tempo de delay até a leitura da amostra: 60 segundos, Fluxo de Argônio de Nebulização: N_2 , gás plasma: argônio comercial, tempo de lavagem: 20 segundos com 2% de HNO_3 .

Para determinar a quantidade de íons prata, primeiramente foi utilizada uma solução estoque de AgNO_3 , concentração de 50 mg L^{-1} . Todas as soluções foram preparadas com água deionizada ($\geq 18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$), obtida de um sistema de purificação de água Milli-Q, Synergy® (Merck Millipore). As soluções de referência, contendo de 0,1 a 25 mg L^{-1} de AgNO_3 , foram preparadas a partir da diluição da solução estoque de 50 mg L^{-1} de AgNO_3 e acidificada com ácido nítrico 0,2% (v/v). Esta solução de ácido nítrico 0,2% (v/v) foi utilizada como branco. Os frascos de polipropileno, vidrarias e utensílios, foram previamente limpos por imersão em solução de HNO_3 10% (v/v), durante 24 h e lavados com água deionizada. Para determinar a quantidades de prata formada foram preparadas três alíquotas de cada amostra biossintetizada de AgNPs a uma concentração de 1:10.

2.11 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC)

A MIC das nanopartículas de prata foi testada contra três bactérias, duas Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *S. aureus* ATCC 43300 (MRSA) resistente à meticilina e uma Gram-negativa, *Escherichia coli* CBAM 0001. A Concentração Mínima Inibitória foi determinada de acordo com Quelemes et al. (2013) usando uma placa de microdiluição com 96 cavidades onde as amostras de bactérias (concentração de $5 \times 10^5 \text{ CFU/mL}$) foram expostas a uma série de diluição contendo a solução de nanopartículas de prata, variando de 500 a $0,97 \text{ }\mu\text{M}$. O mesmo procedimento foi utilizado para determinar a MIC do AgNO_3 (controle). A Concentração Mínima Inibitória foi definida como a concentração mais baixa do agente que restringiu o crescimento visível dos micro-organismos. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

2.12 Análise Morfológica e Estrutural do Mecanismo de Ação entre o Micro-organismo teste e a Nanopartícula de Prata – Microscopia de Força Atômica (AFM)

A fim de obter uma maior compreensão do mecanismo de ação bactericida das AgNPs frente aos patógenos testados. O valor de MIC das AgNPs da amostra promissora foi novamente determinado frente a *S. aureus* com concentrações que variaram de 0,975-500 μM , utilizando um inóculo com concentração de 1×10^8 CFU/mL em cada poço, para facilitar a observação em AFM. Após incubação durante 24 horas, 30 μL do meio de cultura contendo as bactérias não tratadas com AgNPs foram depositadas sobre uma superfície de vidro limpo, seguido de secagem em estufa bacteriológica a 35 °C durante 10 minutos, o mesmo procedimento foi realizado com o MIC. As amostras foram então suavemente lavadas duas vezes com 1 mL de água deionizada para remover os cristais de sal e secou-se novamente nas mesmas condições descritas, antes da análise de AFM. Todas as amostras foram preparadas ao mesmo tempo, exposto às mesmas condições e examinadas dentro de 8 horas após a deposição. AFM foi realizada com um microscópio TT-AFM a partir de AFM Oficina (EUA). A análise do efeito de AgNPs sobre células de *S. aureus* foi levada a cabo no modo de vibração, utilizando NSG10 consolas (NT-MDT) com uma frequência de ressonância de cerca de 280 kHz. As imagens foram analisadas usando software Gwyddion 2.33. Várias áreas de cada uma das amostras foram examinadas e selecionadas imagens representativas.

2.13 Avaliação da Citotoxicidade das Nanopartículas de Prata

Ensaio de proliferação em células de mamíferos - Real-Time Cell Analyzer (RTCA)

Para investigar os efeitos das AgNPs sobre a proliferação celular, foram utilizadas células de fibroblastos de murino NIH-3T3 (ATCC 1658). 25 cm^2 das células foram mantidas em frascos de cultura (TPP, Suíça) a 37 ° C, em 5% (v / v) CO_2 , em DMEM (meio Dulbecco modificado / Sigma-Aldrich de Eagle) meio suplementado com 10% (v / v) soro fetal de bovino inativado por calor (Invitrogen, EUA); 100 IU / mL de penicilina; e 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina.

Para os ensaios de proliferação foi utilizado o Real-Time Cell Analyzer (RTCA) (xCELLigence RTCA DP instrument - Roche). Vinte e quatro horas antes da exposição das nanopartículas ($t=-24$ horas), 5000 células/poço foram inoculadas em E-placas. Este primeiro procedimento visa permitir a ligação de células antes dos tratamentos. No momento $t=0$ horas,

as células (n=3 não tratadas) foram expostas a diferentes concentrações de nanopartículas de prata (controles = 0 μ M, 1 μ M, 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M) e o padrão de proliferação foi seguido durante 70 horas. Os resultados preliminares estão expressos por um Índice Celular que está correlacionado com o número de células aderidas ao fundo das placas, e é uma forte indicação da proliferação celular. As análises estatísticas foram realizadas de duas formas:

(1) comparações da área sob a curva (AUC) do Índice Celular versus tempo entre os diferentes grupos experimentais foram calculados. A análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$) foi realizada entre os grupos experimentais;

(2) determinação da CL50% (concentração letal para 50% das células expostas). Para isso, uma curva não linear entre o índice celular e o registro da concentração de nanopartículas foi calculado para os diferentes pontos de tempo. Uma curva com alguns desses resultados foi produzida para observar a evolução da CL50% ao longo do tempo de exposição.

2.14 Análise Estatística

Os resultados foram submetidos à análise estatística descritiva (média e desvio padrão). Nos testes de citotoxicidade os resultados foram expressos como a média $\pm$ SEM e analisados por análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de comparação múltipla de Dunnett para os grupos experimentais. As diferenças entre grupos e o controle foram considerados significativos quando $p < 0,05$ (software GraphPad Prism 4.0).

REFERÊNCIAS

- ABDEEN, S., RIMAL ISAAC R.S., GEO, S., SORNALEKSHMI S., ARSULA R., PRASEETHA P.K. **Evaluation of antimicrobial activity of biosynthesized iron and silver Nanoparticles using the fungi *Fusarium oxysporum* and *Actinomyces* sp. on human pathogens.** Nano Biomed. Eng., 5(1), 39-45. DOI: 10.5101/nbe.v5i1.p39-45. (2013).
- ABDEEN, S., GEO, S., SUKANYA, PRASEETHA P.K., DHANYA R.P. **Biosynthesis of Silver nanoparticles from *Actinomyces* for therapeutic applications.** Int. J.Nano Dimens. 5(2): 155-162, Spring. (2014).
- AL-ARFAJ, ABDULLAH ABDULLAZIZ. **Exploiting of *Streptomyces bottropensis* as creator for silver nanoparticles inhibiting growth of microbes.** Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci 2(9): 288-298. (2013).
- BIGLARI, S.; SHARIFI, G. H.; SHARIFI, G. R. **Production of gold nanoparticles by *Streptomyces djakartensis* isolate B-5.** Nanomed. J., Vol. 1, No. 4, Summer (2014), page 229-237
- CROSS, T. **Growth and examination of actinomycetes - some guidelines.** In: Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., Williams, S.T. (Eds) **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.** 9. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994.
- DEEPA, S.; KANIMOZHI, K. and PANNEERSELVAM, A.. **Antimicrobial activity of extracellularly synthesized silver nanoparticles from marine derived actinomycetes.** Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci 2(9): 223-230. (2013).
- DURÁN, N., MARCATO, P.D., SOUZA, G.I.H., ALVES, O.L., ESPOSITO, E. **Antibacterial effect of silver nanoparticles produced by fungal process on textile fabrics and their effluent treatment.** J. Biomed. Nanotechnol. 3, 203-208, 2007.
- DURÁN, N.; MARCATO, P. D.; DE CONTI, R.; ALVES, O. L; FABIO T. M. Costa and Marcelo Brocchi. **Potential Use of Silver Nanoparticles on Pathogenic Bacteria, their Toxicity and Possible Mechanisms of Action.** J. Braz. Chem. Soc., Vol. 21, No. 6, 949-959, 2010a.
- DURÁN, N., MARCATO, P.D., INGLE, A., GADE, A., RAI, M. **Fungi-mediated synthesis of silver nanoparticles: Characterization processes and applications.** In Progress in Mycology (Mahendra Rai e George Kövics, Eds), Scientific Publishers, Jodhpur, India, Ch 16, pp. 425-449. 2010b.
- DURÁN, N., MARCATO, P.D. **Biotechnological routes to metallic nanoparticles production: mechanistics aspects, antimicrobial activity, toxicity and industrial implications.** In **Nano-Antimicrobials: Progress and Prospects** (M. Rai and N. Cioffi, Eds). Springer, Germany In press. 2011.
- DURÁN, N., MARCATO, P.D., DURÁN, M., YADAV, A., GADE, A., RAI, M. **Mechanistic aspects in the biogenic synthesis of extracellular metal nanoparticles by peptides, bacteria, fungi, and plants.** Appl. Microbiol. Biotechnol. 90:1609–1624. 2011.

DURÁN, N., MARCATO, P.D. **Biotechnological routes to metallic nanoparticles production: mechanistics aspects, antimicrobial activity, toxicity and industrial applications.** In Nano-Antimicrobials: Progress and Prospects (M. Rai and N. Cioffi, Eds).Springer, Germany, Part 3, 337-374. 2012.

EVELYNE, R J., SUBBIAYH R. **Biosynthesis of Silver Nanoparticles from *Streptomyces olivaceous* and its antimicrobial activity.** International Journal of Pharma Research and Health Sciences. All rights reserved. Volume 2 (2), 2014, Page-166-172.

FOROOTANFAR, H.; ZAREB, B.; FASIHI-BAMD, H.; AMIRPOUR-ROSTAMIA, S.; AMERIA, A.; SHAKIBAIEE, M. and MOHAMMAD, T.N. **Biosynthesis and Characterization of Selenium Nanoparticles Produced by Terrestrial Actinomycete *Streptomyces microflavus* Strain FSHJ31.** RRJMB, Vol. 3. Issue 1, January-March. 2014.

ICHIKAWA, T., ISHIKURA, T., OZAKI, A. **Improvement of Kasugamycin – producing strain by the agar piece method and the prototroph method.** Folia Microbiol. 16,. 218-224. 1971.

KALABEGISHVILI, T.; KIRKESALI, E.; GINTURI, A.; RCHEULISHVILI, I. MURUSIDZE, D. PATARAYA, M. GURIELIDZE, N. BAGDAVADZE, N. KUCHAVA, D. GVARJALADZE, L. LOMIDZE . **Synthesis of gold nanoparticles by new strains of thermophilic actinomycetes.** Nano Studies, 7, 255-260. 2013.

KARTHIK, L., KUMAR, G., KIRTHI, A.V., RAHUMAN, A.A., RAO K.V.B. ***Streptomyces* sp. LK3 mediated synthesis of silver nanoparticles and its biomedical application.** Bioprocess Biosyst. Eng. DOI 10.1007/s00449-013-0994-3. 2013.

KARTHIK, L.; KUMAR, GAURAV; KIRTHI, A. VISHNU; RAHUMAN, A. A.; RAO, K. V. BHASKARA. ***Streptomyces* sp. LK3 mediated synthesis of silver nanoparticles and its biomedical application.** Bioprocess Biosyst Eng. 37:261–267. 2014.

LECHEVALIER, M.P., LECHEVALIER, H.A. **Genus *Frankia* Brunchorst 1886**, 174^{AL}, 2410-2417. *In* S. T. Williams, M. E. Sharpe, J. G. Holt (Eds.), Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 4. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1989.

MANIKPRABHU, D., LINGAPPA, K. **Antibacterial activity of silver nanoparticles against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* synthesized using model *Streptomyces* sp. pigment by photo-irradiation method.** Journal of Pharmacy Research, 255 e 260. 2013.

MANIVASAGAN, P., VENKATESAN, J., SENTHILKUMAR, K., SIVAKUMAR, K., and KIM, S. **Biosynthesis, Antimicrobial and Cytotoxic Effect of Silver Nanoparticles Using a Novel *Nocardiosis* sp. MBRC-1.** BioMed Research International. Article ID 287638, 9 pages. 2013.

MARCATO, P.D., DURÁN, N. **Biogenic silver nanoparticles: Applications in medicines and textiles and their health implications**, IN: Metal Nanoparticles in Microbiology (M.Rai and N Durán,Eds:), Springer verlag, Germany, Chap. 11, 249-267. 2011.

NANDA, A., SARAVANAN, M., **Biosynthesis of silver nanoparticles from *Staphylococcus aureus* and its antimicrobial activity against MRSA and MRSE.** *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 5, 452–456. 2009.

NARASIMHA, G., JANARDHAN. ALZOHAIY, M., KHADRI, H., MALLIKARJUNA, K. **Extracellular synthesis, characterization and antibacterial activity of Silver nanoparticles by *Actinomyces* isolative.** *Int. J.Nano Dimens.* 4(1): 77-83. 2013.

OLIVEIRA, S. R. **Atividade antagônica de Actinomicetos contra *Botrytis cinérea*, patógeno da videira (*Vitis* SP).** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Centro de Ciências Biológicas. Departamento de Antibióticos. Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2004.

PRABHU, V.; SUNDARAMOORTHY, K; DEVARASU, N.M.; C., S. **Biosynthesis of Silver Nanoparticles from *Streptomyces aureofaciens*.** *J. Pharm. Res.,* 4, 820-822. 2011.

PRIYARAGINI S., SATHISHKUMAR S.R., BHASKARARAO K.V **Biosynthesis of silver nanoparticles using actinobacteria and evaluating its antimicrobial and cytotoxicity activity.** *Int J Pharm Pharm Sci*, Vol 5, Suppl 2, 709-712. 2013.

QUELEMES, P.V., ARARUNA, F.B., DE FARIA, B.E.F., KUCKELHAUS, S.A.S., DA SILVA, D.A., MENDONÇA, R.Z., EIRAS, C., SOARES, M.J.S., LEITE, J.R.S.A. 2013. **Desenvolvimento e atividade antibacteriana de nanopartículas de prata à base de goma do cajueiro.** *Int. J. Mol. Sci.* 14: 4969-4981.

RAI, M., YADAV, A., BRIDGE, P., GADE, A. **Myconanotechnology: A new and emerging science.** In: Rai MK, Bridge PD (eds) *Applied mycology.* CAB International, New York, pp 258–267. 2009.

SADHASIVAM, S., SHANMUGAM, P., YUN, K.S. **Biosynthesis of silver nanoparticles by *Streptomyces hygroscopicus* and antimicrobial activity against medically important pathogenic microorganisms.** *Colloids Surf. B: Biointerf.* 81, 358–362. 2010.

SASTRY, M., AHMAD, A., KHAN, M.I. and KUMAR, R. **Biosynthesis of metal nanoparticles using fungi and Actinomycete.** *Current Science*, vol. 85, N. 2, 25. 2003.

SELVAKUMAR. P., PRAKASH, S., JASMINEBEAULA, S., ULOGANATHAN, R. **Antimicrobial activity of extracellularly synthesized silver nanoparticles from marine derived *Streptomyces rochei*.** *Int J Pharm Bio Sci* 3, 188 – 197. 2012.

SILVA-VINHOTE, N. M., MARINHO-PEREIRA, T., ASTOLFI-FILHO, S., MATSUURA, T. **Taxonomic Characterization and Antimicrobial Activity of Actinomycetes Associated with Foliose Lichens from the Amazonian Ecosystems.** *Australian J. Basic Appl. Sci.* 5, 910-918. 2011.

SHIRLEY, DAYANAND, A., SREEDHAR, B., DASTAGER, S.G.. **Antimicrobial activity of silver nanoparticles synthesized from novel *Streptomyces* species.** *Digest J. Nanomat. Biostruct.* 5, 447 – 451. 2010.

SHIRLING, E. B., GOTTLIEB, D. **Methods for characterization of *Streptomyces* species.** *Inter. J. Syst. Bacteriol.* 16, 313-340. 1966.

SUBASHINI, J. and KANNABIRAN, K. **Antimicrobial activity of *Streptomyces* sp. VITBT7 and its synthesized silver nanoparticles against medically important fungal and bacterial pathogens.** Der Pharmacia Lettre, 5 (3):192-200. 2013.

SUDARAMOORTHY, C., DEVARASU, S., VENGADESH PRABHU, K. **Antimicrobial and wound healing activity of silver nanoparticles synthesized from *Streptomyces aureofaciens*.** Inter. J. Pharm. Res. Develop. 2, 69-75. 2011.

USHA, R., PRABU, E., PALANISWAMY, M., VENIL, C.K., and RAJENDRAN, R. **Synthesis of Metal Oxide Nano Particles by *Streptomyces* sp. for Development of Antimicrobial Textiles.** Global Journal of Biotechnology & Biochemistry 5 (3): 153-160. 2010.

VIGNESHWARAN, N., ASHTAPUTRE, N.M., VARADARAJAN, P.V., NACHANE, R.P., PARALIKAR, K.M., BALASUBRAMANYA, R.H. **Biological synthesis of silver nanoparticles using the fungus *Aspergillus flavus*.** Science Direct. Materials Letters 61 1413–1418. 2007.

WAKSMAN, S. A. ,WOODRUFF, H. B. **Actinomyces antibioticus a new soil organism antagonistic to pathogenic and non-pathogenic bacteria.** Journal of Bacteriology, v. 42, p. 231-249. 1941.

ZINICOVSCAIA, I.I.; NELLY Y.; TSIBAKHASHVILI, E.I.; KIRKESALI, D.T.; PATARAYA, M.A.; GURIELIDZE, T.L. KALABEGISHVILI, D.N.; GVARJALADZE, G.I.; TSERTSVADZE, M.V.; FRONTASYEVA, M.S.; WAKSTEIN, S.N. KHAKHANOV, N.V.; SHVINDINA, V. Y.; SHKLOVER. **Microbial Synthesis of Silver Nanoparticles by *Streptomyces glaucus* and *Spirulina Platensis*.** Nanomaterials: Applications and Properties (NAP-2011). Vol. 2, Part II.

ZONOOZ, N.F., SALOUTI, M. **Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using cell filtrate of *Streptomyces* sp. ERI-3.** Scientia Iranica Transactions F: Nanotechnolog 18, 1631–1635. 2011.

CAPÍTULO III

Neste capítulo será apresentado o artigo com o título **Actinomicetos da Amazônia: uma fonte potencial de nanopartícula de prata com aplicação na indústria farmacêutica**, a ser submetido a Revista *International Journal of Applied Research in Natural Products*, organizado de forma a conter as informações referentes a caracterização taxonômica dos Actinomicetos, a atividade antimicrobiana, a biossíntese dos micro-organismos, até a seleção das amostras promissoras quanto ao potencial nanobiotecnológico para posterior caracterização das AgNPs e demais testes.

SUBMISSÃO AO PERIÓDICO

International Journal of Applied Research in Natural Products

**Actinomicetos da Amazônia: uma fonte potencial de nanopartícula de prata com
aplicação na indústria farmacêutica**

**Actinomicetos da Amazônia: uma fonte potencial de nanopartícula de prata com
aplicação na indústria farmacêutica**

Nélly Mara Vinhote Marinho¹

Rosimar Antune Palheta⁴

Bianca Cordeiro de Souza⁵

Nelson Eduardo Durán Caballero²

Maria Francisca Simas Teixeira³

¹ Doutoranda em Biotecnologia (PPG-BIOTEC) – Universidade Federal do Amazonas (UFAM). Av. Gal. Rodrigo O. Jordão Ramos, 3000, Departamento de Parasitologia / ICB / UFAM - Coroado I, Manaus, Amazonas – Brasil - CEP: 69077-000. E-mail: nelly_vinhote@ufam.edu.br

² Professor, Pesquisador na Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brasil. e-mail: duan@iqm.unicamp.br

³, Professora Associada, Universidade Federal do Amazonas, Departamento de Parasitologia / ICB / UFAM. e-mail: mteixeira@ufam.edu.br

⁴, Apoio Técnico (FAPEAM) – Universidade Federal do Amazonas (UFAM). Av. Gal. Rodrigo O. Jordão Ramos, 3000, Departamento de Parasitologia / ICB / UFAM - Coroado I, Manaus, Amazonas – Brasil - CEP: 69077-000. E-mail: rosimar_palheta@hotmail.com

⁵, Graduanda em Farmácia – UNINORTE, Apoio Técnico (FAPEAM) – Universidade Federal do Amazonas (UFAM). Av. Gal. Rodrigo O. Jordão Ramos, 3000, Departamento de Parasitologia / ICB / UFAM - Coroado I, Manaus, Amazonas – Brasil - CEP: 69077-000. E-mail: farmaceuticabiancab@gmail.com

Resumo

A nanotecnologia possibilita novas perspectivas para o desenvolvimento científico devido à abrangência de suas aplicações e a velocidade em que gera resultados, sendo utilizada em diversas áreas do conhecimento, como na medicina, biotecnologia, engenharia, farmácia, química, dentre outras. Este trabalho tem como objetivo promover a produção de nanomateriais por meio da síntese biogênica de actinomicetos, assim como, analisar o potencial de nanopartículas de prata no combate a micro-organismos patogênicos. Dez amostras de actinobactérias foram selecionadas do acervo da Coleção de Cultura-Micoteca DPUA e foram subcultivadas e autenticadas em ISP-2A (extrato de levedura-extrato de malte, agar), com base nas características morfofisiológicas. A identificação em nível de espécie foi realizada pela técnica da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). Para síntese biogênica de nanopartículas de prata (AgNPs), os actinomicetos foram submetidos a fermentação submersa. As AgNPs foram confirmadas por meio de UV-vis e ICP-OES. A atividade antimicrobiana foi determinada pelo método de difusão em ágar. Dos actinomicetos avaliados, 100% expressaram as características morfológicas viáveis para o gênero *Streptomyces*. Pelo teste da PCR foram identificadas as seguintes espécies, *Streptomyces parvulus* (40%), *Streptomyces bullii* (10%), *Streptomyces seoulensis* (10%), *Streptomyces owasiensis* (10%), *Streptomyces malasyensis* (20%), *Streptomyces lavendulae* (10%). Pelo método bloco de gelose a atividade antimicrobiana foi confirmada e, 80% das bactérias inibiram *S. aureus*; 60% *M. smegmatis* e 40% as três espécies de *Candidas*. Apenas 10% dos actinomicetos inibiram o crescimento de *E. coli*. Quando testado o extrato bruto frente aos micro-organismos teste, 50% das amostras inibiram *S. Aureus*, 30% *M. smegmatis* e 20% mostrou-se eficiente contra *C. albicans*, *atlantica* e *valderwaltii*. Nestes testes o diâmetro do halo variou, em média, de 12 e 29 mm. Já para as AgNPs, 100% inibiram o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, com halos variando de 12 a 34 mm. Dados que indicam o amplo espectro destes compostos bioativos. As AgNPs de *Streptomyces* DPUA 1549, *Streptomyces* DPUA 1747 e *Streptomyces* DPUA 1748 apresentaram ação antagônica de maior eficiência, consideradas promissoras para posterior caracterização e verificação da citotoxicidade.

