



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CEILÂNDIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS
EM SAÚDE

TESE DE DOUTORADO

**Investigação da atividade antimicrobiana e da toxicidade de
nanopartículas de prata obtidas por meio de síntese verde assistida
por micro-ondas**

RENATA PASCOAL ILLANES TORMENA

2020

RENATA PASCOAL ILLANES TORMENA

Investigação da atividade antimicrobiana e da toxicidade de nanopartículas de prata obtidas por meio de síntese verde assistida por micro-ondas

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências e Tecnologias em Saúde

Área de concentração: Mecanismos básicos e processos biológicos em saúde

Linha de pesquisa/ investigação:
Nanobiotecnologia Aplicada à Saúde

Temática: Nanossistemas aplicados à saúde

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Henrique Sousa.

Brasília, DF

Julho de 2020

PASCOAL ILLANES TORMENA, RENATA
PT684i Investigação da atividade antimicrobiana e da toxicidade
de nanopartículas de prata obtidas por meio de síntese verde
assistida por micro-ondas / RENATA PASCOAL ILLANES
TORMENA; orientador MARCELO HENRIQUE SOUSA. -- Brasília,
2020.
105 p.

Tese (Doutorado - Doutorado em Ciências e Tecnologias em
Saúde) -- Universidade de Brasília, 2020.

1. Nanobiotecnologia aplicada à saúde. I. SOUSA, MARCELO
HENRIQUE, orient. II. Título.



Universidade de Brasília
Faculdade de Ceilândia

Renata Pascoal Illanes Tormena

Investigação da atividade antimicrobiana e da toxicidade de nanopartículas de prata obtidas por meio de síntese verde assistida por micro-ondas

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências e Tecnologias em Saúde da Universidade de Brasília (UnB) como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências e Tecnologias em Saúde.

Prof. Dr. Marcelo Henrique Sousa (FCE/UnB - Presidente)

Profa. Dra. Graziella Anselmo Joanitti (FCE/UnB - Examinador interno)

Prof.Dr. Alex Fabiano Cortez Campos (FUP/UnB - Examinador externo ao programa)

Perito Dr. Juliano de Andrade Gomes (PCDF - Examinador externo à UnB)

Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi (FCE/UnB - Suplente)

Brasília, 24 de julho de 2020.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcelo Henrique Sousa, pela oportunidade concedida, por toda estrutura e conhecimento transmitido na área de Nanotecnologia e pelo apoio e amizade no doutorado e na vida;

Ao Professor Daniel Oliveira Freire, por dedicar de seu escasso período livre para apresentar a estudantes como eu, o universo da Microbiologia, visando apenas transmitir seu conhecimento em prol da Ciência;

À Faculdade LS Educacional pela estrutura para a realização dos ensaios microbiológicos;

Ao Prof. Dr. César Koppe Grisólia e à Dra. Maria Luíza Fascineli, do Laboratório de Genética e Morfologia (GEM/IB/UnB) pela estrutura de trabalho e por toda a disponibilidade, incentivo e oportunidade de aprendizado ao longo desse trabalho que terá continuidade;

Aos professores da Faculdade de Ceilândia (FCE/UnB), onde ingressei na UnB e no doutorado e que sempre apoiaram e incentivaram o corpo Técnico a cursar a Pós-graduação, em especial aos Professores Paula Martins e Juliano Chaker pela contribuição neste trabalho;

Aos amigos que fiz na FCE, pelo período de convivência e aprendizado;

Aos amigos da Pós-graduação, em especial Mac-Kedson Medeiros, Lorena Noronha, Antônio Leonardo e Natália Guimarães, por toda a ajuda e companhia nessa empreitada;

À Divisão de Ensino de Química (IQ/UnB), que me recebeu de portas abertas no meio desta jornada, sempre possibilitando e incentivando meus estudos. Foi graças ao convívio diário com professores como Roberto Ribeiro da Silva (Bob) que redescobri o amor pela docência;

Aos alunos com quem trabalhei e/ou orientei e que são parte importante desse aprendizado e redescoberta;

Aos amigos do Instituto de Química, cuja amizade construída atravessou os limites da Universidade, em especial: Rodolfo Alexandre, Fernando Nogueira, Naamã Elias, Hugo de Carvalho, Hugo Ramalho, Renata Amaral e Hevelin Balbino.

Um agradecimento especial a três educadoras capazes de transmitir a todos o amor que possuem pela docência e pelas suas respectivas áreas, fazendo disso suas vidas:

Prof^a Eliane Vieira Rosa, por todo o incentivo e apoio, pela inestimável ajuda técnica e por ser um exemplo de caráter e comprometimento em tudo que se dispõe a fazer;

Prof^a Izabel Cristina Rodrigues da Silva, por dedicar sua vida ao próximo, desde sua família até qualquer aluno que necessite de auxílio, fazendo da Ciência seu instrumento de luta por um mundo melhor, envolvendo e motivando a todos que estão ao seu redor;

Prof^a Patricia Fernandes Lootens Machado, a chefe que se tornou amiga, pela ajuda constante e pelas palavras e conselhos que se fizeram tão importantes nos momentos mais difíceis;

Ao meu marido Gustavo Tormena e meu filho Luiz Gustavo, por apoiarem e incentivarem a minha escolha pela vida acadêmica e compreenderem a minha ausência física ao longo desta jornada, mesmo que em pensamento sempre estivessem comigo;

À minha mãe Teresinha Pascoal, por sempre acreditar em mim;

A todos que fizeram parte dessa caminhada para que eu chegasse até aqui.

DEDICATÓRIA

**Dedico este trabalho ao meu filho
Luiz Gustavo Pascoal Tormena e ao nosso anjinho
Helena Duran (in memorian) por terem me ensinado o
que realmente importa e faz sentido nesta vida.**

Sumário

| | |
|---|----|
| 1. Introdução..... | 15 |
| 1.1. Nanotecnologia e nanopartículas de Prata (AgNPs) | 16 |
| 1.2. Sínteses de AgNPs | 17 |
| 1.3. Espécies vegetais empregadas na síntese verde de AgNPs | 20 |
| 1.3.1. <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni | 20 |
| 1.3.2. <i>Handroanthus impetiginosus</i> (Mart. ex DC.) Mattos..... | 21 |
| 1.3.3. <i>Pelargonium sidoides</i> | 22 |
| 1.4. Atividade antimicrobiana das AgNPs..... | 24 |
| 1.5. Nanotoxicologia | 30 |
| 2. Objetivos..... | 32 |
| 2.1. Objetivo Geral..... | 32 |
| 2.2. Objetivos Específicos | 32 |
| 3. Metodologia | 33 |
| 3.1. Obtenção dos extratos vegetais | 33 |
| 3.2. Análise dos extratos | 36 |
| 3.2.1. Análise de resíduo seco | 36 |
| 3.2.2. Análise de Polifenóis totais..... | 36 |
| 3.2.3. Estudo qualitativo dos extratos de ipê roxo | 37 |
| 3.3. Sínteses de AgNPs assistidas por micro-ondas | 39 |
| 3.3.1. Síntese Química de AgNPs..... | 40 |
| 3.3.2. Síntese verde empregando extrato de plantas..... | 41 |
| 3.3.3. Otimização das sínteses de AgNPs com Ipê roxo e Pelargônio..... | 41 |
| 3.4. Métodos de caracterização das AgNPs..... | 42 |
| 3.5. Estudo da atividade antimicrobiana de nanopartículas de Prata: | 44 |
| 3.5.1. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC)..... | 44 |

| | |
|--|----|
| 3.5.2. Estudo de viabilidade celular..... | 45 |
| 3.6. Avaliação toxicológica das Ag-NPs em embriões de peixes da espécie Zebrafish (<i>Danio rerio</i>):..... | 47 |
| 4 Resultados e discussões | 48 |
| 4.1 Síntese tradicional..... | 48 |
| 4.1.1 Caracterização das AgNPs | 49 |
| 4.2 Síntese verde empregando <i>Stevia rebaudiana</i> (Bert.)..... | 52 |
| 4.2.1 Estudo do extrato | 52 |
| 4.2.2 Síntese das AgNPs | 53 |
| 4.3 Síntese verde empregando extratos de <i>Handroanthus impetiginosus</i> (Mart. Ex DC.) <i>Matos</i> :..... | 57 |
| 4.3.1 Estudo de obtenção dos extratos..... | 57 |
| 4.3.2 Otimização da síntese..... | 62 |
| 4.3.3 Caracterização das AgNPs | 67 |
| 4.4 Síntese verde empregando <i>Pelargonium sidoides</i> | 71 |
| 4.4.1 Caracterização do extrato | 71 |
| 4.4.2 Otimização da síntese..... | 71 |
| 4.4.3 Caracterização | 76 |
| 4.5 Estudo da atividade antimicrobiana das nanopartículas..... | 80 |
| 4.6 Avaliação nanotoxicológica | 87 |
| 5 Conclusões..... | 90 |
| 6 Perspectivas futuras: | 90 |
| 7 Referências Bibliográficas | 91 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 – Roteiro dos estudos qualitativos dos extratos de ipê..... | 37 |
| Tabela 2 – Fatores estudados e seus níveis no planejamento Box Behnken | 41 |
| Tabela 3 – Planejamento Box Behnken com fatores codificados..... | 41 |
| Tabela 4 – Planejamento Box Behnken com valores atribuídos para a síntese de AgNPs: | 42 |
| Tabela 5 – Planejamento Box-Behnken para estudo de síntese de AgNPs assistida por micro-ondas com extrato aquoso de <i>Stevia rebaudiana</i> | 53 |
| Tabela 6 – Percentual de resíduo seco dos extratos de <i>Handroanthus impetiginosus</i> | 57 |
| Tabela 7 – Resultados de teor de polifenóis totais em termos de ácido Gálico | 59 |
| Tabela 8 – Comparação estatística entre as técnicas de extração | 59 |
| Tabela 9 – Resultados da análise qualitativa de antocianinas e flavonóides | 60 |
| Tabela 10 – Resumos dos resultados do estudo qualitativo comparativo entre os extratos de ipê roxo | 61 |
| Tabela 11 – Código atribuído aos difratogramas do planejamento de Box-Behnken (AgNP-Ipê) para a representação gráfica..... | 63 |
| Tabela 12 – Intensidade dos picos dos difratogramas e cálculo do tamanho cristalino das AgNPs obtidas nos 15 experimentos do planejamento Box-Behnken (AgNP-Ipê) | 65 |
| Tabela 13 – Intensidade dos picos dos difratogramas e cálculo do tamanho cristalino das AgNPs obtidas nos 15 experimentos do planejamento Box-Behnken (AgNP-Pel) | 73 |
| Tabela 14 – Concentração inibitória mínima (CIM) obtida com AgNP (Ipê) através do método de microdiluição em caldo (mg/mL)..... | 81 |
| Tabela 15 – Resultados da viabilidade celular na linhagem de queratinócitos HaCat com AgNP-Ipê e extrato puro de ipê roxo | 82 |
| Tabela 16 – Concentração inibitória mínima (CIM) obtida com a AgNP (Pel) através do método de microdiluição em caldo (mg/mL)..... | 83 |
| Tabela 17 – Concentração inibitória mínima obtida com a AgNP (Pel) contra a <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de <i>carbapenemase</i> | 86 |
| Tabela 18 – Resultados da viabilidade celular na linhagem de queratinócitos HaCat com AgNP (Pel)..... | 87 |
| Tabela 19 – Resultados estimados de CL 50 baseados nos testes preliminares..... | 89 |
| Tabela 20 – Tabela de concentrações propostas para FET | 89 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Características dos extratos de plantas empregados na síntese verde ... | 19 |
| Figura 2 – <i>Stevia rebaudiana</i> | 20 |
| Figura 3 – Árvore de <i>Handroanthus impetiginosus</i> (ipê roxo) | 21 |
| Figura 4 – flores e raízes de <i>Pelargonium sidoides</i> | 23 |
| Figura 5 – Componentes da parede celular de Bactérias Gram-positiva e Gram-negativa..... | 26 |
| Figura 6– Estágios do ciclo de vida do Zebrafish desde a fertilização até a fase adulta..... | 31 |
| Figura 7 – Esquema das técnicas empregadas na pesquisa | 33 |
| Figura 8 – Etapas do preparo da solução aquosa de estévia..... | 34 |
| Figura 9 – Síntese de AgNPs em Micro-ondas de alta resolução | 40 |
| Figura 10 – Teste de inibição e Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) por microdiluição | 45 |
| Figura 11 – Espectro de UV-Vis das AgNPs obtidas por síntese tradicional (AgNP-Quim)..... | 49 |
| Figura 12 – Difratoograma das AgNPs obtidas por síntese tradicional (AgNP-Quim) . | 50 |
| Figura 13 – FTIR das AgNPs obtidas por síntese tradicional (AgNP-Quim)..... | 50 |
| Figura 14 – (a) Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão (AgNP-Quim) e (b) Histograma de distribuição dos diâmetros medidos..... | 51 |
| Figura 15 – Espectros de UV-Vis referentes ao extrato de estévia, ao sobrenadante e ao precipitado contendo AgNP (Est) | 54 |
| Figura 16 - Imagem de Difração de Raios-X (AgNP-Est) | 55 |
| Figura 17 – (a) Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão (AgNP-Est) e (b) Gráfico Box-Plot de distribuição dos diâmetros medidos | 56 |
| Figura 18 – Curva de calibração de ácido gálico para determinação de polifenóis totais..... | 58 |
| Figura 19 – Espectro de UV-Vis da AgNP (Ipê) | 62 |
| Figura 20 – Difratoogramas do planejamento de Box-Behnken (AgNP-Ipê) | 64 |
| Figura 21 – Diagrama de Pareto obtido na análise dos dados obtidos no planejamento Box-Behnken (AgNP-Ipê)..... | 66 |
| Figura 22 – Gráfico de contorno referente aos dados obtidos no planejamento Box-Behnken (AgNP-Ipê) | 67 |
| Figura 23 – Espectro de FTIR da AgNP (Ipê)..... | 68 |
| Figura 24 – Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão (AgNP-Ipê) | 69 |
| Figura 25 – Histograma de distribuição de diâmetro das AgNPs (Ipê)..... | 70 |
| Figura 26 – Gráfico Potencial zeta x pH..... | 71 |
| Figura 27 – Espectro de UV-Visível (AgNP-Pel x Extrato puro de Pelargônio) | 72 |

| | |
|---|----|
| Figura 28 – Imagem de difração de Raios-X (AgNP-Pel) | 73 |
| Figura 29 – Diagrama de Pareto referente ao planejamento Box-Behnken de AgNP (Pel)..... | 75 |
| Figura 30 – Gráfico de contorno referente aos resultados do planejamento Box-Behnken de AgNP-Pel..... | 76 |
| Figura 31 – Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão (AgNP-Pel) | 77 |
| Figura 32 - Histograma de distribuição de diâmetro (AgNP-Pel)..... | 77 |
| Figura 33 – Espectro de FTIR AgNP (Pelargônio) x Extrato puro | 78 |
| Figura 34 – Curva de titulação de Potencial Zeta x pH | 79 |
| Figura 35 – Placas de teste de microdiluição antes e após revelação com resazurina: AgNP (Pel) x <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de carbapenemase..... | 85 |
| Figura 36 – Dados compilados dos pré-testes realizados em Zebrafish durante a fase embrio-larval: (a)AgNP-Quim, (b) AgNP-Ipê (c) AgNP-Pel)..... | 88 |

ANEXOS

| | |
|----------------------|-----|
| CEUA..... | 99 |
| Cálculo da CL50..... | 100 |
| Artigo..... | 103 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AgNP (Est) – Nanopartículas de Prata obtidas através de síntese verde empregando extrato de *Stevia rebaudiana*

AgNP (Ipê) – Nanopartículas de Prata obtidas através de síntese verde empregando extrato de *Handroanthus impetiginosus* (Ipê roxo)

AgNP (Pel) – Nanopartículas de Prata obtidas através de síntese verde empregando extrato de *Pelargonium sidoides*

AgNP (Quim) – Nanopartículas de Prata obtidas através de síntese Química

AgNPs – Nanopartículas de Prata

BH – Borohidreto

CEUA – Comissão de Ética do Uso Animal

DRX – Difração de raios X

EDL-ZETA – Espalhamento dinâmico de luz

FET – Fish Embryo Acute Toxicity Test (Teste de toxicidade aguda em peixes)

FTIR – Infravermelho com transformada de Fourier

ICP-OES – Espectrometria de emissão óptica por plasma acoplado indutivamente

MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão

PVP – Polivinilpirrolidona

UV-Vis – Espectrometria de absorção no ultravioleta-visível

OMS – Organização Mundial da Saúde

MTT – Método colorimétrico *Methyl Thiazolyl Blue*

CIM – Concentração inibitória mínima

IC 50 – Concentração de amostra que leva à morte 50% da população

KPC – *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase

OECD – Organization for Economic Cooperation and Development (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico)

PAN-BR – Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito da Saúde Única. 2018-2022

HaCat – Linhagem celular de queratinócitos imortais espontaneamente transformados de pele humana adulta

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations (Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura)

OIE – World Organization for Animal Health (Organização mundial da saúde animal)

DMEM – *Dulbecco modified Eagle's Minimal Essential Medium*

EDTA – Ethylenediamine tetraacetic acid (ácido etilenodiamino tetra-acético)

UFC – Unidade Formadora de Colônia

AVMA – American Veterinary Medical Association

Resumo

Nanopartículas de prata (AgNPs) possuem conhecida potencialidade antimicrobiana frente a vários micro-organismos. De maneira alternativa à síntese química, a utilização de plantas no processo de obtenção de AgNPs – a síntese verde – confere maior potencialidade antimicrobiana e diminui a toxicidade desses nanomateriais. Nesse trabalho, como agentes redutores e estabilizantes ainda não empregados para esses fins, foram utilizados extratos de *Stevia rebaudiana bertonii*, *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC.) Mattos e *Pelargonium sidoides* na síntese verde de AgNPs assistida por micro-ondas. Para tal, efetuou-se a otimização dos parâmetros de síntese através de planejamentos estatísticos tipo Box – Behnken e as amostras obtidas nas condições reacionais mais favoráveis foram caracterizadas por técnicas de Espectrometria de absorção no ultravioleta-visível (UV-Vis), infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), difração de raios X (DRX), espalhamento de luz eletroforético (ELS-Zeta) e microscopia eletrônica de transmissão (MET). Foram realizados estudos sobre a atividade antimicrobiana das AgNPs pelo método de microdiluição contra bactérias do tipo Gram-positivas (*Staphylococcus Aureus*) e Gram-Negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase). Em ensaios de nanotoxicidade, a viabilidade celular foi avaliada através do ensaio MTT com cultura de células da linhagem de queratinócitos (linhagem HaCat) de origem humana. Foi comprovado que os compostos dos extratos das plantas atuaram como redutores para formação das AgNPs e como estabilizadores para funcionalizar as AgNPs, resultando em nanopartículas de diâmetros inferiores a 30 nm e superfície carregada negativamente com altos valores de potencial zeta em ampla faixa de pH. Os testes biológicos indicaram que as AgNPs não foram tóxicas para células de mamíferos HaCaT e apresentaram eficiência contra bactérias Gram-positivos (AgNP-Ipê) e contra ambos os tipos de bactérias no caso da AgNP-Pel, o que se deve à associação dos núcleos de prata com seus diferentes revestimentos contendo compostos naturais de conhecidas propriedades antimicrobianas. Além disso, foi iniciado um estudo sobre a toxicidade aguda em embriões de peixes (FET) conforme protocolo da OECD 236/2013, utilizando o modelo animal Zebrafish (*Danio rerio*). Através da realização de pré-testes, foi possível estimar os valores de Concentração letal média (CL 50), que foram no mínimo 150 vezes superiores para as AgNPs obtidas através de síntese verde, o que confirma a baixa toxicidade dos nanocompostos produzidos e caracterizados neste trabalho.

Palavras-chave: Nanopartículas de Prata, micro-ondas, síntese verde, atividade antimicrobiana, nanotoxicidade, Zebrafish.

Abstract

Silver nanoparticles (AgNPs) have a known antimicrobial potential against various microorganisms. As alternative to chemical synthesis, the use of plants in the obtaining process of AgNPs - the green synthesis - confers greater antimicrobial potential and reduces the toxicity of these nanomaterials. In this report, reducing and stabilizing agents not used before for these purposes, extracts of *Stevia rebaudiana* bertonii, *Handroanthus impetiginosus* (Mart. Ex DC.) Mattos and *Pelargonium sidoides* were employed in the microwave-assisted green synthesis of AgNPs. Herein, the optimization of the synthesis parameters was carried out through Box - Behnken design and the samples obtained in the most favorable reaction conditions were characterized by the techniques absorption spectrometry in ultraviolet-visible (UV-Vis), Fourier transform infrared (FTIR), X-ray diffraction (XRD), dynamic scattering of light and zetametry (DLS-Zeta) and transmission electron microscopy (TEM). Studies on the antimicrobial activity from the AgNPs obtained were performed using microdilution method against Gram-positive (*Staphylococcus Aureus*) and Gram-negative bacteria (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing carbapenemase) were carried out. In the nanotoxicity assays, cell viability was assessed using the MTT assay with cell culture of keratinocyte lineage (HaCat lineage) from human origin. It was proved that the compounds from the plant extracts acted as reducers in the AgNPs formation and as stabilizers to functionalize them, resulting in nanoparticles with diameters below 30 nm and negatively charged surface with high values of zeta potential over a large pH range. Biological tests indicated that AgNPs were not toxic to mammalian HaCaT cells and showed high efficiency against Gram-positive bacteria (AgNP-Ipê) and against both types of bacteria in the case of AgNP-Pel, which is due to the association between silver cores and their coating containing different natural compounds with known antimicrobial properties. In addition, it was started a study on acute toxicity in fish embryos (FET) according to the OECD 236/2013 protocol, using the animal model Zebrafish (*Danio rerio*). Through pre-tests, it was possible to estimate the values of lethal concentration (CL 50), which were at least 150 times higher for AgNPs obtained through green synthesis, which confirms the low toxicity of the nanocomposites produced and characterized in this work.

Keywords: Silver nanoparticles, microwave, green synthesis, antimicrobial activity, nanotoxicity, Zebrafish.

1. Introdução

Diante do atual cenário, onde o mundo se curva aos efeitos de uma pandemia desencadeada por um vírus altamente contagioso e letal, a necessidade da pesquisa e desenvolvimento de novos produtos, em especial antimicrobianos, vem ganhando cada vez mais visibilidade e representa a solução para que a situação venha a se normalizar. Nesse contexto, a nanotecnologia representa um importante recurso no combate à patógenos, pois foi desenvolvida em campo multidisciplinar com um grande potencial em aplicações farmacêuticas [1], especialmente contra microorganismos resistentes de difícil tratamento, sendo as bactérias o foco deste trabalho.

O surgimento de espécies de patógenos com alterações genéticas que conferem resistência a antibióticos tem atingido um nível crítico, invalidando os principais medicamentos antimicrobianos atualmente utilizados [2]. Assim, tornou-se um grande desafio para o setor de saúde a pesquisa para descobrir substâncias com atividade antimicrobiana. Uma opção foi pesquisar novos antibióticos ou modificar quimicamente os medicamentos antimicrobianos existentes [3]. No entanto, o abuso de antibióticos tem acelerado a resistência microbiana às drogas. Nesse contexto, o surgimento da nanomedicina oferece uma nova possibilidade de combater o crescente número de novos microorganismos resistentes a antimicrobianos [1].

Em geral, nanopartículas metálicas, especialmente nanopartículas de prata, têm mostrado aplicações antimicrobianas promissoras em aplicações biomédicas [4]. No que diz respeito a alguns tratamentos médicos, os medicamentos empregados atualmente podem apresentar efeitos potencialmente prejudiciais uma vez que as nanopartículas de prata são geralmente fabricadas com produtos químicos tóxicos. Nesse contexto, o desenvolvimento da síntese verde é uma solução mais favorável, pois são empregados agentes de cobertura não tóxicos, agentes redutores menos perigosos e solventes ambientalmente amigáveis [5].

Atualmente, as nanopartículas de prata são amplamente conhecidas por suas propriedades antimicrobianas contra bactérias, fungos e vírus [6]. Portanto, obtê-las por síntese verde a partir de uma solução de nitrato de prata diluída (AgNO_3) e o extrato de plantas como agentes redutores significa uma estratégia importante para reduzir sua toxicidade por uma técnica econômica, favorável ao meio ambiente e promissora no campo farmacêutico [7]. Para tal, frutas e materiais vegetais, como raízes, cascas, folhas e talos, têm sido usados em muitos estudos recentemente [8,9].

Assim, o presente trabalho buscou elaborar nanopartículas de prata empregando extratos de *Stevia rebaudiana*, *Pelargonium sidoides* e *Handroanthus impetiginosus* como agentes redutores e estabilizadores, sendo que os dois últimos, de uso inédito neste tipo de síntese, foram avaliados quanto a sua atividade antimicrobiana e toxicidade. Para controlar melhor os parâmetros de reação, optou-se por trabalhar com síntese assistida por micro-ondas, onde ocorre uma melhora do aquecimento tradicional, permitindo reduzir o tempo de reação e, assim, aumentar a eficiência [10].

1.1. Nanotecnologia e nanopartículas de Prata (AgNPs)

Nanociência é o estudo de estruturas e moléculas em escala nanométrica através da convergência de Ciências como Física, Química, Biologia, Ciência dos materiais etc. O prefixo nano, que possui origem grega, significa algo muito pequeno e se refere à bilionésima parte do metro [11]. A nanotecnologia refere-se à capacidade de observar, medir, manipular, montar, controlar, fabricar e aplicar sistemas com dimensões nanométricas. Ou seja, a nanotecnologia é a capacidade de converter a teoria da nanociência em aplicações úteis, o que fez com que se destacasse nas últimas décadas como uma estratégia promissora em vários ramos da Ciência [12]. Além disso, devido ao seu reduzido tamanho, os nanomateriais apresentam propriedades diferentes dos materiais de mesma composição e de dimensões massivas, possibilitando novas aplicações nas mais diversas áreas da sociedade [1].

O conceito de nanotecnologia foi apresentado pela primeira vez em 1959 pelo físico americano e ganhador do Prêmio Nobel Richard Feynman, durante o Encontro anual da Sociedade Americana de Física. Ele apresentou a célebre palestra intitulada " *There's Plenty of Room at the Bottom: An Invitation to Enter a New Field of Physics*", que pode ser traduzida como: "Há muito espaço na parte inferior da escala, um convite para entrar em um novo campo da física", onde discutiu vários dos problemas físicos associados a sistemas nanométricos, vislumbrando o uso de máquinas para construir sistemas menores até o nível molecular e até mesmo organizar os átomos [1]. Em 1974, o cientista japonês Norio Taniguchi foi o primeiro a usar e definir o termo nanotecnologia como: "nanotecnologia consiste principalmente no processamento de separação, consolidação e deformação de materiais por um átomo ou uma molécula" [13]. Em 1981 os cientistas Gerd Binnig e Heinrich Rohrer criaram o microscópio de

tunelamento, um instrumento que permite obter imagens de átomos e moléculas, ou seja, imagens em nível atômico, recebendo o Prêmio Nobel de Física em 1986 por essa descoberta [1]. Essas e uma série de outros eventos demonstraram que as hipóteses de Feynman se mostraram corretas e, por esses motivos, ele é considerado o pai da nanotecnologia moderna [14].

Dentre os nanomateriais mais empregados, destacam-se nanopartículas de prata (AgNPs), cujas propriedades físico-químicas têm atraído cada vez mais interesse da comunidade científica devido à sua alta condutividade térmica, propriedades plasmônicas, estabilidade química e capacidade antimicrobiana [15].

O emprego da prata para fins medicinais data dos tempos de Hipócrates (400 a.C), que a usava como antibacteriano para tratar úlceras. Sabe-se, também, que os médicos alquimistas aconselharam seu uso para o tratamento de doenças mentais e outras enfermidades. Para os alquimistas, a prata era considerada um metal quase tão perfeito quanto o ouro. Como o ouro tinha por símbolo um círculo que representava o Sol, a prata, “quase perfeita”, recebeu o símbolo de um semicírculo, representando a lua. Esse brilho característico também foi responsável por seu nome em latim, *argentum*, que significa brilhante e deu origem ao símbolo químico referente à prata, Ag [16].

Atualmente, as AgNPs podem ser incorporadas a uma variada gama de produtos comerciais, incluindo sabões, plásticos, alimentos, têxteis etc, correspondendo a uma grande porcentagem de todos os nanoprodutos em uso. Além disso, são amplamente empregadas na agricultura e remediação ambiental [17]. Apresentam propriedades medicinais e antibacterianas, antivirais, antifúngicas e anti-inflamatória, fazendo com que suas aplicações se destaquem no setor da saúde pela aplicação em: diagnóstico, tratamento, distribuição de fármacos, revestimento de dispositivos médicos ou no combate a agentes patógenos [18,19].

1.2. Sínteses de AgNPs

Atualmente, as AgNPs podem ser sintetizadas por diferentes métodos, obtendo-se tamanhos variados e formas ou revestimentos específicos e, principalmente, toxicidade adequadas. Necessita basicamente dos seguintes elementos: metal precursor, agente redutor e agente estabilizador.

