

## NANOBIOTECNOLOGIA VERDE: BIOSÍNTESES DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS E SUAS APLICAÇÕES COMO NANOANTIMICROBIANOS

Mahendra Rai

Tradução de Germana Barata e Diego Stéfani

Existem duas tecnologias importantes no século XXI que desempenharão um papel crucial no desenvolvimento da ciência e da sociedade. Uma delas é a tecnologia da informação que se desenvolveu a partir da virada do século e agora está em progressão, e cujas aplicações têm sido observadas pelo mundo inteiro. A segunda tecnologia, neste contexto, é a nanotecnologia, que desempenhará um papel importante no desenvolvimento de diferentes ciências e tecnologias, devido a suas amplas aplicações. Para o cidadão comum, a nanotecnologia pode ser definida como a manipulação da matéria nos níveis atômico e molecular. A National Nanotechnology Initiative (NNI), que é um programa federal dos Estados Unidos de pesquisa em ciência, engenharia e desenvolvimento tecnológico em nanoescala, define nanotecnologia como a manipulação da matéria com, ao menos, uma dimensão dos objetos que esteja entre 1 a 100 nanômetros (nm). A unidade nanômetro é muito pequena – um nanômetro é igual a  $10^{-9}$  m, ou seja, a bilionésima parte do metro. Se medirmos a largura de um fio de cabelo em nanômetros obteríamos incríveis 80.000 nm. Similarmente, o tamanho da dupla hélice de DNA tem um diâmetro de cerca de 2 nm e quatro átomos de hidrogênio são equivalentes ao tamanho de um nanômetro. Muitos micróbios, como vírus, estão na escala nanométrica.

A nanotecnologia é uma ciência interdisciplinar e existe na natureza desde que a terra evoluiu. Ela atravessa as fronteiras tradicionais do conhecimento da física, química, engenharia, botânica, zoologia e ciências da terra sendo, assim, interdisciplinar. Essa tecnologia tem sido amplamente aceita pelos cientistas, em razão do surgimento de propriedades químicas, mecânicas, magnéticas, químicas, eletrônicas e óticas únicas, dependentes da nanoescala. Além disso, é uma “tecnologia habilitante”. Pode-se mudar a forma e o tamanho das nanopartículas e as propriedades dessas nanopartículas serão igualmente modificadas. Um exemplo interessante é o ouro, que enquanto sólido estendido (*bulk gold*), de tamanho micro ou macroscópico tem a cor amarela. Entretanto, as nanopartículas de ouro possuem cores diferentes de acordo com o tamanho das nanopartículas: partículas de ouro de 100nm apresentam uma cor púrpura-rosado, nanopartículas de 20nm são vermelhas e as de 1nm são de cor marrom-amarelada. Agora emerge a questão, por que as nanopartículas são diferentes quando comparadas ao ouro com tamanho micro/macroscópico? Isto ocorre devido ao surgimento de efeitos quânticos de tamanho.

A nanobiotecnologia é uma ciência de fronteira, é uma ciência avançada e altamente interdisciplinar, sendo a combinação entre nanotecnologia e biotecnologia. A sociedade será altamente beneficiada pela fusão dessas duas tecnologias ao longo deste século, devido às potenciais aplicações em medicina, agricultura, eletrônica, cosméticos, meio ambiente etc.

A nanobiotecnologia verde é enriquecida na medida em que utiliza princípios da química verde para o desenvolvimento sustentável. No entanto, esta ciência está em sua infância e precisa se promover de modo a desenvolver tecnologias ecologicamente corretas e economicamente viáveis, que são as necessidades do momento na direção do desenvolvimento sustentável. Pode-se definir nanobiotecnologia verde quando baseada em princípios limpos de sínteses de nanopartículas, como, por exemplo, a partir de processos biotecnológicos.