Palavras-chave: Nanobiotecnologia; Biodiversidade amazônica; Bactérias filamentosas.

Abstract

Nanotechnology enables new perspectives for scientific development due to the scope of its applications and the speed at which generates results and is used in various fields of knowledge, as in medicine, biotechnology, engineering, pharmacy, chemistry, among others. This work reflects on the possibility of developing new technologies from the production of nanomaterials through the biogenic synthesis of actinomycetes, as well as verification of the potential of silver nanoparticles in combating micro-organisms pathogenic. Ten strains of Actinomycetes from DPUA Culture Collection/UFAM were selected, reactivated and authenticated according their morphological characteristics using ISP-2A medium (yeast extract, malt extract and agar). The species identification was carried out by PCR (Polymerase Chain Reaction). The biogenic AgNPs synthesis was made by submitting the Actinomycetes to submerged fermentation. The recovered crude extract and AgNPs synthetized were used to antimicrobial test by agar difusion. All Actinomycetes evaluated expressed viable morphological characteristics of *Streptomyces* genus. By PCR test the following species were identified: *Streptomyces parvulus* (40%), *Streptomyces bullii* (10%), *Streptomyces seoulensis* (10%), *Streptomyces owasiensis* (10%), *Streptomyces malasyensis* (20%) and *Streptomyces lavendulae* (10%). In the difusion agar test, the antimicrobial activity of Actinomycetes crude extract were confirmed and 80% of them inhibited *S. aureus*; 30% inhibited *M. smegmatis*; 40% were efficient against *C. albicans*, *Candida atlantica* and *Candida valderwaltii*. The clear zones of inhibition varied, in average, from 12 to 30 mm. The Actinomycetes AgNPs synthetized promoted the full inhibition of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, with clear zones raging from 12 to 34 mm. The AgNPs from *Streptomyces* DPUA 1549, *Streptomyces* DPUA 1747 and *Streptomyces* DPUA 1748 had the highest antimicrobial activity, considered promising for further characterization and verification of cytotoxicity.

Keywords: Nanobiotechnology; Biodiversidade amazônica; Bactérias filamentosas.

1 1 Introdução

2
3 A Nanotecnologia, ciência de sistemas de tamanho nano, provavelmente é a fronteira
4 do conhecimento em termos de processamento de bioprodutos que envolve a criação e
5 manipulação de materiais orgânicos e inorgânicos em escala nanométrica (DURÁN et al.,
6 2006; DURÁN et al., 2011).

7 Atualmente a nanotecnologia é mundialmente reconhecida, e por ser uma ciência
8 multidisciplinar, tem recebido novos conceitos, como o termo “nanobiotecnologia” que
9 envolve pesquisa e desenvolvimento de tecnologias por meio da interação com outras
10 ciências, como a biotecnologia, biologia, medicina, química, física, engenharia
11 computacional, entre outras.

12 Na atualidade têm destaque estudos relacionados à nanomedicina para diagnósticos
13 antecipados, podendo levar a melhores tratamentos às doenças emergentes/re-emergentes, que
14 são doenças cuja incidência em humanos vem aumentando nas últimas duas décadas ou
15 ameaçam aumentar num futuro próximo (BIGLARI, SHARIFI e SHARIFI, 2014; DURÁN et
16 al., 2007, 2012; GADE et al , 2010; INGLE, DURÁN e RAI, 2014; KASHYAP et al., 2013;
17 MARCATO e DURÁN, 2011; TRAN et al., 2013).

18 Em função da crescente preocupação pelo ressurgimento de patógenos como bactérias,
19 fungos e parasitas multirresistentes, o desenvolvimento de novos compostos antimicrobianos
20 para melhorar a ação antagônica para terapias, antissépticos ou desinfecção, é atualmente uma
21 área de alta prioridade nas novas pesquisas. Neste panorama, a nanobiotecnologia promove
22 um meio para modificar aspectos importantes de diferentes materiais, incluindo
23 nanopartículas metálicas. Estas são amplamente reconhecidas como eficientes antibacterianos
24 (RAI e DURÁN, 2011).

25 Nanopartículas metálicas podem ser obtidas por métodos químicos, físicos e
26 biológicos. Entretanto, os biológicos têm recebido atenção especial por possuírem uma
27 abordagem ambientalmente correta, ou seja, favoráveis ao meio ambiente, já que nenhum
28 produto químico tóxico está envolvido na biossíntese, além disso, há uma ampla distribuição
29 e disponibilidade dos recursos biológicos em ambientes naturais, e em condições *in vitro* são
30 fáceis de manipular. Estudos têm demonstrado que um grande número de diferentes espécies
31 de bactérias e fungos podem reduzir íons metálicos a nanopartículas metálicas com
32 propriedades antimicrobianas (ABDEEN et al., 2014; DURÁN et al., 2010a,b; EVELYNE e
33 SUBBIAYH, 2014; GUPTA et al., 2011; NARASIMHA et al., 2013).

1 Actinomicetos são bactérias Gram-positivas com grande interesse na biotecnologia,
2 principalmente por produzirem metabólitos secundários, como antibióticos. Estes micro-
3 organismos são cosmopolitas, encontrados principalmente no solo, entretanto, podem também
4 estar presentes em ambientes aquáticos e em associação com líquens e plantas (GONZÁLES
5 et. al., 2005; SILVA-VINHOTE et. al., 2011).

6 Pesquisas com actinomicetos, como *Corynebacterium* sp., *Streptomyces aureofaciens*,
7 *Streptomyces hygroscopicus*, *Streptomyces olivaceus* sp-1392, *Rhodococcus* sp., *Rothia* sp.,
8 *Actinomadura* sp., *Nocardiopsis* sp. MBRC-1, e *Streptomyces* sp., relatam a biossíntese
9 nanopartículas de prata com ação antimicrobiana contra os micro-organismos teste
10 *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus*
11 *hirae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri*, *Monascus purpurea*, *Aspergillus*
12 *brasiliensis*, *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus niger*, *Candida albicans* (ABDEEN et al.,
13 2014; EVELYNE e SUBBIAYH, 2014; SADHASIVAM, SHANMUGAM e YUN, 2010;
14 SHIRLEY et al., 2010; SUNDARAMOORTHY et al., 2011; MANIVASAGAN et al., 2013;
15 USHA, 2010; VENGADESH et al., 2011; ZHANG et al., 2005).

16 Sugere-se que a eficiência da atividade antimicrobiana das nanopartículas metálicas
17 seja devido ao seu tamanho minúsculo e a alta relação superfície/volume, ou seja, uma grande
18 área de superfície aumenta a interação das nanopartículas com os micro-organismos
19 patogênicos para realizar a ação antagonista de amplo espectro (INGLE, DURÁN e RAI,
20 2014).

21 A caracterização das nanopartículas de prata, tais como tamanho e forma são
22 importantes, não apenas para aumentar a ação antagonista, mas também para minimizar ou
23 evitar que sejam tóxicas as células de eucariontes. Sendo assim, mais estudos são necessários
24 para caracterizar plenamente os mecanismos de ação envolvidos com a atividade
25 antimicrobiana e a toxicidade dessas partículas (RAI et al., 2009; RAJAKUMAR e
26 RAHUMAN, 2011).

27 Este trabalho tem como objetivo verificar o potencial de síntese de nanopartículas com
28 atividade antimicrobiana a partir da biodiversidade de actinomicetos do acervo da Coleção de
29 Cultura-DPUA, da Universidade Federal do Amazonas-UFAM.

2 Material e Métodos

2.1 Micro-organismos

Dez (10) amostras de actinomicetos (DPUA 1549; DPUA 1571; DPUA 1589; DPUA 1591; DPUA 1747; DPUA 1748; DPUA 1749; DPUA 1750; DPUA 1752; DPUA 1755) foram selecionadas e cedidas pela Coleção de Cultura-Micoteca DPUA, Manaus-Amazonas, preservados em água destilada esterilizada com conhecida atividade antagônica, de acordo com Silva-Vinhote et al. (2011) (Figura 1).

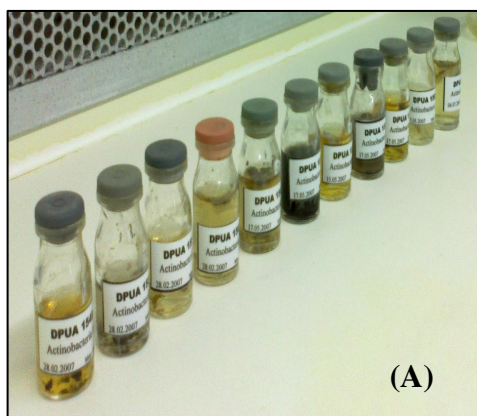


Figura 1. (A) Amostras de actinomicetos preservados na Coleção de Cultura - Micoteca DPUA.

2.2 Subcultivo dos Micro-organismos

A reativação dos actinomicetos foi realizada transferindo fragmentos das culturas preservadas para extrato de ISP2 (amido, extrato de levedura, extrato de malte, dextrose). Após o período de reativação as bactérias filamentosas foram inoculadas em meio de cultura ISP2-A (amido, extrato de levedura, extrato de malte, dextrose, ágar) em pH 7,3 esterilizado a 121 °C por 15 minutos e mantidos em placas de Petri (90 x 15 mm) em BOD, a 30 °C e acompanhados durante 15 dias para verificação da viabilidade e autenticação.

2.3 Autenticação Taxonômica dos Micro-organismos

A determinação da autenticação dos actinomicetos foi realizada com base nas características morfológicas e fisiológicas e por meio do estudo da micromorfologia das linhagens, de acordo com a metodologia descrita em Waksman e Woodruff (1941), Shirling e Gottlieb (1966), Lechevalier e Lechevalier (1989), Cross (1994).

2.3.1 Caracterização da Morfologia

O acompanhamento do crescimento das bactérias semeadas em meio de cultivo ISP2-A foi realizado por 15 dias consecutivos, onde foram determinadas as características morfológicas (micélio aéreo, micélio vegetativo), determinação de cores, presença de pigmento, exsudato e aspecto das bordas de cada amostra com auxílio de um esteriomicroscópio modelo XR-X-3000-Leica.

2.3.2 Caracterização Micromorfológica

Os micro-organismos foram semeados em ágar ISP2-A formando duas linhas horizontais e duas verticais constituindo intercessões entre si em placas de Petri. Em seguida foram inseridas lamínulas em posição parcialmente inclinada para o crescimento sobre a superfície das mesmas e acompanhados em intervalos de cinco dias, durante 15 dias. As lamínulas foram retiradas para a visualização do crescimento micelial por meio da observação de características como, presença ou ausência da cadeia de esporo e a forma da cadeia de esporo. A leitura foi realizada em microscópio óptico com aumento de 400 x (OLIVEIRA, 2004).

2.4 Caracterização Molecular dos actinomicetos

2.4.1 Amplificação do gene 16S rDNA

Com uma alça de platina foi colocado um pequeno volume da colônia de actinomiceto em um microtubo de plástico com 150 µL de água Milli-Q. A desnaturação das células foi realizada em termociclador a 90° C por 15 min e deste tubo, 1 µL foram coletados para a reação de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase).

A PCR foi realizada em termociclador Eppendorf Master Cycle. Para uma reação com volume final de 25 µL, foi utilizado 14,2 µL de água Milli-Q; 1 µL das células desnaturadas/DNA; 2,5 µL de tampão da Taq DNA polimerase 10X (Tris-HCl 200 mM, KCl 500 mM); 2,5 µL de MgCl₂ 25 mM; 2,5 µL dNTP 2,5 mM; 1 µL do oligonucleotídeo ACT235F 5'- CGCGGCCTATCAGCTTGTTG - 3' 5 pmol; 1 µL do oligonucleotídeo ACT878R 5' - CCGTACTCCCCAGGCGGGG - 3' 5 pmol e 0,3 µL de Taq DNA polimerase 5 U.

A reação de amplificação foi realizada com os seguintes ciclos de temperaturas: 1) 95 °C por 5 min, 2) 95 °C por 45 s, 72 °C por 60 s, 72 °C por 60 s (40 vezes), 3) 72 °C por 5 min. Também foi utilizada a temperatura de anelamento a 68 °C. Para confirmação da amplificação, 2 µL da reação foi submetida a uma eletroforese em gel de agarose a 1 % em tampão TBE (Tris-ácido bórico-EDTA) e corado com GelRedTM. A eletroforese foi desenvolvida a 80 V por 10 min e depois a 100 V por 50 min.

A PCR também foi realizada, utilizando os oligonucleotídeos universais para bactérias, em termociclador Bioneer My Genie 96 Thermal Block. Para uma reação com volume final de 25 µL, foi utilizado 18,375 µL de água Milli-Q; 1 µL das células desnaturadas/DNA; 2,5 µL de tampão da Taq DNA polimerase 10X (Tris-HCl 200 mM, KCl 500 mM); 1,5 µL de MgCl₂ 25 mM; 0,5 µL dNTP 2,5 mM; 0,5 µL do oligonucleotídeo 094; 0,5 µL do oligonucleotídeo 095 e 0,125 µL de Taq DNA polimerase 5 U. A reação de amplificação foi realizada nas mesmas condições do ciclo anterior, entretanto, a eletroforese foi desenvolvida a 100 V por 30 min.

2.4.2 Purificação do produto amplificado

A purificação do produto amplificado pela PCR foi realizada com o protocolo PEG:

1 - Um microtubo de plástico foi colocado o volume de 10 µL de produto da PCR e 10µL de PEG e brevemente vortex;

2 - encubou-se em banho maria a 37° durante 15 min (ocasionalmente homogeneização 2 ou 3 vezes durante a incubação por inversão do tubo);

3 - centrifugou-se (PCR + PEG) a 2500 rcf durante 15 min;

4 - descartou-se o sobrenadante;

5 - adicionou-se 125 µL de álcool (ETOH) e centrifugou-se a 1450 rcf durante 2 min e descartar;

6 - Os tubos foram colocados invertidos na centrífuga a 100 cf durante 1 min;

7 – Posteriormente encubou-se em banho maria a 37° durante 15 min;

8 – E por fim, acrescentou-se um volume de água milli-q igual ao da PCR + 40% da PCR.

2.4.3 Sequenciamento do produto purificado

O sequenciamento foi realizado no Sequenciador Automático 3500 de marca Applied Biosystem. Após o sequenciamento, as amostras foram conferidas e editadas com o programa ClustalW (BioEdit). Todas as sequências foram submetidas ao banco NCBI [National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov)] usando o programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) com a ferramenta BLASTn (nucleotídeo-nucleotídeo).

2.5 Determinação da Atividade Antimicrobiana – Método de Difusão em Ágar - Bloco de Gelose

Consistiu na inoculação de 0,1 mL da suspensão do actinomiceto, na concentração de 10^6 a 10^7 UFC/mL, pela técnica de *spread-plate* em 15 mL do meio de cultura ISP-2A acrescido de amido semeado em placas de Petri. Após sete dias de incubação a 25 °C, blocos de gelose circulares de 6 mm de diâmetro foram transferidos para placas contendo, previamente, os micro-organismos teste. As placas foram incubadas respeitando as características fisiológicas de cada micro-organismo teste (Tabela 1). Após o período de incubação os resultados foram obtidos pela medição em milímetros, dos diâmetros dos halos de inibição (ICHIKAWA, et al., 1971; SHIRLEY et al., 2010).

Tabela 1. Micro-organismos patogênicos testados na avaliação da atividade antimicrobiana.

Micro-organismos teste	Código
<i>Escherichia coli</i>	CBAM 0001
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
<i>Micobacterium smegmatis</i>	INCQS 061
<i>Candida albicans</i>	DPUA 1706
<i>Candida atlantica</i>	DPUA 1323
<i>Candida valderwaltii</i>	DPUA 1327

2.6 Fermentação Submersa

Os actinomicetos foram cultivados em 50 mL de meio de cultura líquido MPE (glicose 20 g/L; extrato de soja 20 g/L; NaCl 5 g/L; CaCO₃ 2 g/L e pH 6,7 – 7,0) em frasco Erlenmeyer de 125mL, a 25 °C por 72 horas, a 200 rpm (SASTRY et. al, 2003). Após este período o

extrato bruto foi separado por meio de filtração a vácuo para análises posteriores (Atividade Antimicrobiana), e a biomassa foi utilizada na síntese de Nanopartículas de Prata (AgNPs).

2.6.1 Determinação da Atividade Antimicrobiana dos Actinomicetos – Método Difusão em Agar - *Cup Plate*

Após o período de fermentação, 100 µL do extrato bruto foi inoculado em poços medindo 6 mm de diâmetro em placas de Petri contendo previamente os micro-organismos teste. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica respeitando as características fisiológicas de cada micro-organismo teste. Após o período de incubação o diâmetro dos halos de inibição foi determinado em milímetros (ICHIKAWA, et al., 1971; SHIRLEY et al., 2010).

2.6.2 Extração das Enzimas para Síntese de Nanopartículas

A biomassa recuperada após o período de fermentação foi lavada três vezes com água destilada esterilizada. Em seguida, foram adicionados 50 mL de água deionizada esterilizada em frascos de Erlenmeyer de 125 mL, contendo a biomassa. Posteriormente os frascos foram incubados e submetidos às seguintes condições, 25 °C por 72 h, a 200 rpm. Após o período de incubação a biomassa foi separada em papel de filtro Whatmann nº 1 e a solução aquosa separada para posterior análise (DURÁN, 2007; SUDARAMOORTHY et al., 2011).

2.7 Biossíntese de Nanopartícula de Prata

No extrato obtido no item 2.5.2 foi adicionado o nitrato de prata (AgNO₃) 1 M, até obtenção de concentração final a 1 mM da mistura reacional. A reação foi conduzida em frascos Erlenmeyer de 125 mL, a 25 °C, 200 rpm, por 72h, na ausência de luz. O controle positivo e o negativo foram mantidos em condições similares. Mudanças de cor foram observadas em intervalos específicos (24 horas a 72 horas). As amostras foram monitoradas por espectrometria UV-Vis (Cary 50 Probe Agilent) de 350-900 nm. (DURÁN et al., 2007; VIGNESHWARAN et al., 2007; SADHASIVAM, SHANMUGAM e YUN, 2010; SUDARAMOORTHY et al., 2011).

2.8 Determinação da Atividade Antimicrobiana das Nanopartículas de Prata e Seleção do actinomiceto Promissor

Após o processo de biossíntese de nanopartículas de prata foi realizada a determinação da atividade antibacteriana e antifúngica pelo Método de Difusão em Ágar. As culturas dos micro-organismos testes foram semeadas em placas contendo Ágar Müller Hinton para as bactérias e Ágar Sabouraud para o crescimento dos fungos. Após a semeadura dos micro-organismos teste, poços de 6 mm de diâmetro foram feitos nas placas e com auxílio de uma micropipeta, 100 µL da solução aquosa contendo as AgNPs foram inoculadas. As placas foram incubadas em estufa respeitando as características fisiológicas de cada micro-organismo teste. Ao término do período de incubação os halos de inibição foram medidos em milímetros (NANDA, SARAIVANAN, 2009).