A síntese tradicional é frequentemente empregada para elaborar nanopartículas metálicas de prata e baseia-se no princípio da redução química da prata, gerando uma solução coloidal que é estável em água e solventes orgânicos. São exemplos de agentes redutores o borohidreto (BH), citrato e ascorbato [20]. As nanopartículas de prata preparadas por método de redução química empregam geralmente polivinil pirrolidona (PVP) como dispersante. Os mecanismos de PVP no processo de preparação indicaram que este estabiliza e protege as AgNPs de crescimento e aglomeração [21].

Na área biomédica os métodos de obtenção de nanopartículas com a utilização de solventes orgânicos e fortes agentes redutores como BH têm sido preteridos em relação aos métodos de síntese em meios aquosos (ou com solventes mais brandos) ou por síntese verde, com o uso de polifenóis, açúcares de extratos vegetais, polímeros biodegradáveis, bactérias e enzimas, o que torna as AgNPs obtidas mais biocompatíveis [22].

A síntese verde se destaca como uma alternativa ecologicamente vantajosa em relação à síntese tradicional por inúmeros motivos, dentre eles: empregar apenas materiais não perigosos de ocorrência natural e geralmente biorrenováveis, produzir menos ou nenhum resíduo perigoso, procedimentos de síntese confiáveis, sustentáveis e ecologicamente corretos, visando reduzir a toxicidade e possibilitar o estabelecimento de metodologias simples e eficientes para obtenção de dispersões coloidais estáveis de nanocompostos que sejam ecologicamente corretas e benignas no contexto de proteção do meio ambiente e da saúde humana [23,24].

A síntese verde de nanopartículas metálicas foi adotada tendo como um de seus objetivos incorporar materiais biológicos (por exemplo, bactérias, fungos, algas e extratos de plantas), visando a obtenção de tamanhos, formas ou revestimentos variados [19]. Os métodos de extração utilizados para a obtenção de extratos de plantas envolvem a separação de partes medicamente ativas dos tecidos vegetais dos componentes inativos, empregando solventes seletivos. Maceração, infusão, decocção, percolação e Soxhlet são alguns métodos extrativos muito utilizados, por serem técnicas acessíveis e relativamente simples de serem executadas. Durante a extração, os solventes se difundem no material sólido da planta e solubilizam os compostos com polaridade semelhante [25,26].

Na figura 1 está apresentado um esquema contendo características e vantagens do uso de extratos vegetais na síntese de nanopartículas.

Figura 1 – Características dos extratos de plantas empregados na síntese verde



Fonte: Adaptado de Rajan *et al.* [27]

Nanopartículas de tamanho menor e uniforme podem ser obtidas empregando fontes alternativas de energia. O micro-ondas representa um importante recurso por evitar a perda de amostra por ebulição e degradação, podendo ser empregado nas sínteses tradicionais, na síntese verde, cuja desvantagem está no tempo de reação e, ainda, na produção de extratos vegetais, pelo fato do processo de síntese ou extração ocorrer dentro de um ambiente fechado com temperatura, pressão, rotação e potência monitorados [22,28]. Uma das vantagens de seu uso está justamente na obtenção de altas temperaturas em condições controladas, o que resulta no aumento da nucleação, processo pelo qual as nanopartículas são criadas. Além disso, o uso de micro-ondas, em relação ao aquecimento tradicional cria partículas nanométricas de graus de cristalinidade mais elevados e permite maior controle da morfologia [29].

A elaboração de materiais em nanoescala depende de barreiras termodinâmicas e cinéticas na reação. Os princípios envolvidos nas técnicas de micro-ondas são dois: (i) mecanismo dipolar, onde sob um campo elétrico de alta frequência, as moléculas tentam seguir o campo no mesmo alinhamento liberando calor suficiente para impulsionar a reação e (ii) mecanismo condutor elétrico, onde a amostra irradiada é um condutor elétrico e os portadores de carga, íons e elétrons, movem-se através do material sob a influência do campo elétrico, resultando em uma polarização e, então, essas correntes induzidas aquecem a amostra [30].

O recurso do micro-ondas já foi empregado na obtenção de AgNPs via síntese química empregando PVP como estabilizador e etanol como agente redutor [31] e em diversas sínteses verdes usando como agente redutor e de estabilidade extratos aquosos das cascas de frutas cítricas (laranja, toranja, tangelo e limão) [10].

1.3. Espécies vegetais empregadas na síntese verde de AgNPs

1.3.1. *Stevia rebaudiana* Bertoni

Stevia rebaudiana Bertoni, da família *Asteraceae*, é originária da América do Sul, da região limítrofe entre o Brasil e Paraguai (Figura 2). A principal característica das folhas de stevia é alta doçura devido aos compostos de diterpeno, chamados glicosídeos de esteviol. Por isso, seu uso mais comum está na extração e purificação de esteviosídeos para a obtenção de um adoçante natural não-calórico. Apresenta ainda, outras propriedades benéficas, como efeitos antiinflamatório, diurético, anti-hipertensivo, anti-hiperglicêmico, antidiarreico, antitumoral e antioxidante. Esses efeitos antioxidantes devem-se principalmente à presença de flavonóides e compostos fenólicos. Além disso, ainda estão presentes em suas folhas alcalóides, clorofilas, xantofilas, hidroxichipnâmicas, ácidos, oligossacarídeos, açúcares livres, aminoácidos, lipídios e oligoelementos [32,33].

Figura 2 – *Stevia rebaudiana*



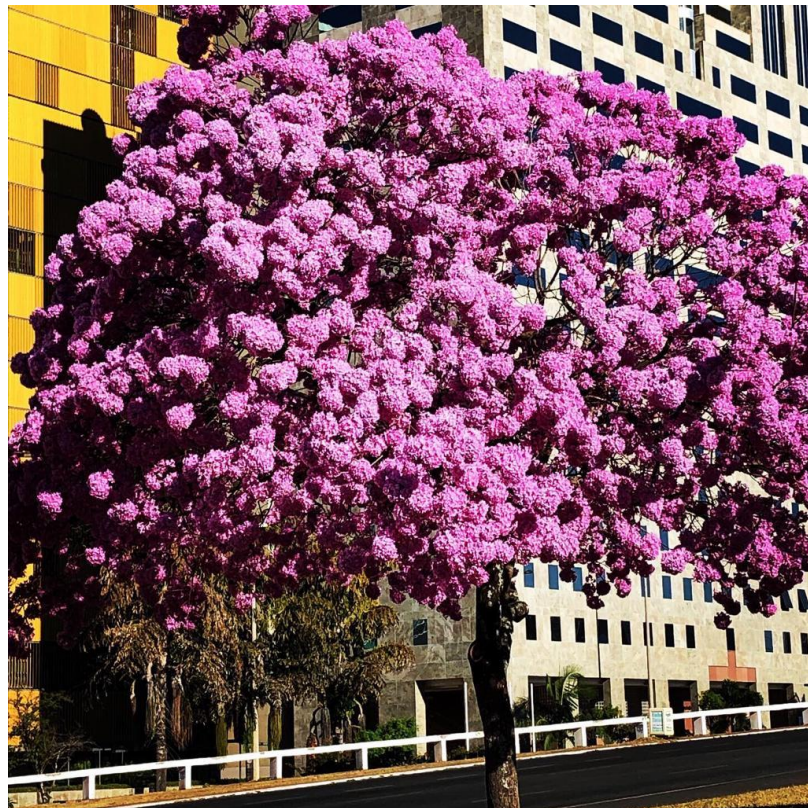
Fonte: Hossain *et al.*, 2017 [34]

Devido às suas características antioxidantes, torna-se possível seu uso como agente redutor na síntese de AgNPs mediante condições adequadas. Estudos anteriores têm conseguido obter AgNPs empregando extrato de *Stevia rebaudiana* em condições ambientes, entretanto não têm sido empregado o recurso do micro-ondas no preparo do extrato vegetal e nem na síntese das nanopartículas [35,36].

1.3.2. *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC.) Mattos

Handroanthus impetiginosus, da família *Bignoniaceae*, é uma árvore nativa das florestas tropicais da América Central e do Sul, que pode medir entre 8 e 30 metros de altura e de 60 a 100 cm de diâmetro. Popularmente conhecido como 'ipê - roxo' e muito conhecido por sua beleza, é uma árvore ornamental, cuja floração ocorre na estação seca (maio-agosto), época em que perde todas as folhas (Figura 3).

Figura 3 – Árvore de *Handroanthus impetiginosus* (ipê roxo)



Fonte: autoria própria

Sua casca e entrecasca são empregadas na medicina popular há vários séculos, como anti-inflamatório e no tratamento de alergias e infecções bacterianas e fúngicas. O uso desta planta com propriedades terapêuticas juntamente com vários outros remédios tradicionais, são geralmente classificadas sob o título de "medicina alternativa" e serviu como base para pesquisas em tratamentos das Ciências Médicas atuais [37,38].

Em sua composição, incluindo quinonas e naftoquinonas, esta espécie possui taninos e flavonóides em abundância. Alguns estudos com extratos secos de galhos e cascas de *H. impetiginosus* também apontaram a presença de glicosídeos iridóides, lignana glicosiladas, isocumarina glicosiladas, glicosídeos feniletanóides e glicosídeos fenólicos, lapachol, naftoquinona e seus derivados [39].

Dos compostos ativos, os majoritários são a β -lapachona, uma quinona, e o lapachol, que atualmente apresenta maior relação com a atividade biológica da planta e é pertencente ao grupo das naftoquinonas - metabólitos secundários heterocíclicos provenientes de compostos aromáticos. O lapachol também pode ser considerado um dos principais representantes do grupo de quinonas das tabebuias em geral [40].

Existem estudos descrevendo a formação de nanopartículas de prata a partir de extratos de flores de *Tabebuia argentea*, planta da mesma família do ipê roxo, que apresenta saponinas, compostos fenólicos, antraquinonas, esteróides, glicosídeos cardíacos e taninos em sua composição [41], mas ainda não havia sido realizada nenhuma síntese envolvendo o ipê roxo.

1.3.3. Pelargonium sidoides

O extrato de uma raiz nativa da África do Sul comercialmente conhecido como Kaloba, está entre os produtos fitoterápicos mais consumidos para o tratamento das infecções das vias áreas superiores. Seu princípio ativo, *Pelargonium sidoides*, pertence à família *Geraniaceae* e possui longa tradição no tratamento de doenças, começando com os registos do etnobotânicos de meados do século 19 [42].

Figura 4 – flores e raízes de *Pelargonium sidoides*.



Fonte: <https://hortodidatico.ufsc.br/kaloba/>

As atividades antibacterianas contra patógenos que são principalmente responsáveis pelas infecções do trato respiratório e o potencial imunomodulador do produto fornecem a base racional para seu uso terapêutico atual. Essas características levaram à produção do extrato EPs 7630. Atualmente, o medicamento fitoterápico a base de EPs 7630, das raízes de *Pelargonium sidoides*, foi aprovada para o tratamento de infecções agudas do trato respiratório em vários países da Europa, Ásia, América Central e do Sul [43]. Além disso, estudos recentes realizados com a tintura comercial destas raízes confirmam seus efeitos antioxidantes e anticancerígenos [44].

O extrato de *Pelargonium sidoides* (EPs 7630) possui diversos constituintes, como ácido gálico, taninos, flavonoides, ácidos graxos insaturados. Contudo, os principais constituintes encontrados no extrato EPs 7630 são compostos fenólicos e derivados cumarínicos, dentre eles o umckalin, que é uma cumarina típica do *Pelargonium sidoides* [45][46]. Estudos apontam que as cumarinas, os taninos e os compostos polifenólicos são os principais responsáveis da característica redutora desta planta [47].

Existem diversos estudos descrevendo sua ação no trato respiratório. O uso do extrato de *Pelargonium sidoides* (EPs 7630) em crianças, adolescentes e pacientes

adultos com bronquite aguda (AB), rinossinusite aguda (SRA) e amigdalofaringite aguda (ATP) foi avaliado através de revisão sistemática e meta-análise também demonstrou ser um tratamento eficiente e seguro [44,48].

Existem relatos do uso de extrato de folhas de *Geranium* (*Pelargonium graveolens*), também pertencente à família *Geraniaceae*, na síntese e avaliação de AgNPs [3,49]. Karatopra *et al.* realizaram um estudo com outra planta da família *Geraniaceae*, o *Pelargonium endlicherianum*, estudando de forma inédita os compostos químicos ativos no extrato de sua raiz e investigando sua atividade no sistema respiratório superior por meio de cultura de células para compará-lo ao *Pelargonium sidoides*, de tradicional emprego medicinal [50]. Entretanto, até o momento nenhum estudo havia empregado o *Pelargonium sidoides* na elaboração de nanocompostos.

1.4. Atividade antimicrobiana das AgNPs

Em geral, nanopartículas metálicas, principalmente nanopartículas de prata, têm mostrado aplicações antimicrobianas promissoras na área biomédica. Ainda que o mecanismo de ação dessas nanopartículas, para tal atividade não tenha sido totalmente esclarecido, elas são comumente usadas como agentes antimicrobianos mais eficazes e universais [50].

O aumento contínuo no número de cepas bacterianas e virais multirresistentes devido a mutações, poluição e mudanças nas condições ambientais vem atingindo um nível crítico, invalidando os principais medicamentos antimicrobianos atualmente utilizados [51]. Como resultado, os tratamentos tornam-se ineficazes, e as infecções, persistentes e até incuráveis. Diante deste cenário, a resistência antimicrobiana tornou-se um grande desafio para o setor de saúde tal como a necessidade de desenvolver medicamentos para o tratamento de tais infecções microbianas. A Organização Mundial da Saúde (OMS) define a Resistência antimicrobiana como a “capacidade de um microrganismo impedir a atuação de um antimicrobiano” [52].

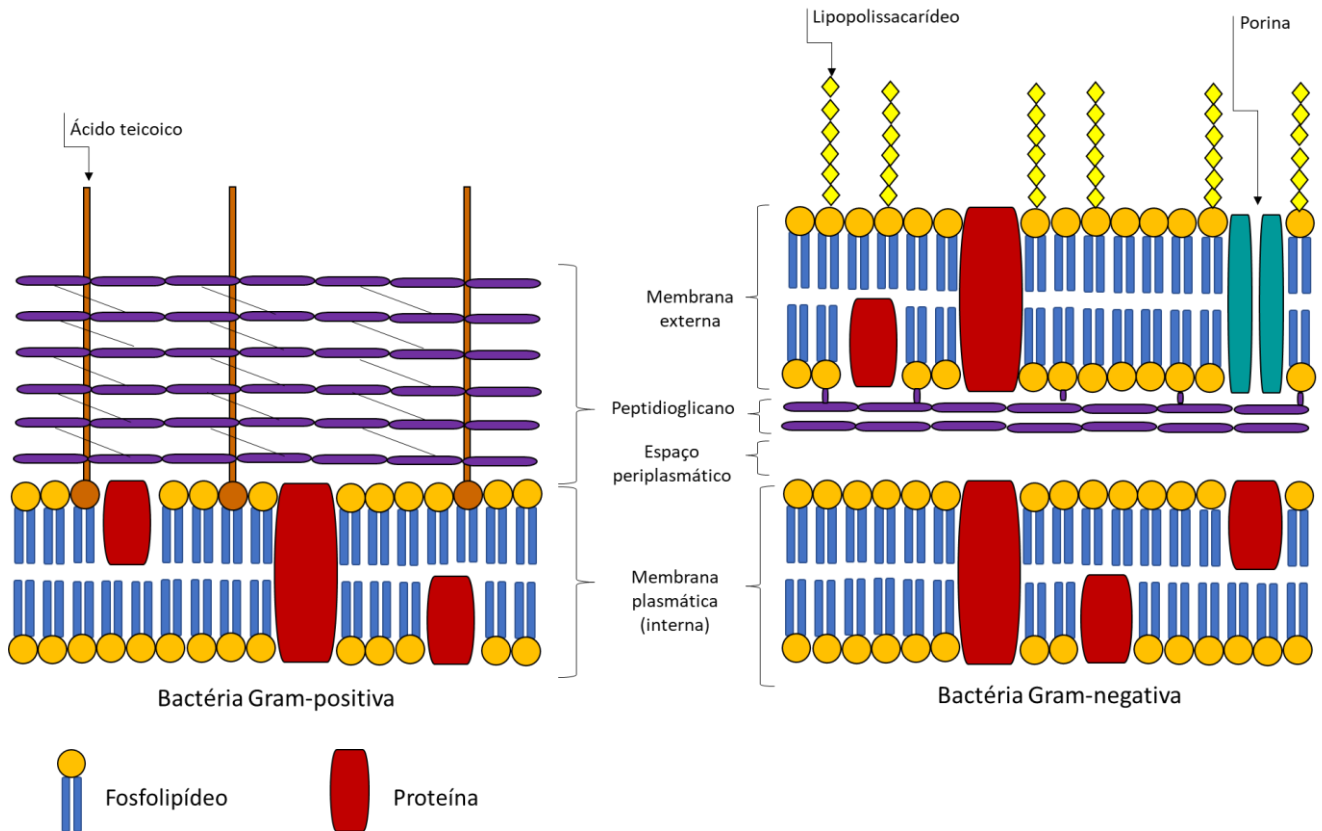
Uma opção tem sido pesquisar novos antibióticos ou modificar quimicamente os medicamentos antimicrobianos existentes. No entanto, o abuso de antibióticos tem acelerado a resistência microbiana às drogas. Nesse contexto, o surgimento de nanofármacos oferece uma nova possibilidade de combater o crescente número de microorganismos resistentes a antimicrobianos disponíveis no mercado [45].

A atividade antimicrobiana das AgNPs tem influência de vários fatores, dentre eles se tem: o tamanho, a morfologia, a carga de superfície, o revestimento superficial e até mesmo o procedimento de síntese dessas nanopartículas [50]. Como as AgNPs possuem maior superfície de contato disponível para interação, devido suas pequenas dimensões, isso pode acarretar uma maior efetividade do poder antimicrobiano. Um outro efeito possível das AgNPs é que elas não apenas interajam com superfície da membrana, mas que possam invadir o interior da célula, acarretando perturbação da permeabilidade e da respiração celular [20].

Para averiguação da potencialidade antimicrobiana das nanopartículas sintetizadas foram utilizadas bactérias gram-positivas e gram-negativas. Estas diferenciam-se pela composição estrutural externa à membrana plasmática [53]. A superfície externa de bactérias gram-positivas é composta por uma espessa camada de peptidoglicano e contém polissacarídeos ácidos (ácidos teicóicos), que conferem uma carga líquida negativa à sua superfície. As bactérias gram-negativas possuem além da membrana plasmática, outra membrana de proteção, uma membrana externa composta principalmente por fosfolípidios no folheto interno e lipopolissacarídeos na camada externa, além de proteínas do tipo porinas que encerram um canal aquoso que pode regular a passagem de espécies hidrofílicas [27][54], como pode ser visto na Figura 5.

Essa diferença na composição também é a base de funcionamento do teste microbiológico que as difere, conhecido como teste de Coloração de Gram, que recebeu esse nome por ter sido criado pelo patologista dinamarquês Hans Christian Joachim Gram em 1884. O procedimento permite aumentar o contraste e evidenciar a estrutura bacteriana ao microscópio e envolve 3 etapas principais: coloração com violeta de cristal (cor roxa), descoloração (usando etanol/acetona) e contra coloração (usando corante Safranina de cor vermelha). A presença da espessa camada de peptidoglicano nas bactérias Gram-positivas faz com que elas retenham o cristal violeta em suas paredes celulares, apresentando-se na cor roxa, enquanto que as bactérias Gram-negativas, não retém o cristal violeta durante o processo de descoloração e recebem a cor vermelha no processo de coloração final [55].

Figura 5 – Componentes da parede celular de Bactérias Gram-positiva e Gram-negativa



Fonte: Autoria própria

As AgNPs elaboradas ao longo desta pesquisa tiveram sua ação antimicrobiana avaliada no combate às seguintes bactérias:

Staphylococcus aureus: São bactérias Gram-positivas em forma de esferas (cocos), que foram identificadas pela primeira vez na década de 60 e, desde então, vem criando resistência a diversas novas classes de fármacos antimicrobianos administradas no seu combate, dentre elas penicilinas, sulfonamidas, tetraciclina, glicopeptídeos etc. O *Staphylococcus aureus* é um organismo comensal e um patógeno debilitante que pode causar uma série de infecções bacterianas humanas, incluindo a pele e outros tecidos moles, ossos, corrente sanguínea, trato respiratório, pneumonia, infecções da válvula cardíaca e infecções ósseas [56,57].

Estima-se que cerca de 30% da população seja colonizada intermitentemente por *S. aureus*. Embora essa colonização normalmente não seja prejudicial ao hospedeiro, *S. aureus* pode violar suas defesas inatas e obter acesso a tecidos mais

profundos, causando uma série de infecções superficiais e invasivas. Em ambientes hospitalares, pode iniciar infecções em locais cirúrgicos ou a partir de dispositivos médicos implantados, incluindo válvulas cardíacas artificiais, cateteres, articulações protéticas e implantes ortopédicos. Durante a bacteremia, o *S. aureus* circula no sangue e pode semear órgãos resultando em infecções disseminadas como endocardite, osteomielite e infecções do trato urinário descendente. A capacidade desse patógeno persistir em uma grande variedade de nichos hospedeiros e tecidos profundos dificultam sua erradicação, resultando em infecções recorrentes [58].

Escherichia coli (*E. coli*) é uma bactéria Gram-negativa, da família *enterobacteriaceae* que residem normalmente no intestino de pessoas saudáveis, mas algumas cepas podem causar infecção no trato digestivo, trato urinário ou muitas outras partes do corpo. É uma bactéria anaeróbia facultativa e fermentadora de açúcares, que possui flagelos em sua superfície que atuam como hélices, permitindo seu movimento [59].

Escherichia coli pode causar infecções graves em humanos e animais e sua transmissão se dá por inúmeras vias, como contato direto, contato com excreções de animais ou via cadeia alimentar. Nas últimas décadas, um número crescente de genes de resistência foi identificado em *E. coli*, que tem a capacidade de atuar como um doador e como receptor desses genes de resistência. No geral, sua resistência antimicrobiana em *E. coli* pode ser considerada um dos principais desafios atuais [60].

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria gram-negativa, baciliforme (característica morfotintorial) e aeróbia, presente no meio ambiente e favorecida por áreas úmidas. Em circunstâncias particulares *P. aeruginosa* torna-se um patógeno oportunista, responsável por infecções graves. Infecta normalmente as vias aéreas e as vias urinárias e pode causar infecções no sangue, infecções por queimaduras, dermatite de banheira de hidromassagem, infecções do ouvido externo, além de colonizar dispositivos médicos (cateteres, nebulizadores, umidificadores) [61].

As infecções por *Pseudomonas aeruginosa* são comuns, principalmente em pacientes hospitalizados e hospedeiros imunocomprometidos, estando associadas a altas taxas de mortalidade. Quando surgiram na década de 60 os primeiros casos dessa bacteremia gram-negativa e antibióticos antipseudomonais não estavam disponíveis, a taxa de mortalidade chegava até 90% [62]. Entretanto, conforme um estudo de coorte retrospectivo, observacional e multicêntrico conduzido em 25 centros de nove países na Europa, Austrália e Israel de 2009 a 2015, essa taxa varia de 20 a 40% em até 30 dias de infecção e continuam apontando como fator de risco o

tratamento inadequado com antibióticos, devido à sua resistência natural e adquirida aos antibióticos comumente usados, tais como ceftazidima, carbapenêmicos ou piperacilina/ tazobactam como monoterapia por pelo menos 72 horas [63].

Klebsiella pneumoniae (*K. pneumoniae*) é um bastonete Gram-negativo aeróbio facultativo em relação aos seres humanos podendo variar desde colonização a infecções, principalmente em pacientes hospitalizados. Destaca-se entre os bacilos gram-negativos, por apresentar uma importante fonte de resistência a antibióticos transferíveis, a resistência plasmidial. Dentre as síndromes clínicas mais frequentes citam-se: pneumonias, infecções do trato urinário, manifestações de feridas, bacteremia, rinite crônica atrófica, artrites, enterites, meningites em crianças e sepse [64].

A *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase é uma bactéria Gram-negativa (enterobactéria) popularmente conhecida por superbactéria KPC, porque a *K. pneumoniae* após sofrer mutações genéticas como mecanismo de sobrevivência, passou a produzir a enzima carbapenemase, capaz de inativar os carbapenêmicos (Ertapenem, Imipenem, Doripenem e Meropenem) e outros Antimicrobianos Betalactâmicos. Como o primeiro relato descrito sobre essa enzima foi em 1996 no Leste dos Estados Unidos em uma cepa de *K. pneumoniae*, associou-se o nome da enzima ao microrganismo de onde foi isolada pela primeira vez, recebendo, então, o nome de *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* (KPC) [65][66].

A enzima KPC é uma carbapenemase que confere função hidrolítica contra cefalosporinas, penicilinas e monobactâmicos e menor atividade contra cefamicinas e carbapenêmicos. As carbapenemases ocorrem mais frequentemente em enterobactérias, sendo predominantes nos gêneros *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Salmonella*, *Proteus* e *Morganella*. As carbapenemases mais prevalentes em enterobactérias são codificadas por genes dos grupos blaKPC, blaIMP, blaVIM, blaNdm e blaOxa, dentre as quais destaca-se a produção de KPC [67,68].

Quando as bactérias são resistentes aos carbapenêmicos, restam poucos antibióticos como alternativas de tratamento e costumam ser chamadas de “Superbactérias”. A ocorrência de enzimas que degradam os carbapenêmicos em enterobactérias tornou-se endêmica nos hospitais, sendo responsável pelo aumento do número de surtos em várias instituições de saúde no Brasil e vários países ao redor do mundo [69,70].

Ocorre que, em diversos países, incluindo o Brasil, restam poucas opções de antimicrobianos para o tratamento de infecções por *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase, onde se destacam a amicacina, a tigeciclina e a polimixina B [71]. Os problemas encontrados nesses tratamentos são resistência a amicacina e a falta de difusão nos tecidos da tigeciclina, restando como única possibilidade terapêutica a polimixina B, que após ter sido praticamente abolida entre 1970 e 1980, voltou a ser administrada a pacientes com infecções por bactéria gram-negativas multirresistentes, internados em unidades de terapia intensiva, devido à ausência de novos antimicrobianos para combater esses patógenos. A polimixina B é um antibiótico polipeptídeo com potente ação sobre várias bactérias gram-negativas que apresentam pouca difusão no tecido pulmonar além de efeitos neurotóxicos e nefrotóxicos. Estes fármacos concentram-se no fígado e rins, tendo pequena passagem através da barreira liquórica, mesmo na presença de inflamação. O efeito tóxico mais frequente é a lesão renal, que se caracteriza por necrose tubular aguda, diretamente relacionado ao mecanismo de ação desses antimicrobianos [72,73].

A necessidade de desenvolvimento de novos compostos é ratificada por políticas governamentais, como é o caso do Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos (PAN-BR), elaborado em 2018 pelo governo brasileiro e pautado pelos princípios orientadores definidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS), pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) e pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) e composto por eixos estratégicos, operacionais e de monitoramento. O PAN-BR compreende o período de 2018-2022 e está estruturado em cinco objetivos estratégicos:

1. Melhorar a conscientização e a compreensão a respeito da resistência aos antimicrobianos por meio de comunicação, educação e formação efetivas.
2. Fortalecer os conhecimentos e a base científica por meio da vigilância e da pesquisa.
3. Reduzir a incidência de infecções com medidas eficazes de saneamento, higiene e prevenção de infecções.
4. Otimizar o uso de medicamentos antimicrobianos na saúde humana e animal.
5. Preparar argumentos econômicos voltados ao investimento sustentável e aumentar os investimentos em novos medicamentos, meios diagnósticos e vacinas e outras intervenções [74].

1.5. Nanotoxicologia

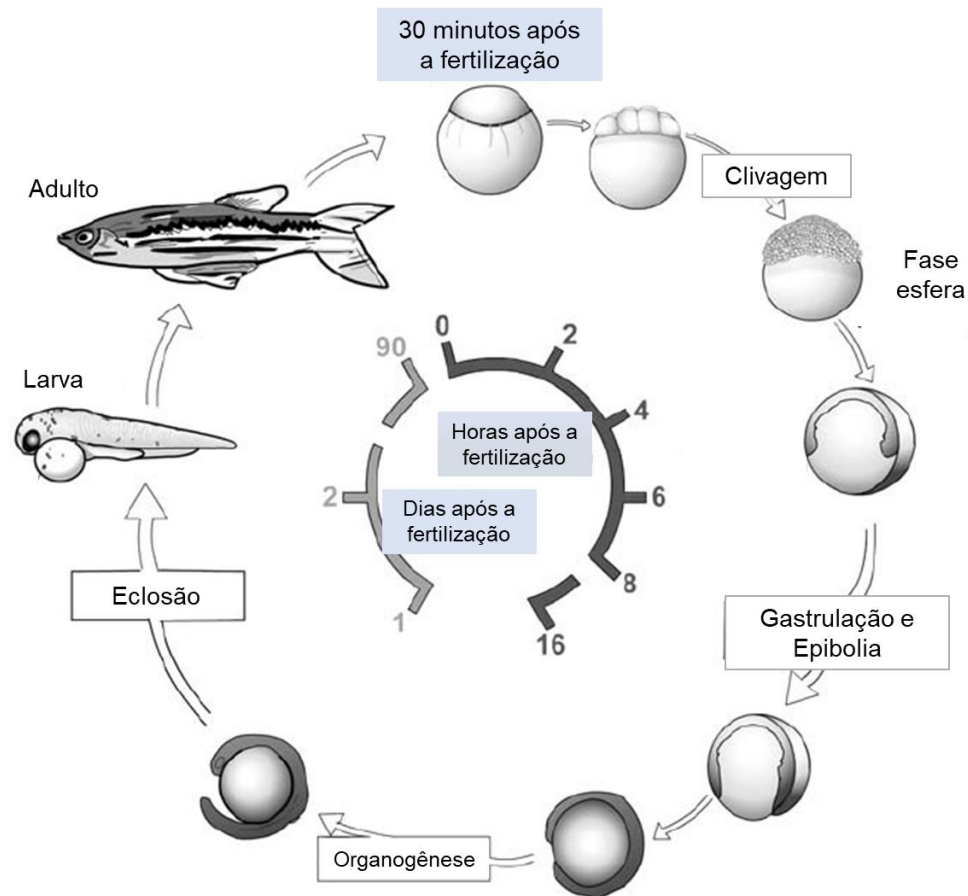
Apesar dos benefícios incontestáveis e das diversas aplicações das AgNPs no setor biomédico, a segurança e toxicidade desses nanomateriais é, atualmente, uma preocupação latente para o público e para a comunidade científica. Sabe-se que nanopartículas obtidas através de síntese verde representam uma opção de menor impacto ao meio ambiente e ao próprio ser humano quando comparadas com as obtidas através de síntese química [19]. Entretanto, ainda existe uma lacuna acerca da toxicidade desses nanomateriais que só pode ser completamente preenchida através da realização de pesquisas e estudos *in vitro* e *in vivo* sob condições controladas a fim de estudar seus efeitos deletérios em organismos vivos.