**SÍNTESE VERDE É SUSTENTÁVEL** Síntese verde, síntese biológica e síntese biogênica são termos comumente usados para a síntese ecologicamente correta de nanopartículas. Normalmente, as nanopartículas são sintetizadas através de métodos químicos, físicos e biológicos. As sínteses físicas e químicas possuem consumo intensivo de energia e às vezes podem envolver substâncias químicas tóxicas, enquanto as técnicas biológicas são rentáveis, limpas, atóxicas e ecologicamente corretas. A via de síntese biológica tem sido efetuada, sobretudo, através do uso de bactérias, fungos, plantas, cianobactérias e actinomicetos. Existem muitos relatos de micossínteses (síntese via fungos) de nanopartículas metálicas usando diferentes espécies de *Fusarium*, nomeadas como *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Fusarium acuminatum*, *Fusarium culmorum*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus tamarii*, *Phoma glomerata*, *Alternaria alternata*, e fungos endofíticos *Pestalotia sp.* Muitas plantas como o coentro (*Coriandrum sativum*), mamão-papaya (*Carica papaya*), o figo-da-Índia (*Opuntia ficus-indica*), datura ou maça com espinhos (*Datura metel*), árvore do caril (*Murraya koenigii*), e Skunkvine (*Paederia foetida*) têm sido usadas para a síntese de nanopartículas. O método de fitossíntese (síntese via plantas) é rápido, ecologicamente correto e rentável, com processamento *downstream* mais fácil que a micossíntese. Quando comparada à fitossíntese, a micossíntese é mais demorada e a biomassa é difícil de ser processada. Portanto, a fitossíntese chama muito a atenção de pesquisadores de todo o mundo. São três fatores chaves na síntese dessas nanopartículas metálicas: o agente redutor, o meio de reação e o agente estabilizador. Geralmente, nanopartículas biosintetizadas possuem forma esféricas.

Em biossíntese, proteínas de fungos ou plantas agem como agentes de proteção e estabilização das nanopartículas sintetizadas. No entanto, quais proteínas estão envolvidas e quais os mecanismos de formação das nanopartículas são questões importante, que precisam ser meticulosamente estudadas. Nesse sentido, tem sido desenvolvido no Laboratório de Química Biológica do Instituto de Química, da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), sob a direção do professor Nelson Duran, estudos sobre o mecanismo de formação das nanopartículas biogênicas. O professor Nelson Duran e seus colaboradores apresentaram um mecanismo no qual a enzima nitroгена redutase é responsável por reduzir íons de prata em nanopartículas de prata. Essa hipótese tem sido amplamente aceita na literatura.

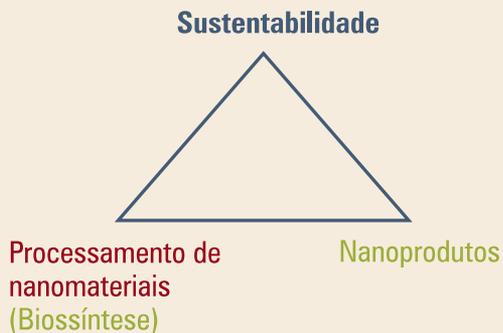


Figura 1 - Fazendo síntese verde e usando nanoprodutos para a sustentabilidade

Síntese verde a partir de extrato de plantas é a técnica mais simples de sintetizar nanopartículas. As plantas produzem biomoléculas funcionais que reduzem ativamente íons metálicos. Além disso, atuam como agentes protetores e estabilizadores das nanopartículas. Alguns exemplos de síntese de nanopartículas de prata utilizando extratos de folhas incluem o uso de alfafa, folhas de gerânio, *Aloe vera* (babosa), *Cinnamomum camphora* (árvore de cânfora), caqui, magnólia, cycas, e *Holarrhena antidysenterica* (Kutij, Kurchi) etc.

Interessantemente, todas as partes das plantas podem ser usadas de modo eficiente para sintetizar nanopartículas, como as folhas,

caules, sementes, frutos, latex etc. A biomassa morta e seca da planta também pode ser usada para a síntese bem sucedida de nanopartículas. Até mesmo compostos bioativos isolados de plantas como polifenólicos, alcaloides, flavonoides e terpenos demonstraram sintetizar nanopartículas.

A biossíntese de nanopartículas usando plantas é uma questão para extensa investigação. No entanto, um mecanismo exato para a síntese de nanopartículas deve ainda ser elucidado, embora inúmeros mecanismos hipotéticos tenham sido propostos por muitos pesquisadores. Absar Ahmad e colegas do Laboratório Nacional de Física (National Physical Laboratory), em Pune, na Índia, sugeriram que a síntese de nanopartículas de ouro ocorre em função da redução de íons de prata pelos açúcares (aldoses) e cetonas presentes nesses extratos.