2.9 Espectroscopia de UV-Visível

Nanopartículas de prata preliminares foram detectadas por meio de espectrofotometria de UV-Vis (Cary 50 Probe Agilent), a um comprimento de onda de 300-900 nm. Para realização desta análise, 3 mL da amostra foram retirados dos frascos e visualizados dentro do intervalo de comprimentos de onda estipulado.

2.10 Espectrometria Óptica de Emissão por Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-OES)

A concentração da AgNPs foi determinada por Espectroscopia de Emissão Atômica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-OES) (Perkin Elmer - Optima 8300), nebulizador concêntrico (Meinhard), câmara de nebulização ciclônica, injetor de Alumina (2 mm i.d), tocha de quartzo 1 slot para amostras aquosas, modelo padrão (Perkin Elmer), amostrador automático (modelo S10). Condições: Vazão da amostra: 1 mL min⁻¹, tempo de delay até a leitura da amostra: 60 segundos, Fluxo de Argônio de Nebulização: N₂, gás plasma: argônio comercial, tempo de lavagem: 20 segundos com 2% de HNO₃.

2.11 Análise Estatística

Os dados com resultados foram submetidos à análise estatística descritiva (média e desvio padrão).

3 Resultados e Discussão

3.1 Autenticação Taxonômica dos Actinomicetos

3.1.1 Caracterização da Macromorfologia

Os resultados obtidos demonstraram que os actinomicetos expressaram as características morfológicas viáveis conforme descrito por Silva-Vinhote et al., (2011). Para autenticação foi efetuada a caracterização morfológica por meio da observação da coloração de colônias e morfologia de hifas sob microscópio óptico. Nos primeiros cinco dias foi verificado que os micro-organismos desenvolveram micélio vegetativo predominando a cor creme e posteriormente branca, além de difusão de pigmentos no meio de coloração amarela (Figura 2 e 3).

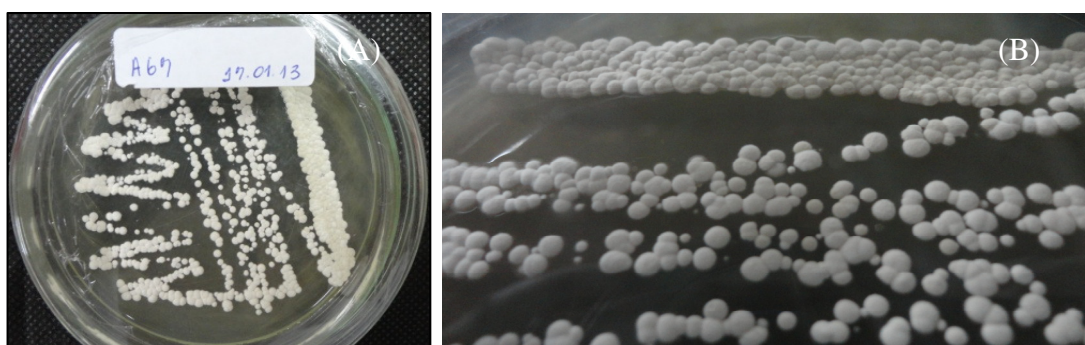


Figura 2. Actinomicetos em meio ISP2A: (A) Colônia de *Streptomyces* sp.; (B) aspecto das bordas com leves ondulações; (C) Colônia de *Streptomyces* sp.; (D) aspecto das colônias em formas esféricas.

No décimo dia no micélio aéreo foi observada mudança na coloração de branco para o cinza e marrom, com variações nas tonalidades, período em que apenas um actinomiceto [*Streptomyces* sp. (DPUA 1571)] apresentou características morfológicas diferentes dos demais. A colônia deste micro-organismo expressou forma esférica, cor creme e não havendo difusão de pigmentos no meio. Pôde ser observada também a produção de exsudatos hialinos amarelos normalmente produzidos por aqueles que produzem pigmentos amarelos. A morfologia das bordas apresentou distintas formas entre, bordas lisas a enrugados. De acordo com Azuma, 2007, as bactérias filamentosas podem apresentar irregularidades quanto à aparência, como superfície levemente dobrada, com coloração que varia entre branca, creme, laranja ou cinza claro.

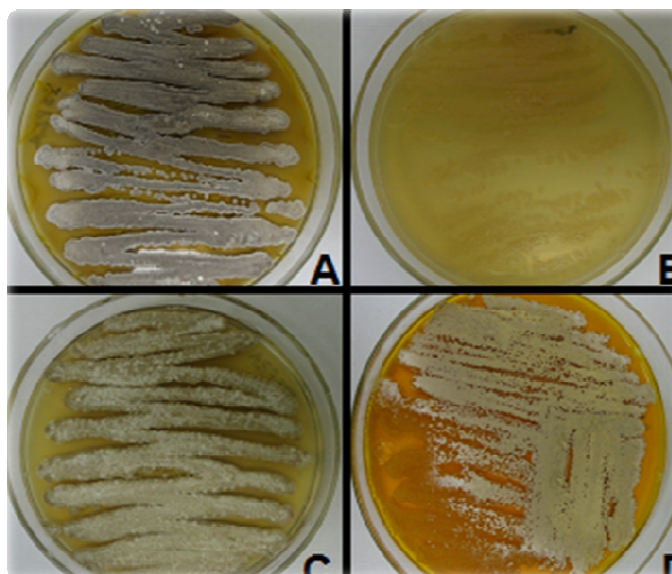


Figura 3. (A e B) Aspectos das colônias de actinomicetos em meio ISP-2A, coloração variando de branca, cinza a creme; (C) Colônias sem ramificações de micélio; (D) Colônia com a coloração levemente acinzentada com produção de pigmento.

No décimo quinto dia os micro-organismos continuavam a expressar características iniciais observadas, predominado a presença de micélio aéreo variando do cinza ao marrom e cinza escuro, os pigmentos produzidos apresentaram-se mais difundido no meio ocupando assim toda área inferior da colônia e, nos dias seguintes os mesmos mostram-se viáveis e mantiveram suas características macroscópicas.

Segundo Strobel, 2003 são consideradas colônias típicas de *Streptomyces* spp. as que apresentarem coloração branco-acinzentada, sem brilho, com aparência pulverulenta ou cottonosa com adesão colonial penetrando fortemente no ágar.

3.1.2 Caracterização Micromorfológica

A identificação com base nas características da estrutura microscópica dos micro-organismos foi realizada de cinco em cinco dias após o crescimento nas lamínulas (técnica do cultivo em lâmina) (Figuras 4-6). Nos primeiros cinco dias foi possível visualizar apenas a presença micélio vegetativo, após dez dias foi observada a presença de características de micélio altamente ramificado e em forma espiral confirmando as formas após a retirada das lamínulas no décimo quinto dia de cultivo. Todas as amostras (DPUA 1549, DPUA 1749, DPUA 1750, DPUA 1747, DPUA 1748, DPUA 1571, DPUA 1752, DPUA 1589, DPUA

1591, DPUA 1755) foram confirmadas como pertencentes ao gênero *Streptomyces* sp. (Tabela 2).

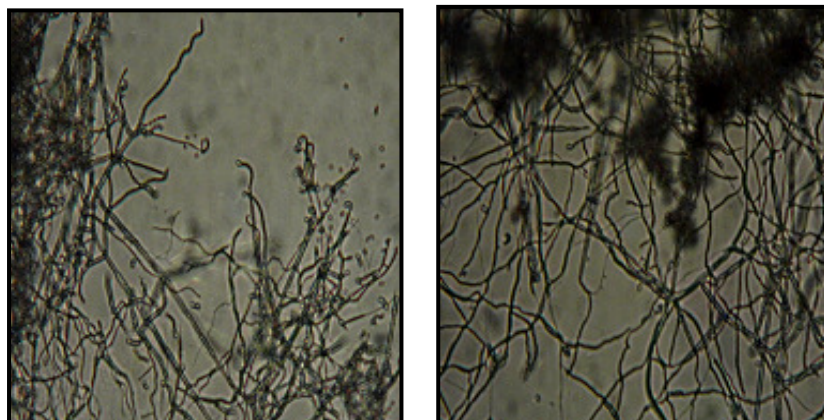


Figura 4. *Streptomyces*: micélio vegetativo (5 dias de crescimento), com leves ondulações em sua estrutura final. Aumento de 400x.

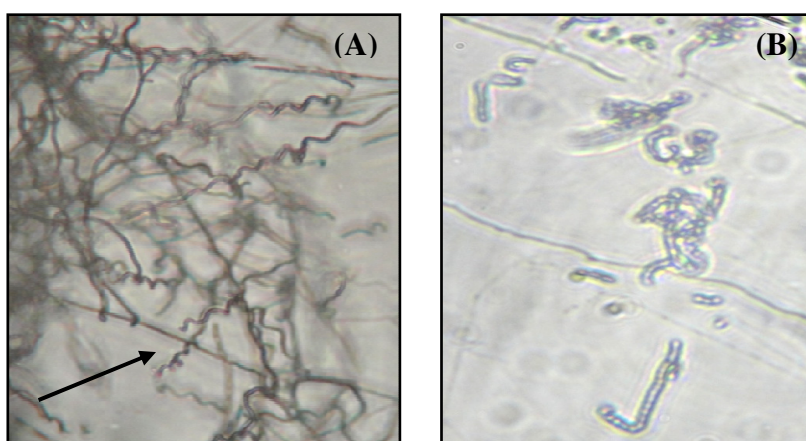


Figura 5. (A) Aspecto das características microscópicas de *Streptomyces* sp., com hifas em espiral e (B) *Streptomyces* sp. observado em cultura mantida em ISP2A por 15 dias. Aumento de 400 x.

Connel (2001) verificou que Actinomicetos tem características morfológicas diversificadas, compreendendo bactérias que se dividem por fissão binária, tais como *Corynebacterium*, espécies com envelope celular e ramificações como *Mycobacterium* e *Nocardia*, até amplamente ramificadas e filamentosas como no caso de *Streptomyces* e *Microbispora*.

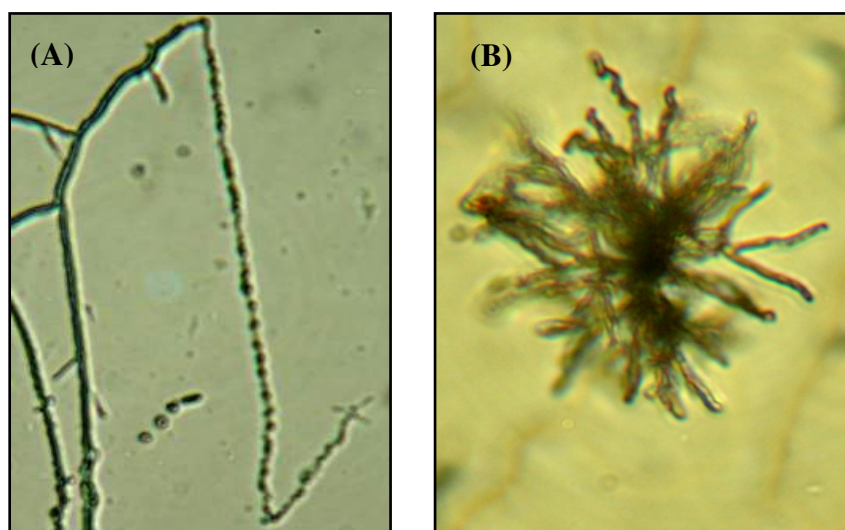


Figura 6. (A) Tipos de formação de esporos de actinomicetos do gênero *Streptomyces* sp. e (B) *Streptomyces* sp. apresentando conjunto de hifas em espirais sobrepostas entre si. Aumento de 400 x.

Tabela 2. Determinação das características macroscópicas e microscópicas dos actinomicetos.

Código da Amostra	Identificação da amostra	Características Macroscópicas	Características Microscópicas
DPUA 1549	<i>Streptomyces</i> sp.	Colônias aderidas firmemente ao ágar, bordas rugosas, pigmento amarelo difundido com o meio e produção de exsudados.	Conjuntos de hifas em pequenas ondulações formando pequenos espirais.
DPUA 1749	<i>Streptomyces</i> sp..	Micélio aéreo cinza escuro, reverso das colônias levemente fragmentadas, bordas enrugadas, não produz pigmentos.	Hifas espaçadas com formato de espículas com fragmentações.
DPUA 1750	<i>Streptomyces</i> sp.	Micélio branco sem alteração na coloração, não produz pigmentos.	Micélio com leves ondulações em sua estrutura final.
DPUA 1747	<i>Streptomyces</i> sp.	Micélio aéreo marrom escuro, forte odor, não produz pigmentos, bordas rugosas e produção de esporos.	Conjunto de hifas ramificadas com leves ondulações em espirais.
DPUA 1748	<i>Streptomyces</i> sp.	Colônias unidas sem fragmentação, reverso creme, micélio marrom terra, produz forte odor, não produz exsudados, bordas rugosas e sobrepostas.	Micélio em espirais sobrepostos com presença de esporos.
DPUA 1571	<i>Streptomyces</i> sp.	Colônia fragmentada, bordas regulares, não produz pigmentos.	Conjunto de hifas mais com fragmentações.

DPUA 1752	<i>Streptomyces</i> sp.	Colônias em forma esférica e unidas, micélio aéreo ramificado e cinza escuro com produção de pigmentos e exsudados.	Conjunto de hifas com leves fragmentações em sua estrutura final.
DPUA 1589	<i>Streptomyces</i> sp.	Micélio aéreo cinza escuro com pequenas fragmentações, bordas finas e levemente sobrepostas, não produz pigmentos, produz exsudado hialino.	Conjunto de hifas em espirais sobrepostas entre si.
DPUA 1591	<i>Streptomyces</i> sp.	Micélio cresce bem perto ao meio não produz muitos esporos, pigmento amarelo escuro, bordas levemente enrugadas filamentosas.	Hifas com pequenas ondulações em sua estrutura e na ponta vários espirais.
DPUA 1755	<i>Streptomyces</i> sp.	Borda regular, micélio aéreo marrom escuro, produz forte odor, sem produção de pigmentos.	Hifas com vários espirais fragmentados

A autenticação macro e microscópicas das amostras dos actinomicetos demonstraram que o método de conservação avaliado permitiu a manutenção da viabilidade durante o período armazenado e da reprodução dos mesmos quando subcultivados após cinco anos de preservação (Figuras 7-11).

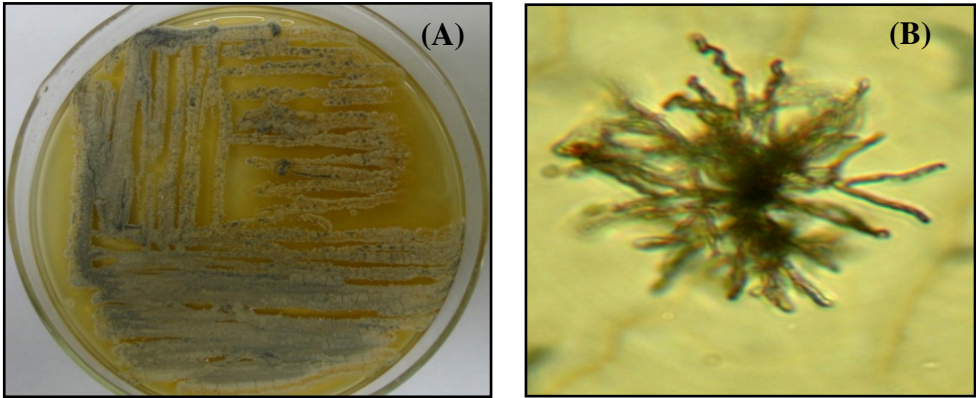


Figura 7. *Streptomyces* sp.: aspecto macroscópico da colônia de coloração cinza sem produção de pigmento (A); (B) apresentando conjunto de hifas em espirais sobrepostas entre si. Aumento de 400 x.

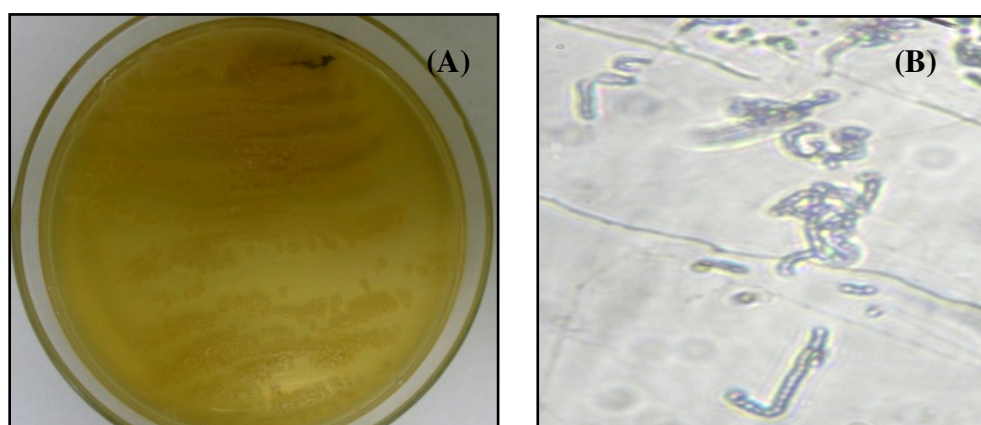


Figura 8. (A) aspecto do gênero *Streptomyces* sp.: colônia de coloração creme sem difusão de pigmento; (B) apresenta hifas emaranhadas e septadas. Aumento de 400 x.

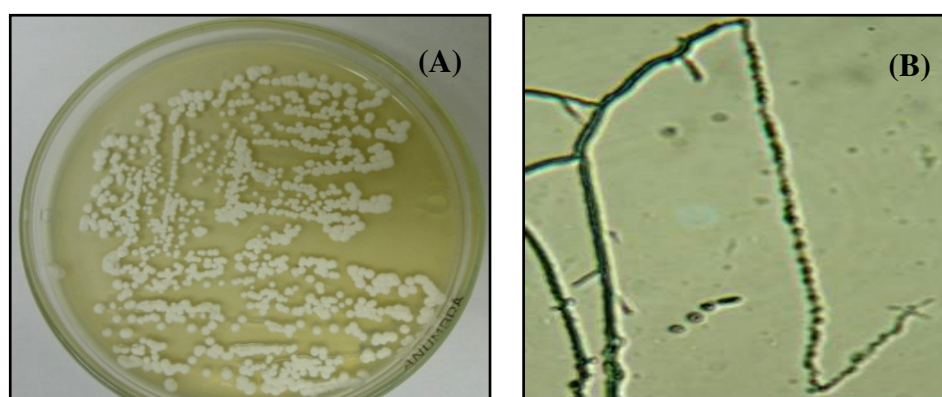


Figura 9. (A) aspecto do gênero *Streptomyces* sp.: colônias brancas sem produção de pigmentos; (B) hifas septadas. Aumento de 400 x.

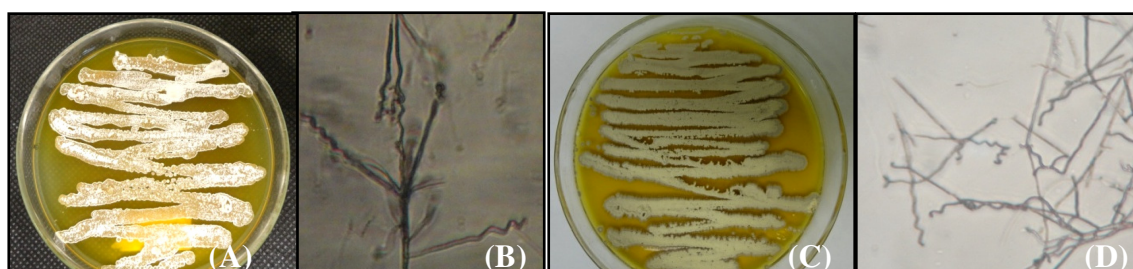


Figura 10. (A e C) aspecto de colônias de *Streptomyces* variando a coloração do micélio de branco ao cinza claro com produção de pigmento; (B e D) aspecto da hifa em pequenos espirais. Aumento de 400 x.

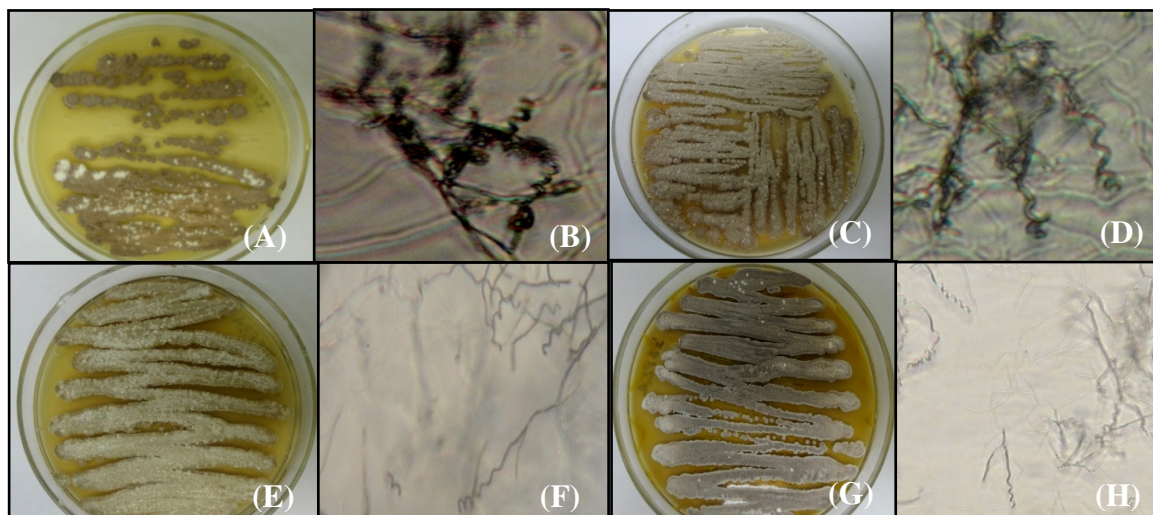


Figura 11. (A, C, E e G) Aspecto de colônias de *Streptomyces* com variação na tonalidade do micélio de branco para marrom; (B, D, F e H) Conjuntos de hifas em pequenas ondulações formando espirais. Aumento de 400 x.