Dessa forma, a nanotoxicologia se faz presente como uma importante ferramenta da nanotecnologia, tendo como foco a elucidação dos mecanismos, caminhos e rotas de entrada das nanopartículas em organismos multicelulares complexos, além do estudo da relação entre suas propriedades e a indução de respostas tóxicas aos sistemas biológicos [75,76].

Experimentos *in vivo* utilizando peixes do tipo Zebrafish (*Danio rerio*) são capazes de mimetizar o potencial tóxico das AgNPs e tem sido amplamente utilizados como modelo para testes toxicológicos em vertebrados, particularmente durante a embriogênese [77].

Este modelo biológico foi escolhido por se tratar de um animal aquático de fácil aquisição e apresentar vantagens em relação a outros modelos animais como, por exemplo, ciclo de reprodução curto e desenvolvimento embrionário rapidamente completado com estágios de desenvolvimento bem definidos (Figura 6).

Figura 6– Estágios do ciclo de vida do Zebrafish desde a fertilização até a fase adulta



Fonte: Adaptado de D'Costa & Shepherd [78]

O teste de toxicidade aguda em embriões de peixes (FET - *Fish Embryo Acute Toxicity*), é capaz de fornecer importantes informações sobre os indicadores de letalidade: (i) coagulação de ovos fertilizados, (ii) falta de formação de somito, (iii) falta de descolamento da cauda-gema do saco vitelino e (iv) falta de batimento cardíaco [79].

Além disso, os embriões são transparentes, o que possibilita o estudo em tempo real dos transportes e os efeitos das AgNPs no desenvolvimento embrionário e a imagem direta de fenótipos patológicos e de desenvolvimento inadequado in vivo. Como uma grande quantidade de embriões de peixes tipo zebrafish pode ser gerada rapidamente a um custo muito baixo, permite que este modelo seja um teste in vivo relativamente simples e economicamente viável para detectar biocompatibilidade, eficácia farmacológica e toxicidade de nanomateriais. assim como impactos e riscos potenciais que possam causar ao meio ambiente [77,80].

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Produzir e caracterizar nanopartículas de prata por síntese tradicional e síntese verde a fim de avaliar suas características antimicrobianas e nanotoxicológicas.

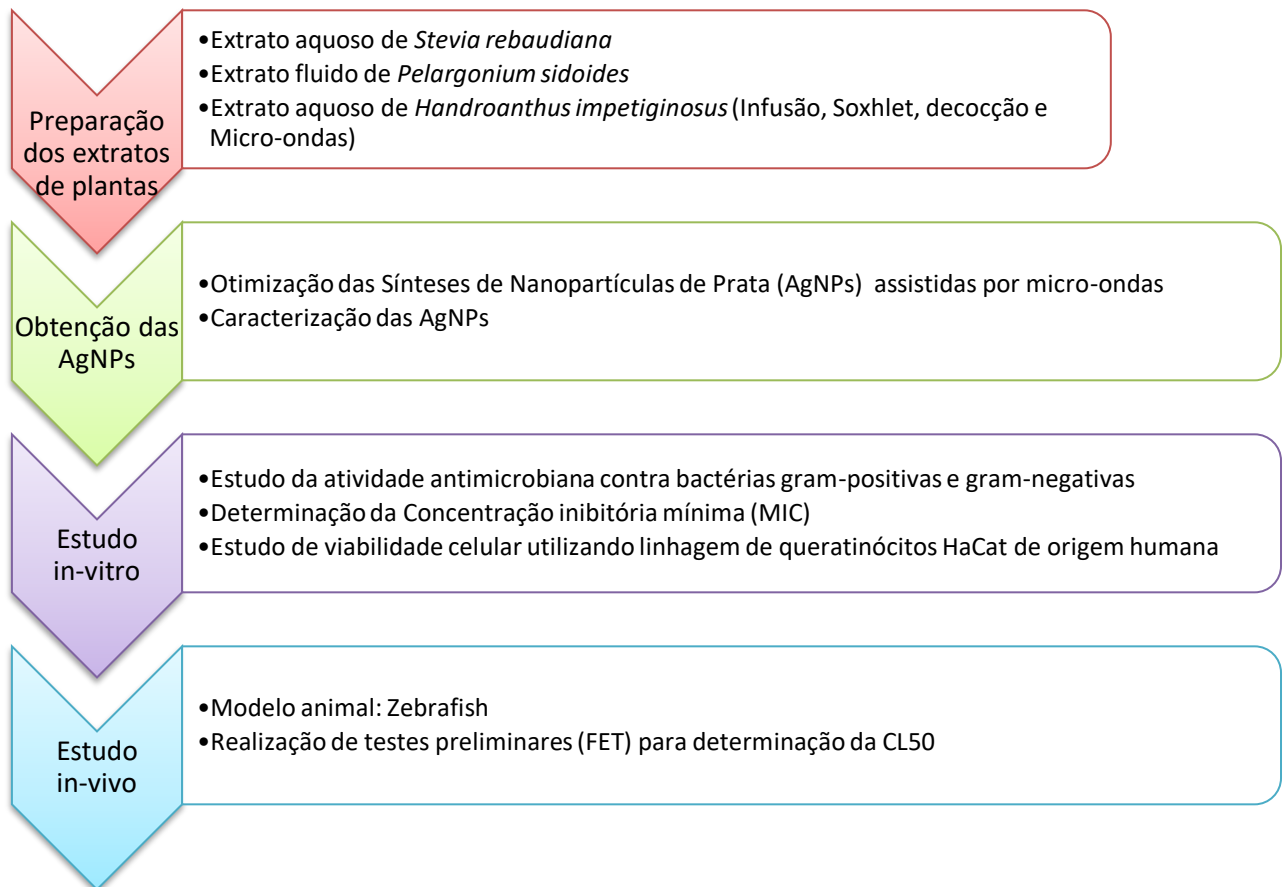
2.2. Objetivos Específicos

- Elaborar nanopartículas de prata através de sínteses assistidas por micro-ondas por diferentes rotas de sínteses em meios aquosos tradicionais;
- Otimizar as sínteses verdes através de planejamentos estatísticos do tipo Box-Behnken;
- Caracterizar a composição, tamanho, morfologia, estrutura cristalina, características de superfície e propriedades coloidais das AgNPs sintetizadas;
- Avaliar a atividade antimicrobiana das AgNPs obtidas com uso de extratos de *Handroanthus impetiginosus* e *pelargonium sidoides* contra bactérias gram-negativas e gram-positivas e a viabilidade celular utilizando linhagem de queratinócitos (linhagem HaCat) de origem humana;
- Estudar a relação entre as propriedades das nanopartículas de prata elaboradas e sua indução de respostas tóxicas aos sistemas biológicos utilizando como modelo peixes da espécie Zebrafish.

3. Metodologia

Um resumo das técnicas empregadas no trabalho está representado na figura 7.

Figura 7 – Esquema das técnicas empregadas na pesquisa



3.1. Obtenção dos extratos vegetais

As amostras de *Stevia rebaudiana* foram obtidas através do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas de Campinas (CPQBA) e as folhas foram secas em estufa, trituradas e peneiradas.

O extrato de *Stevia rebaudiana* foi obtido com o uso de uma solução extrativa de álcool 70% preparada com álcool etílico Absoluto Puro (mínimo de 99,5%) e água ultrapura. A extração foi realizada em um reator de micro-ondas de alto desempenho modelo *Monowave 300* da marca Anton Paar. O método escolhido para a realização

da extração através do micro-ondas foi o *Heat to Temperature in Time* (HTTT) e as variáveis foram proporção vegetal/ solvente 1:30, temperatura de 80°C, tempo de reação de 2 minutos e 600 rpm de agitação.

O extrato hidroalcoólico foi filtrado com papel de filtro em funil de vidro, levado ao rotoevaporador (G3 Heidolph 2, da marca Heidolph) nas condições de 70 mbar de vácuo, 85 rpm e temperatura do banho de 40°C para a evaporação do etanol e ressuspendido em água ultrapura até o volume inicial, conforme apresentado na figura 8.

Figura 8 – Etapas do preparo da solução aquosa de estévia



O extrato fluido de *Pelargonium sidoides* foi doado pelo Grupo Centroflora (Código do produto: 200219) e os estudos realizados foram cadastrados conforme o SisGen (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado), sob o número A484B78, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

As entrecascas de *Handroanthus impetiginosus* (Mart. Ex. DC.) Mattos (ipê roxo) foram coletadas pela manhã em Brasília / DF (latitude: -15.937266 e longitude: -47.959666), conforme o SisGen (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado, A7B10E5). Um exsicate foi depositado no Herbário da Universidade de Brasília, sob o Voucher Fagg CW 2528.

Após a coleta, as entrecascas foram submetidas a procedimentos de limpeza para separá-las do cerne. A matéria botânica foi seca a 50° C, em estufa, por três dias e, posteriormente, moída em um moinho de facas tipo Willey.

Os extratos de ipê roxo foram obtidos através de 4 técnicas diferentes, tendo sido as 3 primeiras de acordo com o Guia da Farmacopeia Brasileira [81]:

- Infusão: 100 ml de água destilada fervente foram adicionados a 4 g de droga vegetal e, em seguida, o sistema foi deixado em repouso por 15 minutos.

- Decocção: 4g da droga vegetal são adicionados a 100 mL de água fervente e deixados sob fervura por 15 minutos com vidro de relógio em cima. Em seguida, a mistura é filtrada e reservada para utilização após o resfriamento.

- Soxhlet: 20 g de droga vegetal foram adicionados a 500 mL de água destilada. A droga vegetal foi embrulhada em um cartucho de papel de filtro e colocada dentro do extrator de soxhlet. O conjunto de extração foi colocado em uma manta de aquecimento a uma temperatura média de 100 ° C por um período de 12 horas, durante a noite.

- Extração assistida por micro-ondas: A quarta técnica de extração avaliada foi realizada em um reator de micro-ondas de alto desempenho da Anton Paar, modelo Monowave 300, no modo de reação HTTT (Aquecimento à temperatura no tempo). 20 mL de água destilada e 0,8 g de droga vegetal foram adicionados a um vaso de reação tipo G30 e a reação ocorreu nas seguintes condições: 4 minutos de reação a 120 ° C (5 minutos para alcançar) por 4 minutos sob agitação de 600 rpm e resfriando até 40°C).

A proporção de 1:25, ou seja, 1 g de fármaco vegetal para 25 mL de solvente (água destilada) foi respeitada em todas as técnicas descritas. As técnicas foram comparadas a fim de saber qual apresentou melhor capacidade extrativa dos componentes da droga vegetal de *Handroanthus impetiginosus*. Esta parte da pesquisa faz parte do Trabalho de Conclusão de Curso de Mota (2018) [82], realizado sob orientação da Prof^a Paula Melo Martins e co-orientação da doutoranda Renata Pascoal Illanes Tormena.

3.2. Análise dos extratos

A análise farmacognóstica dos extratos de plantas empregados nas sínteses das AgNPs foi realizada através das análises de resíduo seco (secagem em banho Maria modelo SL-154, marca SOLAB e estufa da marca Lucadema), densidade (densímetro eletrônico, modelo DMA 4500M da marca Anton Paar) e polifenóis totais com reativo de Folin.

A fim de comparar as técnicas de extração da entrecasca de ipê roxo, foram realizados testes qualitativos [83] com os 4 extratos.

3.2.1. Análise de resíduo seco

O ensaio de resíduo seco consistiu na transferência de 2 mL de amostra para um pesa-filtro (pesado vazio e depois cheio) e secagem em banho Maria a 80°C. Após a secagem, os recipientes permanecem em estufa por 3h a 105°C. Após resfriamento as amostras foram repesadas para obtenção do percentual de resíduo seco de cada extrato.[81]

3.2.2. Análise de Polifenóis totais

O ensaio de polifenóis totais dos extratos com reagente de *Folin-Ciocalteu* foi realizado através da técnica de espectrofotometria de UV-Visível em metodologia adaptada de *Singleton et al* [84].

Inicialmente, foi preparada a solução de carbonato de sódio 20 % m/v em água deionizada, com validade de uma semana. Foram adicionados 20g de carbonato de sódio anidro em 80 mL de água deionizada quente. Após resfriamento, foi estocada em refrigerador e, após 24h, a solução foi filtrada e avolumada para 100 mL. A solução de ácido gálico 5000mg/L (ppm) foi preparada a partir da dissolução de 0,500 g de ácido gálico em água deionizada e avolumada para 100 mL, estocada em refrigerador. A partir desta, foram preparadas as seguintes diluições: 50; 100; 150; 200; 250; 300; 400; e 500 mg/L.

O seguinte procedimento foi realizado para o preparo de todas as amostras:

1. Retirou-se 50 µL da amostra diluída para um tubo de ensaio;

2. Adicionou-se em cada tubo 3,95 mL de água destilada e 250 µL do reagente de Folin;
3. Após o tempo de espera de 3 minutos, adicionou-se 750 µL da solução de carbonato de sódio 20%
4. Realizou-se a homogeneização com auxílio de um vórtex e as amostras foram guardadas no escuro por 2 horas. Após este tempo foi realizada a leitura da absorbância em 750nm.

Os resultados obtidos para as diluições da solução mãe de ácido gálico foram plotados em gráfico (ácido gálico na alíquota 0,1 mL X absorbância) para a determinação da equação da reta.

As concentrações de polifenóis totais presentes nos extratos foram determinadas a partir da interpolação dos valores de absorbância das amostras na equação da reta da curva de calibração do ácido gálico.

3.2.3. Estudo qualitativo dos extratos de ipê roxo

O estudo qualitativo foi conduzido conforme metodologia descrita em Matos, 2009 [83]. Foram pesquisadas a presença de fenóis, taninos, antocianinas, flavonoides, esteroides, saponinas, alcaloides, quinonas e cumarinas.

4 tubos de ensaio contendo 4 ml de extrato foram colocados em banho-Maria para a redução do volume até aproximadamente a metade. O pH foi ajustado para 4 e a amostra filtrada. Em seguida, foi realizada a sequência de experimentos resumida na tabela 1:

Tabela 1 – Roteiro dos estudos qualitativos dos extratos de ipê

| Compostos investigados | Procedimento | Indicações |
|-------------------------|--|---|
| Fenóis e taninos | Adicionar 3 gotas de FeCl ₃ etanólico ao filtrado acidificado e comparar com o respectivo branco. | Coloração vermelha e azul: indicativo para taninos hidrossolúveis. Coloração verde: indicativa para taninos condensados. |

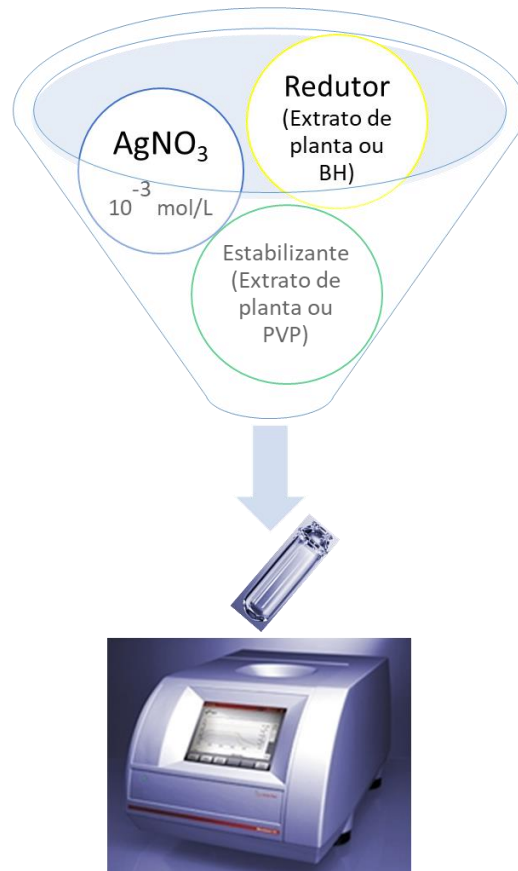
| | | |
|--|--|--|
| <p>Antocianinas e flavonóides</p> | <p>Corrigir o pH de 3 tubos contendo 2 mL do filtrado acidificado para 3, 8/9 e 11, respectivamente.</p> | <p>Vermelho em pH 3, lilás em pH 8 e azul em pH 11: presença de antocianinas e antocianidinas.</p> <p>Amarelo em pH 11: Presença de flavonas, flavonóis e xantonas.</p> <p>Vermelho em pH 3 e 11: presença de charconas e auronas.</p> <p>Vermelho alaranjado em pH 11: presença de flavonóis.</p> |
| <p>Esteróides e triterpenos</p> | <p>Evaporar 2 béqueres contendo 10 ml de extrato e manter o resíduo seco em dessecador. 1 deles lavar com 1ml de clorofórmio por 3 vezes. Adicionar 3 gotas de H₂SO₄ concentrado.</p> | <p>Surgimento de cor azul e verde: indicativo para presença de esteroides livres.</p> <p>Coloração marrom ou vermelha: indica presença de triterpenos penta cíclicos livres.</p> |
| <p>Saponinas</p> | <p>Ao béquer contendo os resíduos não solúveis em clorofórmio, adicionar 6 ml de água destilada e filtrar. Agitar o filtrado de 2 a 3 minutos.</p> | <p>Presença de espuma persistente é indicativo para saponinas.</p> |
| <p>Alcalóides</p> | <p>Lavar 5 ml de extrato em um funil de separação com 30, 20 e 10 mL de solução éter-clorofórmio (3:1) e reservar as fases. Tratar a solução éter-clorofórmio com Na₂SO₄ para retirar o excesso de água e filtrar. Lavar esta nova solução por 3 vezes com HCl concentrado e separar as soluções.</p> <p>Em 1 ml da solução aquosa ácida pingar 3 gotas de reagente de Dragendorff</p> | <p>Formação de precipitado floculoso: indicativa para presença de alcalóides.</p> |

| | | |
|-----------------------------|--|--|
| Quinonas e cumarinas | No tubo contendo 5 ml da solução éter-clorofórmio, adicionar 2 ml de NH_4OH (6mol/L) e observar a separação de fases. | Fase aquosa: Surgimento de coloração vermelha é indicativo para quinonas |
| | Adicionar 15 ml de etanol ao tubo contendo a solução etérea e filtrar. Fazer 2 manchas de cerca de 1,5 cm com esse filtrado sobre papel filme. Em uma das manchas pingar 1 gota de solução de KOH (1 mol/L). Expôr à luz UV, cobrindo parcialmente as manchas e descobrindo-as após 3 minutos. | Fase etérea: O surgimento de fluorescência azul na metade não encoberta da mancha alcalinizada indica a presença de cumarinas. |

3.3. Sínteses de AgNPs assistidas por micro-ondas

As sínteses de AgNPs foram realizadas em um frasco de reação de vidro de borossilicato de 30 mL (modelo G30, Anton Paar) em reator de micro-ondas de alta performance modelo Monowave 300 da marca Anton Paar, no Laboratório de Nanobiotecnologia da Faculdade de Ceilândia (FCE/UnB), conforme esquema apresentado na figura 9. Neste tipo de reação, o extrato aquoso da planta ou o agente redutor juntamente com o estabilizante (no caso da síntese Química) foram misturados com uma solução de AgNO_3 de concentração normalmente igual a $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L sob uma proporção específica até o volume final de 20,0 mL. A mistura foi aquecida em condições solvotérmicas assistidas por micro-ondas sob diferentes condições reacionais. Para obter a amostra em pó, as amostras contendo AgNPs em solução estável aquosa foram liofilizadas.

Figura 9 – Síntese de AgNPs em Micro-ondas de alta resolução



3.3.1. Síntese Química de AgNPs

O método desenvolvido por Malina *et al.* [85] empregando Borohidreto de sódio (BH) como agente redutor e Polivinilpirrolidona (PVP) como estabilizante foi testado e adaptado ao reator de micro-ondas de alto desempenho.

Para a síntese, foram adicionados ao frasco de reação 20 mL de solução de Polivinilpirrolidona (PVP) a 1% + 0,080 g de AgNO_3 + 0,008 g de Borohidreto de Sódio (BH), sob as seguintes condições: Método Constant power m/v, 800 W a 40°C por 5 minutos e 600 rpm de agitação.

A formação das nanopartículas de Prata obtidas por síntese Química (AgNP – Quim) foi monitorada através da técnica de Espectrofotometria no UV-Vis através da observação de uma banda de ressonância plasmônica superficial (SPR) característica das AgNPs para fins de comparação com as sínteses verdes.

3.3.2. Síntese verde empregando extrato de plantas

Após a obtenção dos extratos, os parâmetros reacionais de cada síntese foram testados e as sínteses foram monitoradas com o auxílio de um espectrofotômetro UV-Vis, através de varredura de 200 a 800nm, pois a presença de uma banda de ressonância plasmônica superficial indica a formação das AgNPs.

3.3.3. Otimização das sínteses de AgNPs com Ipê roxo e Pelargônio

Após realização de testes preliminares monitorados através da técnica de espectrofotometria UV-Vis e Difração de raios-X (DRX) (item 3.4), foi realizado um planejamento estatístico Box-Behnken variando temperatura, tempo e proporção (extrato fluido/solução de AgNO_3) com condições semelhantes as empregadas no planejamento Box-Behnken do Ipê roxo. (Tabelas 2,3 e 4)

Uma vez definidos os 3 níveis de cada parâmetro, as sínteses foram realizadas em única etapa em micro-ondas, seguindo o planejamento experimental Box-Behnken apresentado na Tabela 1, visando determinar a melhor condição reacional para a obtenção de AgNPs.

Após realização de testes preliminares monitorados através da técnica de espectrofotometria UV-Vis e Difração de raios-X (DRX), foi realizado um planejamento estatístico Box-Behnken (Tabelas 1, 2 e 3) variando temperatura, tempo e proporção (extrato fluido/solução de AgNO_3) para ambas as AgNPs.

Tabela 2 – Fatores estudados e seus níveis no planejamento Box Behnken

| FATORES | NÍVEIS | | |
|---|--------|-----|-----|
| | -1 | 0 | +1 |
| Temperatura (°C) | 100 | 150 | 200 |
| Tempo (min) | 5 | 10 | 15 |
| Proporção (%) extrato/ AgNO_3 10^{-3} mol/L | 5 | 10 | 15 |

Tabela 3 – Planejamento Box Behnken com fatores codificados

| Experimento | Temperatura | Tempo | Proporção |
|-------------|-------------|-------|-----------|
|-------------|-------------|-------|-----------|

| | | | |
|----|----|----|----|
| 1 | -1 | -1 | 0 |
| 2 | 1 | -1 | 0 |
| 3 | -1 | 1 | 0 |
| 4 | 1 | 1 | 0 |
| 5 | -1 | 0 | -1 |
| 6 | 1 | 0 | -1 |
| 7 | -1 | 0 | 1 |
| 8 | 1 | 0 | 1 |
| 9 | 0 | -1 | -1 |
| 10 | 0 | 1 | -1 |
| 11 | 0 | -1 | 1 |
| 12 | 0 | 1 | 1 |
| 13 | 0 | 0 | 0 |
| 14 | 0 | 0 | 0 |
| 15 | 0 | 0 | 0 |

Tabela 4 – Planejamento Box Behnken com valores atribuídos para a síntese de AgNPs:

| Experimento | Temperatura | Tempo | Proporção |
|-------------|-------------|-------|-----------|
| 1 | 100 | 5 | 10 |
| 2 | 200 | 5 | 10 |
| 3 | 100 | 15 | 10 |
| 4 | 200 | 15 | 10 |
| 5 | 100 | 10 | 5 |
| 6 | 200 | 10 | 5 |
| 7 | 100 | 10 | 15 |
| 8 | 200 | 10 | 15 |
| 9 | 150 | 5 | 5 |
| 10 | 150 | 15 | 5 |
| 11 | 150 | 5 | 15 |
| 12 | 150 | 15 | 15 |
| 13 | 150 | 10 | 10 |
| 14 | 150 | 10 | 10 |
| 15 | 150 | 10 | 10 |

3.4. Métodos de caracterização das AgNPs

Espectrofotometria de Ultravioleta-Visível (UV-Vis): Os espectros UV-Vis foram obtidos usando um espectrômetro Hitachi 3900 H UV-vis em uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 1,0 cm. As suspensões foram diluídas 10 vezes em água ultrapura antes da análise. Estas análises foram realizadas no Laboratório de Nanobiotecnologia (CEM-4/FCE/UnB).

Difração de raios-X: As AgNPs estáveis em solução foram secas em um liofilizador modelo L 101, da Liotop e aplicadas em um porta amostras de silício para análise por difração de raios-X (DRX). Foi utilizado um difratômetro modelo Miniflex 600 de raios X (Rigaku), usando radiação Cu-K α ($\lambda = 1,541 \text{ \AA}$), operando a 40 kV e 30 mA. para monitorar a estrutura cristalina das AgNPs. As condições foram: ângulos entre 30 a 80°, step 0,05 e speed 5. Estas análises foram realizadas no Laboratório de Nanobiotecnologia (CEM-4/FCE/UnB)

Após a otimização das sínteses verdes, foram realizadas as seguintes análises com as amostras selecionadas:

Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR): os espectros foram obtidos com pastilhas de KBr na região de 4000-400 cm^{-1} em um espectrofotômetro Varian FTIR com resolução de 2 cm^{-1} no Laboratório de Instrumentação Analítica (FCE/UnB) e também por transformada de Fourier com refletância total atenuada (ATR-FTIR) em um espectrofotômetro Varian 640-IR com acessório ATR, na Central Analítica do Instituto de Química (UnB)

Microscopia eletrônica de transmissão (MET): As amostras foram analisadas em um microscópio eletrônico de transmissão, modelo JEOL JEM-2100 (operando a 200 kV), equipado com EDS, da Thermo Scientific. As amostras de TEM foram preparadas dispersando as AgNPs em água ultrapura sob ultrassom e depois aplicando essa suspensão em uma grade de cobre com filme de carbono. As análises foram realizadas em 2 laboratórios: Laboratório CICBioGUNE em San Sebastian, Espanha (AgNP-Est e AgNP-Pel) e Laboratório Multiusuário de Microscopia de Alta Resolução na Universidade Federal de Goiás (AgNP-Quim e AgNP-Ipê)

Determinação do potencial Zeta (ζ): Foi realizado usando um equipamento de espalhamento de luz dinâmico Nano-Zetasizer – ZS, do modelo ZEN3600 da Malvern Instruments, acoplado a um titulador MPT-2 com cubeta descartável DTS 1070 (Malvern) no Laboratório de Nanobiotecnologia (CEM-4/FCE/UnB). Os resultados das mobilidades eletroforéticas foram convertidos em valores de potencial zeta usando a equação de Henry.

3.5. Estudo da atividade antimicrobiana de nanopartículas de Prata:

3.5.1. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC)

A avaliação da atividade antimicrobiana da nanopartícula foi realizada no Laboratório de Microbiologia da Faculdade LS Educacional, sob a supervisão do Prof. Daniel Oliveira Freire, através de ensaios da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) pelo método de microdiluição em caldo conforme a descrição da *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) [86]. A CIM é definida como a menor concentração (expressa em mg/L, µg/mL ou UI/mL) de um agente antimicrobiano capaz de inibir o crescimento microbiano. Os inóculos foram preparados com o crescimento das cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase ATCC BAA-1705, incubadas em caldo Muller Hinton (MH).

A concentração foi ajustada pela turbidez de 0,5 na escala de Mcfarland, apresentando aproximadamente 1×10^8 UFC (Unidade Formadora de Colônia)/mL, sendo ajustada entre 0,08 – 0,10 de densidade óptica com o auxílio de um espectrofotômetro de densidade ótica a 625 nm.