Trabalhando no Departamento de Engenharia Química e Bioquímica, na Faculdade de Química e Engenharia Química, da Universidade de Xiamen, da República Popular da China, Huang e colegas também apoiaram o fato de a síntese de nanopartículas de prata ocorrer na presença de biomoléculas redutoras presentes no extrato de folhas de *Cinnamomum camphora*. Análise de espectroscopia no infravermelho (FT-IR) também confirmou a presença de grupos funcionais como:  $-C-O-C$ ,  $-C-O-$ ,  $-C=C-$ , e  $-C=O-$ , derivados de vários compostos heterocíclicos. Presumia-se que esses compostos bioativos atuavam como agentes redutores e de proteção de cadeia de nanopartículas de prata. Da mesma forma, a substância filantina extraída de *Phyllanthus amarus* é responsável pela síntese de nanopartículas de ouro e de prata. Os espectros de FT-IR das nanopartículas biosintetizadas descrevem uma mudança na estrutura do grupo metoxi ( $-OCH_3$ ) banda ( $1088\text{ cm}^{-1}$ )

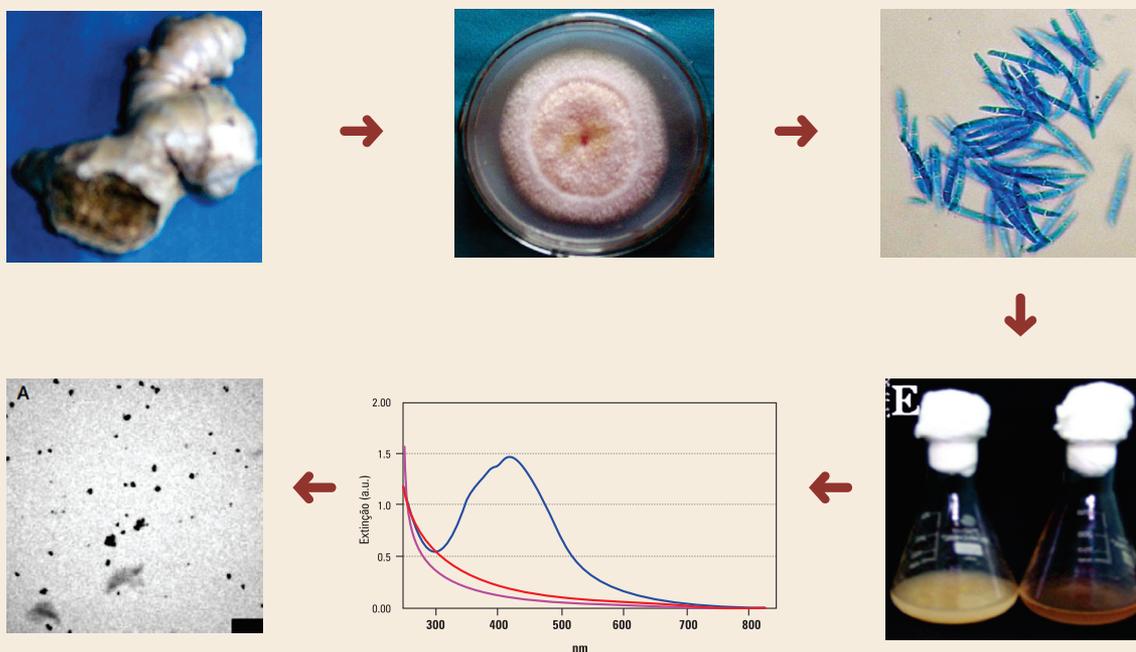


Figura 2 - Mostrando o isolamento da *Fusarium Sp.* do gengibre (*Zingiber officinale*) e a formação de nanopartículas



Extratos de plantas usados para a síntese de nanopartículas de prata. *Holarrhena antidysenterica* (dir.) é usada na medicina tradicional indiana, enquanto a *Cinnamomum camphora* (esq.) é usada como tempero

filantina após a formação de nanopartículas de prata ou de ouro. Essa mudança foi atribuída à ligação com as nanopartículas. No entanto, essa alteração, nas nanopartículas de ouro, era ligeiramente maior do que nas nanopartículas de prata, indicando que a adsorção de filantina na superfície das nanopartículas de ouro foi mais eficiente do que em nanopartículas de prata. Dependendo da concentração de filantina, obtiveram-se diferentes formas de nanopartículas de ouro e de prata.