3.2 Autenticação Molecular dos Actinomicetos

Para realização da autenticação molecular das amostras, o DNA é necessário para a reação de amplificação com a adição da DNA polimerase. A PCR é uma ferramenta composta basicamente de dois oligonucleotídeos sintéticos, cada um complementar às sequências das fitas opostas do DNA alvo em posições justamente flanqueadoras das extremidades do segmento a ser amplificado. A extração de DNA genômico das culturas puras das actinobactérias foi realizada com êxito. Os oligonucleotídeos iniciadores (primers - 235F e 878R específicos para actinomicetos), auxiliaram a iniciação da replicação das cópias do fragmento alvo (BITTENCOURT, 2008), amplificando o DNA das amostras: DPUA 1549; DPUA 1571; DPUA 1589; DPUA 1591; DPUA 1747; DPUA 1748; DPUA 1749; DPUA 1750; DPUA 1752; DPUA 1755, conforme Figura 12.

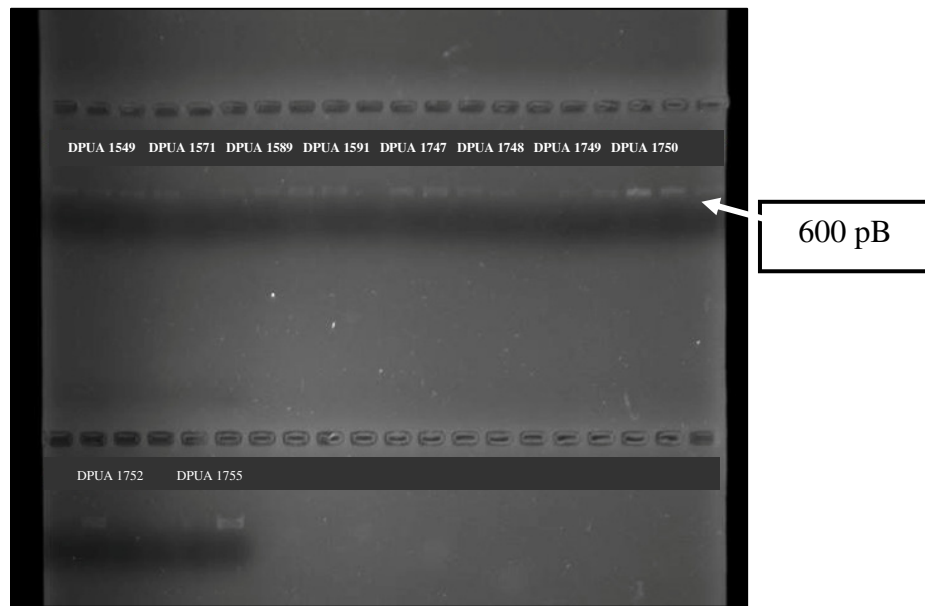


Figura 12. Gel de agarose de 1% mostrando a purificação do DNA dos amplificados utilizando o par de oligonucleotídeos iniciadores 235F e 878R para actinomicetos.

Os demais oligonucleotídeos iniciadores (094 e 095 universais para bactérias) amplificaram o DNA dos isolados DPUA 1549; DPUA 1571; DPUA 1589; DPUA 1591; DPUA 1748; DPUA 1750; DPUA 1752; DPUA 1755, representado na Figura 13, confirmando a análise morfológica que estas actinobactérias fazem parte da família Streptomycetaceae.

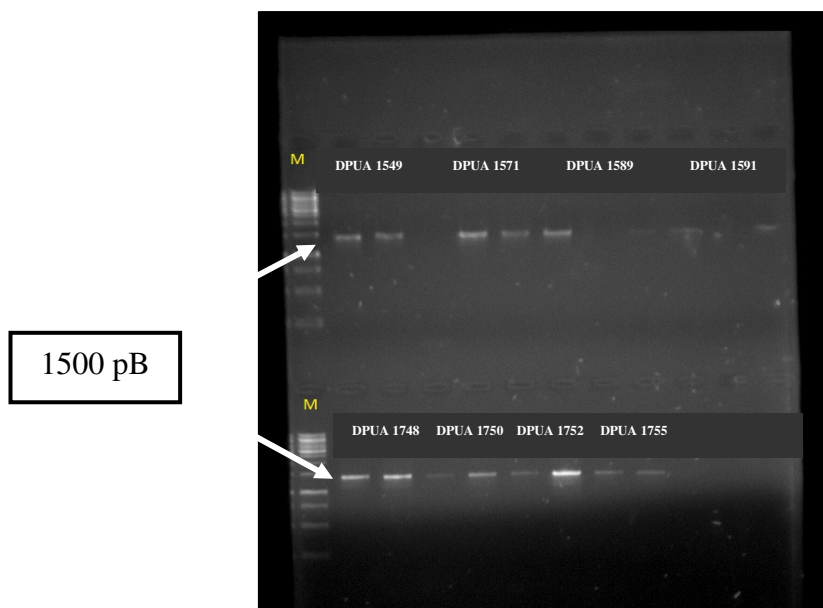


Figura 13. Gel de agarose de 1% mostrando a amplificação do DNA dos isolados utilizando par de oligonucleotídeos iniciadores 094 e 095 para bactérias.

O sequenciamento do DNA ribossomal 16S das amostras foi realizado para então propor a identificação ao nível de espécie. A utilização do sequenciamento de regiões intergênicas 16S-23S (ITS) baseia-se na existência de sequências altamente conservadas nos genes rDNA da subunidade menor dos ribossomos (rRNA 16S) de todas as bactérias, e sequências intersticiais variáveis nessas moléculas, que são espécie-específicas. A molécula de rRNA 16S é encontrada em todas as bactérias e tornou-se padrão universal para a sua identificação e classificação (NEIVA, 2007). O sequenciamento do gene 16S rDNA é um poderoso método para elucidação das relações genéticas entre organismos procariotos. Embora, a região 16S do rDNA seja altamente conservada entre os procariotos, estas sequências contêm regiões variáveis adequadas para distinguir taxas (STACH, 2003).

A comparação das sequências do rDNA 16S das culturas testadas com o GenBank database demonstrou que os isolados pertencem de fato ao gênero *Streptomyces*, com 100% de homologia. As sequências das amostras de *Streptomyces* sp. foram identificadas revelando alta similaridade com as espécies de acordo com a Tabela 03, onde foram identificados os seguintes micro-organismos: *Streptomyces parvulus* (40%), *Streptomyces bullii* (10%), *Streptomyces seoulensis* (10%), *Streptomyces owasiensis* (10%), *Streptomyces malasyensis* (20%), *Streptomyces lavendulae* (10%).

Tabela 03. Identificação molecular das amostras de actinomicetos.

Código da amostra	Identificação
1549	<i>Streptomyces parvulus</i>
1749	<i>Streptomyces bullii</i>
1750	<i>Streptomyces parvulus</i>
1747	<i>Streptomyces seoulensis</i>
1748	<i>Streptomyces owasiensis</i>
1571	<i>Streptomyces malasyensis</i>
1752	<i>Streptomyces parvulus</i>
1589	<i>Streptomyces malasyensis</i>
1591	<i>Streptomyces parvulus</i>
1755	<i>Streptomyces lavendulae</i>

3.3 Determinação da Atividade Antimicrobiana Qualitativa

3.3.1 Método Bloco de Gelose

A atividade antimicrobiana, já reconhecida por Silva-Vinhote et al. (2011), das amostras dos actinomicetos foi confirmada e os resultados demonstraram a ação antagônica, onde 80% das amostras inibiram o crescimento de *S. aureus* (ATCC 25923), 30% demonstraram ação frente a *M. smegmatis* (INCQS 061), 40% foi positivo para os micro-organismos *C. albicans* (DPUA 1706), *C. atlantica* (DPUA 1323) e *C. valderwaltii* (DPUA 1327) e apenas a amostra do actinomiceto (DPUA 1747), 10% apresentou halo contra *E. coli* (CBAM 0001). Os halos de inibição variaram entre 12 e 30 mm (Figura 14).

O método de conservação permitiu a manutenção da viabilidade dos actinomicetos após cinco anos de preservação, sem alterações das propriedades fisiológicas relacionadas à síntese de compostos antimicrobianos.

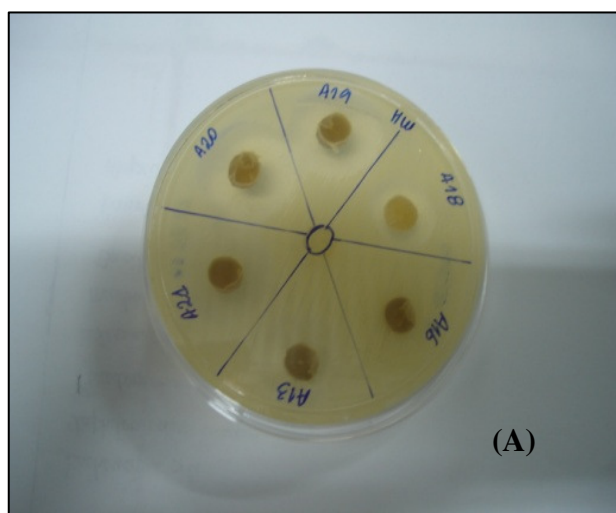


Figura 14. (A) Atividade Antimicrobiana das amostras DPUA 1750 e 1747 demonstrando os halos de inibição frente ao micro-organismo teste *S. aureus*.

3.2.2 Fermentação Submersa - Cup Plate

Os resultados da atividade antimicrobiana por meio da Técnica do Cup Plate utilizando os extratos brutos das amostras dos actinomicetos confirmaram a ação antagônica de 30% das amostras frente a *M. smegmatis* INCQS 061, 50% dos actinomicetos inibiram o crescimento da bactéria Gram-positiva *S. aureus* ATCC 25923, 20% formaram halo contra *C. albicans* DPUA 1706, *C. atlantica* DPUA 1323 e *C. valderwaltii* DPUA 1327, com halos variando

entre 12 a 29 mm de diâmetro, e não houve ação antimicrobiana frente *E. coli* CBAM 0001 (Figura 15).

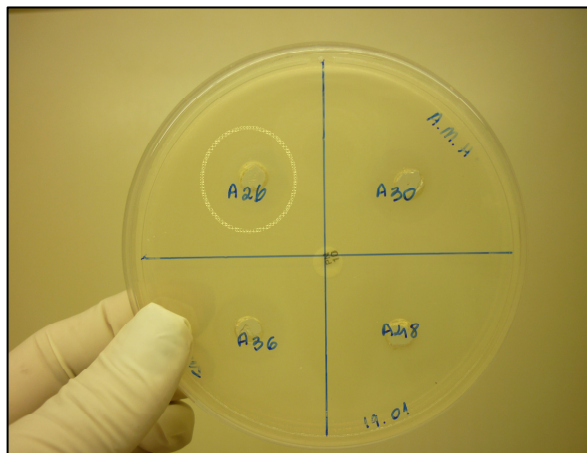


Figura 15. Atividade Antimicrobiana de AgNPs de actinomicetos frente a *Staphylococcus aureus*.

3.3 Biossíntese das Nanopartículas de Prata (AgNPs), Avaliação da Atividade Antimicrobiana e Seleção do Actinomiceto Promissor

3.3.1 Biossíntese de Nanopartículas de Prata

A biossíntese de nanopartículas de prata foi acompanhada durante 72 h, após o processo de fermentação, a formação das nanopartículas pôde ser visualizada a partir da mudança de cor de amarelo claro a marrom escuro, enquanto que nenhuma mudança de cor foi observada no filtrado da cultura sem o nitrato de prata, resultado que revela a formação das nanoestruturas (WANG, 2005; LIZ-MARZÁN, 2006; DURÁN, et al., 2010a; NARASIMHA et al., 2013) (Figura 16).

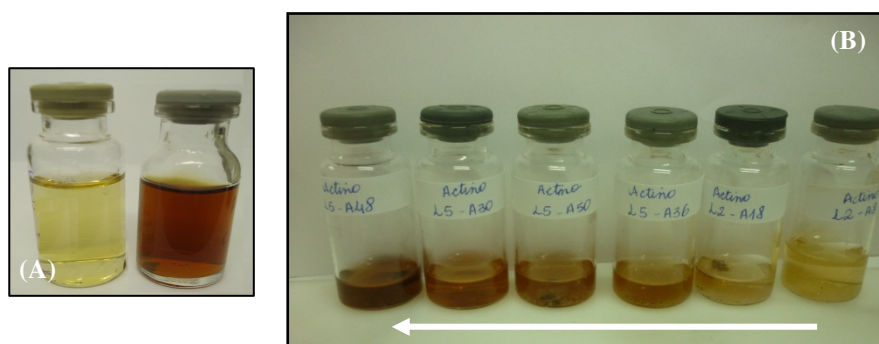


Figura 16. (A) Comparação entre o filtrado sem o AgNO_3 e após a reação demonstrando a mudança de coloração e formação das AgNPs. (B) Variação da coloração característica para formação das AgNPs (amarelo claro a marrom escuro).

3.4 Espectroscopia de UV-Visível

Nanopartículas de prata preliminares foram detectadas por meio de espectrofotometria, a um comprimento de onda de 300-900 nm. Neste estudo observou-se que a biossíntese por actinobactérias foi eficiente para a formação das AgNPs, confirmadas pela banda de absorção de plamon na região do UV-Vis, em torno de ~430 nm, atribuída a AgNPs esférica (Figura 17).

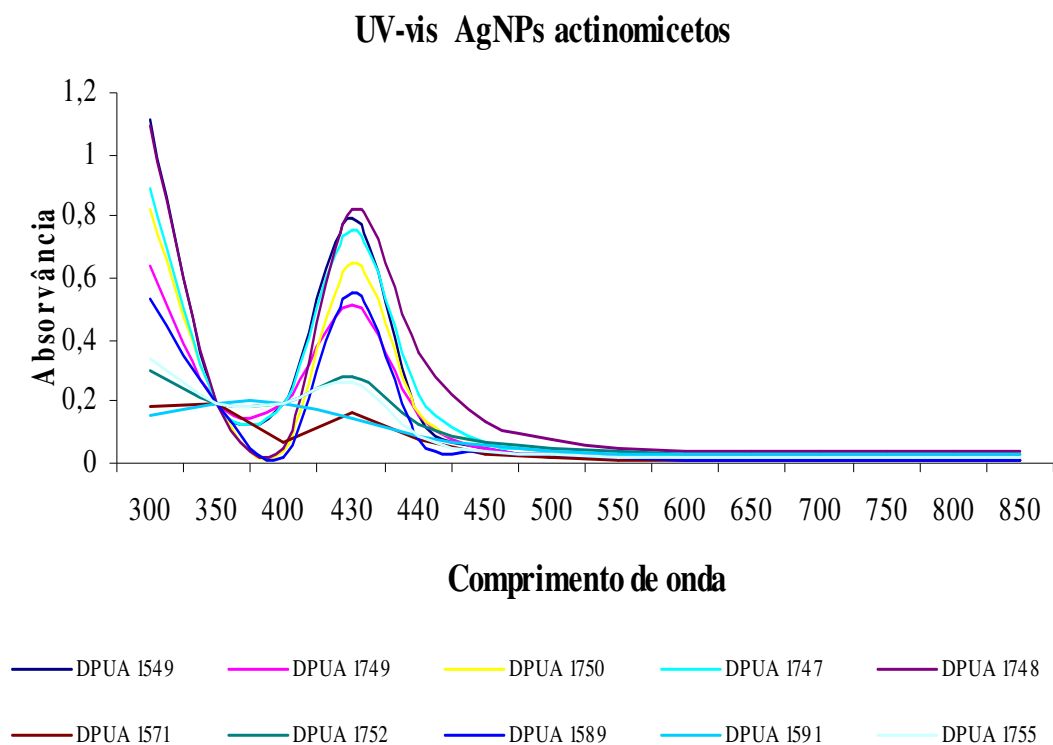


Figura 17. AgNPs das amostras de actinomicetos confirmadas pela banda de absorção de plamon na região do UV-Vis em torno de ~430 nm.

Martinez-Castanon et al. (2008), em seu trabalho, demonstraram que as AgNPs esféricas com aproximadamente 20 nm exibiram uma única Banda Plasmônica Superficial (SPR) que ocorreu na região do visível entre 420 a 450 nm.

De acordo com Pal et al. (2007), a largura das bandas SPR estão relacionadas com distribuição de tamanhos das AgNPs. Para partículas não esféricas, podem ocorrer duas ou mais bandas SPR.

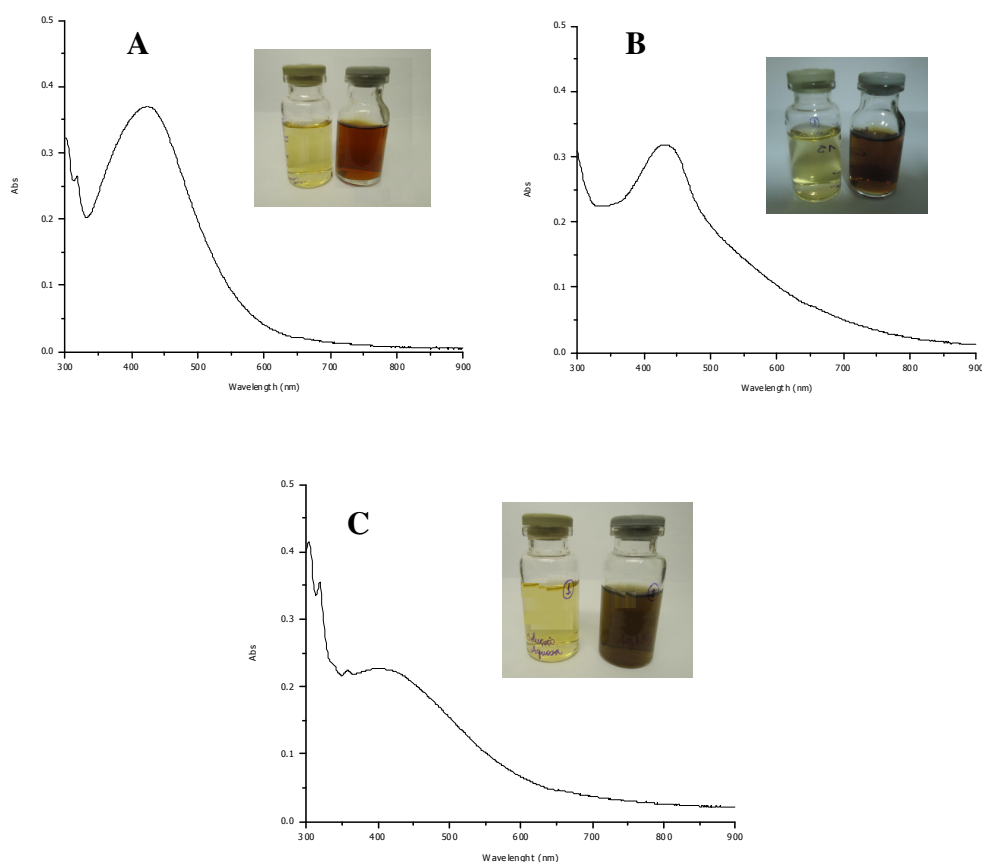


Figura 18. UV-vis das AgNPs de *Streptomyces* DPUA 1549 (A), *Streptomyces* DPUA 1747 (B) e *Streptomyces* DPUA 1748 (C) que apresentaram ação antagônica de maior eficiência.

3.5 Determinação da Atividade Antimicrobiana das Nanopartículas de Prata

A prata (Ag) apresenta propriedades antimicrobianas frente a diversos micro-organismos, incluindo bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e leveduras (PANACEK et al., 2006). A atividade antimicrobiana das AgNPs pode apresentar-se mais efetiva por serem partículas extremamente pequenas e com maior razão de área de superfície por volume.

Os resultados deste trabalho demonstraram que 100% dos extratos contendo nanopartículas de prata positivos inibiram o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* revelado pela formação dos halos translúcido (Figura 16). Para *M. smegmatis* 30% dos extratos *Streptomyces* (DPUA 1549), *Streptomyces* (DPUA 1747) e *Streptomyces* (DPUA 1748) formaram halo de inibição. *C. albicans*, *C. atlântica* e *C. valderwaltii* foram inibidas por 50% dos extratos (Tabela 04).