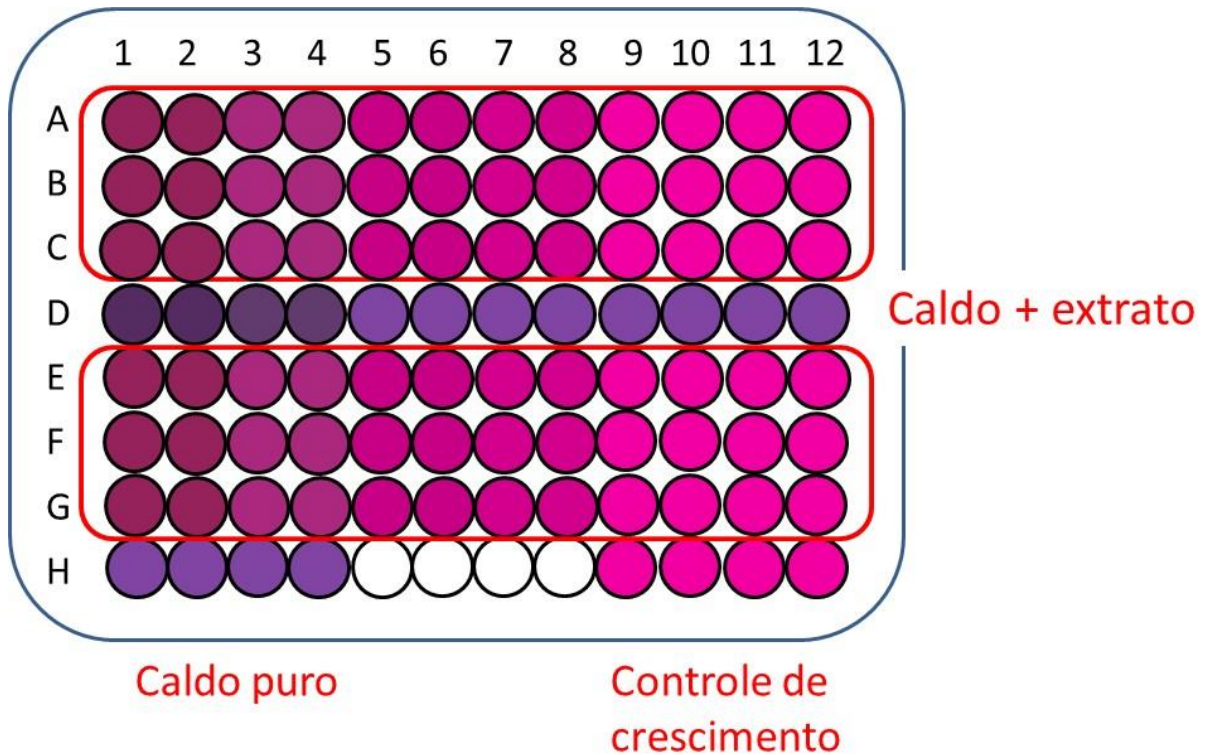
A partir da concentração inicial da AgNP foram realizadas diluições sucessivas com o auxílio de uma pipeta multicanal. Os ensaios foram realizados em microplacas de ELISA, de fundo chato, em triplicata contra cada cepa de bactéria. As placas são compostas de 96 orifícios, identificados por números (colunas) e letras (fileiras). Cada poço das fileiras A, B, C, E, F e G apresentou um volume final de 200 µL, recebendo 80 µL de caldo MH, 100 µL de solução de AgNP e 20 µL do inóculo. As diluições das culturas em caldo MH resultaram em uma concentração final de 1×10^5 UFC/mL por poço. Os controles receberam os seguintes tratamentos:

- Controle de crescimento (H9, H10, H11 e H12): 180 µL de caldo MH e 20 µL do inóculo;
- Caldo puro (H1, H2, H3 e H4): 200 µL de caldo Mueller Hinton;
- Caldo + extrato (linha D): 100 µL de caldo Mueller Hinton e 100 µL da AgNP (Realizado para que a coloração resultante do extrato de planta com o caldo MH fosse subtraída do resultado final de absorbância)

As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37° C por 24 horas e o procedimento foi realizado em triplicata. A leitura das placas foi realizada em leitora

de microplaca Multiskan®, com comprimento de onda de 630nm. A figura 10 apresenta um esquema do teste de CIM em microplaca.

Figura 10 – Teste de inibição e Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) por microdiluição



Os dados da leitura de absorvância obtidos foram calculados através da seguinte fórmula, indicando a porcentagem e inibição alcançada:

$$\% \text{ de inibição} = \frac{(DO \text{ obtida} - DO \text{ cont. Neg})}{(DO \text{ contr. Pos} - DO \text{ cont. Neg})} \times 100$$

A análise da repetibilidade dos dados foi executada através do cálculo do Intervalo de Correlação Intraclasse a 95% e cálculos de IC 50 foram executados pela metodologia do ajuste à curva de dose resposta-sigmoidal. Os programas estatísticos utilizados foram o SPSS versão 22.0 e o GraphPadprism versão 7.0 ao nível de significância de 5%.

3.5.2. Estudo de viabilidade celular

Os estudos de viabilidade celular foram conduzidos pela Profa. Dra. Izabel Cristina Rodrigues da Silva, na sala de cultura do Laboratório 1 da Faculdade de Ceilândia/UnB. Para a cultura de células foi utilizada a linhagem de queratinócitos (linhagem HaCat) de origem humana. As células foram estocadas em nitrogênio líquido e, conforme necessário, descongeladas uma semana antes do ensaio, e aclimadas em um frasco para cultivo (25 cm², TPP, EUA) contendo meio de cultura DMEM (*Dulbecco modified Eagle's Minimal Essential Medium*) suplementado com 1% de solução antibiótica (penicilina e estreptomicina) e 10% de soro fetal bovino, e mantido em incubadora úmida a 37 °C e 5% de CO₂.

Após as células atingirem confluência ideal (cerca de 1000000) para os experimentos (cerca de 10³), elas foram removidas dos frascos e semeadas em placas de cultura conforme a necessidade do ensaio. Inicialmente, o meio de cultura DMEM foi descartado e as células lavadas com uma solução tampão de fosfato-salina (PBS). Logo após, as células foram incubadas com solução de tripsina EDTA (Gibco, USA) por 4 minutos a 37 °C.

Os grupos experimentais foram divididos em: Extrato, AgNP e controle negativo (sem a formulação). Os tratamentos foram realizados em triplicata.

Depois de tratar as células com AgNPs e extratos vegetais em concentrações diferentes, a viabilidade celular foi avaliada através do método colorimétrico MTT - *Methyl Thiazolyl Blue*, um ensaio para avaliar a atividade metabólica celular. Resumidamente, as células HaCat foram transferidos para uma placa de cultura de 96 poços (3000 células por poço) e tratadas com concentrações variadas do produto, partindo-se de uma concentração de 1 mg/mL e incubadas por 24 horas.

Em seguida, o meio foi removido e 150 µL de 0,5 mg/mL de solução 1 MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-brometo de difenil tetrazólio) foram adicionados.

Após 3 horas de incubação em uma incubadora umidificada (37 °C e 5% de CO₂), o meio de cultura foi removido e 200 µL de DMSO foram adicionados a cada poço para dissolver o produto formado. A quantificação da viabilidade celular foi determinada após a leitura da absorbância a 570 nm.

Análise estatística: Foram executadas análises da repetibilidade dos dados pelo cálculo do Intervalo de Correlação Intraclasse a 95% e cálculos de IC 50 foram executados pela metodologia do ajuste à curva de dose resposta-sigmoidal. Os

programas estatísticos utilizados foram o SPSS versão 22.0 e o GraphPadprism versão 6.0. O nível de significância adotado foi de 5%.

3.6. Avaliação toxicológica das Ag-NPs em embriões de peixes da espécie Zebrafish (*Danio rerio*):

Os ensaios foram realizados no Departamento de Genética e Morfologia do Instituto de Biologia da UnB (GEM-IB-UnB) e se enquadram no projeto aprovado pela Comissão de Ética do Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília sob o número 56/2018, conforme princípios éticos de experimentação animal.

Os animais utilizados para avaliação de toxicidade foram fornecidos pelo Departamento de Genética e morfologia, onde encontram-se em ambiente climatizado, em aquários automatizados e sob controle constante de pH $7,5 \pm 0,5$ e fotoperíodo de 10 horas claro/14 horas escuro sob a temperatura de $26^{\circ} \pm 1^{\circ}C$. Os animais receberam ração comercial para peixes, duas vezes ao dia. Eles foram aclimatados em aquários por 24h antes dos ensaios, alimentados duas vezes ao dia com ração específica e o tanque foi monitorado quanto aos níveis de nitrato, nitrito e amônia. Machos e fêmeas foram mantidos separados por barreiras físicas por 24 horas e, posteriormente, colocados em contato para a reprodução. Para obtenção de ovos fertilizados, fêmeas e machos adultos foram colocados em aquários apropriados aleatoriamente na proporção de 1:3, respectivamente. Os ovos viáveis recém-fertilizados foram coletados e distribuídos aleatoriamente nos tratamentos, em placas de cultura contendo 48 poços onde foram alojados individualmente.

O cálculo amostral é justificado, pois a proposta baseia-se no protocolo OECD-236 (2013) e, portanto, goza de total credibilidade (OECD: Organization for Economic Cooperation and Development). Este protocolo prevê o uso de 20 embriões/concentração (que não deve ser inferior a 5 concentrações testadas). Dessa forma, em cada poço ficará um embrião exposto a nanopartículas de prata nas concentrações estimadas nos pré-testes (vinte embriões expostos a cada concentração dos nanomateriais mais quatro controles internos em cada placa), e um grupo controle negativo ($0 \mu g/L$), totalizando 24 embriões. Para cada réplica experimental serão utilizados 144 ovos de peixes, totalizando 1.296 ovos para o estudo (em triplicata) das três nanopartículas descritas acima.

Os embriões foram analisados a cada período de 24 horas num total de 96 horas (ou mais). Desta forma, foram feitas no mínimo 04 observações em Microscópio Invertido para análise e registro dos seguintes indicadores de letalidade: coagulação de ovos fertilizados, formação dos olhos, otólitos e somitos, movimentos espontâneos, pigmentação do corpo, ausência de descolamento da cauda, falta de batimentos cardíacos, anencefalia, microcefalia, anoftalmia, microftalmia, pigmentação, edema cardíaco, absorção do saco vitelínico, malformação da cauda, alteração do equilíbrio, eclosão larval e outras anomalias que porventura apareçam durante a realização do experimento. Em todo o período foram mantidas as condições ambientais de temperatura da água a $26 \pm 1^\circ\text{C}$.

Após 96h de exposição, a toxicidade aguda foi determinada com base em um resultado positivo em qualquer uma das quatro observações apicais registradas e a Concentração Letal Media - CL50 foi calculada. Posteriormente, as larvas foram submetidas a eutanásia. Neste momento, as amostras que forem submetidas ao estudo de Prata incorporada mediante processamento por ICP-OES precisam passar por digestão.

Para evitar a influência do uso de fármacos nos resultados da pesquisa, os embriões e as larvas recém-eclodidas foram eutanasiados pela submersão em água fria ($0-4^\circ\text{C}$) ou solução de hipoclorito (6,15%) por aproximadamente 10 minutos e após análises, descartadas conforme normas de segurança, em local adequado. Estes procedimentos seguiram as normas para experimentação estabelecidas na Lei Arouca (nº 11.794, de 8 de outubro de 2008) e os procedimentos preconizados pelo National Research Council (1996) e pela American Veterinary Medical Association (2013).

4 Resultados e discussões

4.1 Síntese tradicional

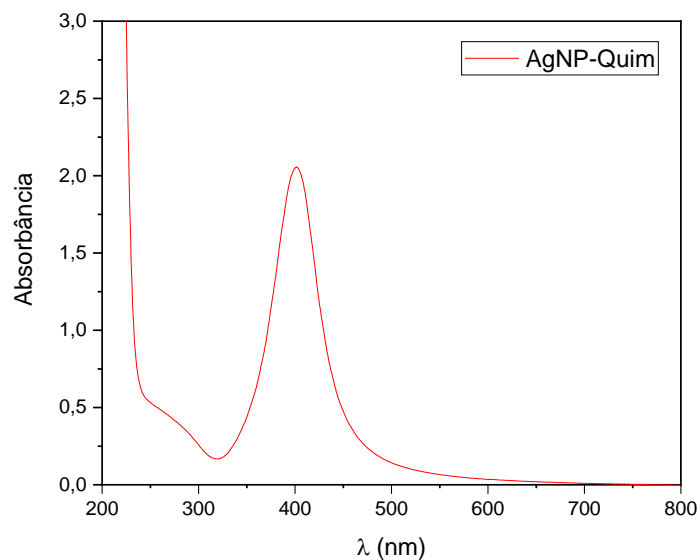
A metodologia para a obtenção de AgNPs por síntese tradicional foi baseada no estudo desenvolvido por Malina e colaboradores [85] e adaptada para o reator de micro-ondas de alta eficiência. Foram adicionados ao frasco de reação 1 mL de solução de Polivinilpirrolidona (PVP) a 1%, 0,0040 g de AgNO_3 + 0,0004 g de

Borohidreto de Sódio (BH) para a obtenção de um padrão de resposta para os ensaios posteriores.

4.1.1 Caracterização das AgNPs

A formação das AgNPs mediante variação nos parâmetros reacionais foi monitorada através da técnica de Espectrofotometria no UV-Vis pela formação de uma banda de ressonância plasmônica superficial (SPR) em aproximadamente 401,5 nm, ou seja, região característica da presença de AgNPs (Figura 11). A condição reacional foi a seguinte: Método Constant power m/v, 800 W a 40°C por 5 minutos e 600 rpm de agitação.

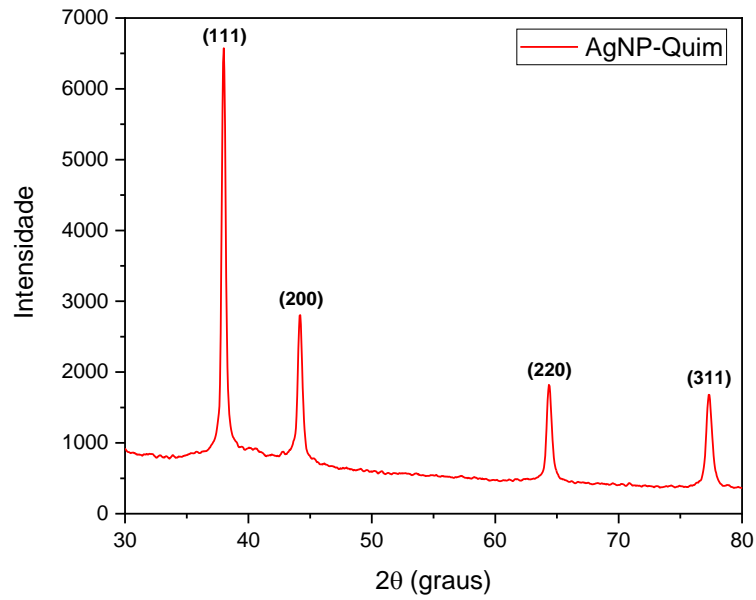
Figura 11 – Espectro de UV-Vis das AgNPs obtidas por síntese tradicional (AgNP-Quim)



A amostra foi liofilizada e, então, submetida aos ensaios de DRX, FTIR e MET.

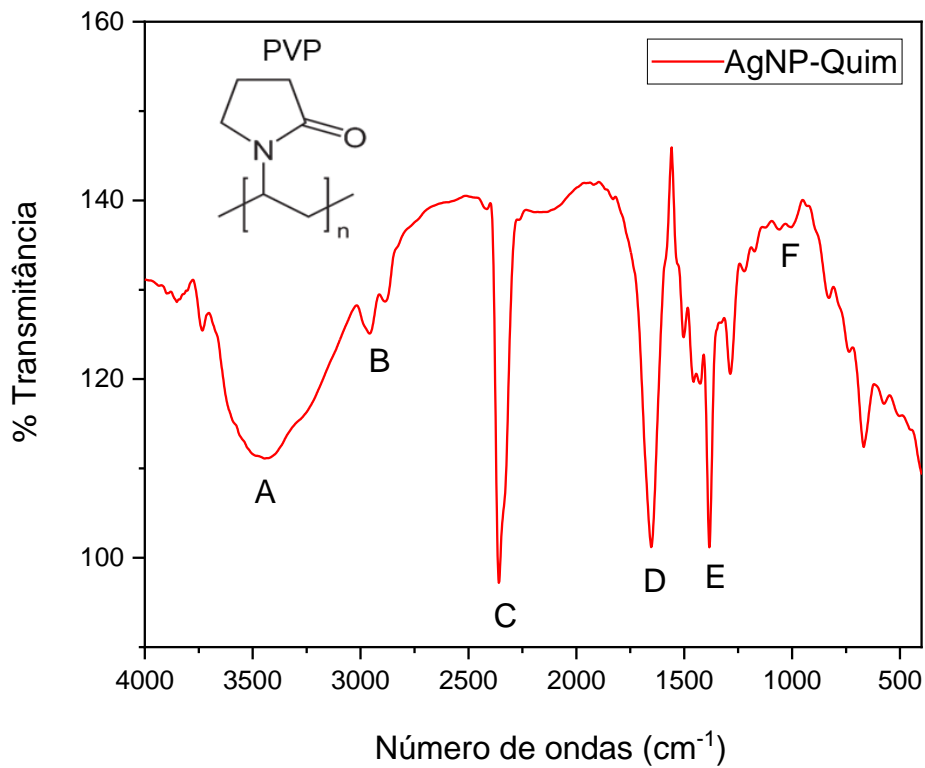
O difratograma obtido confirmou a formação de AgNPs evidenciada pelos picos de intensidade a valores de 2θ de aproximadamente 38° , 44° , 64° e 77° , correspondendo aos planos de 111, 200, 220 e 311 para prata, respectivamente. (Figura 12). Tal confirmação é possível mediante comparação com a ficha cristalográfica da Prata (JCPDS N° 00-004-0783).

Figura 12 – Difratoograma das AgNPs obtidas por síntese tradicional (AgNP-Quim)



Através da análise do espectro de FTIR (Figura 13), é possível identificar os seguintes grupamentos presentes na AgNP-Quim, conforme previsto na literatura que serviu de base para esta síntese [85].

Figura 13 – FTIR das AgNPs obtidas por síntese tradicional (AgNP-Quim)



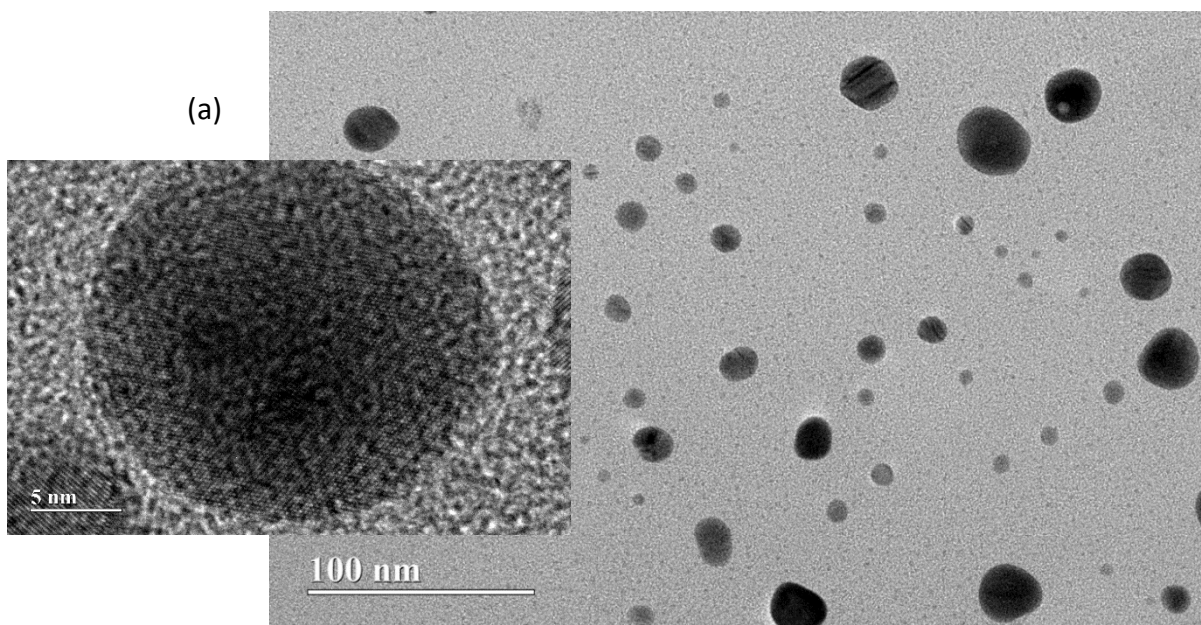
A: banda larga em 3470 cm^{-1} atribuída ao grupo $\sim\text{OH}$ da água, B: Bandas observadas em $\sim 2960\text{ cm}^{-1}$ e $\sim 2900\text{ cm}^{-1}$ atribuída às vibrações de alongamento assimétricas e simétricas da ligação C-H e C: Pico em aproximadamente 2360 cm^{-1} que pode ser atribuído ao alongamento assimétrico do gás CO_2 adsorvido [87]

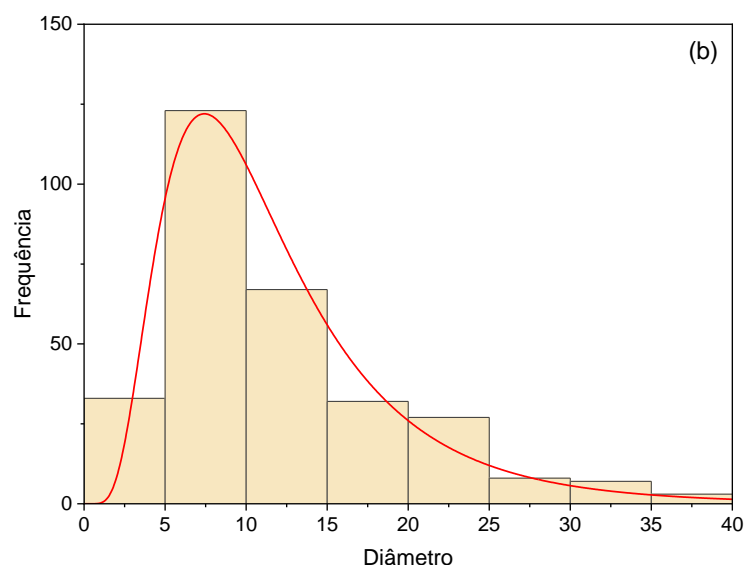
D: Banda de absorção de estiramento de carbonila amida posicionada próximo a 1650 cm^{-1} e E: Presença de uma ampla banda de absorção em 1390 cm^{-1} e 1450 cm^{-1} , resultante da vibração do nitrogênio terciário [85]

É possível ainda observar em aproximadamente 1650 um pico de ressonância de $\sim\text{CO}$ (D) e, em 1030 e 1070 os picos referentes a $\sim\text{CN}$ (F) [88]

De acordo com a microscopia eletrônica de transmissão (MET) realizada as nanopartículas sintetizadas são aproximadamente (Figura 14.a). Foram realizadas 300 medidas de diâmetro das AgNP-Quim com o auxílio do software image J e esses dados foram analisados através do Software Origin 2019b, onde os mesmos apresentaram distribuição lognormal pelo teste de Kolmogorov Smirnov ao nível de significância de 5%, com diâmetro médio em aproximadamente $9,7\text{ nm}$. (Figura 14.b)

Figura 14 – (a) Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão (AgNP-Quim) e (b) Histograma de distribuição dos diâmetros medidos.





4.2 Síntese verde empregando *Stevia rebaudiana* (Bert.)

4.2.1 Estudo do extrato

A análise farmacognóstica preliminar para caracterizar as folhas de *Stevia rebaudiana* forneceram resultados de teor de água de $8,62 \pm 0,20\%$ e teor de cinzas totais de $8,16 \pm 1,08\%$ [89]. A análise de resíduo seco a partir do extrato aquoso empregado nas sínteses foi realizada em quadruplicada, apresentando resultado de $1,05 \pm 0,02\%$ e a densidade foi de $0,9990 \text{ g/cm}^3$ à $20,01^\circ\text{C}$.

As condições de extração das folhas de *Stevia rebaudiana*, no micro-ondas de alto desempenho foram determinadas sob supervisão da Prof^a Dra. Paula Martins, empregando baixas temperaturas para evitar a degradação da amostra, o que inviabilizou o emprego de potências elevadas (ocasionam a mensagem de erro acusando que o sensor do equipamento havia excedido a temperatura limite). Desta forma, optou-se por desenvolver um experimento de extração no modo Heat to Temperature in Time (HTTT), com temperaturas de 50°C e 100°C , conforme sugerido no estudo de Periche *et al* [32]. O tempo de reação foi escolhido para fins comparativos com o método de extração com banho ultrassônico, sendo 3 minutos o tempo mínimo e 18 minutos o tempo máximo, pois conforme trabalhos anteriores, a partir desta temperatura o processo de extração já começa a apresentar sua eficiência reduzida [90,91].

Após a finalização dos testes, a condição de preparo do extrato de estévia no micro-ondas de alto desempenho foi: granulometria fina, proporção planta:solvente (etanol 70%) de 1:30, temperatura de 80°C (5 minutos para ser atingida), tempo de reação de 2 minutos e agitação de 600 rpm. O extrato de *Stevia rebaudiana* preparado nesta condição foi empregado nas sínteses de AgNPs após a eliminação do etanol mediante rotoevaporação e ressuspensão até o volume inicial com água ultrapura, para que fosse possível avaliar a eficiência da planta na síntese sem a interferência do solvente etanol.

4.2.2 Síntese das AgNPs

Foram realizados testes preliminares das sínteses de AgNPs empregando extrato aquoso de *S.rebaudiana* e soluções de AgNO₃ nas concentrações de 10⁻² mol/L e 10⁻³ mol/L a fim de estabelecer as melhores condições reacionais para a síntese. Nestes ensaios, observou-se que somente foi possível obter AgNPs empregando solução de AgNO₃ com concentração de 10⁻² mol/L, ou seja, superior à normalmente encontrada na literatura [10,36].

Baseado no estudo preliminar, foi realizado um estudo de otimização da síntese conforme planejamento estatístico Box-Behnken com 3 níveis para cada fator reacional avaliado (proporção Extrato de estévia/ Solução de AgNO₃ 10⁻² mol/L, temperatura e tempo), totalizando 15 experimentos (Tabela 5).

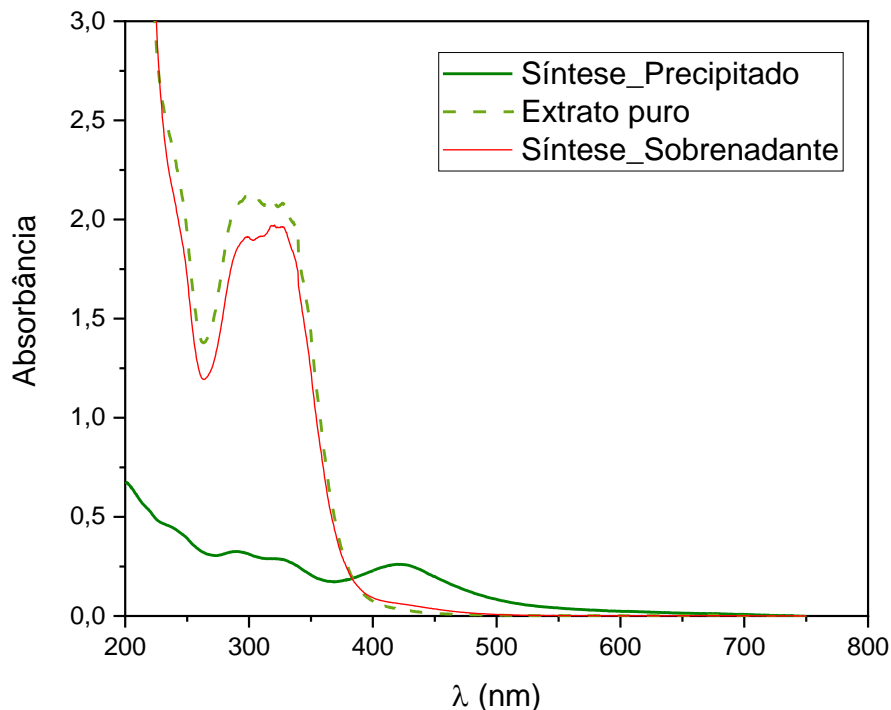
Tabela 5 – Planejamento Box-Behnken para estudo de síntese de AgNPs assistida por micro-ondas com extrato aquoso de *Stevia rebaudiana*

| Experimento | Proporção Extrato de estévia/ Solução de AgNO ₃ 10 ⁻² mol/L | Temperatura (°C) | Tempo (minutos) |
|-------------|--|---------------------|--------------------|
| 1 | 1:1 | 40 | 5 |
| 2 | 1:1 | 40 | 25 |
| 3 | 1:1 | 80 | 5 |
| 4 | 1:1 | 80 | 25 |
| 5 | 1:9 | 60 | 5 |
| 6 | 1:9 | 60 | 25 |
| 7 | 9:1 | 60 | 5 |
| 8 | 9:1 | 60 | 25 |
| 9 | 1:9 | 40 | 15 |
| 10 | 1:9 | 80 | 15 |
| 11 | 9:1 | 40 | 15 |

| | | | |
|-----------|-----|----|----|
| 12 | 9:1 | 60 | 5 |
| 13 | 1:1 | 60 | 15 |
| 14 | 1:1 | 60 | 15 |
| 15 | 1:1 | 60 | 15 |

Após a realização dos 15 experimentos, todas as amostras foram centrifugadas e os precipitados foram lavados com água ultrapura e centrifugados três vezes para posterior leitura no Espectrofotômetro de UV-Visível. As análises de espectrofotometria de UV-Vis permitem inferir que o sobrenadante apresentou perfil semelhante ao extrato aquoso puro utilizado na síntese, enquanto que a formação de nanopartículas de prata ocorre apenas no precipitado, onde observou-se a presença de uma banda de ressonância plasmônica superficial (SPR) em torno de 420 nm (Figura 15).