**RESOLVENDO O PROBLEMA DA RESISTÊNCIA BACTERIANA A MULTIDROGAS COM NANOPARTÍCULAS** O alarmante problema da resistência a multidrogas (MDR – *multi-drug resistance*) por parte de bactérias patogênicas obrigou os pesquisadores a enfrentar o problema e a buscar novas drogas e moléculas na natureza e outras fontes como as nanopartículas. Ao longo das últimas décadas, alguns antibióticos de terceira geração como as cefalosporinas, imipenem, vancomicina e fluoroquinolonas têm apresentado maior risco de gerar resistência.

Um exemplo importante de MDR é a *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA), que ainda está entre as causas mais importantes de infecções hospitalares associadas à bactéria. Esta bactéria é resistente a vários outros agentes antimicrobianos (beta-lactama) e, conseqüentemente, o tratamento de *Staphylococcus aureus* resistente à metilina depende da vancomicina. Contudo, a transmissão de plasmídeos de resistência de enterococos para *Staphylococci* resultou em um aumento em nível elevado de resistência à vancomicina entre *S. aureus*. Outro exemplo são enterococos resistentes à vancomicina (VRE) que têm capacidade de se adaptar a mudanças ambientais e desenvolver resistência antimicrobiana, levando a múltiplos fenótipos resistentes à vancomicina. Eles são resistentes à ampicilina e outros antibióticos beta-lactâmicos. Para resolver o problema, tem sido conduzida em várias partes do mundo, a triagem de diferentes produtos naturais, porém, com baixa taxa de

sucesso. A única solução para lidar com esse grave problema parece ser com o uso das nanopartículas em geral e das nanopartículas de prata, em particular.

### NANOPARTÍCULAS DE PRATA AMPLAMENTE USADAS

#### *Nanopartículas de prata e o potencial de matar germes*

Uma pesquisa realizada no PubMed a respeito das publicações sobre propriedades antimicrobianas de nanopartículas indica que a maioria dos artigos publicados é baseada no uso de nanopartículas de prata seguidas por outras nanopartículas, por exemplo, de ouro, óxido de titânio e óxido de zinco.

As nanopartículas de prata são altamente eficientes contra doenças causadas por micróbios como bactérias (sobretudo *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*) e fungos que causam infecções de *ringworm* (micose de pele) e *Candida albicans*. A beleza dessas nanopartículas é que elas atuam em sinergia e demonstram alta atividade quando comparada a seu uso isolado.

Infecções por micotoxinas também são um grave problema depois da resistência a multidrogas. Essas toxinas são produzidas principalmente por espécies diferentes de fungos como o *Aspergillus* e *Fusarium*. A toxina T-2 é muito tóxica e é produzida por *F. sporotrichioides*, *F. poae*, *F. equiseti* e *F. acuminatum*. Às vezes, o paciente morre com a toxina T-2 em um curto espaço de tempo.

Pesquisa conduzida pelo autor deste artigo no Laboratório de Nanobiotecnologia do Departamento de Biotecnologia, da Universidade SGB Amravati, em Amravati, estado de Maharashtra, na Índia central, reportou alta eficácia de óleo de cravo contendo nanopartículas de prata contra a toxina T-2 produzida por fungo. O óleo nanofuncional aumentou sua atividade fungicida quando usado em combinação com nanopartículas de prata.

O controle de doenças virais causadas por diferentes vírus que ameaçam a vida, como o causador da hepatite B, o HIV-1, o sim-

plex herpes tipo 1, o vírus sincicial respiratório, vírus de tacaribe, vírus da varíola de macacos e o vírus da influenza são de difícil tratamento e há uma necessidade de desenvolver uma nova geração de antimicrobianos.

Normalmente, agentes antivirais agem diretamente nas membranas virais se ligando a camada proteica de revestimento do vírus e destruindo sua estrutura ou interrompendo sua atividade. Até agora, a maior parte das pesquisas focaram na avaliação da atividade antiviral de nanopartículas de prata e já se demonstrou que as nanopartículas de prata são mais eficazes como agentes antivirais em função de suas múltiplas interações com receptores de glicoproteínas e/ou envelopes virais. Suas interações com biomoléculas virais sugerem que as nanopartículas de prata têm um enorme potencial não apenas de enfrentar o desafio existente nas infecções virais, mas também de aumentar a qualidade de terapias antivirais existentes.