Tabela 04. Diâmetro dos halos de inibição dos micro-organismos testados com os extratos de nanopartícula de prata.

Actinomiceto	Micro-organismos teste					
	<i>E.coli</i> (mm)	<i>S. aureus</i> (mm)	<i>M. smegmatis</i> (mm)	<i>C. albicans</i> (mm)	<i>C. atlantica</i> (mm)	<i>C. valderwaltii</i> (mm)
DPUA 1549	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)
DPUA 1571	(+)	(++)	(++)	(-)	(-)	(-)
DPUA 1589	(+)	(++)	(-)	(-)	(-)	(-)
DPUA 1591	(++)	(++)	(-)	(-)	(+)	(+)
DPUA 1747	(+)	(++)	(-)	(-)	(+)	(+)
DPUA 1748	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)
DPUA 1749	(++)	(++)	(-)	(-)	(-)	(-)
DPUA 1750	(+)	(++)	(-)	(-)	(-)	(+)
DPUA 1752	(++)	(++)	(-)	(-)	(-)	(-)
DPUA 1755	(++)	(++)	(-)	(-)	(-)	(-)

* Halos de inibição para organismos Gram-positivos; negativos e leveduras. Resistente: 12 mm ou (<) = (-); Intermediário: 12 mm a 14 mm = (+); Sensível: 15 ou (>) = (++).

Entre os extratos aquosos de nanopartícula positiva os oriundos de *Streptomyces* DPUA 1549, *Streptomyces* DPUA 1747 e *Streptomyces* DPUA 1748 foram os que apresentaram ação antagônica de maior eficiência, contra os micro-organismos patogênicos testados (bactérias e leveduras). Os resultados indicam que estes micro-organismos demonstraram ação antagônica de amplo espectro, com halos variando de 12 a 34 mm (Figura 19).

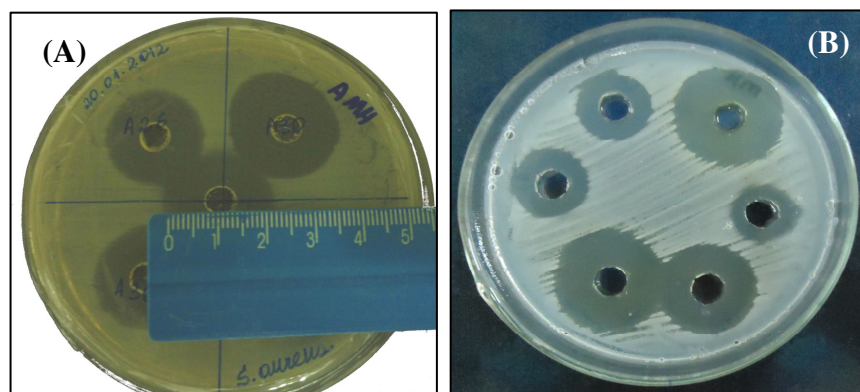


Figura 19. Halos de inibição medidos em mm: (A) Inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus* pelos extratos aquosos contendo a nanopartícula; (B) Halo formado frente à *Escherichia coli*.

Íons de prata e nanopartículas de prata têm efeitos inibitórios e letais sobre espécies bacterianas, como a *E. coli* (KIM et al., 2007; SONDI e SALOPEK-SONDI, 2004), contra *S. aureus* (KIM et al., 2007). Deepa, Kanimozhi e Panneerselvam (2013) verificaram a inibição do crescimento de bactérias Gram-positivas (*Bacillus subtilis*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*) e Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *K. pneumoniae*, *Salmonella typhi* e *Vibrio cholerae*). A atividade antagônica contra fungos também foi verificada por Kim et al. (2007).

Outros resultados de pesquisas realizadas mostram que AgNPs apresentaram excelente atividade antibacteriana contra *S. aureus*, *Bacillus cereus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* (CLEMENT e JARRET, 1994; FENG et al., 2000). Bergmann (2007) demonstrou que as NPs de Ag formaram zona de inibição contra *E.coli*, *P.aeruginosa*, *S.aureus* e o trabalho de Evelyne e Subbiayh, (2014) demonstrou ação antagônica contra *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli* e *S. aureus*.

O desenvolvimento de novas moléculas ativas por meio dos sistemas nanoestruturados torna a indústria farmacêutica uma das áreas mais atraentes. Isso porque uma nova formulação com nanopartículas pode resgatar drogas promissoras, que foram descartadas após vultosos investimentos por causa da descoberta de potenciais efeitos colaterais ou baixa biodisponibilidade, além de gerar novas patentes (BERGMANN, 2007).

Dessa forma, estudos mais amplos devem ser realizado, visando a biossíntese de nanopartículas de prata, associada à caracterização destas nanoestruturas, toxicidade, assim como, os mecanismos de ação envolvidos na ação antimicrobiana, para propor o uso terapêutico tendo em vista o aumento da expectativa de vida das populações.

3.6 Espectrometria Óptica de Emissão por Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-OES)

A concentração de prata nas amostras obtidas por meio da biossíntese utilizando actinomicetos foi determinada quantitativamente por análise de ICP-OES. Os resultados confirmaram a formação de AgNPs demonstrando que a concentração de Ag foi de 47,7 µg/mL, 504,3 µg/mL, 663,7 µg/mL para as amostras de *Streptomyces* sp. DPUA 1549, *Streptomyces* sp. DPUA 1747, *Streptomyces* sp. DPUA 1748, respectivamente.

4 Conclusão

O uso de fontes de recursos naturais, como sistemas biológicos para obtenção de nanopartículas de prata tornou-se essencial, a exemplo, a utilização de micro-organismos do grupo dos actinomicetos. As actinobactérias reativadas mostraram-se viáveis e expressaram as características morfofisiológicas típicas do gênero *Streptomyces* e identificadas posteriormente às espécies empregando a Técnica da PCR. No processo de fermentação a massa micelial se mostrou favorável para a recuperação do extrato aquoso para biossíntese das AgNPs, após a reação houve a verificação da mudança de cor sugerindo a formação das nanopartículas de prata. Os extratos aquosos contendo as nanopartículas mostraram ampla ação antimicrobiana frente à *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e contra *Candida albicans*, *Candida atlântica* e *Candida valderwaltii*; As amostras *Streptomyces* DPUA 1549, *Streptomyces* DPUA 1747 e *Streptomyces* DPUA 1748 demonstraram os melhores resultados quanto a ação antagônica, sendo considerados os micro-organismos promissores para realização da caracterização das AgNPs. Além disso, os resultados por ICP-OES demonstraram a baixa concentração de Ag. Estes resultados demonstram que AgNPs podem ser utilizados como potencial inibidores do crescimento de diferentes sistemas biológicos, tornando-as aplicáveis para aplicações nas indústrias farmacêuticas e médicas.

Agradecimentos

A Universidade Federal do Amazonas – UFAM, ao apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES e a Agencia de Fomento do Estado do Amazonas – FAPEAM.

Divulgação

Este artigo é inédito e não está sendo considerado para qualquer outra publicação. O(s) autor(es) e revisores não relataram qualquer conflito de interesse durante a sua avaliação. Logo, a revista *Current Biotechnology* detém os direitos autorais, tem a aprovação e a permissão dos autores para divulgação, deste artigo, por meio eletrônico.

Referências

- Abdeen, S., Geo, S., Sukanya, Praseetha P.K., Dhanya R.P. Biosynthesis of Silver nanoparticles from *Actinomycetes* for therapeutic applications. *Int. J.Nano Dimens.* 5(2): 155-162, Spring. (2014).
- Azuma, M. V. P. Actinobactérias com Potencial Biotecnológico isoladas da Região Entremarés da Ilha do Mel, PR, Brasil. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná. Curitiba-PR. 2011.
- Bergmann, B. R. A Nanotecnologia: da saúde para além do determinismo tecnológico. *Artigos e Ensaio*s. Rio de Janeiro. 2007.
- Biglari, S; Gholam H. Sharifi; Gholam Reza Sharifi. Production of gold nanoparticles by *Streptomyces djakartensis* isolate B-5. *Nanomed. J.*, Vol. 1, No. 4, Summer, page 229-237. (2014).
- Bittencourt, J. V. M.; Lima, M. L. A. Manual de Biologia Molecular em Plantas Arbóreas. Curitiba: CBAB, p. 157, (2008).
- Clement, J.L, Jarret, P.S: Antibacterial Silver. *Metal-Based Drugs* 1994, 1: 467-482.
- Connell, N. D. Expression systems for use in actinomycetes and related organisms. *Current Opinion in Biotechnology*. London, v. 12, p. 446-449, 2001.

1 Cross, T. Growth and examination of actinomycetes - some guidelines. In: Holt, J.G., Krieg,
2 N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., Williams, S.T. (Eds) Bergey's Manual of Determinative
3 Bacteriology. 9. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994.

4
5 Deepa, S.; Kanimozhi, K. and Panneerselvam, A.. Antimicrobial activity of extracellularly
6 synthesized silver nanoparticles from marine derived actinomycetes. Int. J. Curr. Microbiol.
7 App. Sci 2(9): 223-230. (2013).

8
9 Durán, N., Marcato, P.D., Teixeira, Z. Nanotecnologia e nanobiotecnologia: Conceitos
10 básicos. Ciencia Viva. [http://www.cienciaviva.org.br/arquivo/cdebate/012nano/](http://www.cienciaviva.org.br/arquivo/cdebate/012nano/Nanotecnologia_e_Nanobiotecnologia.pdf)
11 [Nanotecnologia e Nanobiotecnologia.pdf](http://www.cienciaviva.org.br/arquivo/cdebate/012nano/Nanotecnologia_e_Nanobiotecnologia.pdf). (2005a).

12
13 Durán, N., Mattoso, L.H.C., De Moraes, P.C. (Eds). Nanotecnologia: Introdução, preparação
14 de nanomateriais e exemplos de aplicação. ArtLiber Ed. São Paulo, Brasil. (2006).

15
16 Durán, N., Marcato, P.D., Souza, G.I.H., Alves, O.L., Esposito, E. Antibacterial effect of
17 silver nanoparticles produced by fungal process on textile fabrics and their effluent treatment.
18 J. Biomed. Nanotechnol. 3, 203-208, 2007.

19
20 Durán, N.; Marcato, P. D.; De Conti, R.; Alves, O. L; Fabio T. M. Costa and Marcelo
21 Brocchi. Potential Use of Silver Nanoparticles on Pathogenic Bacteria, their Toxicity and
22 Possible Mechanisms of Action. J. Braz. Chem. Soc., Vol. 21, No. 6, 949-959, 2010. Printed
23 in Brazil – (2010).

24
25 Durán, N., Marcato, P.D., De Conti, R., Alves, O.L., Costa, F.T.M., Brocchi, M. Potential use
26 of silver nanoparticles on pathogenic bacteria, their toxicity and possible mechanisms of
27 action. J. Braz. Chem. Soc., 21, 949-959. (2010a).

28
29 Durán, N., Marcato, P.D., Ingle, A., Gade, A., RAI, M. Fungi-mediated synthesis of silver
30 nanoparticles: Characterization processes and applications. In Progress in Mycology
31 (Mahendra Rai e George Kövics, Eds), Scientific Publishers, Jodhpur, India, Ch 16, pp. 425-
32 449. (2010b).

- Durán, N., Marcato, P.D. Biotechnological routes to metallic nanoparticles production: mechanistic aspects, antimicrobial activity, toxicity and industrial implications. In Nano-Antimicrobials: Progress and Prospects (M. Rai and N. Cioffi, Eds).Springer, Germany In press. (2011).
- Durán, N., Marcato, P.D., Durán, M., Yadav, A., Gade, A., Rai, M. Mechanistic aspects in the biogenic synthesis of extracellular metal nanoparticles by peptides, bacteria, fungi, and plants. Appl. Microbiol. Biotechnol. 90,1609–1624. (2011).
- Evelyn, R.J., Subbiah R. Biosynthesis of Silver Nanoparticles from *Streptomyces olivaceous* and its antimicrobial activity. International Journal of Pharma Research and Health Sciences. All rights reserved. Volume 2 (2), Page-166-172. (2014).
- González, I., Ayuso-Sacido, A. Anderson, A., Genilloud, O. Actinomycetes isolated from lichens: Evaluation of their diversity and detection of biosynthetic gene sequences. FEMS Microbiol. Ecol. 54, 401-15. (2005).
- Gupta, I., Durán, N., Rai, M. Nanosilver toxicity: Emerging concerns to human and environment. In Nano-Antimicrobials: Progress and Prospects (M. Rai and N. Cioffi, Eds).Springer, Germany In press. (2011).
- Ingle, A. P., Durán, N., Rai, M. Bioactivity, mechanism of action, and cytotoxicity of copper-based nanoparticles: A review. Appl Microbiol Biotechnol, 98:1001–1009. (2014).
- Ichikawa, T., Ishikura, T., Ozaki, A. Improvement of Kasugamycin – producing strain by the agar piece method and the prototroph method. Folia Microbiol. 16,. 218-224. 1971.
- Kashyap, P.L., Kumar, S., Srivastava, A.K., Sharma, A.K., Myconanotechnology in agriculture: a perspective. World J. Microbiol. Biotechnol. 29:191–207. (2013).
- Kim, J. S.; Kuk, E.; Yu, K. N.; Kim, J. H.; Park, S. J.; Lee, H. J.; Kim, S. H.; Park, Y. K.; Park, Y. H.; Hwang, C. Y.; Kim, Y. K.; Lee, Y. S.; Jeong, D. H.; Cho, M. H.; Nanomedicine. 3, 95. 2007.

- 1 Lechevalier, M.P., Lechevalier, H.A. Genus *Frankia* Brunchorst 1886, 174^{AL}, 2410-2417. In
2 S. T. Williams, M. E. Sharpe, J. G. Holt (Eds.), Bergey's manual of systematic bacteriology,
3 vol. 4. The Williams & Wilkins Co., Baltimore. (1989).
4
- 5 Liz-Marzán, L.M. Tailoring Surface Plasmons through the Morphology and Assembly of
6 Metal Nanoparticles. *Langmuir*, 22, 32-41. (2006).
7
- 8 Manivasagan, P., Venkatesan, J., Senthilkumar, K., Sivakumar, K., and Kim, S. Biosynthesis,
9 Antimicrobial and Cytotoxic Effect of Silver Nanoparticles Using a Novel *Nocardia* sp.
10 MBRC-1. *BioMed Research International*. Article ID 287638, 9 pages. (2013).
11
- 12 Marcato, P.D., Durán, N. Biogenic silver nanoparticles: Applications in medicines and
13 textiles and their health implications, IN: *Metal Nanoparticles in Microbiology* (M.Rai and N
14 Durán,Eds:), Springer verlag, Germany, Chap. 11, 249-267. (2011).
15
- 16 Martinez-Castanon, G. A., Nino-Martinez, N., F. Martinez-Gutierrez *et al.*, Synthesis and
17 antibacterial activity of silver nanoparticles with different sizes, *Journal of Nanoparticle*
18 *Research*, vol. 10, no. 8, pp. 1343-1348, (2008).
19
- 20 Narasimha, G., Janardhan. Alzohairy, M., Khadri, H., Mallikarjuna, K. Extracellular
21 synthesis, characterization and antibacterial activity of Silver nanoparticles by Actinomycetes
22 isolative. *Int. J.Nano Dimens.* 4(1): 77-83. (2013).
23
- 24 Neiva, I.F. Caracterização molecular de biosorotipos selvagens de *streptococcus mutans*
25 isolados de crianças com diferentes históricos da doença cárie. Tese apresentada ao curso de
26 Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos. Curitiba: UFPR, (2007).
27
- 28 Oliveira, S. R. Atividade antagônica de Actinomicetos contra *Botrytis cinérea*, patógeno da
29 videira (*Vitis* SP). Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Centro de Ciências Biológicas.
30 Departamento de Antibióticos. Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2004.
31

- 1 Pal, S.; Tak, Y. K. and Song, J. M. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles
2 depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gramnegative bacterium *Escherichia*
3 *coli*, *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 73, no. 6, pp. 1712-1720. (2007).
- 4
- 5 Panacek A, Kvitek L, Prucek R, Kolar M, Vecerova R, Pizurova N. Silver colloid
6 nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. *J Phys Chem*
7 *B*;110:16248-53. 2006.
- 8
- 9 Rai, M., Yadav, A., Bridge, P., Gade, A. Myconanotechnology: A new and emerging science.
10 In: Rai MK, Bridge PD (eds) *Applied mycology*. CAB International, New York, pp 258–267.
11 (2009).
- 12
- 13 Rai, M., Durán, N. (Eds) *Metal Nanoparticles in Microbiology*. Springer-Verlag, Berlin
14 Heidenberg, pp. 303. (2011).
- 15
- 16 Rajakumar, G., Rahuman, A. A., Acaricidal activity of aqueous extract and synthesized silver
17 nanoparticles from *Manilkara zapota* against *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. *Research*
18 *in Veterinary Science*. (2011).
- 19
- 20 Sadhasivam, S., Shanmugam, P., Yun, K.S. Biosynthesis of silver nanoparticles by
21 *Streptomyces hygroscopicus* and antimicrobial activity against medically important
22 pathogenic microorganisms. *Colloids Surf. B: Biointerf.* 81, 358–362. (2010).
- 23
- 24 Sastry, M., Ahmad, A., Khan, M.I. and Kumar, R. Biosynthesis of metal nanoparticles using
25 fungi and Actinomycete. *Current Science*, vol. 85, N. 2, 25. (2003).
- 26
- 27 Silva-Vinhote, N.M., Marinho-Pereira, T., Astolfi-Filho, S., Matsuura, T. Taxonomic
28 Characterization and Antimicrobial Activity of Actinomycetes Associated with Foliose
29 Lichens from the Amazonian Ecosystems. *Australian J. Basic Appl. Sci.* 5, 910-918. (2011).
- 30
- 31 Shirley, Dayanand, A., Sreedhar, B., Dastager, S.G.. Antimicrobial activity of silver
32 nanoparticles synthesized from novel *Streptomyces* species. *Digest J. Nanomat. Biostruct.* 5,
33 447 – 451. (2010).

- Shirling, E. B., Gottlieb, D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. Inter. J. Syst. Bacteriol. 16, 313-340. (1966).
- Strobel, G.A. et al. Endophytes as sources of bioactive products. Microbes Infect. v.5, pág. 535–544. (2003).
- Sudaramoorthi. C, Devarasu. S., Vengadesh Prabhu. K. Antimicrobial and wound healing activity of silver nanoparticles synthesized from *Streptomyces aureofaciens*. Inter. J. Pharm. Res. Develop. 2, 69-75. (2011).
- Stach, J. E.; Maldonado, L. A.; Ward, A. C.; Goodfellow M.; Bull A. T. Statistical approaches to estimating bacterial diversity in marine sediments. Applied Environmental Microbiology. Vol. 69. p. 6189–6200. (2003).
- Tran, Q.H., Nguyen, V.Q., Le A.T.. Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives. Adv. Nat. Sci.: Nanosci. Nanotechnol. 4, 033001. (2013).
- Waksman, S.A., Woodruff, H.B. 1941. Actinomyces antibioticus a new soil organism antagonistic to pathogenic and non-pathogenic bacteria. J. Bacteriol. 42: 231-249.
- Wang, H. et. al. Colloid Surface Physicochem Eng Aspect, 256. 2005.
- Usha, R., Prabu, E., Palaniswamy, M., Venil, C.K., and Rajendran, R. Synthesis of Metal Oxide Nano Particles by *Streptomyces* sp. for Development of Antimicrobial Textiles. Global Journal of Biotechnology & Biochemistry 5 (3): 153-160. (2010).
- Vengadesh, P., K; Sundaramoorthi, N.M.; C, Devarasu. S. Biosynthesis of Silver Nanoparticles from *Streptomyces aureofaciens*. J. Pharm. Res., 4, 820-822. (2011).
- Vigneshwaran, N., Ashtaputre, N.M., Varadarajan, P.V., Nachane, R.P., Paralikar, K.M., Balasubramanya. R.H. Biological synthesis of silver nanoparticles using the fungus *Aspergillus flavus*. Science Direct. Materials Letters 61 1413–1418. 2007.

- 1
- 2 Zhang, Li, Q., Lu, Y., Sun, D., Lin, X., Deng, X., He, N., Zheng, S. Biosorption and
- 3 bioreduction of diamine silver complex by *Corynebacterium*. J. Chem. Technol. Biotechnol.
- 4 80, 285–290. (2005).

CAPÍTULO IV

Neste capítulo será apresentado o artigo com o título **Biogenic synthesis and characterization of antimicrobial silver nanoparticles produced by *Streptomyces* from Amazonic biome**, submetido a Revista *Canadian Journal of Microbiology* - B2, e contém as informações referentes a caracterização das AgNPs a atividade antimicrobiana, a verificação da Concentração Mínima Inibitória das amostras, a visualização da ação das AgNPs sobre as células de bactérias patogênicas e multirresistentes, por meio de imagen de AFM, além do perfil citotóxico, confirmando assim o potencial Nanobiotecnológico dos micro-organismos em estudo.