Figura 15 – Espectros de UV-Vis referentes ao extrato de estêvia, ao sobrenadante e ao precipitado contendo AgNP (Est)

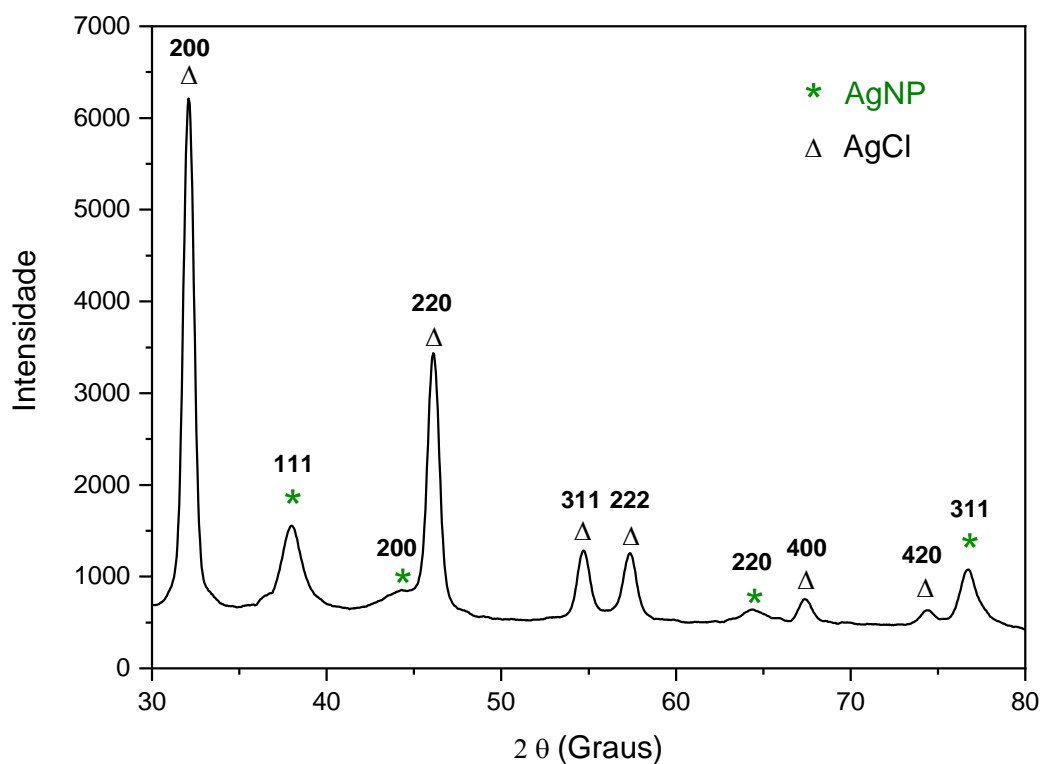


A avaliação das amostras do experimento utilizou como critério a análise comparativa entre espectros de absorção de UV-Vis obtidos, assim como relatado em outro estudo de síntese verde empregando extrato de melancia como agente redutor e estabilizante. [9]

A melhor condição reacional foi observada como 80 °C durante 25 minutos e a proporção de extrato de estêvia / solução de AgNO₃ 1:1. Observou-se que o aumento

de intensidade da banda de ressonância plasmônica está associado a temperaturas mais elevadas, como visto em relatos anteriores [92] e a um tempo de reação mais longo. Além disso, o aumento da quantidade de extrato de estévia na síntese aumentou a formação de subprodutos em detrimento à formação de AgNPs. As análises para caracterização da AgNP (Est) obtida na condição reacional 4 foram DRX (Figura 16), MET (Figura 17) e determinação do Potencial Zeta de cisalhamento.

Figura 16 - Imagem de Difração de Raios-X (AgNP-Est)



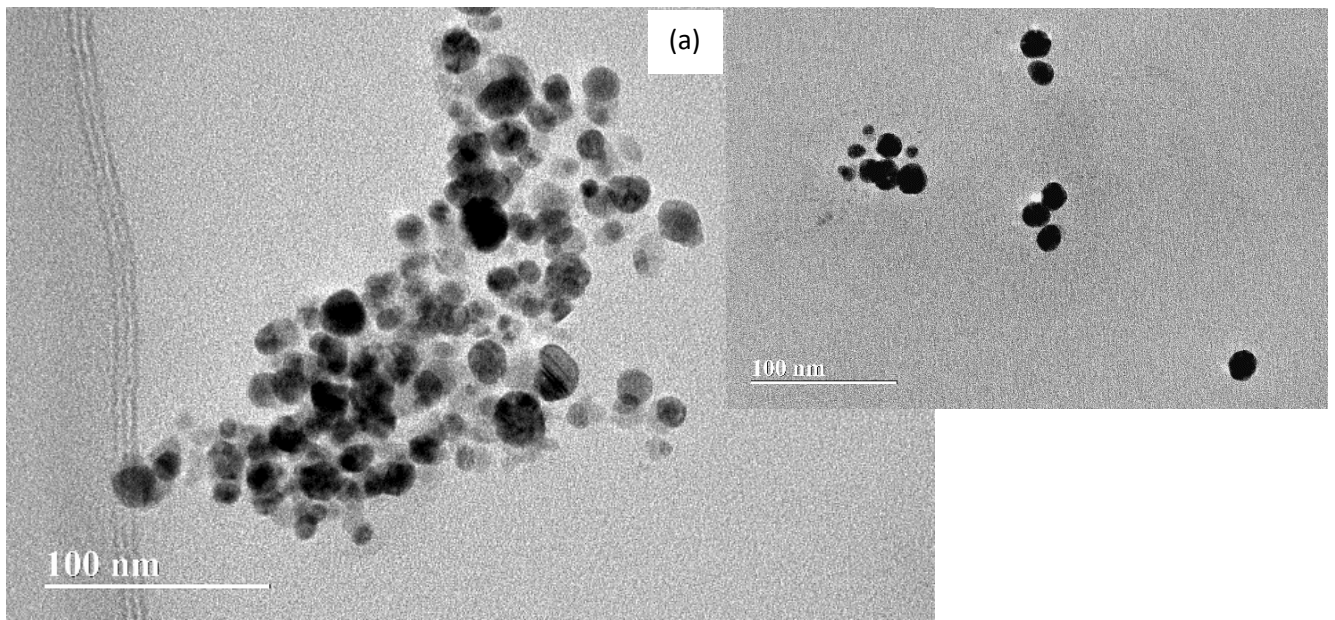
O difratograma obtido confirma que as AgNPs sintetizadas encontravam-se na forma de nanocristais, evidentes pelos picos a valores 2θ de aproximadamente 38° , 44° , 64° e 77° , correspondendo a planos 111, 200, 220 e 311 para Prata, respectivamente.

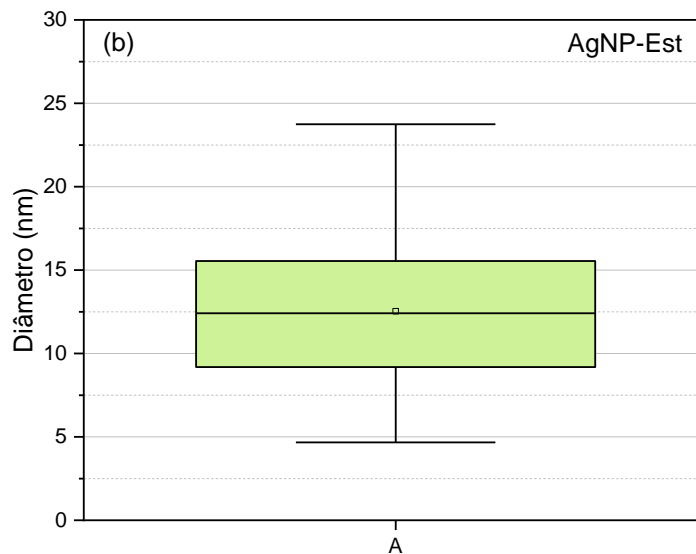
Entretanto, a presença de picos referentes a presença de AgCl indicou a contaminação com Cloretos (Cl^-) em algum momento do processo. Como os testes foram realizados com água ultrapura e todos os cuidados necessários para evitar a contaminação por cloretos foi tomado, foi questionado ao laboratório fornecedor das folhas de *Stevia rebaudiana* se em algum momento do processo de produção da planta poderia ter ocorrido contato com íons cloreto (Cl^-). A suspeita foi confirmada

uma vez que a adubação foi feita com produtos químicos que contêm potássio administrado na forma de Cloreto de Potássio, fato que pode justificar a presença dos picos referentes à presença de AgCl.

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) indicou que as nanopartículas são aproximadamente esféricas e elipsoidais, variando 4 a 24 nm de diâmetros. (Figura 17.a). Foram realizadas 300 medidas de diâmetro das AgNP-Est com o auxílio do software image J e esses dados foram analisados através do Software Origin 2019b, onde os mesmos não apresentaram distribuição lognormal pelo teste de Kolmogorov Smirnov ao nível de significância de 5%. Sendo assim, a distribuição simétrica (mediana em 12,4) dos diâmetros está apresentada através de um gráfico do tipo Box-plot. (Figura 17.b)

Figura 17 – (a) Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão (AgNP-Est) e (b) Gráfico Box-Plot de distribuição dos diâmetros medidos





O potencial zeta é um dos parâmetros essenciais para a caracterização da estabilidade da nanopartícula. As medidas desta amostra revelaram que $\zeta \sim -20$ mV a pH = 5, que corresponde ao pH no qual as AgNPs foram obtidas.

4.3 Síntese verde empregando extratos de *Handroanthus impetiginosus* (Mart. Ex DC.) Matos:

4.3.1 Estudo de obtenção dos extratos

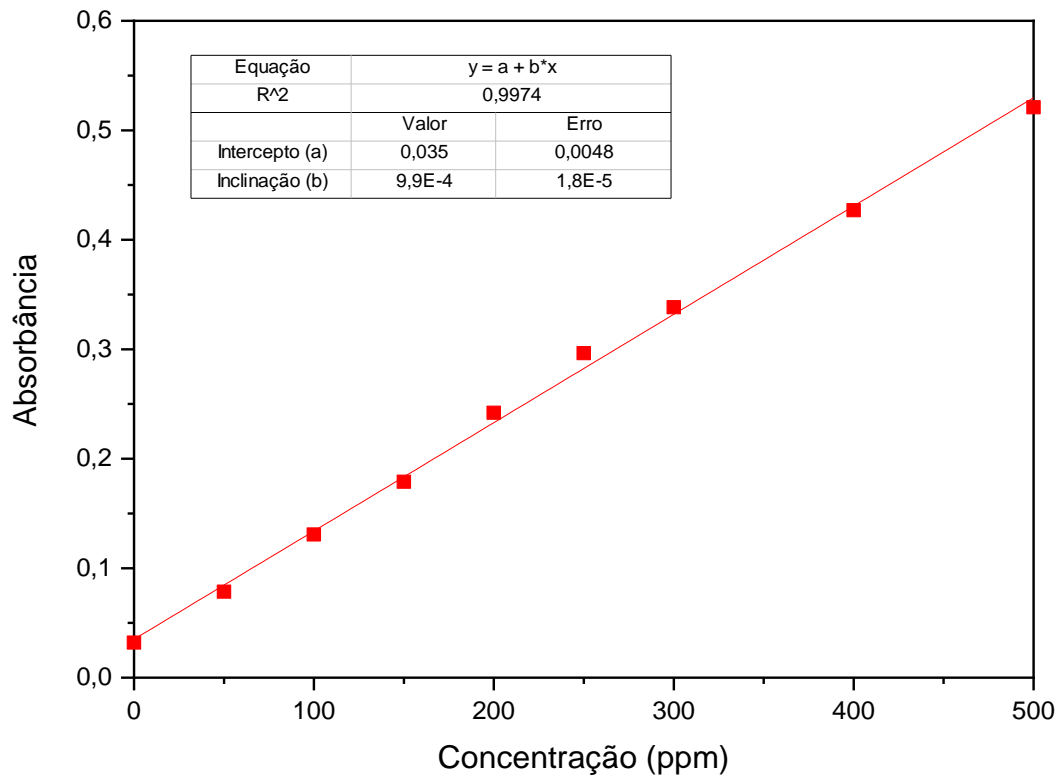
Os resíduos secos do extrato obtidos a partir da entrecasca de ipê roxo foram calculados sobre porcentagem de matéria seca em extrato fluido (% m/m) e os resultados estão disponíveis na tabela 6:

Tabela 6 – Percentual de resíduo seco dos extratos de *Handroanthus impetiginosus*.

| Amostra | Resíduo Seco (%) |
|------------------------------|------------------|
| Extrato de ipê (Infusão) | 0,81 ± 0,02 |
| Extrato de ipê (Decocção) | 1,21 ± 0,13 |
| Extrato de ipê (Soxhlet) | 0,89 ± 0,11 |
| Extrato de ipê (Micro-ondas) | 1,05 ± 0,06 |

Para a determinação do teor de polifenóis totais (mg/L) com reagente de Folin-Ciocalteu foi preparada uma curva de calibração obtida através da leitura da absorbância das soluções padrões de ácido gálico. (Figura19)

Figura 18 – Curva de calibração de ácido gálico para determinação de polifenóis totais



A equação da reta obtida foi empregada para calcular (por interpolação) a concentração de polifenóis (mg/L) em termos de ácido gálico presentes em cada extrato. Para cada concentração foi aplicado um fator de correção correspondente a diluição realizada no início da análise de modo que a absorbância das amostras de extratos se enquadrasse na curva de calibração. (Tabela 7)

Tabela 7 – Resultados de teor de polifenóis totais em termos de ácido Gálico

| Extrato | Abs (leituras) | | | Abs (media) | Fator de correção | Conc (mg/mL) | | | Média (mg/mL) | Desvio Padrão |
|----------------------|----------------|------|------|-------------|-------------------|--------------|------|------|---------------|---------------|
| | | | | | | | | | | |
| Ipê roxo Decocção | 0,32 | 0,34 | 0,34 | 0,33 | 3 | 0,93 | 0,93 | 0,94 | 0,93 | 0,005 |
| Ipê roxo Micro-ondas | 0,34 | 0,40 | 0,38 | 0,37 | 2 | 0,71 | 0,73 | 0,70 | 0,71 | 0,019 |
| Ipê roxo Soxhlet | 0,35 | 0,36 | 0,36 | 0,36 | 1,5 | 0,47 | 0,50 | 0,50 | 0,49 | 0,014 |
| Ipê roxo Infusão | 0,23 | 0,23 | 0,22 | 0,22 | 5 | 0,98 | 0,96 | 0,95 | 0,96 | 0,015 |

A comparação entre as técnicas de extração foi possível através da análise de variância ANOVA One-Way, $p < 0,05$ (Tabela 8). Essa análise foi realizada utilizando o software SPSS versão 26.0 para avaliar qual extrato apresentou a melhor capacidade de extração de compostos para ser empregado na síntese de AgNP-Ipê.

Tabela 8 – Comparação estatística entre as técnicas de extração

| Extrato | Resíduo Seco (%) | Teor de polifenóis totais (mg/mL) |
|--------------------|------------------|-----------------------------------|
| Decocção | 1,21 ± 0,13 b | 0,93 ± 0,005 a |
| Micro-ondas | 1,05 ± 0,06 b,c | 0,71 ± 0,019 b |
| Soxhlet | 0,89 ± 0,11 a,c | 0,49 ± 0,014 c |
| Infusão | 0,81 ± 0,02 a | 0,96 ± 0,015 a,b |

Em todas as variáveis, $p < 0,05$

a x b são diferentes estatisticamente

b x c são diferentes estatisticamente

Os resultados de resíduo seco das extrações realizadas através de decocção apresentaram níveis superiores aos demais, o que podem indicar que esta técnica demonstrou melhor eficiência de extração de compostos da planta, levando em consideração que o mesmo solvente foi empregado nas quatro técnicas.

A análise estatística realizada por ANOVA para resíduo seco indicou que os resultados mais elevados e estatisticamente semelhantes foram obtidos nas extrações

por decocção e micro-ondas (estatisticamente semelhantes). Porém este último apresenta resultado mais baixo no teste de polifenóis totais, podendo-se observar que os melhores resultados para extração de polifenóis totais foram obtidos com as técnicas de decocção e infusão (estatisticamente semelhantes). Desta forma, a extração por decocção representa a técnica mais indicada mediante comparação entre os resultados de resíduo seco e polifenóis totais.

Visando comparar a composição dos extratos de ipê roxo obtidos através das quatro técnicas supracitadas, foram obtidos os seguintes resultados para os estudos qualitativos:

Teste A – Análise de fenóis e taninos

- ✓ Observou-se coloração esverdeada em todas as amostras, o que corresponde à presença de taninos condensados.

Teste B – Análise de antocianinas e flavonóides

Tabela 9 – Resultados da análise qualitativa de antocianinas e flavonóides

| Constituintes | Cor em meio | | | Resultados dos extratos | | | |
|---------------------------------------|---------------|--------------------|---------------------|-------------------------|-----------------|---------------------|----------------|
| | Ácido pH 3 | Alcalino pH 8/9 | Alcalino pH 11 | Ipê Infusão | Ipê Decocção | Ipê Micro- ondas | Ipê Soxhlet |
| Antocianinas e antocianidinas | vermelho | lilás | Azul– purpura | - | - | - | - |
| flavonas, flavonóis e xantonas | - | - | Amarelo | * | * | * | * |
| Chaconas e auronas | vermelho | - | Vermelho purpura | - | - | - | - |
| Flavonóides | - | - | Vermelho laranja | - | + | - | - |

* A coloração castanho dos extratos analisados pode mascarar o resultado deste ensaio, cujo resultado positivo seria a coloração amarela em meio alcalino.

Teste C – Análise de Esteróides e triterpenos penta cíclicos

- ✓ Ausência de esteróides em todas as amostras

- ✓ Coloração marrom indicativa da presença de triterpenos penta cíclicos apenas na amostra obtida através de decocção.

Teste D – Saponinas

- ✓ Foi observada a presença de espuma persistente indicativa de saponinas em todas as amostras

Teste E – alcalóides

- ✓ Formação de precipitado floculoso compatível com a presença de alcalóides apenas foi observada na amostra obtida através de decocção.

Teste F – quinonas e cumarinas

- ✓ Surgimento de coloração vermelha na fase aquosa indicativa para quinonas apenas foi observada na amostra obtida através de decocção.
- ✓ Ensaios negativos para a presença de cumarinas

A tabela 10 resume o estudo qualitativo realizado:

Tabela 10 – Resumos dos resultados do estudo qualitativo comparativo entre os extratos de ipê roxo

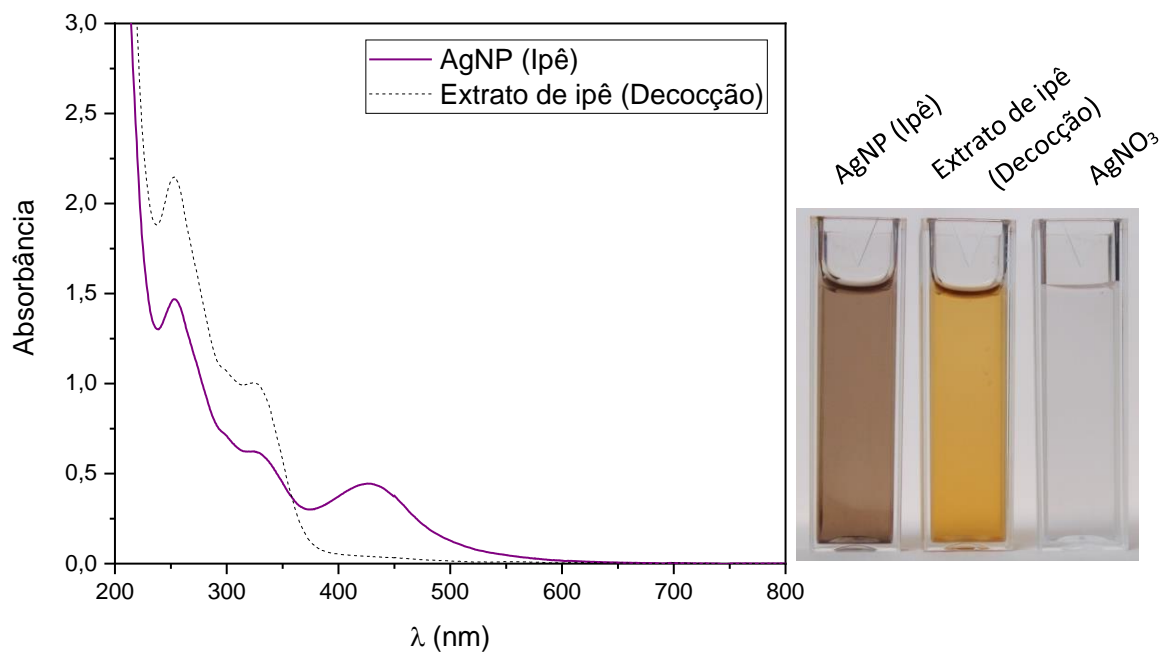
| Testes | Sohxlet | Decocção | Micro-ondas | Infusão |
|-----------------------------------|---------|----------|-------------|---------|
| Fenóis e taninos | + | + | + | + |
| Antocianinas e flavonoides | - | + | - | - |
| Esteroides | - | - | - | - |
| Triterpenos pentacíclicos | - | + | - | - |
| Saponinas | + | + | + | + |
| Alcaloides | - | + | - | - |
| Quinonas | - | + | - | - |
| Cumarinas | - | - | - | - |

Os resultados dos ensaios qualitativos realizados corroboram para a escolha da técnica de extração por decocção, pois, embora a presença de saponinas e taninos condensados ocorra em todos os extratos testados, apenas no extrato produzido por decocção há a presença de flavonóides, alcalóides, quinonas e triterpenos pentacíclicos, compostos que conferem um maior caráter redutor ao composto. Além disso, a escolha pela decocção se deu por ser o método tradicionalmente em estudos anteriores [93][94].

4.3.2 Otimização da síntese

Dada a ausência de referências empregando extrato de ipê roxo como agente redutor neste tipo de síntese, foram realizados diversos ensaios preliminares empregando o reator de micro-ondas de alto desempenho a partir do contato entre uma solução AgNO_3 10^{-3} mol / L com o extrato de ipê roxo selecionado. A formação de AgNPs foi monitorada por UV-vis, conforme apresentado na Figura 19.

Figura 19 – Espectro de UV-Vis da AgNP (Ipê)



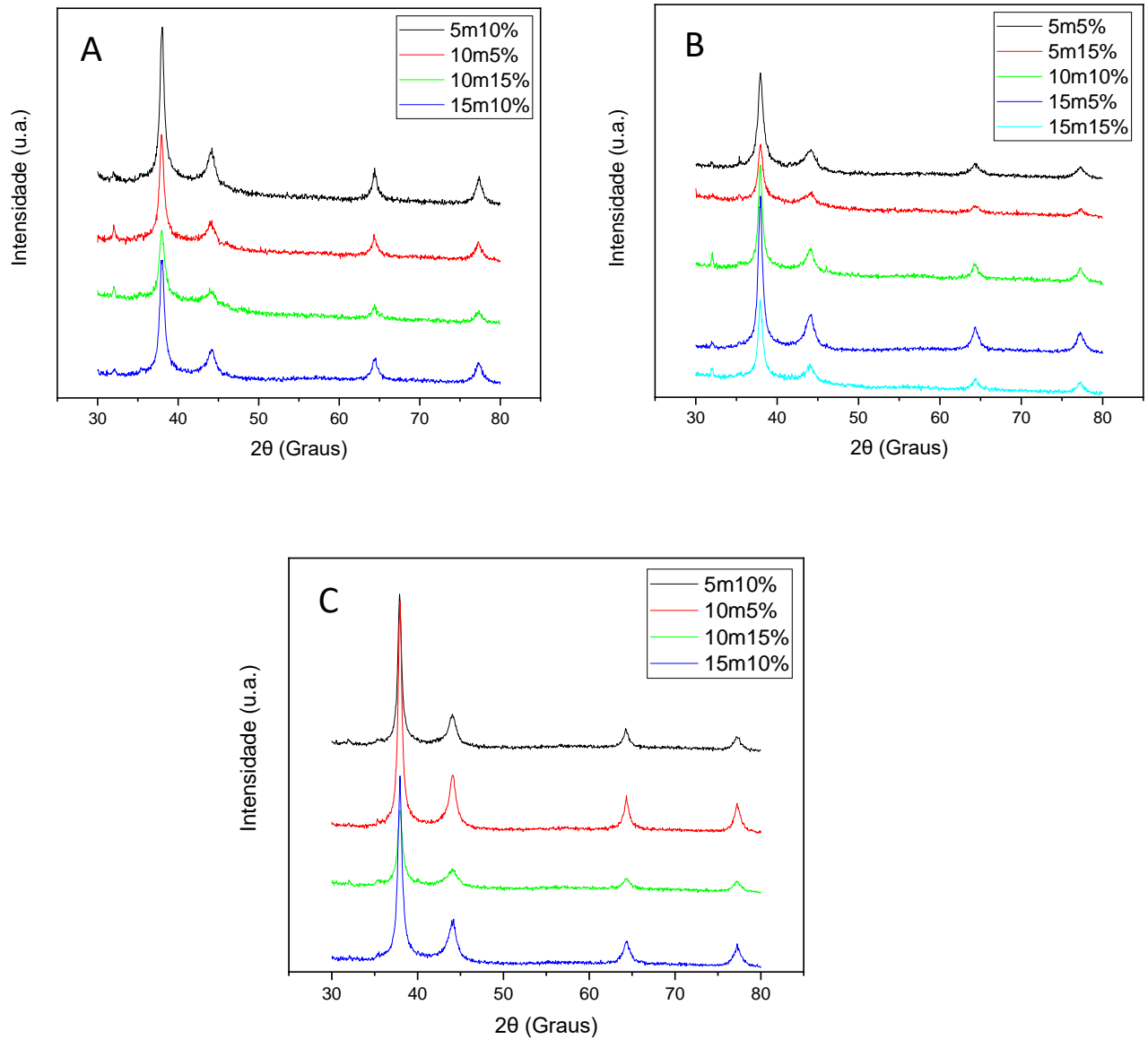
Após a definição dos parâmetros da reação que forneceram melhores resultados, foi realizado por meio do delineamento experimental de Box-Behnken para três fatores para determinar as melhores condições de reação, em um total de quinze experimentos (Tabela 4).