O professor Nelson Duran e colegas do Instituto de Química da Unicamp pesquisaram extensivamente as nanopartículas de prata sintetizadas biologicamente no combate à leishmaniose e à onicomicose (doença que ocorre nas unhas deformando-as e, posteriormente, deteriorando-as). Não existe droga antifúngica disponível no mercado que possa curar o *ringworm* das unhas. Felizmente, as nanopartículas de prata possuem efeito mortal nesses fungos, chamados de *Trichophyton rubrum*. Assim, esforços têm sido feitos para o desenvolvimento de um gel ou creme com propriedades antimicrobianas que cure as feridas. Sua toxicidade também está sendo avaliada. A pesquisa também tem focado a atividade antiviral de nanopartículas de prata sendo os resultados bastante animadores.

**PROMESSAS DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS EM ALIMENTOS E NA AGRICULTURA** Os nanomateriais verdes não são úteis apenas em medicamentos, mas também muito benéficos na agricultura: (i) para preservação e aumento da vida útil de frutas e verduras; (ii) no

controle de patógenos de plantas; (iii) e para promover o crescimento de plantas de cultivo.

Uma grande quantidade de frutas se deteriora rapidamente graças a patógenos de plantas. Portanto, é necessário desenvolver novas estratégias baseadas na nanotecnologia para que as frutas possam ficar livres de doenças microbianas e sua vida útil possa aumentar. Nesse sentido, estão em progresso pesquisas para o desenvolvimento de camadas de proteção antimicrobianas baseadas em nanotecnologia para aumentar, portanto, a vida útil de frutas e verduras.

Nos últimos cinco anos, tem crescido o interesse em relação à síntese verde e ao uso de nanopartículas de cobre como agentes potencialmente antimicrobianas contra patógenos de plantas, especialmente, devido ao desenvolvimento de resistência pelos patógenos aos fungicidas existentes. Fungicidas têm sido usados nos últimos 200 anos para o controle de doenças de plantas cultivadas. Notadamente, formulações que usam cobre e enxofre ainda são usadas por fazendeiros. Contrariamente, no entanto, muitos desses produtos são banidos por inúmeras razões incluindo questões de segurança humana no que diz respeito ao uso de fungicidas químicos. Essas substâncias químicas também são responsáveis pelo aumento da poluição ambiental.

Uma área de pesquisa que merece atenção é a de uso de nanopartículas para a promoção do crescimento de plantas de cultivo, sendo que o crescimento microbiano causado pelo endófito em nanopartículas será muito útil para aumentar o crescimento dessas plantas e também para mantê-las livres de patógenos.

O papel de nanopartículas na transferência de genes tem sido observado, por exemplo na transferência de gene feita pela *Agrobacterium tumefaciens* ou por meio de outros métodos físicos como eletroporação, microinjeção e biobalística. As nanopartículas também podem ser usadas para a transferência de genes em plantas. Os potenciais da tecnologia do DNA já foram constatados por todos os biotecnólogos.

**PERCEÇÃO PÚBLICA SOBRE NANOTECNOLOGIA** É preciso organizar encontros públicos de modo a acabar com o medo das pessoas em relação à nanobiotecnologia verde, pois esse sentimento se compara ao medo em relação aos OGMs (organismos geneticamente modificados ou transgênicos), porque as pessoas são, em princípio, contrárias à nanotecnologia em alimentos. Mas, na verdade, a nanobiotecnologia verde tem potencial para transformar a sociedade graças à sua vasta aplicação na medicina e agricultura.

Há uma grande necessidade de aumentar a compreensão dos cidadãos no que diz respeito à nanotecnologia em geral e à nanobiotecnologia verde em particular. Isso pode ser feito através da organização de palestras, debates, filmes, exposições etc.

O objetivo último dessa estratégia deve ser inculcar os valores da nanobiotecnologia verde no maior número de pessoas. Acima de tudo, a participação e o engajamento público é sempre necessário, porque nenhuma tecnologia pode ser implementada sem o envolvimento dos cidadãos.