Biogenic synthesis and characterization of antimicrobial silver nanoparticles produced by Streptomyces from Amazonic biome

Journal:	Canadian Journal of Microbiology
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Silva-Vinhote, Nelly Mara; Federal University of Amazon, Parasitology Department/ Culture Collection DPUA Duran, Nelson; Campinas State University, Biological Chemistry Laboratory Silva, Taciana; Federal University of Amazon, Parasitology Department/ Culture Collection DPUA Quelemes, Patrick; Federal University of Piauí, Research Centre in Biodiversity and Biotechnology Araújo, Alyne; Federal University of Piauí, Research Centre in Biodiversity and Biotechnology Moraes, Ana Carolina; Campinas State University, Biological Chemistry Laboratory Câmara, Ana Lygia; University of Brasília, Institute of Biological Sciences, Department of Genetics and Morphology Longo, João Paulo; University of Brasília, Institute of Biological Sciences, Department of Genetics and Morphology Azevedo, Ricardo; University of Brasília, Institute of Biological Sciences, Department of Genetics and Morphology Silva, Durcilene; Federal University of Piauí, Research Centre in Biodiversity and Biotechnology Leite, José Roberto; Federal University of Piauí, Research Centre in Biodiversity and Biotechnology Teixeira, Maria Francisca; Federal University of Amazonas-UFAM, Parasitology Department/ Culture Collection DPUA
Keyword:	Filamentous bacteria, Nanobiotechnology, Antimicrobial, Tropical Region

SCHOLARONE™
Manuscripts

<https://mc06.manuscriptcentral.com/cjm-pubs>

**Biogenic synthesis and characterization of antimicrobial silver nanoparticles produced
by *Streptomyces* from Amazonic biome**

Nélly Mara Silva-Vinhote¹; Nelson Eduardo Durán Caballero³; Taciana de Amorim Silva¹;
Patrick Veras Quelemes²; Alyne Rodrigues de Araújo²; Ana Carolina Mazarin de Moraes³;
Ana Lygia dos Santos Câmara⁴; João Paulo Figueiró Longo⁴; Ricardo Bentes Azevedo⁴;
Durcilene Alves da Silva²; José Roberto de Souza de Almeida Leite²; Maria Francisca Simas
Teixeira^{1,*}

¹Department of Parasitology, Institute of Biological Sciences, Federal University of
Amazonas, UFAM, Manaus, Amazonas, AM, Brazil;

²Research Centre in Biodiversity and Biotechnology, Campus Ministro Reis Velloso, Federal
University of Piauí, UFPI, Parnaíba, PI, Brazil;

³Campinas State University, UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brazil.

⁴Department of Genetics and Morphology, Institute of Biological Sciences, University of
Brasília, Brasília, Brazil.

*Corresponding Author: Federal University of Amazonas, Institute of Biological Sciences,
Department of Parasitology. Av. Gen. Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 3000 - Mycology
Laboratory; Aleixo, 69.077-000, Manaus, AM, Brazil. E-mail: mteixeira@ufam.edu.br

Abstract

The biological sources, as micro-organisms, for nanoparticles production become important and one of the reasons for bacterial preference is their ease of manipulation and ecofriendly potential. Three bacteria strains of *Streptomyces* genus were used to the biosynthesis of silver nanoparticles (AgNPs). The aim of the present study was to verify *Streptomyces* spp. as biological systems to the synthesis and extracellular characterization of silver nanoparticles with antimicrobial activity. The nanoparticles were characterized by UV-Vis, DLS, RDX, FTIR and TEM. In qualitative antimicrobial test, *Streptomyces parvulus* DPUA 1549 and *Streptomyces owasiensis* DPUA 1748 showed activity against all pathogenic micro-organisms (bacteria and yeasts) tested. *Streptomyces parvulus* DPUA 1549 AgNPs showed the most efficient MIC at low concentrations (1.95 μ M) against *S. aureus*, promoted structural damage to the micro-organism cell surface according to AFM images and also reduced the proliferation of NIH-3T3 cells in the cytotoxic assay. Thus, biosynthesis of silver nanoparticles by *Streptomyces* spp. is a potential source to be used in nanomedicine.

Keywords: Filamentous bacteria; Nanobiotechnology; Antimicrobial; Tropical Region.

1. Introduction

Nanobiotechnology is a known field that micro-organisms can be used for synthesis of nanomaterials and nanostructures with desirable shape and sizes with applications in medicine, agriculture, food, cosmetic and pharmaceutical areas. Many researchers, such as microbiologists, biochemists, chemists, physicists and other branches of engineer are contributing with new solutions through approaches of green chemistry that provide increase efficiency of processes and materials. Furthermore, the use of nanotechnology in medicine may provide early diagnosis, leading to better treatments and increase the efficiency of the drug and its development process (Biglari et al. 2014; De Lima et al. 2012; Durán et al. 2007; Durán and Marcato 2012; Mishra et al 2014; Rai et al. 2013).

The biological sources, as micro-organisms, for nanoparticles production become important and one of the reasons for bacterial preference is their ease of manipulation and ecofriendly potential, non-toxicity, in addition, the biosynthesis pathway can scale-up for industrial production (Kumar et al. 2015).

Nanoparticles with desired size and composition are of great interest, as they provide solutions to various environmental and technological challenges (Thakkar et al. 2010). A strategy way is conducting researches to identify micro-organisms that are renewable natural reducing agent and low cost (Chemat and Strube 2015).

Actinomycetes are Gram-positive filamentous bacteria, saprobes, soil living and source of different bioactive compounds. Over 500 species of Actinomycetes have been described until now and among them, *Streptomyces* genus provides nearly 80% of all antibiotics in the world (Silva-Vinhote et al. 2011).

Recent studies have shown the potential of Actinomycetes as silver nanoparticles (AgNPs) producers. These AgNPs have antimicrobial action against pathogen Gram-positive and Gram-negative bacteria and also multiresistant strains such as methicillin-resistant

Staphylococcus aureus. Karthik et al. (2014) and Abdeen et al. (2014) used *Streptomyces* sp. to synthesize silver nanoparticles with sizes varying from 5 to 20 nm; Manivasagan et al. (2013) related the production of AgNPs from 30 to 90 nm by *Nocardiopsis* sp.; *Streptomyces* sp. LK3 (Karthik et al. 2014) and *Streptomyces* sp. (Alani et al. 2012) from liquid extract produced spherical AgNPs from 5 to 50 nm and from 15-25 nm, respectively; Soil actinobacteria presented NPs from 5-50 nm (Narasimha et al., 2013); *Streptomyces* sp. BDUKAS 10n (Sivalingam et al. 2012) isolated from mangrove, *Streptomyces* sp. JAR1 (Chauhan et al. 2013) and *Streptomyces* sp. ERI- 3 (Zonooz an Salouti 2011) produced spherical AgNPs of 21-48 nm, 68 nm and 1-100 nm, respectively.

Other studies using Actinomycetes identified in species level also reported the production of AgNPs. Biglari et al. (2014) isolated 50 Actinomycetes from soil but only one, *Streptomyces djkartnsis*, produced spherical and triangular nanoparticles, varying from 2 to 25 nm. *Streptomyces olivaceus* sp-1392 produced NPs from 500 nm to 1 μ m (Evelyn and Subbiah 2014). *Streptomyces coelicolor* (Manikprabhu and Lingappa 2013), *Streptomyces albogriseolus* (Samundeeswari et al. 2012), *Streptomyces parvulus* SSNP11 and *Streptomyces albidoflavus* CNP10 (Prakashan et al. 2012) produced AgNPs of 28-50 nm, 16.25 nm, 20-30 nm and from 2 to 100 nm, respectively. Selvakumar et al. (2012) isolated *Streptomyces rochei* from marine sediment and also obtained silver nanoparticles production.

The aim of this research was to evaluate *Streptomyces* spp. as biological system to silver nanoparticles synthesis and the screening of antimicrobial and cytotoxic activity.

2. Materials and Methods

2.1 Micro-organisms

Three cultures (DPUA 1549, DPUA 1747 and DPUA 1748) of *Streptomyces* genus were selected and obtained from DPUA Culture Collection, Federal University of Amazonas,

Brazil. All of them had already presented antimicrobial activity by liquid fermentation in previous study (Silva-Vinhote et al. 2011). The Actinomycetes were reactivated transferring a culture fragment to ISP2A agar (g/L): (starch, 10; yeast extract, 4; malt extract, 10; dextrose, 4; agar, 20), adjusted to pH 7.3. The cultures were maintained at 30 °C for 21 days and authenticated based on the physiologic, macromorphological and micromorphological characteristics of the group (Lechevalier and Lechevalier 1989; Waskman and Wodruff 1941).

2.2 *Identifications of the micro-organism*

The identification at level species of the isolates that showed the best production antimicrobial was carried out by polymerase chain reaction (PCR). The strain DNA was excreted using the purification kit of genomic DNA (Promega Corporation, Madison, EUA) according to the manufacture's instructions. Amplification of 16S ribosomal DNA gene was performed by PCR using universal primers from eubacteria ACT235F (5'-CGCGGCCTATCAGCTTGTTG) and ACT878R (5' - CCGTACTCCCCAGGCGGGG).

PCR was conducted in Eppendorf Master Cycle thermocycler. To obtain the final volume of 25 µL were used: 14.2 µL of Milli-Q water, 1.0 µL of denatured cells/DNA, 2.5 µL of DNA polymerase 10X (200 mM Tris-HCl, 500 mM KCl) buffer, 2.5 µL of 25 mM MgCl₂, 2.5 µL of 2.5 mM dNTP, 1.0 µL of ACT235F 5' - 3' 5 pmol oligonucleotide, 1.0 µL of ACT878R 5' - 3' 5 pmol oligonucleotide and 0.3 µL of 5 U Taq DNA polymerase.

The amplification reaction was carried out with the following temperature cycles: (1) 95 °C for 5 min, (2) 95 °C for 45 s, 72 °C for 60 s, 72 °C for 60 s (40 times), (3) 72 °C for 5 min. The annealing was also made at 68 °C. To confirm the amplification, 2.0 µL of the reaction was submitted to electrophoresis in agarose gel with TBE (boric acid-EDTA) and

1 stained with GelRedTM. The electrophoresis was developed in 80 V for 10 min and than in
2 100 V for 50 min.

3 The amplification product was sequenced and the resulting sequence was compared
4 with all sequences available in GenBank using BLAST software of the National Center for
5 Biotechnology Information (NCBI).

6 7 *2.3 Synthesis of silver nanoparticles*

8 *2.3.1 Submerged Fermentation*

9 The Actinomycetes were cultivated in 50 mL of MPE broth (g/L): (glucose, 20;
10 soybean flour, 20; NaCl, 5; CaCO₃, 2) distributed in Erlenmeyer flasks of 125 mL. The
11 process was carried out at 25 °C, 200 rpm, for 72 hours and the biomass was separated from
12 the extract by vacuum using Whatman n° 1 filter. The biomass was filtrated three times with
13 sterilized water and after last washing the liquid solution was recovered to silver nanoparticles
14 biosynthesis process.

15 16 *2.3.2 Silver nanoparticles biosynthesis*

17 Silver nanoparticles synthesis was made using 50 mL from the recovered solution with
18 addition of silver nitrate solution (1 M) in Erlenmeyer of 250 mL until final concentration of 1
19 mM. The reaction was carried out at 25 °C, 200 rpm, for 72 hours, in absence of light and the
20 control presented only aqueous solution without the silver ion and maintained at same
21 conditions.

22 23 *2.4 Characterization of silver nanoparticles*

24 *2.4.1 UV-Visible spectroscopy analysis*

The bioreduction of silver nitrate and the formation of nanostructures were confirmed by UV–Vis spectra, in a range of wavelengths between 350 and 900 nm using UV-Vis Cary 50 Probe Agilent.

2.4.2 Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy analysis

The AgNPs were also examined for the presence of biomolecules responsible for bioreduction using Fourier Transform Infrared spectral analysis in a Bomem MB Series-B102 Spectrometer. FTIR reveals the biomolecules responsible for the silver ion reduction and the stabilization of AgNPs in the solution.

2.4.3 Characterization of AgNPs by XRD

The XRD analysis was obtained by a Shimadzu XRD7000 instrument. The Ag-NPs diameters were determined using Scherrer equation ($D = 0.9 \lambda / \beta \cos\theta$), where: D = average of particles diameter; λ = wave-length of electromagnetic radiation; θ = diffraction angle ; β (2θ) = width at half height of the diffraction peak.

2.4.4 Particle size (DLS) analysis e Potencial Zeta

Particle size and zeta potential (ζ) measurements were carried out in a Malvern Zetasizer Nano, Model ZS 3600. The hydrodynamic diameter was measured by dynamic light scattering with laser with wavelength of 633 nm and a fixed scattering angle of 173°. Particle size was measured considering the particle as spherical like. Each sample was measured 3 times for two replicates samples at a constant temperature of 25 ± 1 °C.

2.4.5 Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)

The intensity analyses of nanoparticles in aqueous suspension were visualized using Nano Sight-Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) Version 2.0 Release Version Build 0127.

2.4.6 Characterization of AgNPs by Transmission Electron Microscopy (TEM)

The characterization of silver nanoparticles was done by using TEM images to know the size and shape of nanoparticles using a Zeiss Libra 120 instrument at 120 kv.

2.5 Antimicrobial Activity

2.5.1 Qualitative Assay

The agar diffusion assay was used to screen the AgNPs antimicrobial activity against the following test micro-organisms: *Escherichia coli* CBAM 0001, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Mycobacterium smegmatis* INCQS 061, *Candida albicans* DPUA 1706, *Candida atlantica* DPUA 1323 and *Candida valderwaltii* DPUA 1327. The bacterial cultures were inoculated on Müller Hinton agar (MHA) and the fungi cultures on Sabouraud agar (SAB) using sterilized cotton swabs (6 mm). In each plate, wells were cut out using a sterilized gel borer and 100 µl of biosynthesized AgNPs were used as a test sample against clinical isolates. Inoculated plates were incubated at 37 °C for 24 hours. After incubation, the plates were examined for the presence of an inhibition zone around the wells.

2.5.2 Minimum Inhibitory Concentration (MIC) determination

The antibacterial activity of AgNPs was tested against three bacterial strains: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Gram-positive), Methicillin-Resistant *S. aureus* ATCC 43300 (MRSA) (Gram-positive) and *Escherichia coli* CBAM 0001 (Gram-negative). Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was determined according to Quelemes et al. (2013) method using 96-well microdilution plates, where the strains (concentration of 5×10^5

CFU/mL) were exposed to two-fold dilution series of AgNPs solution with concentrations ranging from 0.97 to 500 μ M. The same procedure was used to determine the MIC of AgNO₃ (control). MIC was defined as the lowest concentration of agent that restricted the bacterial visible growth. All assays were performed in triplicate.

2.6 Atomic Force Microscopy Analysis (AFM)

The MIC value of *Streptomyces* that showed the best antimicrobial action of AgNPs against *S. aureus* ATCC 25923 was again determined with concentrations ranging from 0.975 to 500 μ M. A more concentrated inoculum of 1×10^8 CFU/mL was used in each well to better observation by AFM. After incubation for 24 hours, 30 μ L of the culture media containing MIC-treated or MIC-untreated bacteria were deposited into a clean glass surface and dried in bacteriological incubator at 35 °C for 10 min. The samples were gently rinsed twice with 1 mL of deionized water to remove salt crystals and dried again at the same described conditions before AFM analysis. All samples were prepared at the same time, exposed to the same conditions and examined within 8 hours of deposition. AFM was carried out with a TT-AFM microscope from AFM Workshop (USA). The analysis of the effect of AgNPs on *S. aureus* cells was carried out in vibrating mode, using NSG10 cantilevers (NT-MDT) with resonant frequency of approximately 280 kHz. Images were analyzed using Gwyddion software 2.33. Multiple areas of each sample were examined and representative images were shown.

2.7 Mammalian Cell Proliferation Assay – Real-Time Cell Analyzer (RTCA)

To investigate the effects of silver nanoparticles from *Streptomyces* that showed the best MIC on cell proliferation, murine fibroblast cell line NIH-3T3 (ATCC number 1658) was used. Cells were maintained in 25 cm² culture flasks (TPP, Switzerland) at 37 °C, in 5% (v/v)

CO₂, in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Sigma-Aldrich) medium supplemented with 10% (v/v) heat inactivated fetal bovine serum (Invitrogen, USA); 100 IU/mL penicillin; and 100 µg/mL streptomycin.

For proliferation assays a Real-Time Cell Analyzer (xCELLigence RTCA DP instrument - Roche) was used. Twenty four hours previous the nanoparticle exposure (t=-24 hours), 5000 cells/well were seeded in E-plates. This first procedure aims to allow cell attachment before treatments. At t=0 hour, cells (n=3 well per treatment) were exposed to different silver nanoparticle concentrations (control = 0 µM, 1 µM, 10 µM, 50 µM, 100 µM) and the proliferation pattern was followed for 70 hours. The primary results were expressed by a Cell Index that is correlated with the number of cells attached in plate bottom, and is a strong indication of cell proliferation. The statistical analyses were conducted in two ways:

(1) Comparisons of the area under the curve (AUC) of Cell Index versus Time from the different experimental groups. The analyses of variance (ANOVA) were made followed by Dunnett's test (p<0.05) among the experimental groups;

(2) Determination of the LC50% (lethal concentration for 50% of exposed cells). For that, a nonlinear curve between the cell index and the log of nanoparticle concentration was calculated for different time points. A curve with some of those results was produced to observe the evolution of LC50% along the exposure time.

3. Results and discussion

3.1 Characterization of cultures

The pure colonies were authenticated after reactivation as *Streptomyces* sp. DPUA 1549, *Streptomyces* sp. DPUA 1747 and *Streptomyces* sp. DPUA 1748. *Streptomyces* sp. DPUA 1549 varied the mycelium colour from white to light gray with pigment production; in

Streptomyces sp. DPUA 1747 was not observed pigment production; and *Streptomyces* sp. DPUA 1748 showed united colonies without fragmentation, reverse cream, brown mycelium land, without exudate, rough and overlapping edges (**Figure 1**).

3.2 Identification of the microorganism

The comparison of rRNA sequences is a particularly powerful tool in Streptomycetes family taxonomy (Anderson and Wellington 2001). Comparison of the 16S rDNA sequences of cultures with the GenBank database showed that these isolates belong to the genus *Streptomyces* with 100% homology.

The sequence of *Streptomyces* sp. DPUA 1549, *Streptomyces* sp. DPUA 1747 and *Streptomyces* sp. DPUA 1748 revealed high similarity with *Streptomyces parvulus*, *Streptomyces seoulensis* and *Streptomyces owasiensis*, respectively.

3.3 Synthesis and Characterization of Nanoparticles

The use of UV visible spectra in the AgNPs characterization allowed the observation of absorptions from 420 to 445 nm. These references are attributed to plasmonic bands of silver nanoparticles that present spherical shape (Narasimha et al. 2013) (**Figure 2**).

The visible-UV spectrum of DPUA 1549, 1747 and 1748 presented values of $\lambda_{\max}$ close to each other. However, was observed a band enlargement of *Streptomyces owasiensis* DPUA 1748 suggesting a dimension rise of the AgNPs obtained. No color change was observed in the culture filtrated without silver nitrate.

Transmission electronic microscopy has proportioned a detailed view about size and morphology of AgNPs. TEM images of *Streptomyces* sp. DPUA 1549, DPUA 1747 and DPUA 1748 from aqueous solution are demonstrated in **Figure 3 (A, B and C)**. The

nanoparticles presented spherical shape with bigger diameters of DPUA 1748, confirming with data obtained from DLS and UV-vis.

The obtained results in TEM study indicated that the nanoparticles are single spread with average size from 1-40 nm. Also was observed the particles involved by an organic matrix layer acting as covering agent to the silver nanoparticles (Basavaraja et al. 2008). According to Golinska et al. (2014), nanoparticles stabilization is necessary to avoid aggregation and protecting its properties.

Golinska et al. (2014) and Narasimha et al. (2013) report that metallic nanoparticles biologically synthesized are more stable and disperse better presenting a secreted coverage by these biological systems. Some studies that used biological systems confirmed the presence of proteins as stabilization agents of metallic nanoparticles (Golinska et al. 2014; Ingle et al. 2014; Prakashan et al. 2012).

Silver nanoparticles TEM analysis corroborate with the results presented by Manivasagan et al. (2013), suggesting that AgNPs were synthesized due the action of Actinomycetes free cells extracts as bioreducers in this process.

Data of Dynamic Light Dispersion (DLS) demonstrated that the average particles size of *Streptomyces* sp. DPUA 1549, DPUA 1747 and DPUA 1748 were 100 nm, 121 nm and 160 nm, respectively. An unimodal distribution and low values of polydispersion to the systems was observed (**Figure 3D**).

Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) was used to confirm the obtained results by DLS (**Figures 4 A, B and C**) and they are in agreement to all samples analyzed. NTA values were 116 nm, 115 nm and 120 nm to DPUA 1549, DPUA 1747 and DPUA 1748, respectively, confirming the existence of only one population of nanoparticles without significant size variations between them.

The value of zeta potential of silver nanoparticles from *Streptomyces* sp. DPUA 1549, DPUA 1747 and DPUA 1748 were -20,3 mV, -6,77 mV and -7,94 mV, respectively (**Table 1**). The highest negative zeta potential of *Streptomyces parvulus* DPUA 1549 may be attributed due a high silver oxide concentration.