Alguns estudos disponíveis já trabalharam com otimização de síntese verde de AgNPs. Entretanto, basearam-se somente em dados de UV-Vis. Um deles otimizou os parâmetros de micro-ondas usando um planejamento de Box-Behnken para três fatores (tempo, limites de pressão e temperatura) e ANOVA de fator único para determinar a significância estatística [10]. Visando obter resultados mais confiáveis e precisos, optou-se por realizar a análise estatística baseada nos resultados obtidos por Difração de Raio-X (DRX). Os resultados de DRX foram agrupados conforme a tabela 11 para a elaboração dos gráficos:

Tabela 11 – Código atribuído aos difratogramas do planejamento de Box-Behnken (AgNP-Ipê) para a representação gráfica

| GRUPOS | Tempo (minutos) | Extrato/AgNO ₃ (% v/v) | NºAmostra | Nome da Amostra | |
|--------|-----------------|-----------------------------------|-----------|-----------------|------------|
| A | 5 | 10 | 1 | 100_5m10% | |
| | 10 | 5 | 5 | 100_10m5% | |
| | 100°C | 10 | 15 | 7 | 100_10m15% |
| | | 15 | 10 | 3 | 100_15m10% |
| B | 5 | 5 | 9 | 150_5m5% | |
| | 5 | 15 | 11 | 150_5m15% | |
| | 150°C | 10 | 10 | 15 | 150_10m10% |
| | | 15 | 5 | 10 | 150_15m5% |
| C | 15 | 15 | 12 | 150_15m15% | |
| | 5 | 10 | 2 | 200_5m10% | |
| | 10 | 5 | 6 | 200_10m5% | |
| | 200°C | 10 | 15 | 8 | 200_10m15% |
| 15 | | 10 | 4 | 200_15m10% | |

Figura 20 – Difratomogramas do planejamento de Box-Behnken (AgNP-Ipê)



Um valor de variável dependente foi obtido em cada síntese pela normalização entre o pico de maior intensidade (38 °) e um pico localizado em uma região de baixo ruído (64 °) nos difratogramas (I_{111}/I_{220}). Os resultados estão apresentados na tabela 12:

Tabela 12 – Intensidade dos picos dos difratogramas e cálculo do tamanho cristalino das AgNPs obtidas nos 15 experimentos do planejamento Box-Behnken (AgNP-Ipê)

| Amostra | Temperatura (° C) | Tempo (min) | Proporção Ext/AgNO ₃ (%) | Int. 38 (DRX) | Int. 64 (DRX) | I _(38/64) | Tamanho (nm) |
|---------|-------------------|-------------|-------------------------------------|---------------|---------------|----------------------|--------------|
| 1 | 100 | 5 | 10 | 2385,43 | 507,53 | 4,70 | 13,06 |
| 2 | 200 | 5 | 10 | 2917,02 | 366,79 | 7,95 | 16,10 |
| 3 | 100 | 15 | 10 | 1772,68 | 341,52 | 5,19 | 13,87 |
| 4 | 200 | 15 | 10 | 3498,98 | 447,27 | 7,82 | 13,37 |
| 5 | 100 | 10 | 5 | 1648,41 | 340,72 | 4,84 | 12,25 |
| 6 | 200 | 10 | 5 | 4336,98 | 679,02 | 6,39 | 16,43 |
| 7 | 100 | 10 | 15 | 1077,68 | 224,31 | 4,80 | 11,84 |
| 8 | 200 | 10 | 15 | 1445,66 | 203,98 | 7,09 | 12,52 |
| 9 | 150 | 5 | 5 | 1689,83 | 227,46 | 7,43 | 14,10 |
| 10 | 150 | 15 | 5 | 2713,67 | 431,11 | 6,29 | 13,06 |
| 11 | 150 | 5 | 15 | 1009,81 | 133,08 | 7,59 | 11,83 |
| 12 | 150 | 15 | 15 | 1408,11 | 216,34 | 6,51 | 12,70 |
| 13 | 150 | 10 | 10 | 1320,56 | 202,20 | 6,53 | 12,20 |
| 14 | 150 | 10 | 10 | 752,29 | 113,39 | 6,63 | 11,06 |
| 15 | 150 | 10 | 10 | 1851,10 | 288,82 | 6,41 | 14,33 |

Através da Equação de Scherrer foi possível calcular o diâmetro cristalino das AgNPs, conforme fórmula descrita abaixo:

$$d_c = \frac{k\lambda}{\beta \cos\theta}$$

Onde:

d_c : diâmetro médio das partículas

k : constante que depende da forma das partículas

λ : comprimento de onda da radiação eletromagnética

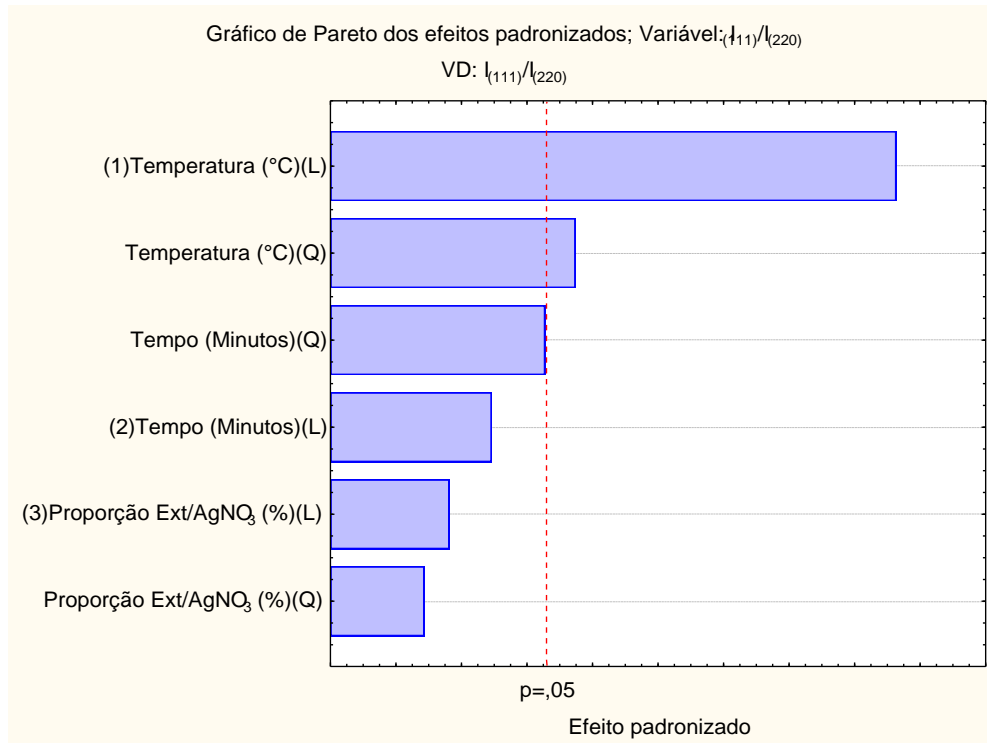
β : largura na metade da altura do pico de difração

θ : ângulo de difração

Foi observada uma variação entre 11 e 16 nm no diâmetro cristalino das AgNPs. Como esta medida pode sofrer variações conforme a resolução e integração dos picos para a obtenção da largura à meia altura, optou-se por considerar a

intensidade do pico normalizado $I_{(38/64)}$ como parâmetro principal. A análise estatística foi realizada de acordo com esse valor de intensidade normalizado (I_{111}/I_{220}) através do software Statistica 8.0.

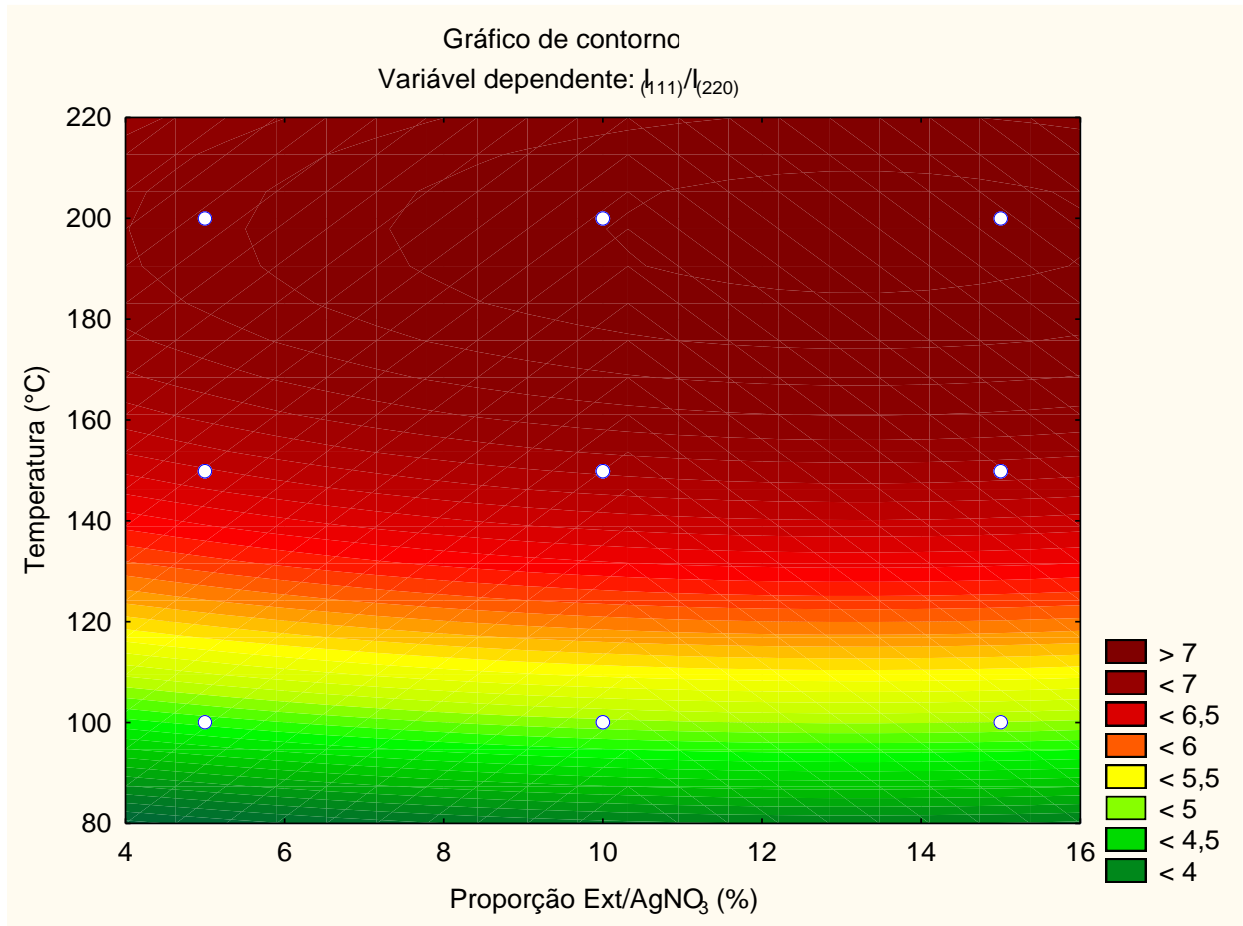
Figura 21 – Diagrama de Pareto obtido na análise dos dados obtidos no planejamento Box-Behnken (AgNP-Ipê)



A figura 21 mostra os efeitos padronizados do gráfico de Pareto em ordem decrescente (temperatura > tempo > $C_{Ext/AgNO_3}$). A representação gráfica de barras ordenadas em forma decrescente no Diagrama de Pareto mostra quais parâmetros causam um impacto geral maior ao processo. A análise permite inferir que o parâmetro Temperatura é o fator que exerce principal influência na síntese, pois seus resultados linear e quadrático extrapolam a linha divisória ($p = 0,05$), o que os torna estatisticamente significativos ao nível de 95 % de confiança. [95]

Para a construção do gráfico de contorno (Figura 22), fixou-se a variável tempo = 15 minutos buscando facilitar a análise visual. Pode-se observar que as regiões de máxima resposta são representadas pelas áreas em vermelho e situadas nas temperaturas mais elevadas, o que ratifica a influência da temperatura observada no Diagrama de Pareto. As áreas verdes se referem aos níveis de parâmetros que apresentam os menores valores para a variável considerada.

Figura 22 – Gráfico de contorno referente aos dados obtidos no planejamento Box-Behnken (AgNP-Ipê)

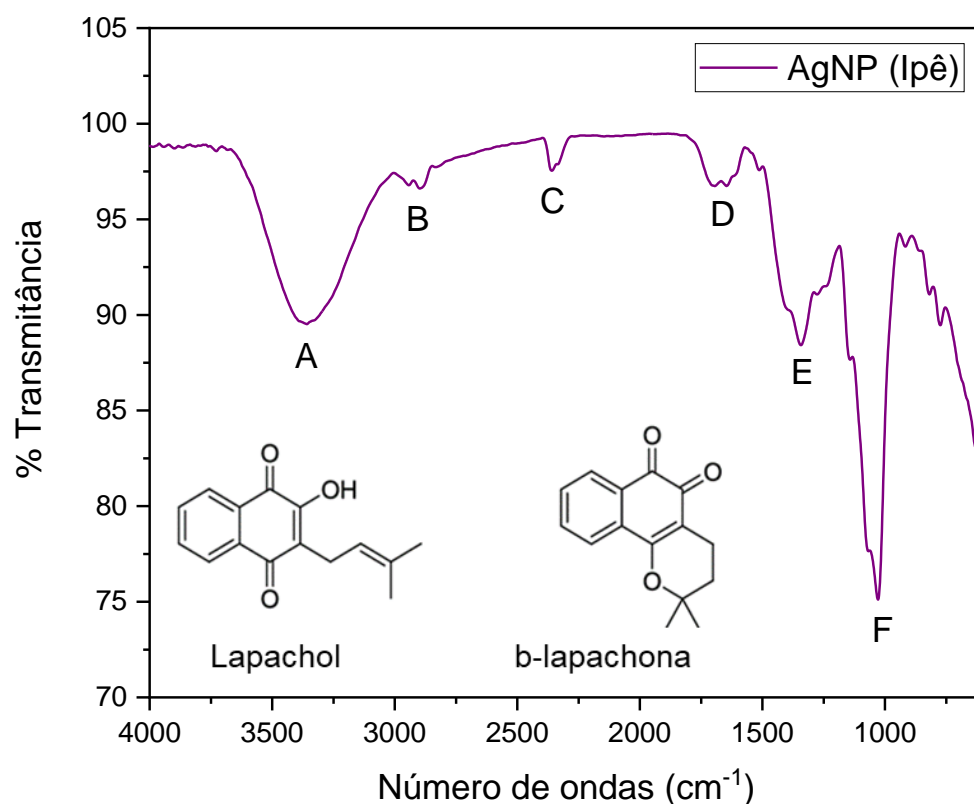


Associando esta análise estatística aos difratogramas obtidos, optou-se por trabalhar com a síntese 4 (200 °C durante 15 minutos, usando a $C_{PE} = 10\%$) cujas condições reacionais situam-se na região onde se obtém os maiores valores para a variável dependente.

4.3.3 Caracterização das AgNPs

Foi realizada a análise de FTIR da amostra obtida através da síntese 4 e os principais picos estão marcados no espectro com letras de A a F. (Figura 23)

Figura 23 – Espectro de FTIR da AgNP (Ipê)



Pela análise do espectro de FTIR da síntese obtida na condição reacional 2 (10% Ext/ AgNO_3 , 200°C por 15 min) é possível observar a presença de vários grupos funcionais que responsáveis pela redução no processo que produz a nanopartícula de prata. As regiões marcadas de A a F são correspondentes a:

(A) $\approx 3360 \text{ cm}^{-1}$ pode ser associado à vibração de estiramento -OH de porções de álcoois e fenóis e / ou estiramento por flexão de fenóis e álcoois ligados a hidrogênio nas moléculas adsorvidas [96].

(B) $\approx 2940 \text{ cm}^{-1}$ e 2875 cm^{-1} são típicos das vibrações de alongamento ou alongamento de C-H de grupos metil de espécies adsorvidas, como moléculas de quinona [97][98].

(C) As duas bandas de ~ 2360 e 2340 cm^{-1} são atribuídas ao alongamento assimétrico do gás CO_2 adsorvido e (D) $\approx 1600 \text{ cm}^{-1}$ pode ser atribuído ao alongamento da amida $\text{C}=\text{O}$. Outros picos são provenientes de flexões OH no plano e vibrações assimétricas e simétricas de porções de COO [80].

(E) Os picos em ~ 1507 e $\sim 1345 \text{ cm}^{-1}$ pode ser atribuído, respectivamente, à vibração de alongamento de $\text{C}=\text{C}$ nos anéis aromáticos e nos grupos CH_2 [99].

(F) Os picos em $1150-1085\text{ cm}^{-1}$ ao alongamento C-O dos éteres alifáticos presentes nas moléculas adsorvidas [98].

Portanto, a presença desses picos sugere a funcionalização dos AgNPs com as moléculas de extrato da planta, como é corroborado pela análise fitoquímica qualitativa.

Através análise por Microscopia Eletrônica de Transmissão da nanopartícula preparada conforme a síntese 4, foram obtidas imagens da AgNP-Ipê cujos diâmetros foram medidos com o auxílio do software Image J (Figura 24). Foram realizadas 650 medidas de diâmetro das AgNP com o auxílio do software image J. Esses dados foram analisados através do Software Origin 2019b ao nível de significância de 5% onde os mesmos apresentaram distribuição lognormal conforme teste de Kolmogorov Smirnov (Figura 25).

Figura 24 – Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão (AgNP-Ipê)

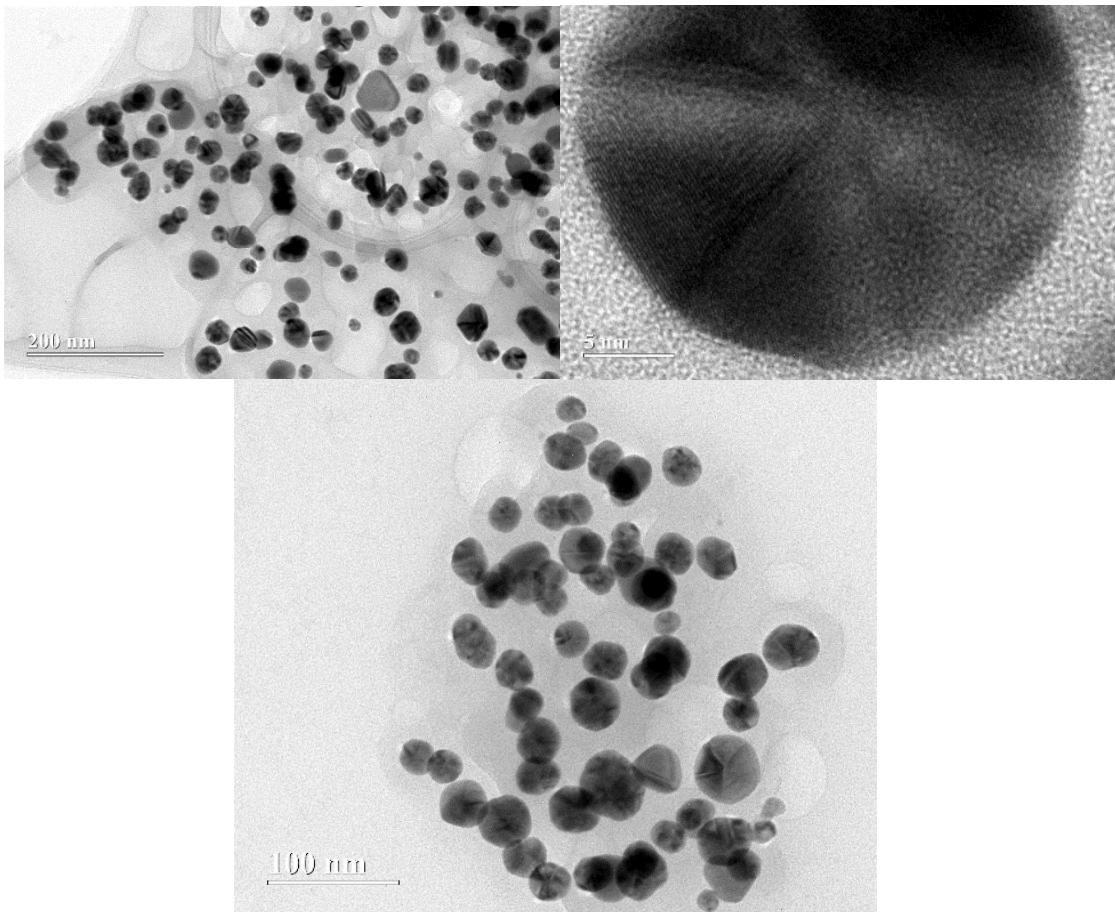
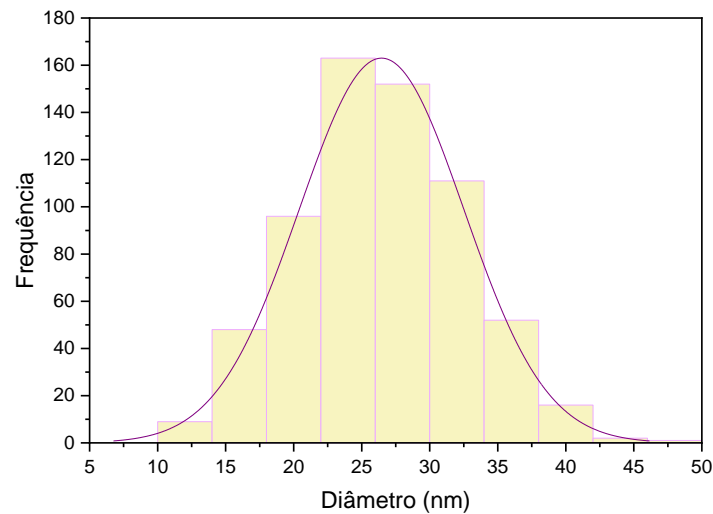


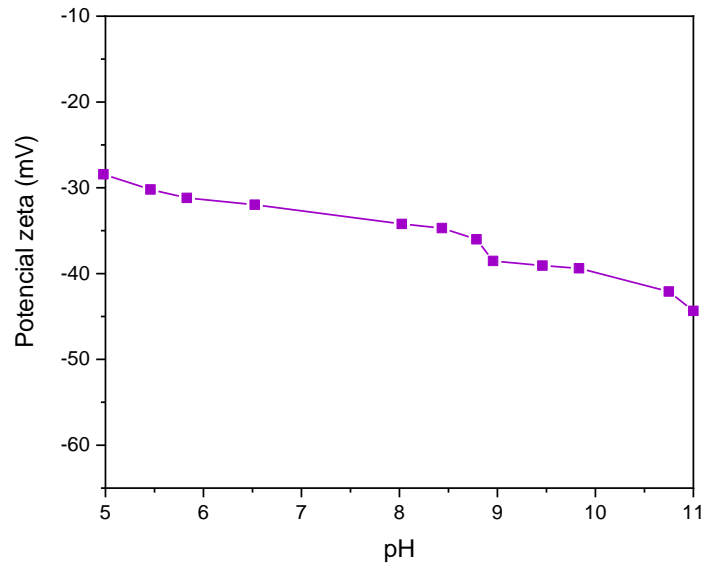
Figura 25 – Histograma de distribuição de diâmetro das AgNPs (Ipê)



É possível observar que a média do diâmetro obtido através das imagens de MET é aproximadamente 26 nm, enquanto que o diâmetro do cristalito obtido por DRX através da equação de Scherer foi de aproximadamente 16nm. Essa diferença entre o diâmetro do cristalito obtido e o diâmetro da AgNP (Ipê) sugere que a nanopartícula está revestida/associada a fitoquímicos oriundos do processo de redução.

A figura 26 apresenta o gráfico referente à variação de potencial zeta ao longo da faixa de pH de 5 a 11. É possível observar que o potencial zeta da AgNP-Ipê é sensível ao pH, variando desde -40 mV a -55 mV. Essa análise permite monitorar se a funcionalização foi bem sucedida na superfície da nanopartícula. Neste caso, a correlação com a presença de substâncias naturais adsorvidas ocorre pois moléculas que possuem grupos funcionais capazes de desprotonação sob condições dependentes de pH, induzem a cargas superficiais [100,101]. Com o aumento do pH, esses grupos funcionais atingem um maior grau de desprotonação, o que faz aumentar a quantidade de carga superficial negativa. Portanto, a adsorção de moléculas polifuncionais aumenta a repulsão eletrostática entre as partículas podendo causar uma blindagem das forças atrativas de Van der Waals, o que faz aumentar a estabilidade cinética dos colóides [102].

Figura 26 – Gráfico Potencial zeta x pH



4.4 Síntese verde empregando *Pelargonium sidoides*

4.4.1 Caracterização do extrato

Foram obtidos os seguintes resultados na análise do extrato fluido de pelargônio:

- Densidade: 0,9798g/cm³ à 20°C.
- Resíduo seco: A análise de resíduo seco a partir do extrato fluido de *Pelargonium sidoides* foi realizada em quadruplicada e o resultado foi de 0,60 ± 0,02%.
- Polifenóis totais: Com base na equação obtida a partir da curva de calibração do padrão de ácido gálico (Figura 18), o valor médio de absorvância do extrato (diluído 5x) foi 0,37 nm que corresponde a uma concentração corrigida no valor de (1,72 ± 0,015) mg/mL de polifenóis totais em termos de ácido gálico.

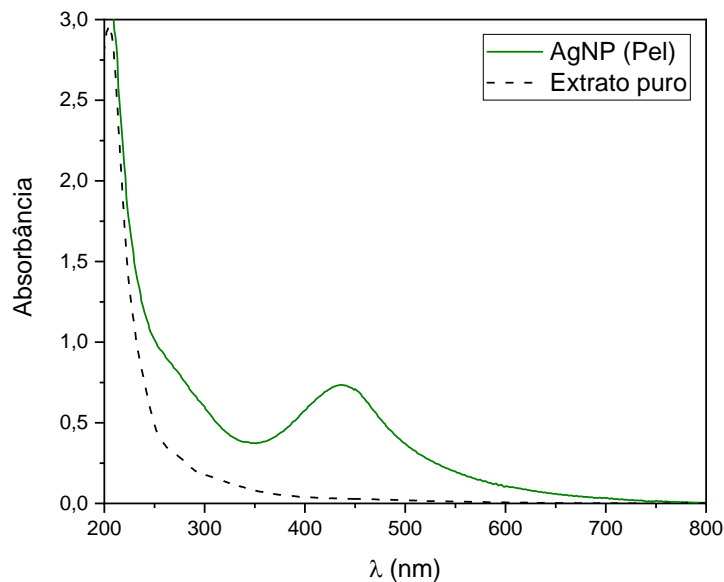
4.4.2 Otimização da síntese

As sínteses foram realizadas com o auxílio do reator de microondas Monowave 300 no modo HTTT sob agitação (600 rpm) e os testes preliminares tiveram como base o trabalho de Shankar *et al.* [23] onde é realizada uma síntese verde convencional com *Pelargonium graveolens*, planta da mesma família do *Pelargonium*

sidoides, *geraniaceae* adicionando-se 5 mL do extrato a 100 mL de nitrato de prata (AgNO_3) aquoso 10^{-3} mol/L, durante 9 horas, em temperatura de 25°C .

Após realização desses testes preliminares monitorados através de espectrofotometria de UV-Vis, confirmou-se a formação de AgNPs mediante o surgimento de uma banda de ressonância plasmônica superficial em aproximadamente 435 nm (Figura 27) e foi possível estabelecer as condições reacionais para otimizar a metodologia.

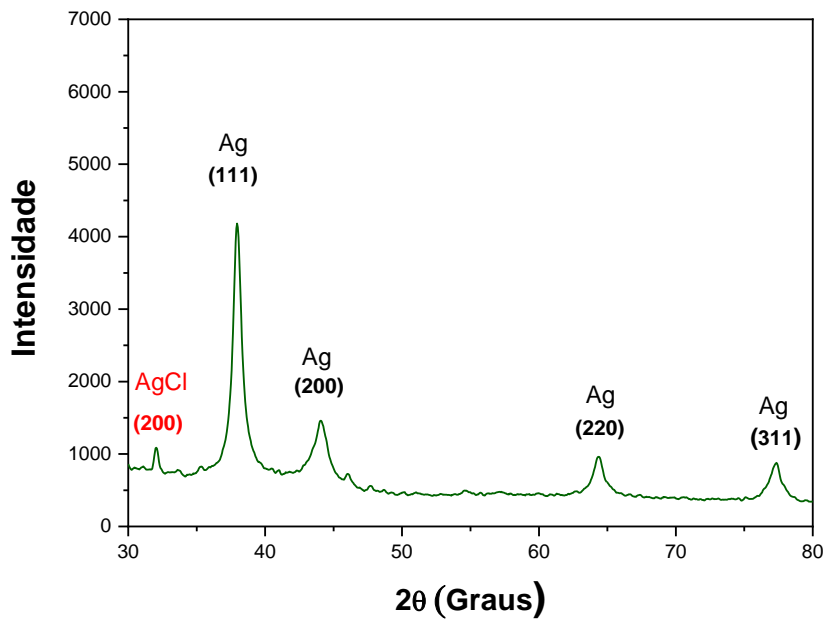
Figura 27 – Espectro de UV-Visível (AgNP-Pel x Extrato puro de Pelargônio)



Foi realizado um planejamento estatístico Box-Behnken (Tabela 4) variando temperatura, tempo e proporção (extrato fluido/solução de AgNO_3). Optou-se por trabalhar diretamente com o extrato fluido e a concentração de AgNO_3 foi fixada em 10^{-3} mol/L, sob agitação.

Um valor de variável dependente foi obtido em cada síntese pela normalização entre o pico de maior intensidade referente à AgNP (38°) e o pico mais significativo referente ao subproduto AgCl (32°) nos difratogramas. (Figura 28).

Figura 28 – Imagem de difração de Raios-X (AgNP-Pel)



A análise estatística foi realizada buscando a condição reacional que fornecesse maior valor para a relação I_{Ag}/I_{AgCl} e, por conseguinte, menor formação de AgCl, através do software Statística 8.0. Foram obtidos os seguintes resultados:

Tabela 13 – Intensidade dos picos dos difratogramas e cálculo do tamanho cristalino das AgNPs obtidas nos 15 experimentos do planejamento Box-Behnken (AgNP-Pel)

| Amostra | Parâmetros | | | DRX | |
|---------|----------------------------|-------------|-----------|---------------------------|--------------------|
| | Ext/ AgNO ₃ (%) | Tempo (min) | Temp (°C) | Relação I_{Ag}/I_{AgCl} | Tamanho cristalino |
| 1 | 10 | 5 | 100 | 0,757 | 10,95 |
| 2 | 10 | 5 | 200 | 9,721 | 11,78 |
| 3 | 10 | 15 | 100 | 0,905 | 9,42 |
| 4 | 10 | 15 | 200 | 8,627 | 12,12 |
| 5 | 5 | 10 | 100 | 1,441 | 9,87 |
| 6 | 5 | 10 | 200 | 6,665 | 12,47 |
| 7 | 15 | 10 | 100 | 0,66 | 11,57 |
| 8 | 15 | 10 | 200 | 5,526 | 13,10 |
| 9 | 5 | 5 | 150 | 3,411 | 10,24 |
| 10 | 5 | 15 | 150 | 5,536 | 10,73 |
| 11 | 15 | 5 | 150 | 2,625 | 9,16 |
| 12 | 15 | 15 | 150 | 3,29 | 10,72 |
| 13 | 10 | 10 | 150 | 4,603 | 11,13 |
| 14 | 10 | 10 | 150 | 5,758 | 10,05 |
| 15 | 10 | 10 | 150 | 5,873 | 10,13 |

A análise por DRX foi necessária para confirmar a formação das AgNPs, distinguindo-as de outros subprodutos ou reagentes em excesso. O difratograma obtido do DRX confirmou a formação de AgNPs evidenciada pelos picos de intensidade a valores de 2θ de aproximadamente 38° , 44° , 64° e 77° , correspondendo aos planos de 111, 200, 220 e 311 para prata, respectivamente.