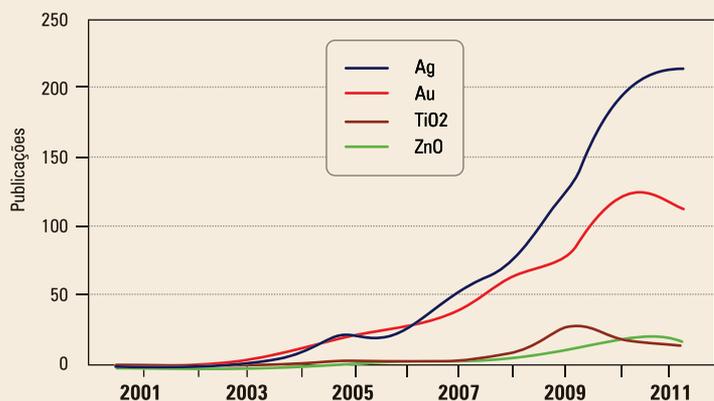


Figura 3 - Dinâmica das publicações no PubMed sobre propriedades antimicrobiais de nanopartículas

**AS NECESSIDADES DE PESQUISA** É preciso promover a nanotecnologia verde, mostrando que é uma tecnologia ecologicamente correta e sustentável. Os professores Oswaldo Luiz Alves e Nelson Duran do Instituto de Química da Unicamp, deram um passo adiante ao associar o Laboratório NanoBio ao programa SisNANO do Ministério de Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI), do governo brasileiro e ao já iniciarem atividades de pesquisa. Isso motivará as jovens mentes a participarem de pesquisas interdisciplinares, em busca de soluções ecologicamente corretas e economicamente viáveis nessa área. No entanto, há uma necessidade premente em se iniciar um laboratório em nanotecnologia verde. Isso requererá colaborações extensivas entre a academia, governo, indústrias e público para que esta tecnologia seja traduzida em ações.

*Mahendra Rai é professor e chefe do Departamento de Biotecnologia, Universidade SGB Amravati, na Índia. Atualmente, ele é professor visitante do Instituto de Química, da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), em programa de pesquisa da Fapesp. Email: mahendrarai@sgbau.ac.in.*

#### SUGESTÕES DE LEITURA

- Birla, S. S.; Tiwari, V. V.; Gade, A. K.; Ingle, A. P.; Yadav, A. P. and Rai, M. K. "Fabrication of silver nanoparticles by *Phoma glomerata* and its combined effect against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*". *Lett. Appl. Microbiol.*, vol.48, pp.173-179. 2009.
- Durán, N.; Priscyla, D.; Marcato; Oswaldo L. Alves; Gabriel IH De Souza, and Espósito, Elisa. "Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains". *J. Nanobio-technol.*, vol.3, nº.8, PMID: 16014167 DOI: 10.1186/1477-3155-3-8 PII: 1477-3155-3-8. 2005.
- Fayaz, A. M.; Balaji, K.; Girilal, M.; Kalaichelvan, P. T. and Venkatesan, R. "Mycobased synthesis of silver nanoparticles and their incorporation into sodium alginate films for vegetable and fruit preservation". *J. Agric. Food Chem.*, vol.57, pp.6246-6252. 2009.
- Gade, A.; Gaikwad, S.; Tiwari, V.; Yadav, A.; Ingle, A. and Rai, M. "Biofabrication of silver nanoparticles by *Opuntia ficus-indica*: *in vitro* antibacterial activity and study of the mechanism involved in the synthesis". *Current Nanoscience*, vol.6, nº.4, pp.370-375. 2010.
- Huang, J.; Chen, C.; He, N.; et al. "Biosynthesis of silver and gold nanoparticles by novel sun-dried *Cinnamomum camphora* leaf". *Nanotechnology*, vol.18, pp.105-06. 2007.
- Marcato, P.D.; Duran, M.; Huber, S.; Rai, M.; Melo, P.S.; Alves, O.L. and Duran, N. "Biogenic silver nanoparticles and its antifungal activity as a new topical transungual drug delivery". *J. Nano Res.*, vol.20, pp.99-107. 2012.
- Rai, M.; Gade, A. and Yadav, A. "Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials". *Biotechnol. Advan.*, vol.27, nº.1, pp.76-82. 2009.
- Shiv Shanker, S.; Ahmad, A., Pashricha, R. and Sastry, M. "Bioreduction of chloroaurate ions by geranium leaves and its endophytic fungus yields gold nanoparticles of different shapes". *J. Mater. Chem.*, vol.13, pp.1822-1826. 2003.