Table 1.

FTIR spectra of DPUA 1549, DPUA 1747 and DPUA 1748 silver nanoparticles presented bands in 3416, 2940, 1634 and 1054 cm^{-1} that can be attributed to vibrations of symmetric stretching of primary amine, non-symmetric stretching of C-H and stretching due – C=O and C-O-C groups, respectively. These results also suggest the presence of amino acids and peptides residues which are capable to link to metal, suggesting that biological molecules could play a function to formation and stabilization of silver nanoparticles in aqueous medium (Basavaraja et al. 2008; Narasimha et al. 2013;).

The XDR method was used to determinate and confirm the crystalline structure of the synthesized nanoparticles. *Streptomyces parvulus* DPUA 1549 showed peaks in 38°, 44°, 66°, 78° and 81° of 2 θ which describes the presence of planes (111), (200), (220), (222) and (311) of face-centred cubic silver nanoparticles structure. The presence of silver oxide in 33° and in 55° in the study of Feng et al. (2000) was described. These values are in agreement to those obtained by JCPD (Joint Committee on Powder Diffraction, standard file n°. 04-0783) and a similar XDR pattern with *Streptomyces seoulensis* DPUA 1747. In *Streptomyces owasiensis* DPUA 1748 a low content of silver nanoparticles and silver oxide mixture indicated a low reactivity of this culture biocompounds with silver nitrate.

3.4 Antimicrobial Activity

Silver (Ag) is a metallic element presenting antimicrobial properties against several micro-organisms as fungi, Gram-positive and Gram-negative bacteria. The antimicrobial activity of AgNPs can be more effective for being extremely small particles and show high superficial area and volume ratio (Jung et al. 2008; Tamboli and Lee, 2013).

The AgNPs from *Streptomyces parvulus* DPUA 1549 and *Streptomyces owasiensis* DPUA 1748 presented antagonist action, in a large spectrum, against all pathogenic micro-organisms tested (bacteria and yeasts). The inhibition zones varied from 12 to 34 mm (**Table 2**) with significative values of DPUA 1549 against *S. aureus*. The synergic effect of AgNPs promoted an inhibition raise against the micro-organisms test. Manivasagan et al. (2013) and Chauhan et al. (2013) proposed that the antibiotic molecules produced by Actinomycetes contain several active groups as hidroxile and amide that can easily react with AgNPs by chelation. It suggests that this reaction can raise the growth inhibition of bacterial cells.

Table 2.

MIC assay had the proposal to determinate the lowest concentration of AgNPs produced capable to inhibit microbial growth of pathogens. The AgNPs produced in aqueous solution by *Streptomyces parvulus* DPUA 1549 showed synergic effect with high efficiency in low values of concentration against the tested Gram-negative bacteria *E. coli* CBAM 001, Gram-positive bacteria *S. aureus* ATCC 25923 and the methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA ATCC 43300) (**Table 3**). Besides, an important result is the most effective action of the AgNPs against these Gram-positive bacteria. Others studies demonstrated an antagonistic action against Gram-negative and Gram-positive pathogens (Kumar et al. 2015; Zonooz and Salouti 2011). The negative zeta potential (-20.37) and size of nanostructures (100 nm) of

Streptomyces parvulus DPUA 1549 sample was lower compared to the others tested samples, confirming the results of MIC. According to Kumar et al. (2015) and Kaviya et al. (2011) the antimicrobial activity of colloidal AgNPs is influenced by particles dimensions. Durán et al. (2010) reports that silver nanoparticles obtained in different formulations, sizes and shapes exhibit variable antimicrobial activity.

Table 3.

After previous observation of AgNPs antimicrobial action by MIC, the particles of *Streptomyces parvulus* DPUA 1549 were selected to analyze the structural effect against *S. aureus* ATCC 25923 using Atomic Force Microscopy (AFM). The micrographs of *S. aureus* ATCC 25923 incubated without AgNPs showed that the bacteria remained structurally intact (**Figure 5A**) while the bacteria treated with AgNPs lost the structural integrity of the membrane (**Figure 5B**).

Although the antimicrobial action mechanism of AgNPs not being totally understood, many reports demonstrate that the silver interaction and bacterial membrane components caused structural damage to these cells (Jung et al. 2008; Pal et al. 2007).

According to literature data there are some possible action mechanisms to the AgNPs activity: membrane structural damages; decreasing cell viability due interaction with cofactors and ions; inhibition of DNA replication and, consequently, the protein expression; and the inactivation of some essential enzymes to ATP production (Durán et al. 2010). Li et al. (2011) reported that AgNPs act on membrane permeability. After treatment of bacteria with AgNPs, they seemed suffer lyses occurring rupture of cell wall which resulted in the release of cellular contents to the external environment.

Although there are reports related to AgNPs action against *S. aureus*, there are no references that detail all the mechanisms associated to this activity (Jung et al., 2008). Modrzejewska et al. (2010) described that AgNPs act in several different ways in bacteria physiology. For that reason, these particles difficult the microbial ability to enhance defense mechanisms, decreasing the resistant strains. Pal et al. (2007) and Shang et al. (2014) affirmed that AgNPs interaction with cell membrane depends on the surface availability. If the nanoparticles are small, the antimicrobial effect can be higher. The AgNPs synthesized by *Streptomyces parvulus* DPUA 1549 might be loaded with antibiotic substances during biosynthesis and produce small bionanoparticles which demonstrate more efficient antibiotic effect.

3.5 Cytotoxic Effects - Mammalian Cell Proliferation Assay

Based on AgNPs antimicrobial activity, cytotoxic activity of the sample was conducted. Mammalian cell proliferation assay after treatment with different concentrations of silver nanoparticles from *Streptomyces parvulus* DPUA 1549 showed that all concentrations evaluated impaired NIH-3T3 cell proliferation. In **Figure 6A**, is possible to observed a concentration dependent manner of this proliferation impairment, however in the AUC analyses (**Figure 6B**) no significant differences were observed among the nanoparticle treatments, although all of them presented significant reduction ($p < 0.05$) compared to the control. In addition, was observed time dependent proliferation impairment. In **Figure 6C** can be observed the reduction of LC50% along the time, results that indicate that the potential cytotoxic activity of this nanomaterial is also dependent upon time. Silver nanoparticles used as antimicrobial agent are gaining highlight in applications, especially in medical areas (Vivek et al. 2012). There are not many studies testing the cytotoxic effects of synthesized biologically AgNPs from *Streptomyces* against proliferation of mammalian cancer cells.

4. Conclusion

AgNPs biosynthesis of *Streptomyces* was proved by spectroscopic characterization of UV–Visible, DLS, RDX, FTIR and TEM. The AgNPs expressed activity against bacteria, specially the Gram-positive ones. *Streptomyces parvulus* DPUA 1549 silver nanoparticles were the most efficient promoting cell superficial damage in bacteria. Low MIC was also effective against multiresistant *S. aureus*. This scientific evidence demonstrated that biogenic AgNPs were effective and can be considered as a promising antimicrobial agent against multiresistant bacteria and also reducing the proliferation of NIH-3T3 cells in the cytotoxic assay. This potential favors the application of these nanoparticles in the elaboration of products to be used in medical and cosmetic industries.

Acknowledgements

The authors thank to Federal University of Amazonas-UFAM, Amparo of the Amazonas State Research Foundation-FAPEAM and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel-CAPES for the financial support e contribution to the development of this research.

References

- Abdeen, S., Geo, S., Sukanya, Praseetha, P.K., Dhanya, R.P. 2014. Biosynthesis of Silver nanoparticles from Actinomycetes for therapeutic applications. *Int. J. Nano Dimens.* **5**(2): 155-162.
- Alani, F., Moo-Young, M., Anderson, W. 2012. Biosynthesis of silver nanoparticles by a new strain of *Streptomyces* sp. compared with *Aspergillus fumigates*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **28**: 1081-1086.
- Anderson, A.S., and Wellington, E.M.H. 2001. The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *Int J Syst Evol Microbiol.* **51**: 797–814.
- Basavaraja, S., Balaji, S.D., Legashetty, A., Rasab, A.H., and Venkatraman. 2008. A. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium semitectum*. *Mater Res. Bull.* **43**: 1164–1170.
- Biglari, S., Gholam, H.S., Gholam, R.S. 2014. Production of gold nanoparticles by *Streptomyces djakartensis* isolate B-5. *Nanomed. J.* **1**(4): 229-237.
- Chauhan, R., Kumar, A., Abraham, J. 2013. A biological approach to the synthesis of silver nanoparticles with *Streptomyces* sp JAR1 and its antimicrobial activity. *Sci. Pharm.* **81**: 607–621.

1 Chemat, F., and Strube, J. 2015. Green Extraction of Natural Products: Theory and Practice.
2 John Wiley & Sons, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Boschstr: 12, 69469
3 Weinheim, Germany. 300 p.

4
5 De Lima, R., Seabra, A.B., Durán, N. 2012. Silver nanoparticles: a brief review of
6 cytotoxicity and genotoxicity of chemically and biogenically synthesized nanoparticles. J.
7 Appl. Toxicol. **32**: 867-879.

8
9 Durán, N., Marcato, P.D., Souza, G., Alves, O.L., Esposito, E. 2007. Antibacterial effect of
10 silver nanoparticles produced by fungal process on textile fabrics and their effluent treatment .
11 J. Biomed. Nanotechnol. **3**: 203-208.

12
13 Durán, N., Marcato, P.D., De Conti, R., Alves, O.L., Fabio, T.M., Costa, M.B. 2010. Potential
14 use of silver nanoparticles on pathogenic bacteria, their toxicity and possible mechanisms of
15 action. J. Braz. Chem. Soc., **21**(6): 949-959.

16
17 Durán, N., Marcato, P.D. 2012. Biotechnological routes to metallic nanoparticles production:
18 mechanistics aspects, antimicrobial activity, toxicity and industrial applications. In Nano-
19 Antimicrobials: Progress and Prospects (M. Rai and N. Cioffi, Eds). Springer, Germany, Part
20 **3**: 337-374.

21
22 Evelyne, R.J., Subbiayh, R. 2014. Biosynthesis of Silver Nanoparticles from *Streptomyces*
23 *olivaceous* and its antimicrobial activity. Int. J. of Pharma Research and Health Sciences. All
24 rights reserved. **2**(2): 166-172.

1 Feng, Q.L., Wu, J., Cheng, G.Q., Cui, F.Z., Kim, T.N., Kim, J.O. 2000. A mechanistic study
2 of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. J.
3 Biomed. Mater. **52**(4): 662–668.

4
5 Golinska, P., Wypij, M., Ingle, A.P., Gupta, I., Dahm, H., and Rai, M. 2014. Biogenic
6 synthesis of metal nanoparticles from actinomycetes: biomedical applications and
7 cytotoxicity. Appl. Microbiol. Biotechnol. **98**: 8083–8097.

8
9 Ingle, A.P., Durán, N., Rai, M. 2014. Bioactivity, mechanism of action, and cytotoxicity of
10 copper-based nanoparticles: A review. Appl Microbiol Biotechnol. **98**: 1001–1009.

11
12 Jung, W.K., Koo, H.C., Kim, K.W., Shin, S., Kim, S.H., Park, Y. 2008. H. Antibacterial
13 activity and mechanism of action of the silver Ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia*
14 *coli*. Appl. Environ. Microbiol. Apr. 2171–2178.

15
16 Karthik, L., Kumar, G., Kirthi, A.V., Rahuman, A.A., Rao, K.V.B. 2014. *Streptomyces* sp.
17 LK3 mediated synthesis of silver nanoparticles and its biomedical application. Bioprocess
18 Biosyst. Eng. Bioprocess Biosyst. **37**: 261–267.

19
20 Kaviya, S., Santhanalakshmi, J., Viswanathan, B. 2011. Green Synthesis of silver
21 nanoparticles using *Polyalthia longifolia* Leaf extract along with D-Sorbitol. J.
22 Nanotechnology. 1-5.

- 1 Kumar, P. S., Balachandran, C., Duraipandiyan, V., Ramasamy, D., Ignacimuthu S., Al-
2 Dhabhi, N. A. 2015. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticle using *Streptomyces* sp. 09
3 PBT 005 and its antibacterial and cytotoxic properties Appl Nanosci. **5**: 169–180.
4
- 5 Lechevalier, M.P., Lechevalier, H.A. 1989. Genus *Frankia* Brunchorst 1886, 174^{AL}, 2410-
6 2417. In S. T. Williams, M. E. Sharpe, J. G. Holt (Eds.), Bergey's manual of systematic
7 bacteriology, vol. 4. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
8
- 9 Li, W., Xie, X., Shi, Q., Duan, S., Ouyang, Y., Chen, Y. 2011. Antibacterial effect of silver
10 nanoparticles on *Staphylococcus aureus*. Biometals. **24**: 135–141.
11
- 12 Manikprabhu, D., and Lingappa, K. 2013. Antibacterial activity of silver nanoparticles against
13 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* synthesized using model *Streptomyces* sp.
14 pigment by photo-irradiation method. Journal of Pharmacy Research. 255-260.
15
- 16 Manivasagan, P., Venkatesan, J., Senthilkumar, K., Sivakumar, K., Kim, S. 2013.
17 Biosynthesis, antimicrobial and cytotoxic effect of silver nanoparticles using a Novel
18 *Nocardiosis* sp. MBRC-1. BioMed. Research International. vol. 2013. Article ID 287638,
19 9p.
20
- 21 Mishra, A., Kumari, M., Pandey, S., Chaudhry, V., Gupta, K.C., Nautiyal, C.S. 2014.
22 Biocatalytic and antimicrobial activities of gold nanoparticles synthesized by *Trichoderma* sp.
23 Bioresour. Technol. **166**: 235–242.
24

- 1 Modrzejewska, Z., Zarzycki, R., Sielski. 2010. Synthesis of Silver Nanoparticles in a
2 Chitosan Solution. J. Progress on chemistry and application of chitin and its derivatives. **15**:
3 63-72.
- 4
- 5 Narasimha, G., Janardhan, Alzohairy, M., Khadri, H., Mallikarjuna, K. 2013. Extracellular
6 synthesis, characterization and antibacterial activity of silver nanoparticles by actinomycetes
7 isolative. Int. J.Nano Dimens. **4**: 77-83.
- 8
- 9 Pal, S., Tak, Y.K., Song, J.M. 2007. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles
10 depend on the shape of the nanoparticle? A study of the Gram-negative bacterium *Escherichia*
11 *coli*. Appl. Environ. Microbiol. **73**: 1712-1720.
- 12
- 13 Prakasham, R.S., Buddana, S.K., Yannam, S.K., Guntuko, S.K. 2012. Characterization of
14 silver nanoparticles synthesized by using marine isolate *Streptomyces albidoflavus*. J.
15 Microbiol. Biotechnol. **22**: 614-621.
- 16
- 17 Quelemes, P.V., Araruna, F.B., De Faria, B.E.F., Kuckelhaus, S.A.S., Da Silva, D.A.,
18 Mendonça, R.Z., Eiras, C., Soares, M.J.S., Leite, J.R.S.A. 2013. Desenvolvimento e atividade
19 antibacteriana de nanopartículas de prata à base de goma do cajueiro. Int. J. Mol. Sci. **14**:
20 4969-4981.
- 21
- 22 Rai, M., Ingle, A.P., Gupta, I.R., Birla, S.S., Yadav, A.P., Abd-Elsalam, K.A. 2013. Potential
23 role of biological systems in formation of nanoparticles: mechanism of synthesis and
24 biomedical applications. Curr. Nanosci. **9**: 576-587.
- 25

- 1 Samundeeswari, A., Dhas, S.P., Nirmala, J., John, S.P., Mukherjee, A., Chandrasekaran, N.
2 2012. Biosynthesis of silver nanoparticles using actinobacterium *Streptomyces albogriseolus*
3 and its antibacterial activity. Biotechnol. Appl. Biochem. **59**: 503–507.
4
- 5 Shang, L., Nienhaus, K., Gerd, U.N. 2014. Engineered nanoparticles interacting with cells:
6 size matters. J. of Nanobiotechnol. **12**(5): 2-11.
7
- 8 Selvakumar, P., Prakash, S., Jasminebeaula, S., Uloganathan, R. 2012. Antimicrobial activity
9 of extracellularly synthesized silver nanoparticles from marine derived *Streptomyces rochei*.
10 Int. J. Pharm. Bio. Sci. **3**: 188-197.
11
- 12 Silva-Vinhote, N.M., Marinho-Pereira, T., Astolfi-Filho, S., Matsuura, T. 2011. Taxonomic
13 characterization and antimicrobial activity of actinomycetes associated with foliose lichens
14 from the amazonian ecosystems. Australian J. Basic Appl. Sci. **5**: 910-918.
15
- 16 Sivalingam, P., Antony, J.J., Siva, D., Achiraman, S., Anbarasu, K. 2012. Mangrove
17 *Streptomyces sp.* BDUKAS10 as nanofactory for fabrication of bactericidal silver
18 nanoparticles. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. **98**: 12-17.
19
- 20 Tamboli, D.P., Lee, D.S. 2013. Mechanistic antimicrobial approach of extracellularly
21 synthesized silver nanoparticles against gram positive and gram negative bacteria. J. Hazard.
22 Mater. **260**: 878- 884.
23
- 24 Thakkar, K.N., Mhatre, S.S., Parikh, R.Y. 2010. Biological synthesis of metallic
25 nanoparticles. Nanomed. Nanotechnol. Biomed. **6**: 257-262.

- 1 Vivek, R., Thangam, R., Muthuchelian, K., Gunasekaran, P., Kaveri, K., Kannan, S. 2012.
2 Green biosynthesis of silver nanoparticles from *Annona squamosa* leaf extract and its *in*
3 *vitro* cytotoxic effect on MCF-7 cells. *Process Biochem.* **47**: 2405–2410.
4
- 5 Waksman, S.A., Woodruff, H.B. 1941. *Actinomyces antibioticus* a new soil organism
6 antagonistic to pathogenic and non-pathogenic bacteria. *J. Bacteriol.* **42**: 231-249.
7
- 8 Zonooz, N.F., Salouti, M. 2011. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using cell
9 filtrate of *Streptomyces* sp. ERI-3. *Scientia Iranica Transactions F: Nanotechnology* **18**: 1631–
10 1635.

- 1 **Table 1.** Physical chemistry parameters of AgNPs Diameter calculated (mean $\pm$ standard
 2 deviation) by DLS, Zeta Potential, and PDI of AgNPs biosynthesized by *Streptomyces* sp.

AgNPs	Diameter (nm)	Zeta Potential (mV)	PDI*
<i>Streptomyces parvulus</i> DPUA 1549	100.34 $\pm$ 0.7	-20,37	0.180
<i>Streptomyces seoulensis</i> DPUA 1747	121.20 $\pm$ 1.7	-6.77	0.205
<i>Streptomyces owasiensis</i> DPUA 1748	160.77 $\pm$ 1.65	-7.94	0.200

- 3 *PDI: Polydisperity Index.

1 **Table 2.** Qualitative antimicrobial activity assay against micro-organisms test.

Samples AgNPs	Micro-organisms					
	Ec	Sa	Ms	Ca	Cat	Cav
<i>Streptomyces parvulus</i> DPUA 1549	S20	S34	S27	S24	S14	S15
<i>Streptomyces seoulensis</i> DPUA 1747	S13	S23	R	R	S12	S13
<i>Streptomyces owasiensis</i> DPUA 1748	S15	S29	S16	S28	S15	S15

- 2 Ec = *Escherichia coli* CBAM 001, Sa = *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, Ms =
- 3 *Mycobacterium smegmatis* INCQS 061, Ca = *Candida albicans* DPUA 1706, Cat = *Candida*
- 4 *atlantica* DPUA 1323, Cav = *Candida valderwaltii* DPUA 1327, R = resistant (there was no
- 5 development of the inhibition halo), S = sensible (was development of the inhibition halo).

Table 3. Quantitative Antimicrobial Assays. Minimum Inhibitory Concentrations (MIC's) of AgNPs and AgNO₃ on *S. aureus* MRSA ATCC 43300, *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* CBAM 001.

AgNPs and Control	<i>S. aureus</i> MRSA ATCC 43300 μM	<i>S. aureus</i> ATCC 25923 μM	<i>E. coli</i> CBAM 001 μM
<i>Streptomyces parvulus</i> DPUA 1549	1.95	1.95	31.25
<i>Streptomyces seoulensis</i> DPUA 1747	250	250	62.5
<i>Streptomyces owasiensis</i> DPUA 1748	125	125	62.5
AgNO ₃	125	62.5	125

Figure 1. Macroscopic aspects of *Streptomyces parvulus* DPUA 1549 (A), *Streptomyces seoulensis* DPUA 1747, and *Streptomyces owasiensis* DPUA 1748 (C) colonies, respectively.