Estas análises permitiram inferir que:

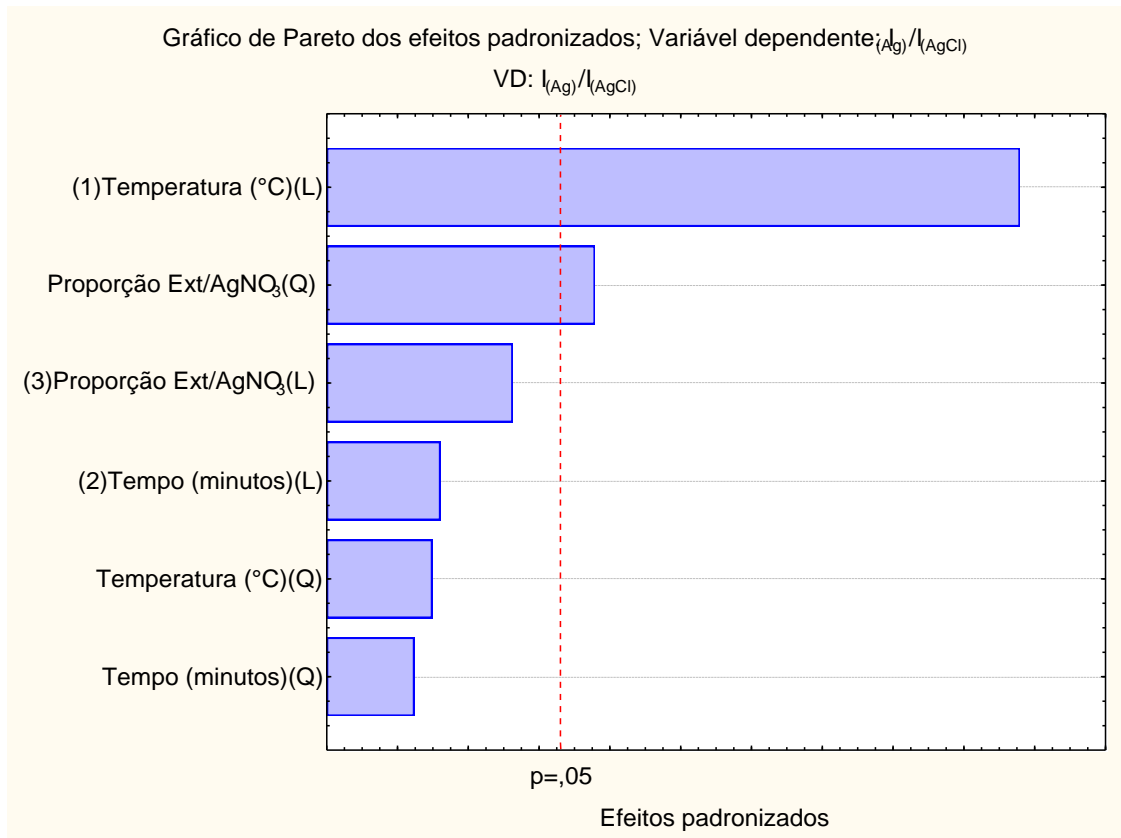
- (i) Temperaturas maiores favorecem a formação das AgNPs;
- (ii) O aumento na quantidade de AgNO_3 na síntese causa o surgimento de picos referentes a este reagente e
- (iii) O excesso de extrato fluido na síntese diminui a formação das AgNPs. Desta forma, o teste 4 do planejamento experimental e teste adicional 1 foram os que apresentaram melhores resultados, sendo este último de maior intensidade (Figura 13).

A formação de AgNP foi confirmada de acordo com o surgimento da superfície da ressonância plasmônica, entretanto a síntese apresentou como principal problema o surgimento de AgCl concomitante, o que já havia sido relatado em alguns estudos anteriores.

Uma dessas hipóteses é que o AgCl nas nanopartículas de Ag-AgCl se dissolva como Ag (I) na solução, sendo reduzido a Ag (0) e deixando a porção Ag como AgNPs isolados com tamanho de partícula, morfologia e microestruturas semelhantes. Essas AgNPs representaram a maioria do produto final [13].

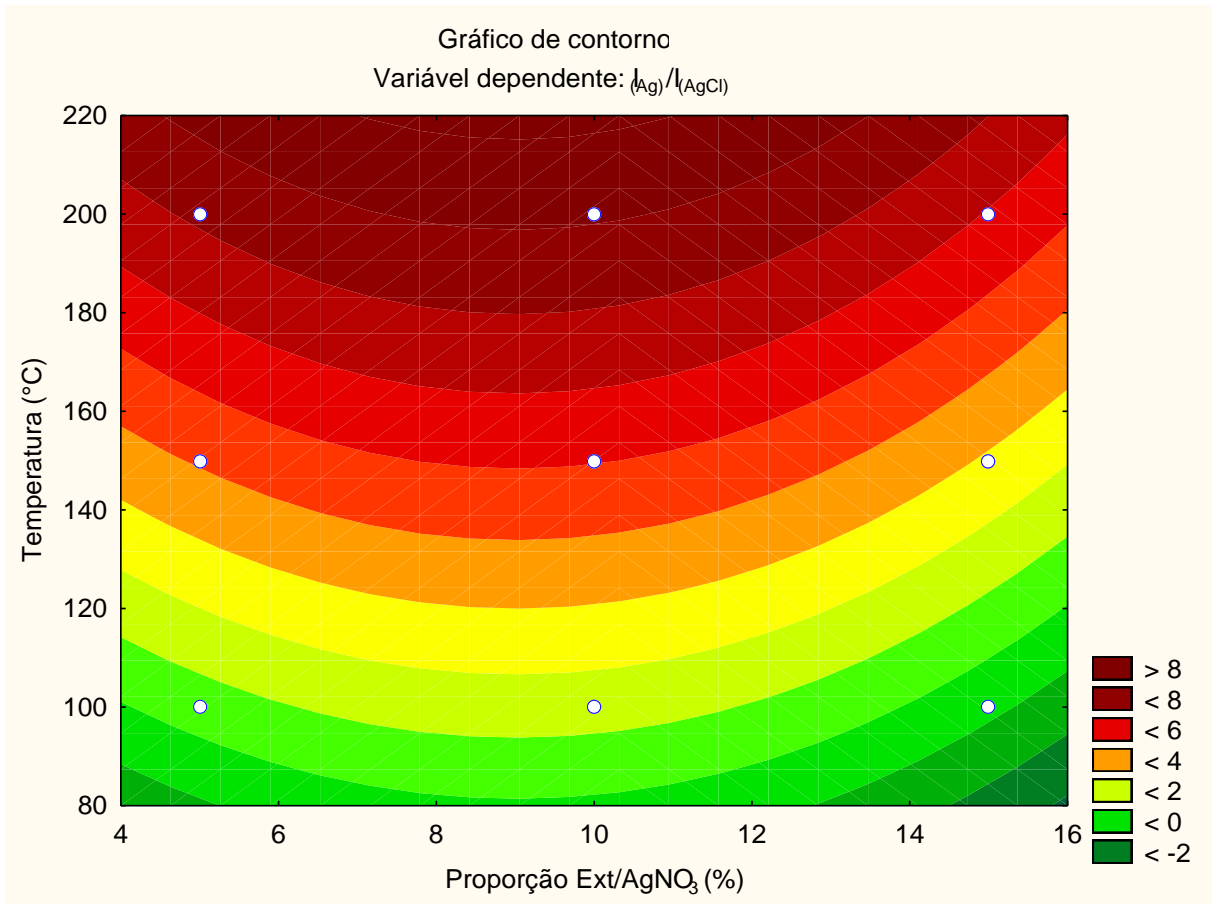
Os resultados analíticos mostraram que a formação de AgCl diminui a altas temperaturas. A representação gráfica de barras ordenadas em forma decrescente no Diagrama de Pareto (Figura 29) ratifica essa observação, pois a temperatura representa o parâmetro que causa um impacto geral maior ao processo pois seu resultado linear extrapola de forma muito mais representativa a linha divisória ($p = 0,05$) quando comparado com o resultado quadrático da proporção Extrato/ AgNO_3 . Desta forma, podemos inferir que o fator 1 (Temperatura) exerce grande influência e o fator 3 (proporção extrato/ AgNO_3) pouca influência no processo [95].

Figura 29 – Diagrama de Pareto referente ao planejamento Box-Behnken de AgNP (Pel)



Como o fator 2 (tempo de reação em minutos) não exerce influência significativa no nível de 95%, fixou-se a variável tempo = 5 minutos para a construção do gráfico de contorno. (Figura 30) As regiões de máxima resposta da superfície de resposta são representadas pelas áreas em vermelho, enquanto as verdes se referem aos níveis de parâmetros que apresentam os menores valores para a variável considerada.

Figura 30 – Gráfico de contorno referente aos resultados do planejamento Box-Behnken de AgNP-Pel



É possível observar no gráfico de contorno que a região em vermelho escuro representa a combinação entre as variáveis 1 (Temperatura) e 3 (proporção extrato/AgNO₃) onde a relação Ag/AgCl é maior, ou seja, em temperaturas mais elevadas e percentual de extrato próximo a 10%. Desta forma, pode-se concluir que a condição reacional 2 do planejamento Box-Behnken encontra-se na região de máxima resposta.

4.4.3 Caracterização

As imagens da síntese 2 foram obtidas por MET (Figura 31) e a leitura de seus diâmetros foi realizada com o auxílio do software Image J, num total de 500 medidas. O histograma contendo a frequência de distribuição dos diâmetros foi obtido utilizando o Software Origin 2019b e a análise dos dados por Kolmogorov-Smirnov confirmou a distribuição lognormal para um intervalo de confiança de 5%. (Figura 32)

Figura 31 – Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão (AgNP-Pel)

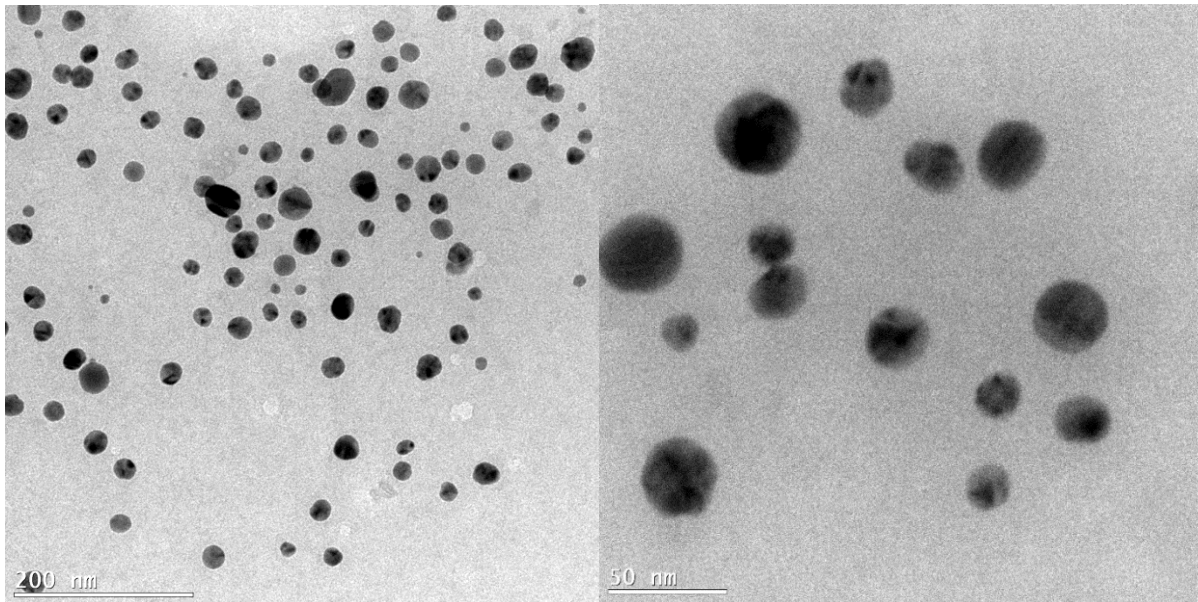
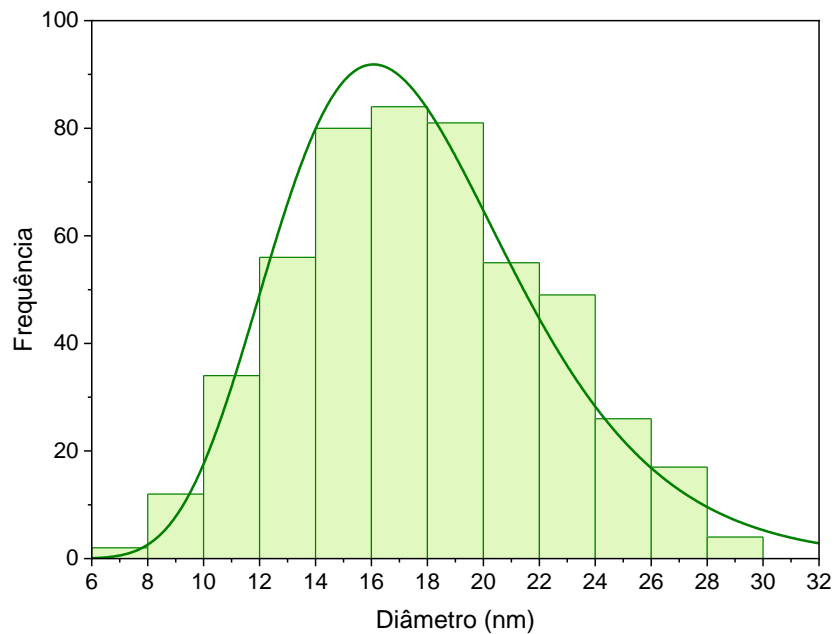
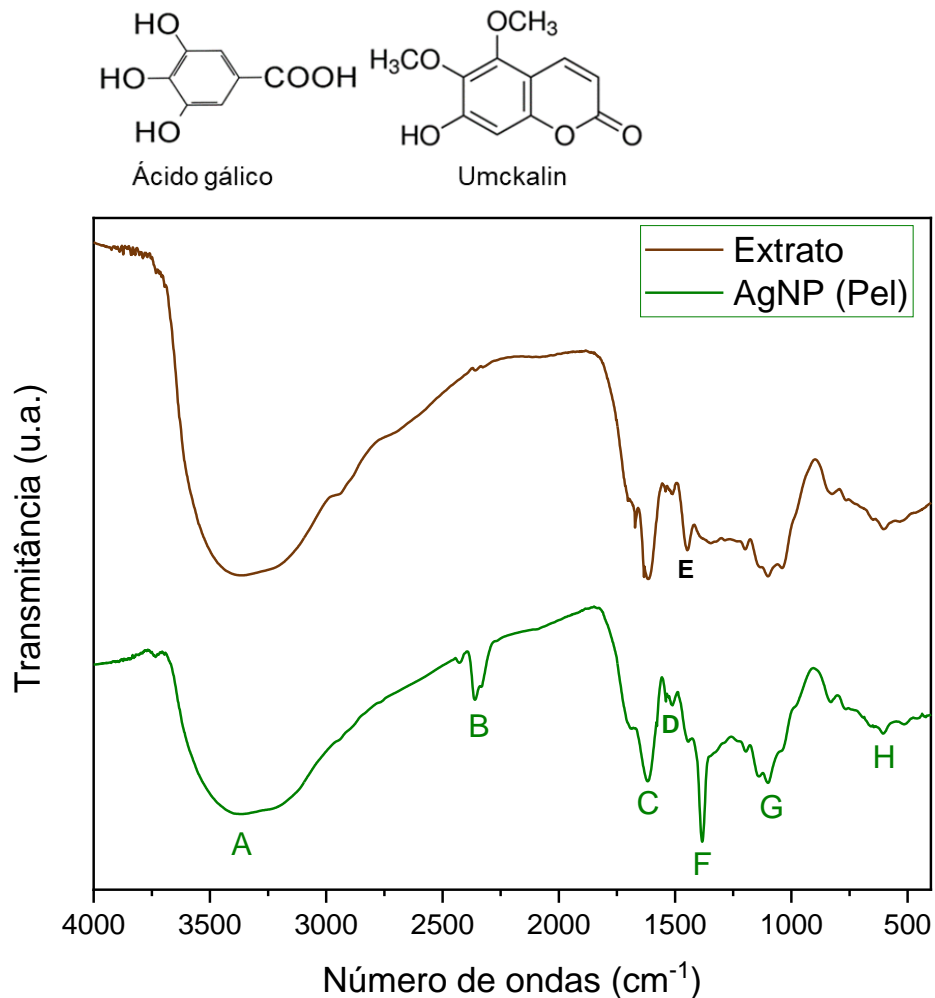


Figura 32 - Histograma de distribuição de diâmetro (AgNP-Pel).



É possível observar que a média do diâmetro obtido através das imagens de MET é aproximadamente 18 nm, enquanto que o diâmetro do cristalito obtido por DRX através da equação de Scherer foi de aproximadamente 12 nm. Essa diferença entre o diâmetro do cristalito obtido e o diâmetro da AgNP (Ipê) sugere que a nanopartícula está revestida/associada a fitoquímicos oriundos do processo de redução.

Figura 33 – Espectro de FTIR AgNP (Pelargônio) x Extrato puro



Pela análise do espectro de FTIR da síntese obtida na condição reacional 2 (10% extrato/AgNO₃, 200°C por 5 min) é possível observar a presença de vários grupos funcionais que são responsáveis pela redução no processo que produz a nanopartícula de prata (Figura 33). As regiões marcadas de A a H são correspondentes a:

(A) $\approx 3380 \text{ cm}^{-1}$ pode ser associado à vibração de estiramento -OH de porções de álcoois e fenóis e / ou estiramento por flexão de fenóis e álcoois ligados a hidrogênio nas moléculas adsorvidas [96]

(B) $\approx 2370 \text{ cm}^{-1}$ e 2320 cm^{-1} correspondem a vibrações assimétricas do CO₂ adsorvido;

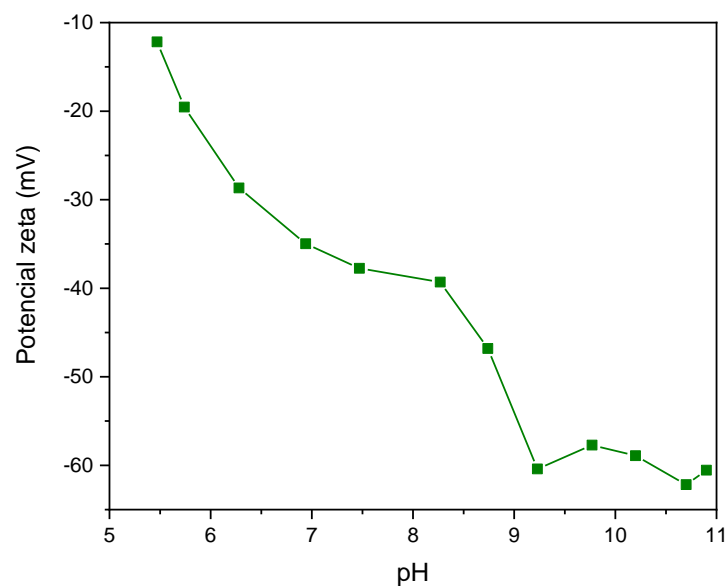
(C) $\approx 1705 \text{ cm}^{-1}$ e 1635 cm^{-1} podem ser atribuídos ao alongamento da amida C = O. Outros picos são provenientes de flexões OH no plano e vibrações assimétricas e simétricas de porções de COO [80,87,103]

- (D) Pico duplo em $\approx 1540\text{ cm}^{-1}$ e 1520 cm^{-1} pode ser atribuído, respectivamente, à vibração de alongamento de $\text{C} = \text{C}$ nos anéis aromáticos e nos grupos CH_2 [99]
- (E) $\approx 1450\text{ cm}^{-1}$ pode ser atribuído aos grupos alifáticos CH_2 e CH_3 [87]
- (G) Os picos em $1150\text{-}1050\text{ cm}^{-1}$ correspondem ao alongamento C-O dos éteres alifáticos presentes nas moléculas adsorvidas [98]
- (H) Banda em $\approx 620\text{ cm}^{-1}$ indica a existência da ligação C-H pertencente ao grupo funcional aromáticos [103].

Sabendo que os principais constituintes encontrados no extrato de Pelargonium sidoides são compostos fenólicos e derivados cumarínicos, dentre eles o umckalin, que é uma cumarina, os dados de FTIR indicam que houve uma incorporação desses compostos à superfície da AgNP, o que pode também justificar o tamanho da AgNP (Pel) ser maior que o do cristalito [47].

Foi realizada a análise do Potencial Zeta ao longo na faixa de pH 5 até pH 11 (Figura 34), onde foi possível observar que o potencial zeta da AgNP-Pel é extremamente sensível ao pH, variando desde -20 mV a -80 mV , o que, assim como na AgNP-Ipê, pode ser correlacionado com a presença de substâncias naturais adsorvidas, ou seja, moléculas que possuem grupos funcionais capazes de desprotonação sob condições dependentes de pH, induzindo a cargas superficiais [101].

Figura 34 – Curva de titulação de Potencial Zeta x pH



Observa-se ainda, que em pH fisiológico (próximo a 7,4) o valor de potencial zeta da nanopartícula é próximo a -50 mV, o que a classifica como sendo de boa estabilidade [100].

4.5 Estudo da atividade antimicrobiana das nanopartículas

Para a realização dos estudos de atividade antimicrobiana, optou-se por trabalhar apenas com as AgNPs obtidas com extrato de ipê roxo (AgNP-Ipê) e com extrato de Pelargônio (AgNP-Pel), pelos seguintes motivos:

- AgNP-Ipê e p AgNP-Pel apresentaram menor formação de subprodutos, conforme visto nos respectivos difratogramas.
- Apenas conseguiu-se obter AgNPs com extrato de estévia (AgNP-Est) com solução de AgNO_3 10^{-2} mol/L, ou seja, mais concentrada que as demais obtidas
- Os extratos de estévia necessitaram de etapa adicional de rotoevaporação para a eliminação do etanol, o que pode vir a ser um fator de erro no processo, diminuindo sua repetitividade.
- Conforme observado no difratograma obtido, as AgNP-Est apresentaram significativa presença de AgCl, formado pela de presença de Cloretos (Cl^-) oriundos de etapa existente na plantação da estévia.

Desta forma, tanto os estudos *in vitro* e *in vivo* quanto algumas análises realizadas para as duas AgNPs selecionadas não foram estendidas a AgNP-Est.

O efeito antibacteriano da AgNP produzido por síntese verde com *Handroanthus impetiginosus* (AgNP-Ipê) e seu extrato aquoso puro foram avaliados através do método de microdiluição contra as bactérias *Staphylococcus aureus* (gram-positivas) e *Escherichia coli* (gram-negativas). Essas espécies de bactérias são de grande importância para o sistema de saúde [104] e foram utilizadas por outros pesquisadores para avaliar a ação antibacteriana de AgNPs obtidas por meio da síntese verde [105,106].

Tabela 14 – Concentração inibitória mínima (CIM) obtida com AgNP (Ipê) através do método de microdiluição em caldo (mg/mL)

| Estatística (mg/mL) | <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 Gram positiva | | <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 Gram negativa | |
|------------------------|--|-------------|---|--------------|
| | Extrato puro | AgNP (Ipê) | Extrato puro | AgNP (Ipê) |
| CIM | 2,65 | 0,31 | 1,23 | 66,72 |
| IC (IC 50) | 1,61 a 3,41 | 0,19 a 0,49 | 0,02 a 65,56 | 32,9 a 288,2 |
| IC 99,9 (MBC) | 30,42 | 262,05 | 121,77 | 6605,58 |

O nanomaterial (AgNP-*Ipê*) apresentou resposta diferente em *S. aureus* e *E. coli*, conforme apresentado na Tabela 14. Esses resultados revelaram que a formulação da AgNP induziu inibição de crescimento no microrganismo *S. aureus*, apresentando menor CIM (0,31 mg / mL) em comparação com o extrato puro CIM (2.647mg / mL). No entanto, com cepas de *E. coli*, a formulação de AgNP-*Ipê* (CIM = 66,72 mg / mL) foi mais de 50 vezes maior do que o extrato puro com CIM de 1,23 mg / mL. Em pesquisa semelhante, foi observada atividade antibacteriana contra *E. coli* usando AgNP sintetizado usando partes diferentes da planta *Handroanthus heptaphyllus*, onde o valor de CIM calculado foi de 75 μ M (12,75 mg / L) independente da parte de material botânico utilizada [107].

No processo de síntese verde da AgNP (*Ipê*), foram adicionados novos grupos químicos nas AgNP, conforme sugerido pelo FTIR (Figura 24), e os melhores resultados, neste trabalho, foram contra o *S. aureus*, uma bactéria gram-positiva. O potencial zeta apresentou carga negativa e os resultados do FTIR demonstraram a presença de OH, indicado em grupos fenólicos, como flavonóides, antioxidantes com efeitos antibacterianos contra *S. aureus* [108]. Pesquisas com extratos metanólicos puros de *Handroanthus heptaphyllus* encontraram esse composto e eficácia antibacteriana contra *S. aureus* [109]. Outras pesquisas utilizando síntese verde na produção de AgNP apresentaram resultados semelhantes contra *S. aureus*, demonstrando a influência de compostos químicos de plantas na seletividade bactericida [110].

Um estudo realizado com nanopartículas de prata obtidas com extratos de flores de *Tabebuia argentea* avaliou sua atividade antimicrobiana contra

Pseudomonas aeruginosa, *Klebsiella aerogenes*, *Staphylococcus aureus* e *E-coli* pelo método padrão de difusão em poços encontrando efeitos significantes contra essas bactérias. Entretanto, este ensaio permite apenas uma análise qualitativa da atividade antimicrobiana das AgNPs, não sendo possível calcular seu MIC [41].

Uma possível explicação está na possibilidade de atuação da AgNP (Ipê) na parede celular produzindo orifícios [111,112] ou penetrando na célula bacteriana, agindo internamente, interferindo na fosforilação oxidativa [53,113] ou complexo produtor de ácidos nucleicos [113,114]. É possível, ainda, que enzimas bacterianas específicas promovam a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) devido à redução na região quinolínica [40,107].

Também encontra-se na literatura a proposta de que o efeito antimicrobiano das AgNPs esteja associado a um contato direto das nanopartículas com a parede celular bacteriana, seguido pela penetração no citoplasma. Tal contato de AgNPs com grandes áreas de superfície em uma parede celular bacteriana pode levar a danos na membrana, resultando no vazamento do conteúdo celular e na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) pela interação com AgNPs levando à inibição de enzimas respiratórias e na eventual morte celular [115,116].

Entretanto, o mecanismo bioquímico que explica a ação específica dessa nanopartícula contra bactérias precisa ser elucidado, para disponibilizar os efeitos dos compostos químicos associados à Ag através da síntese verde.

A viabilidade celular das AgNP-Ipê foi avaliada conforme descrito no item 3.5.2, através do método colorimétrico MTT - *Methyl Thiazolyl Blue* e os resultados estão apresentados na tabela 15:

Tabela 15 – Resultados da viabilidade celular na linhagem de queratinócitos HaCat com AgNP-Ipê e extrato puro de ipê roxo

| | | Formulação contendo extrato puro | Formulação contendo AgNP (Ipê) |
|-----|------------------------|----------------------------------|--------------------------------|
| MTT | IC50 (µg/ml) | 7823 | 8333 |
| | Intervalo de confiança | 4276-9333 | 5936-10232 |

Os critérios de citotoxicidade para novos compostos, estabelecidos pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI), são $IC_{50} > 1000 \mu\text{g} / \text{mL}$ no teste preliminar para serem considerados inofensivos aos seres humanos, onde IC_{50} corresponde a concentração necessária para matar metade de uma população [117]. Logo, as formulações testadas cumpriram os critérios do NCI e, portanto, apresentam indícios de serem inofensivas aos seres humanos. Entretanto, outros estudos devem ser realizados para confirmar tal indicação.

O efeito antibacteriano do AgNP produzido por síntese verde com *Pelargonium sidoides* e seu extrato aquoso puro foi avaliado por microdiluição contra as bactérias *Staphylococcus aureus* (gram-positiva), *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (gram-negativas). Essas espécies de bactérias são de grande importância para o sistema de saúde [104] e foram utilizadas por outros pesquisadores para avaliar a ação antibacteriana de AgNPs obtidas por meio da síntese verde [105,106]. Uma parte do trabalho com esta planta foi realizado com o auxílio de um aluno de iniciação científica, vindo a fazer parte de seu Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia na FCE/UnB [118], realizado sob orientação do Prof. Dr. Marcelo Henrique Sousa e co-orientação da doutoranda Renata Pascoal Illanes Tormena.