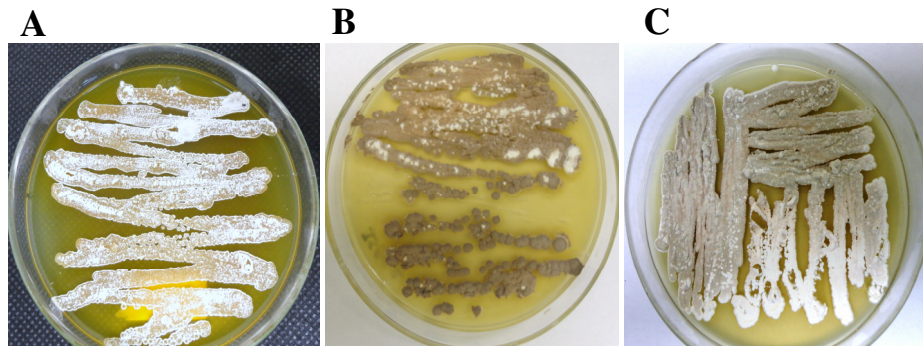


Figure 2. UV-vis absorption spectra of silver nanoparticles biosynthesized by *Streptomyces* (DPUA 1549, DPUA 1747 and DPUA 1748) with peaks at 444 nm, 431 nm and 430 nm, respectively.

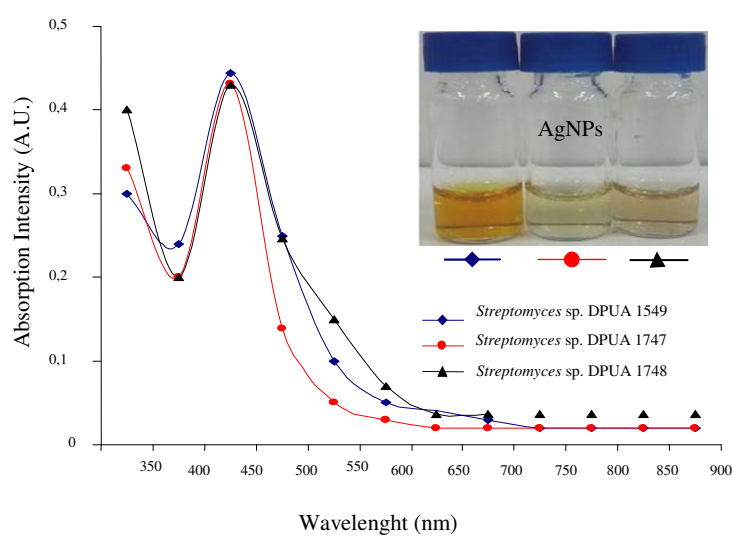


Figure 3. TEM images of AgNPs from *Streptomyces parvulus* DPUA 1549 (A), *Streptomyces seoulensis* DPUA 1747 (B) and *Streptomyces owasiensis* DPUA 1748 (C). (Scale bar=200 nm). (D) Particle size distribution of AgNPs: DPUA 1549 (d, 100.34±0.7 nm), DPUA 1747 (d, 121.20±1.7 nm), DPUA 1748 (d, 160.77±1.65 nm) by DLS.

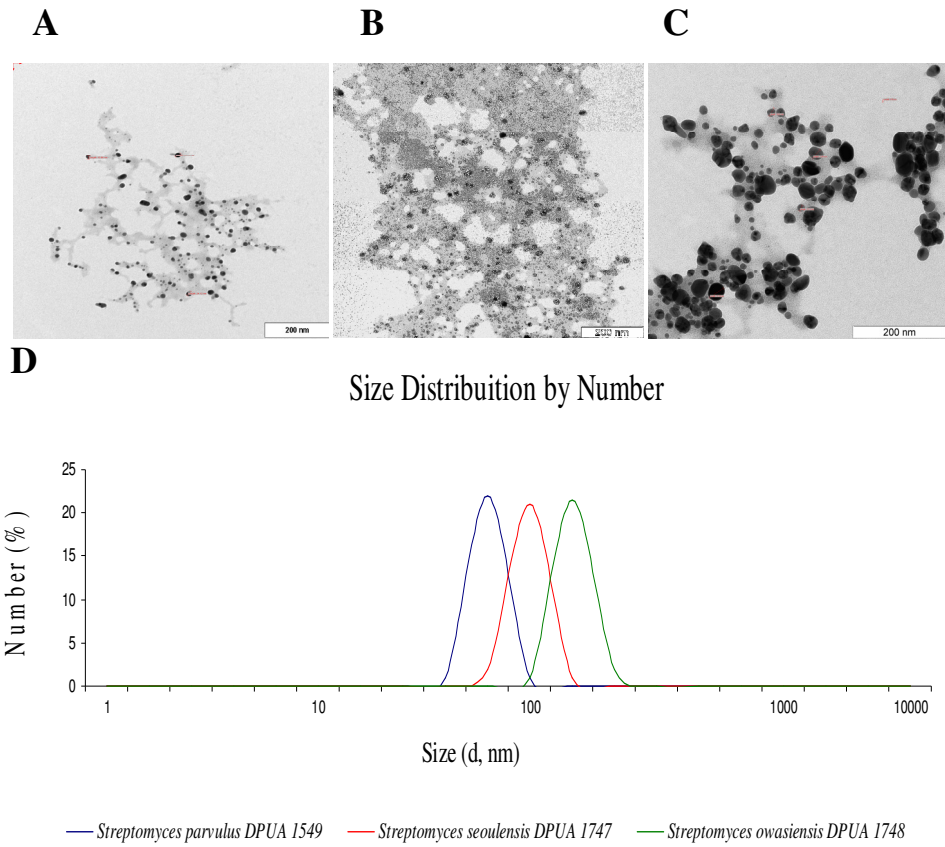


Figure 4. Size distribution graphics by NTA method of AgNPs. *Streptomyces parvulus* DPUA 1549 (A); *Streptomyces seoulensis* DPUA 1747 (B) and *Streptomyces owasiensis* DPUA 1748 (C).

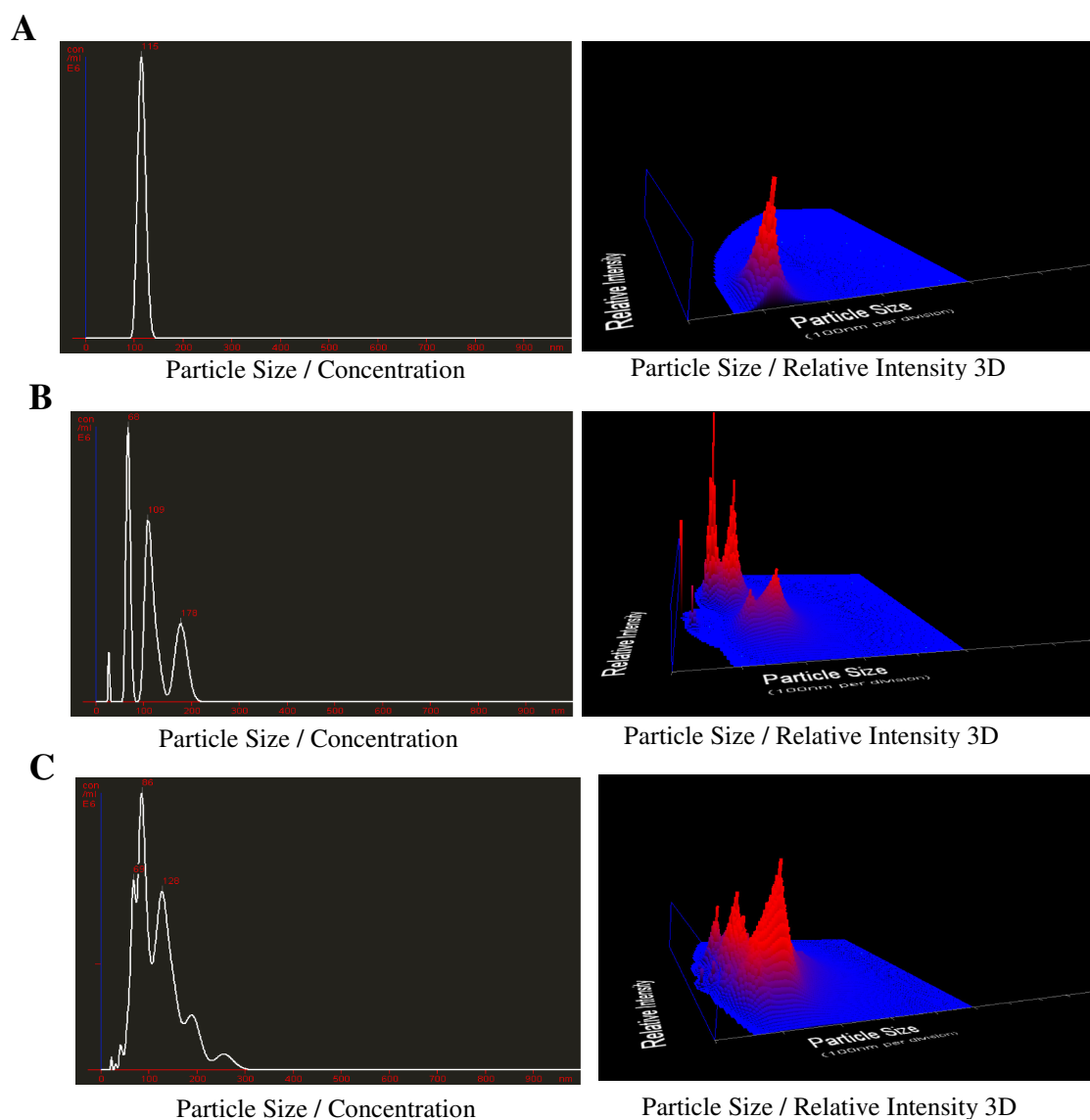


Figure 5. Effect of AgNPs from *Streptomyces parvulus* DPUA 1549 against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 cells. (A) Cells control and (B) *S. aureus* cells after 24 hours of treatment with AgNPs (1.95 μM) at the Minimal Inhibition Concentration (MIC).

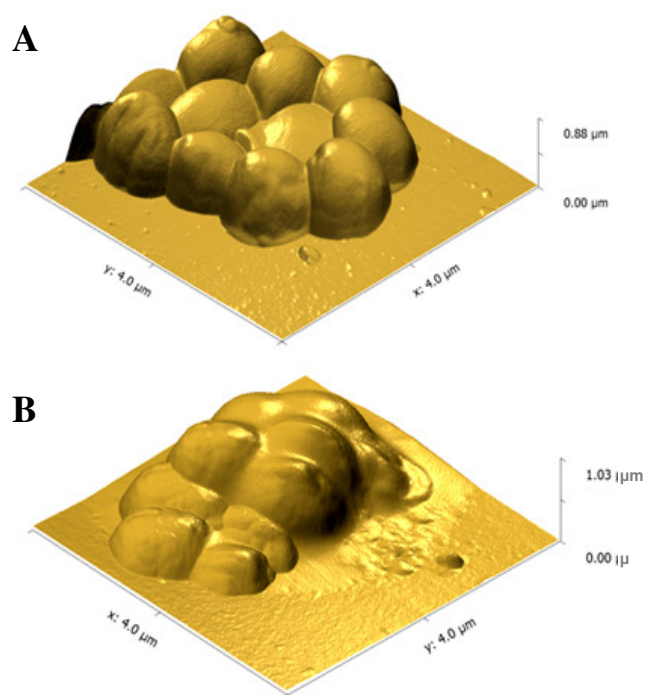
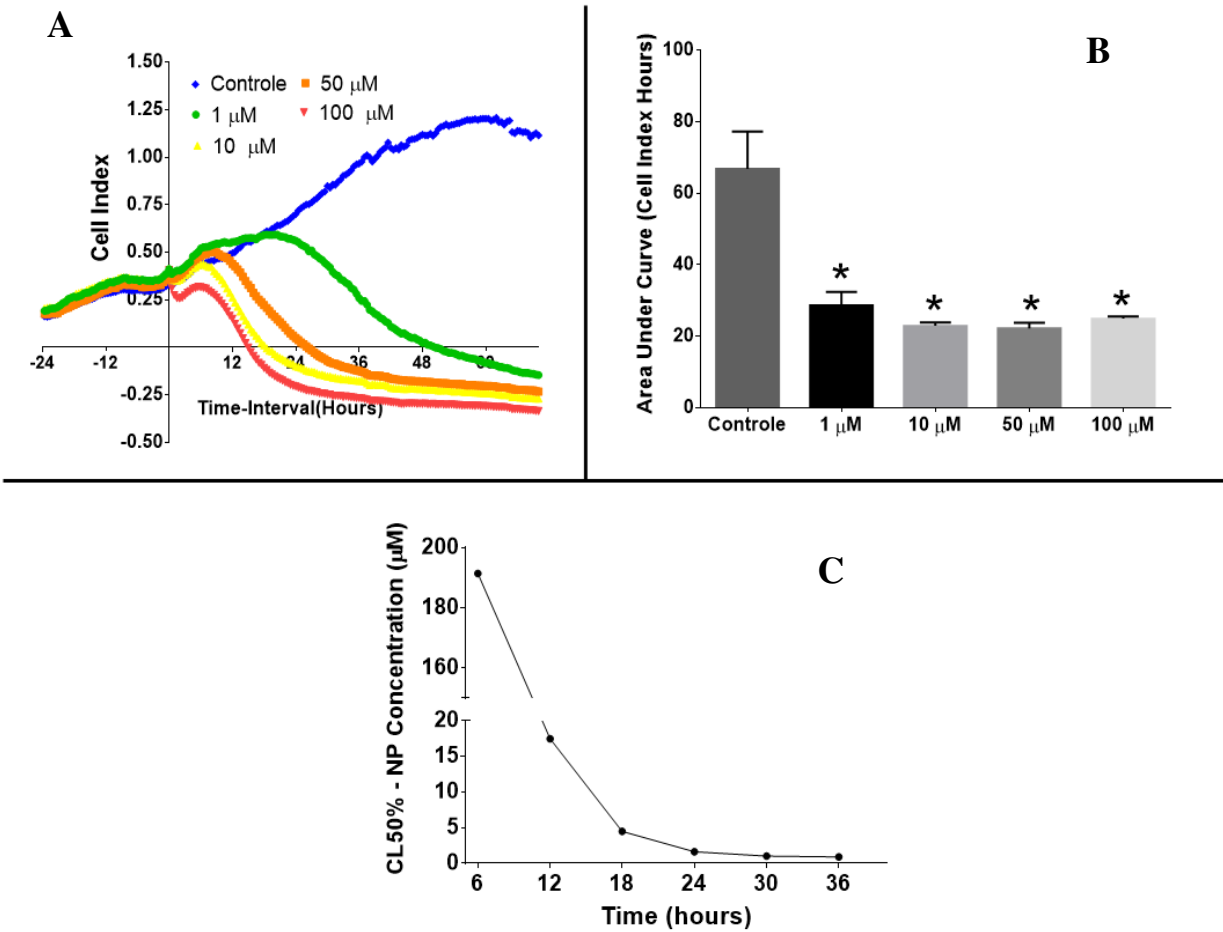


Figure 6. Murine Fibroblast (NIH-3T3) proliferation after treatment with different concentrations of silver nanoparticles from *Streptomyces parvulus* DPUA 1549. NIH-3T3 cell proliferation (Cell Index) after different treatments (A); Area Under Curve (cell index vs hours) of the different treatments. *Denotes statistically significant difference ($p<0.05$) compared to control (B). A correlation between LC50% and time of exposure (C).



CONCLUSÃO GERAL

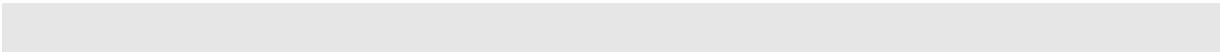
A nanobiotecnologia representa uma perspectiva moderna e inovadora para desenvolver e testar novas formulações à base de nanopartículas metálicas, com destaque as nanopartículas de prata. O que torna esta área de grande relevância, tendo em vista a possibilidade de criar novos fármacos com propriedades antimicrobianas mais eficazes. Para conseguir isso, o uso de fontes de recursos naturais, como os sistemas biológicos tornou-se essencial, como exemplo, a utilização de micro-organismos do grupo dos actinomicetos.

Dessa forma, os resultados conduziram as seguintes conclusões:

- Os actinomicetos reativados mostraram-se viáveis e expressaram as características morfofisiológicas típicas do gênero *Streptomyces* sp. Com a utilização de técnicas moleculares a comparação das sequências do rDNA 16S das culturas testadas com o GenBank database demonstrou que os isolados pertencem de fato ao gênero *Streptomyces*, com 100% de homologia, sendo identificadas as seguintes espécies: *Streptomyces parvulus*, *Streptomyces bullii*, *Streptomyces seoulensis*, *Streptomyces owasiensis*, *Streptomyces malasyensis* e *Streptomyces lavendulae*;
- No processo de fermentação, a massa micelial se mostrou viável para a recuperação do extrato aquoso para biossíntese das AgNPs; no final da biossíntese dos extratos recuperados contendo o AgNO₃, a mudança de cor sugeriu a formação das nanopartículas de prata, assim no UV-vis com o comprimento de onda do característico para AgNPs;
- As AgNPs presentes nos extratos aquosos de *Streptomyces parvulus* DPUA 1549, *Streptomyces seoulensis* DPUA 1747 e *Streptomyces owasiensis* DPUA 1748, demonstraram amplo espectro de ação antimicrobiana frente à *Staphylococcus aureus* (Gram-positiva), *Escherichia coli* (Gram-negativa) e contra as espécies de *Candidas*;
- As amostras promissoras foram caracterizadas quanto as propriedades físico-químicas, quanto a forma, tamanho e carga superficial, tendo em vista a possibilidade de elucidar os efeitos biocidas das AgNPs;

- As AgNPs dos actinomicetos promissores apresentaram forma esférica e tamanhos variando entre 1-40 nm. Contudo, entre estas três nanopartículas, as originárias de *Streptomyces* sp. DPUA 1549 foram as mais eficientes, apresentando MIC frente a *S. aureus*, em baixas concentrações (1,95 μ M);
- Por meio das imagens visualizadas em AFM foi possível observar os danos estruturais à membrana celular de *S. aureus*. Nos testes de toxicidade as AgNPs reduziram a proliferação de células NIH-3T3. Além disso, a atividade citotóxica deste nanomaterial é dependente do tempo;
- E por meio do ICP-OES foi possível comprovar a baixa concentração de Ag (47,7 μ g/mL) na amostra;
- Estas evidências científicas demonstram a potencial aplicação desta amostra na elaboração de produtos para utilização nas indústrias médicas, cosméticas e farmacêuticas.

Vale ressaltar, que a aplicação destas AgNPs ainda não são conclusivas e têm sido extensivamente estudadas, sendo necessários testes adicionais antes que possam ser utilizados clinicamente. Muitas questões cruciais ainda não foram resolvidos, e muitos esforços estão sendo destinados para a definição de procedimentos e materiais padronizados, para uma maior compreensão de como AgNPs interagem com as células de procariotos e eucariotos.



ANEXOS



PRODUÇÃO CIENTÍFICA COMPLEMENTAR

ARTIGO 3

Estudo da Produção de Biocompostos com Atividade Antimicrobiana produzidos por *Streptomyces* sp.

¹Tamiris Rio Branco; ¹Nélly Mara Vinhote Marinho; ¹Bianca Cordeiro de Souza; ¹Rosimar Antunes Palheta; ¹Mircella Marialva Alecrim; ²Valéria de Carvalho Santos Ebinuma ¹Maria Francisca Simas Teixeira*

¹Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas-UFAM, Manaus, Amazonas, AM, Brasil.

²Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de São Paulo-UNESP, Araraquara, SP, Brasil.

*Correspondência Autor: Universidade Federal do Amazonas, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Parasitologia. Av. Gen. Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 3000 - Laboratório de Micologia Aleixo, 69.077-000, Manaus, AM, Brasil. E-mail: mteixeira@ufam.edu.br

ARTIGO 4**Caracterização Molecular de *Streptomyces* spp. Isolados de Fragmento Florestal de Região Tropical com Atividade Antimicrobiana**

¹Nélly Mara Vinhote-Silva; ¹Luiz Felipe da Silva Vieira; ¹Pedro Queiroz; ¹Bianca Cordeiro de Souza; ¹Rosimar Antunes Palheta; ¹Maria Francisca Simas Teixeira*

¹Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas-UFAM, Manaus, Amazonas, AM, Brasil.

*Correspondência Autor: Universidade Federal do Amazonas, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Parasitologia. Av. Gen. Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 3000 - Laboratório de Micologia Aleixo, 69.077-000, Manaus, AM, Brasil. E-mail: mteixeira@ufam.edu.br

ARTIGO 5**AgNPs Biossintetizadas por Actinomicetos Impregnadas em Membrana de Celulose:
potencial para a terapia antimicrobiana**

Nélly Mara Vinhote-Marinho¹; Karen Segala¹; Silvia Vaz Guerra Nista²; Taciana de Amorim Silva¹; Patrícia Andrade²; Nelson Eduardo Duran Caballero³, Maria Francisca Simas Teixeira^{1,*}

¹Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, UFAM, Manaus, Amazonas, AM, Brazil;

²Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brazil.

*Corresponding Author: Universidade Federal do Amazonas, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Parasitologia. Av. Gen. Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 3000 - Laboratório de Micologia Aleixo, 69.077-000, Manaus, AM, Brazil. E-mail: mteixeira@ufam.edu.br