Os resultados de atividade antimicrobiana obtidos para a AgNP (Pel) estão apresentados na Tabela 16:

Tabela 16 – Concentração inibitória mínima (CIM) obtida com a AgNP (Pel) através do método de microdiluição em caldo (mg/mL).

| Estatística (mg/mL) | <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 (Gram-positiva) | | <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 (Gram-negativa) | | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 (Gram-negativa) | |
|-----------------------------|---|-----------------|--|------------------|--|------------------|
| | Extrato | AgNP | Extrato | AgNP | Extrato | AgNP |
| | CIM (IC₅₀) | 84,98 | 12,04 | 267,01 | 71,37 | 10000 |
| IC (IC₅₀) | 67,25 a 107,4 | 5,88 a 24,65 | 192,3 a 372,6 | 69,03 a 98,87 | muito amplo | 16,24 a 23,75 |
| IC 99,9 (MBC) | 8413,02 | 1191,96 | 26433,01 | 7065,63 | 990000 | 1688,94 |

Diferente da AgNP (Ipê), a AgNP elaborada com *Pelargonium sidoides* apresentou ação antimicrobiana contra ambos os tipos de bactérias: gram-positiva e gram-negativas.

O *Pelargonium sidoides* possui diversos constituintes, como ácido gálico, taninos, flavonoides, ácidos graxos insaturados e derivados cumarínicos, dentre eles o umckalin, que é sua cumarina. Observa-se então que os principais constituintes encontrados são compostos fenólicos, a quem são atribuídas as atividades antioxidante, antimicrobiana e anticâncer do extrato de *P. sidoides* [47,119].

Considerando que o EPs 7630 é rico em ácido gálico, já foi estudado o mecanismo de ação deste sobre superfícies bacterianas negativas, onde a partir da medição do potencial zeta dele e das células bacterianas verificou-se que após a exposição a ácidos fenólicos, houveram alterações na carga superficial das células para valores menos negativos, principalmente para *E. coli* e *P. aeruginosa* [120]. AgNPs elaboradas com compostos constituintes do *Pelargonium endlicherianum* Fenzl., também da família Gerinaceae, tiveram sua atividade antimicrobiana avaliada empregando o método de microdiluição in vitro e apresentaram resultados significativos de CIM contra *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 3699 [121].

A manutenção da presença de compostos químicos do extrato de *Pelargonium sidoides* junto à nanopartícula pode ser evidenciada pelo espectro de FTIR (Figura 33) e pelo potencial zeta obtido. Esta característica contribuiu para a eficiência bactericida frente aos dois grupos de bactérias testados, levando a danos celulares e consequente morte das bactérias [122].

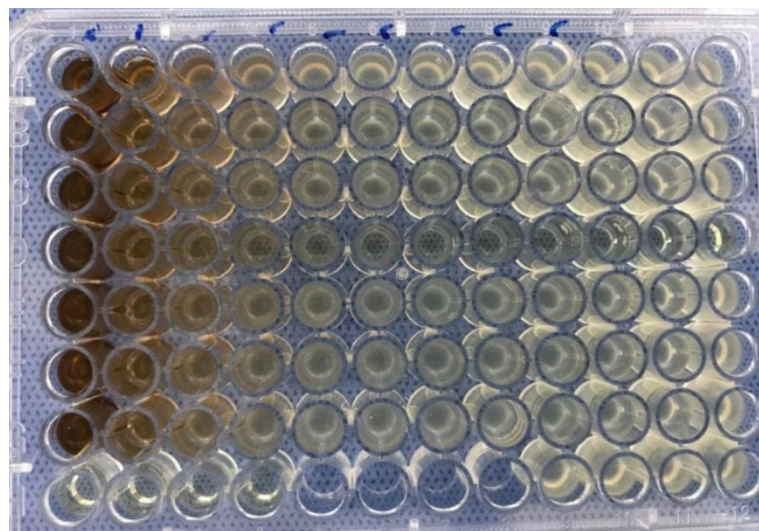
Já foi demonstrado seu efeito inibidor em infecções causadas por bactérias gram-positivas do tipo *Streptococcus aureus* baseado na ação de um antagonista específico contra as proteínas de adesão na superfície bacteriana, impedindo a adesão às células epiteliais (efeito antiaderente) e a subsequente penetração delas. Essa atividade antibacteriana estaria associada a presença de proantocianidinas (taninos condensados), presentes no extrato [44,123,124].

Estudos apontam que as cumarinas, os taninos e os compostos fenólicos são os principais responsáveis pela característica redutora desta planta, o que potencializa sua capacidade redutora necessária à formação das AgNPs e, possivelmente, lhe confere a ação antimicrobiana esperada [125]. Além disso, como AgNPs apresentam grande área de superfície disponível para interação, espera-se que quanto menores forem suas dimensões maior o aumento do seu efeito bactericida, interagindo não

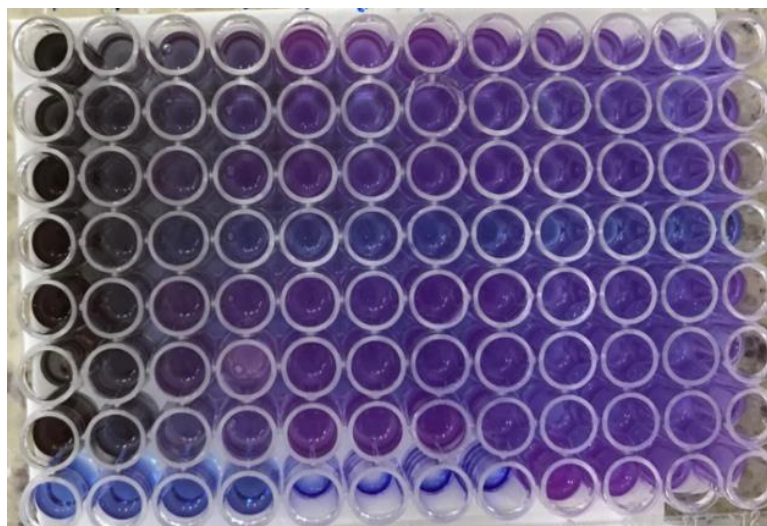
apenas com a superfície da membrana, mas também penetrando dentro das bactérias [20].

Diante dos resultados obtidos contra bactérias gram-negativas, optou-se por testá-las contra uma bactéria multirresistente, a *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase, conforme pode ser visto nas placas de 96 poços da figura 35.

Figura 35 – Placas de teste de microdiluição antes e após revelação com resazurina: AgNP (Pel) x *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase



Após revelação com resazurina



Para a análise da atividade antimicrobiana das nanopartículas da prata foram empregadas cepas de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase ATCC BAA-1705, portadoras do gene blaKPC que confere resistência aos antibióticos

carbapenêmicos (Ertapenem, Meropenem e Imipenem). Esse gene é encontrado em elementos genéticos móveis, em geral em transposons carregados por plasmídeos, que podem ser transmitidos de uma bactéria para outra, sendo da mesma espécie ou não, por um processo conhecido como conjugação. Esse tipo de disseminação da resistência aos antibióticos é mais difícil de ser contido e a resistência pode se espalhar mais rapidamente [126]. Os resultados obtidos foram os seguintes:

Tabela 17 – Concentração inibitória mínima obtida com a AgNP (Pel) contra a *Klebsiella pneumoniae* produtora de *carbapenemase*

| Estatística (mg/mL) | <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de <i>carbapenemase</i> ATCC BAA-1705 | |
|---------------------|---|-------------|
| | Extrato puro | AgNP (Pel) |
| CIM (IC50) | 21,11 | 0,85 |
| IC (IC 50) | 12,57 a 35,39 | 0,01 a 7,23 |
| IC 99,9 (MBC) | 2088,9 | 84,15 |

O resultado de concentração inibitória mínima (CIM) da atividade antibacteriana da AgNPs foi de 0,85mg/mL (Tabela 17), o que, segundo Aligiannis *et al.* [127], a enquadra como um inibidor moderado para *Klebsiella pneumoniae produtora de carbapenemase*. Este resultado representa uma alternativa extremamente promissora no combate a infecções causadas pelo microrganismo supracitado, dada a conhecida complexidade em seu tratamento [128].

É importante ressaltar que a demanda por novos fármacos com ação contra bactérias multirresistentes é uma necessidade de cunho mundial, visto que em 2017, a OMS publicou uma lista contendo os “agentes patogênicos prioritários” numa tentativa de orientar e promover a pesquisa e desenvolvimento (P&D) de novos antibióticos alinhados às atuais prioridades na saúde pública. Essa lista compreende 12 famílias de bactérias divididas em 3 categorias: prioridade crítica, alta ou média, sendo que a família *Enterobacteriaceae*, resistente à carbapenema e onde se inclui a *Klebsiella*, encontra-se no grupo de maior prioridade, o das bactérias multirresistentes.

A partir do ensaio de viabilidade celular pela técnica de redução do MTT, verificou-se que as formulações obtidas não apresentaram atividade citotóxica frente

à linhagem HacaT e IC_{50} de 9522 $\mu\text{g/mL}$ para a formulação contendo extrato, e de 10277 $\mu\text{g/mL}$ para contendo AgNP-Pel com extrato, resultado que não difere estatisticamente do controle negativo. Os dados estão descritos na tabela 18.

Tabela 18 – Resultados da viabilidade celular na linhagem de queratinócitos HaCat com AgNP (Pel)

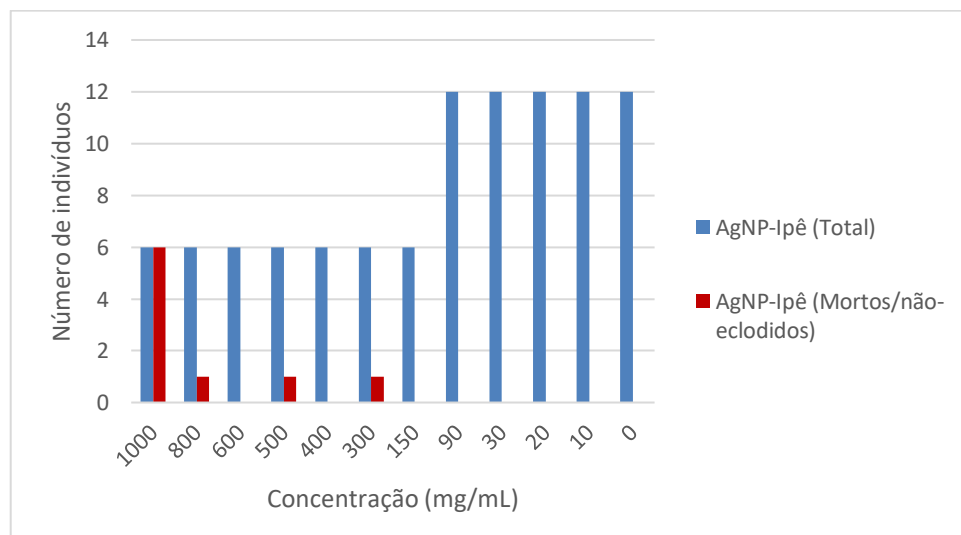
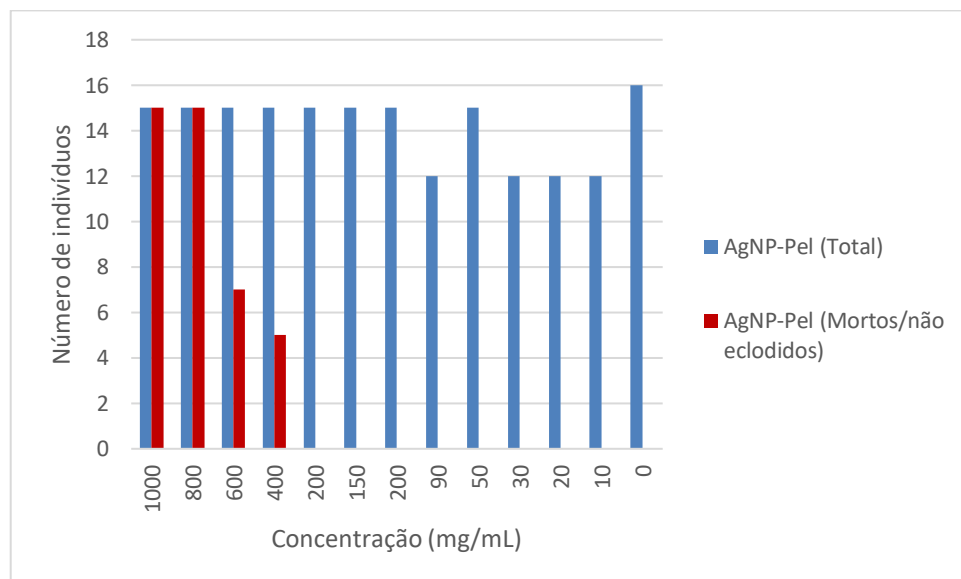
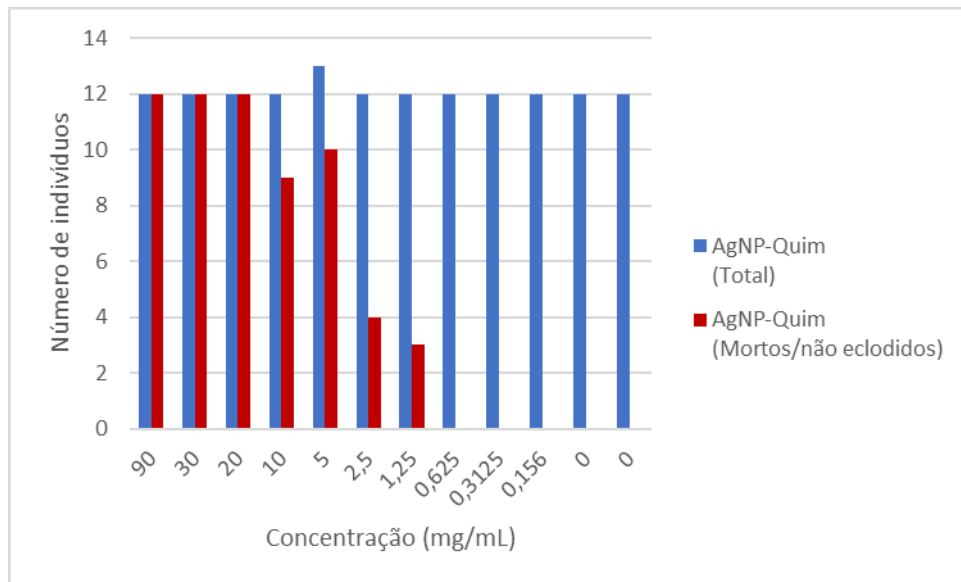
| | | Formulação contendo extrato puro | Formulação contendo AgNP (Pel) |
|------------|---------------------------|----------------------------------|--------------------------------|
| MTT | IC50 ($\mu\text{g/ml}$) | 9522 | 10277 |
| | Intervalo de confiança | 7105-7245 | 7245-13309 |

Conforme estabelecido pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI), os critérios de citotoxicidade para novos compostos são de $IC_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$ no ensaio preliminar para serem consideradas inócuas ao ser humano [117]. Logo, essa formulação se enquadra nos critérios do NCI, portanto pode ser considerada como inócua. Dessa forma, as formulações produzidas não têm efeito citotóxico em células HaCat, e, dados os critérios estabelecidos pelo NCI, podem ser consideradas como inócuas.

4.6 Avaliação nanotoxicológica

Foi necessária a realização de pré-testes para definir as concentrações que deveriam ser utilizadas no teste de toxicidade aguda em peixes pois observou-se no primeiro teste que em concentrações mais baixas apenas a AgNP-Quim causou a morte das larvas. Dessa forma, foram realizados 3 pré-testes em diferentes períodos com o objetivo de determinar a CL50 das nanopartículas investigadas e, assim, as concentrações a serem utilizadas no teste final. Os resultados estão resumidos na Figura 36.

Figura 36 – Dados compilados dos pré-testes realizados em Zebrafish durante a fase embrio-larval: (a) AgNP-Quim, (b) AgNP-Ipê (c) AgNP-Pel)



Não foi possível determinar a CL50 dentro da faixa estabelecida pelo protocolo OECD 236/2013 para as AgNPs elaboradas via síntese verde, pois, conforme os procedimentos descritos nesta diretriz, a concentração limite do produto de teste é de 100 mg/L, o que abrange apenas ao cálculo da CL 50 para a AgNP (Quim).

Entretanto, através da análise com o Software SPSS, os seguintes valores puderam ser estimados:

Tabela 19 – Resultados estimados de CL 50 baseados nos testes preliminares

| AgNPs | CL50 (mg/L) | Intervalo de confiança |
|------------------------|--------------------|-------------------------------|
| Síntese Química | 3,286 | (2,299-4,648) |
| AgNP (Ipê) | 859,804 | Não foi possível determinar |
| AgNP (Pel) | 528,587 | (442,1-610,142) |

Após a realização dos pré-testes foi possível constatar que as nanopartículas obtidas através de síntese verde apresentam CL 50 pelo mesmo 150 vezes maior do que a AgNP obtida por síntese química, sendo, dessa forma, muito menos tóxicas. Este resultado preliminar é de extrema importância pois, apesar de apresentar diversos aspectos positivos quanto a sua atuação, a toxicidade das AgNPs têm sido uma preocupação recorrente tanto para uso humano seguro quanto pelo aspecto da contaminação de organismos vivos no meio ambiente [129,130].

A partir dos resultados preliminares de CL50 dados, foi possível propor as concentrações a serem utilizadas no Ensaio de toxicidade aguda em embriões de peixes (FET), conforme tabela 20:

Tabela 20 – Tabela de concentrações propostas para FET

| AgNPs | CONCENTRAÇÕES (mg/mL) | | | | | | |
|-------------------|------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | C1 | C2 | C3 | C4 | C5 | C6 | CC |
| AgNP Quim) | 0,156 | 0,3125 | 0,625 | 1,25 | 2,5 | 5 | 10 |
| AgNP (Pel) | 23,44 | 46,88 | 93,75 | 187,5 | 375 | 750 | 10 |
| AgNP (Ipê) | 46,88 | 93,75 | 187,5 | 375 | 750 | 1500 | 10 |

OBS: CC= Concentração controle 10 mg/L, escolhida para que as sínteses possam ser comparadas entre si.

5 Conclusões

Através de uma sequência de ensaios e planejamentos estatísticos, foi possível desenvolver e otimizar métodos simples, rápidos e amigáveis ao meio ambiente para a síntese assistida por micro-ondas de nanopartículas de prata empregando extratos de *Stevia rebaudiana*, *Pelargonium sidoides* e *Handroanthus impetiginosus* como agentes redutores e estabilizadores.

Em relação às metodologias existentes, o uso do reator de micro-ondas de alto desempenho representou uma diminuição significativa no tempo de reação além de assegurar a confiabilidade e reprodutibilidade do processo.

O estudo da atividade antimicrobiana das AgNPs obtidas com o emprego de extratos de *Handroanthus impetiginosus* e *Pelargonium sidoides* comprovou a ação antimicrobiana das mesmas contra bactérias Gram-positivas, no primeiro caso e, para Gram positivas e Gram-negativas no caso do Pelargônio, onde podemos destacar a ação contra a bactéria multirresistente *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase.

Através dos estudos de viabilidade celular e dos ensaios preliminares em peixes tipo Zebrafish, é possível sugerir que as AgNPs produzidas não oferecem risco à saúde, o que representa resultados promissores para o tratamento de infecções causadas por bactérias, inclusive as multirresistentes.

6 Perspectivas futuras:

- ✓ Realização de análises bioquímicas e imagens que confirmem o local de atuação das AgNPs para proceder a submissão do artigo sobre a ação antimicrobiana da AgNP- Pel;
- ✓ Realização da análise final em peixes tipo Zebrafish;
- ✓ Teste das AgNPs em outros tipos de bactérias e/ou vírus.
- ✓ Estudar possíveis vias de administração das AgNPs

7 Referências Bibliográficas

1. Bayda S, Adeel M, Tuccinardi T, Cordani M, Rizzolio F. The history of nanoscience and nanotechnology: From chemical-physical applications to nanomedicine. *Molecules*. 2020;25:1–15.
2. Huh AJ, Kwon YJ. “Nanoantibiotics”: A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. *J Control Release* [Internet]. Elsevier B.V.; 2011;156:128–45. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.07.002>
3. Rosato A, Maggi F, Cianfaglione K, Conti F, Ciaschetti G, Rakotosaona R, et al. Chemical composition and antibacterial activity of seven uncommon essential oils. *J Essent Oil Res* [Internet]. Taylor & Francis; 2018;30:233–43. Available from: <http://doi.org/10.1080/10412905.2018.1442753>
4. Shaker MA, Shaaban MI. Synthesis of silver nanoparticles with antimicrobial and anti-adherence activities against multidrug-resistant isolates from *Acinetobacter baumannii*. *J Taibah Univ Med Sci* [Internet]. Elsevier Ltd; 2017;12:291–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtumed.2017.02.008>
5. Amini SM. Preparation of antimicrobial metallic nanoparticles with bioactive compounds. *Mater Sci Eng C* [Internet]. Elsevier; 2019;103:109809. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109809>
6. Majeed S, Samad MSBA. Plant mediated synthesis of silver nanoparticles and its antibacterial effect. *J Pure Appl Microbiol*. 2019;13:1267–72.
7. Haider A, Kang I. Preparation of Silver Nanoparticles and Their Industrial and Biomedical Applications : A Comprehensive Review. 2015;2015.
8. Aldosary SK, Abd El-Rahman SN. Green synthesis and antibacterial properties of silver nanoparticles of lawsonia inermis, rhamnus frangula, camellia sinensis and thymus vulgaris extracts. *J Pure Appl Microbiol*. 2019;13:1279–84.
9. Alzahrani E, Welham K. Optimization preparation of the biosynthesis of silver nanoparticles using watermelon and study of its antibacterial activity. *Int J Basic Appl Sci*. 2014;3:392–400.
10. Kahrilas GA, Wally LM, Fredrick SJ, Hiskey M, Prieto AL, Owens JE. Microwave-Assisted Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Orange Peel Extract. *ACS Sustain Chem Eng* [Internet]. 2014;2:367–76. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/sc4003664>
11. Mansoori GA, Soelaiman TAF. Nanotechnology - An introduction for the standards community. *J ASTM Int*. 2005;2:17–38.
12. Albanese A, Tang PS, Chan WCW. The Effect of Nanoparticle Size, Shape, and Surface Chemistry on Biological Systems. *Annu Rev Biomed Eng*. 2012;14:1–16.
13. Schulz PA. Há mais história lá embaixo - um convite para rever uma palestra. *Rev Bras Ensino Física*. 2018;40.
14. Binns C. Introduction to Nanoscience and Nanotechnology (Wiley Survival Guides in Engineering and Science) [Internet]. Wiley; 2010. Available from: <http://www.amazon.com/Introduction-Nanoscience-Nanotechnology-Survival-Engineering/dp/0471776475>

15. Matteis V De, Cascione M, Toma CC, Leporatti S. Silver Nanoparticles : Synthetic Routes , In Vitro Toxicity and Theranostic Applications for Cancer Disease. *nanomaterials*. 2018;8:1–23.
16. de Souza GD, Rodrigues MA, Silva PP, Guerra W. Silver: Brief history, properties and applications | Prata: Breve histórico, propriedades e aplicações. *Educ Quim*. 2013;24:14–6.
17. Singh J, Dutta T, Kim KH, Rawat M, Samddar P, Kumar P. “Green” synthesis of metals and their oxide nanoparticles: Applications for environmental remediation. *J Nanobiotechnology* [Internet]. BioMed Central; 2018;16:1–24. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0408-4>
18. Singh P, Kim YJ, Singh H, Wang C, Hwang KH, Farh MEA, et al. Biosynthesis, characterization, and antimicrobial applications of silver nanoparticles. *Int J Nanomedicine*. 2015;10:2567–77.
19. Tarannum N, Divya, Gautam YK. Facile green synthesis and applications of silver nanoparticles: A state-of-the-art review. *RSC Adv. Royal Society of Chemistry*; 2019;9:34926–48.
20. Sharma VK, Yngard RA, Lin Y. Silver nanoparticles : Green synthesis and their antimicrobial activities. *Adv Colloid Interface Sci* [Internet]. Elsevier B.V.; 2009;145:83–96. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cis.2008.09.002>
21. Wang H, Qiao X, Chen J, Wang X, Ding S. Mechanisms of PVP in the preparation of silver nanoparticles. *Mater Chem Phys*. 2005;94:449–53.
22. Hebbalalu D, Lalley J, Nadagouda MN, Varma RS. Greener techniques for the synthesis of silver nanoparticles using plant extracts, enzymes, bacteria, biodegradable polymers, and microwaves. *ACS Sustain Chem Eng*. 2013;1:703–12.
23. Mohapatra B, Kuriakose S, Mohapatra S. Rapid green synthesis of silver nanoparticles and nanorods using Piper nigrum extract. *J Alloys Compd* [Internet]. Elsevier B.V.; 2015;637:119–26. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jallcom.2015.02.206>
24. Mittal AK, Chisti Y, Banerjee UC. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. *Biotechnol Adv* [Internet]. Elsevier Inc.; 2013;31:346–56. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.01.003>
25. Prashant Tiwari, Bimlesh Kumar, Mandeep Kaur, Gurpreet Kaur HK. Phytochemical screening and Extraction: A Review. *Int Pharm Sci*. 2011;1:98–106.
26. S NSLMRRP. Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos. Santafé de Bogotá, D.C. C, editor. 2000.
27. Rajan R, Chandran K, Harper SL, Yun S II, Kalaichelvan PT. Plant extract synthesized silver nanoparticles: An ongoing source of novel biocompatible materials. *Ind Crops Prod* [Internet]. Elsevier B.V.; 2015;70:356–73. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.03.015>
28. Periche A, Castelló ML, Heredia A, Escriche I. Influence of Extraction Methods on the Yield of Steviol Glycosides and Antioxidants in Stevia rebaudiana Extracts. *Plant Foods Hum Nutr*. 2015;70:119–27.
29. Meléndrez MF, Medina C, Solis-Pomar F, Flores P, Paulraj M, Pérez-Tijerina E. Quality and high yield synthesis of Ag nanowires by microwave-assisted hydrothermal method. *Nanoscale Res Lett*. 2015;10:1–9.

30. Nadagouda MN, Speth TF, Varma RS. Microwave-assisted green synthesis of silver nanostructures. *Acc Chem Res.* 2011;44:469–78.
31. Pal A, Shah S, Devi S. Microwave-assisted synthesis of silver nanoparticles using ethanol as a reducing agent. *Mater Chem Phys.* 2009;114:530–2.
32. Periche A, Koutsidis G, Escriche I. Composition of Antioxidants and Amino Acids in Stevia Leaf Infusions. 2014;1–7.
33. Kou J, Bennett-Stamper C, Varma RS. Green synthesis of noble nanometals (Au, Pt, Pd) using glycerol under microwave irradiation conditions. *ACS Sustain Chem Eng.* 2013;1:810–6.
34. Hossain MF, Islam MT, Islam MA, Akhtar S. Cultivation and uses of Stevia (*Stevia Rebaudiana* Bertoni): A review. *African J Food, Agric Nutr Dev.* 2017;17:12745–57.
35. Yilmaz M, Turkdemir H, Kilic MA, Bayram E, Cicek A, Mete A, et al. Biosynthesis of silver nanoparticles using leaves of *Stevia rebaudiana*. *Mater Chem Phys [Internet]. Elsevier B.V.;* 2011;130:1195–202. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.matchemphys.2011.08.068>
36. Bujak T, Nizioł-Lukaszewska Z, Gaweł-Bęben K, Seweryn A, Kucharek M, Rybczyńska-Tkaczyk K, et al. The application of different *Stevia rebaudiana* leaf extracts in the “green synthesis” of AgNPs. *Green Chem Lett Rev.* 2015;8:78–87.
37. Roberto Fontes Vieira, Julcéia Camillo LC. Espécies Nativas da Flora Brasileira de Valor Econômico Atual ou Potencial - Plantas para o Futuro - Região Centro-Oeste. *Anacardium spp. Caju-do-cerrado.* 2016.
38. Park B, Lee K, Shibamoto T, Lee S, Takeoka GR. Antioxidant Activity and Characterization of Volatile Constituents of Taheebo (*Tabebuia impetiginosa* Martius ex DC). *J Agric Food Chem.* 2003;51:295–300.
39. Zhang L, Hasegawa I, Ohta T. Fitoterapia Anti-inflammatory cyclopentene derivatives from the inner bark of *Tabebuia avellanedae*. *Fitoterapia [Internet]. Elsevier B.V.;* 2016;109:217–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2016.01.005>
40. Antonio WCF, Victoria L dos AS, Cleonia RMA, Edigenia C da CA, Helinando P de O, Mateus M da C. Antimicrobial activity and FTIR characterization of lapachol derivatives against *Staphylococcus aureus*. *African J Microbiol Res.* 2017;11:915–9.
41. Vinai SP, Chandrashekar N CC. One-step green synthesis of silver nanoparticles using flower extract of *Tabebuia argentea* Bur . & K . Sch . and their antibacterial activity. *Res J Pharm , Biol Chem Sci.* 2018;8:527–34.
42. Brendler T, van Wyk BE. A historical, scientific and commercial perspective on the medicinal use of *Pelargonium sidoides* (Geraniaceae). *J Ethnopharmacol.* 2008;119:420–33.
43. Theisen LL, Muller CP. EPs® 7630 (Umckaloabo®), an extract from *Pelargonium sidoides* roots, exerts anti-influenza virus activity in vitro and in vivo. *Antiviral Res [Internet]. Elsevier B.V.;* 2012;94:147–56. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2012.03.006>
44. Careddu D, Pettenazzo A. *Pelargonium sidoides* extract EPs 7630: A review of its clinical efficacy and safety for treating acute respiratory tract infections in children. *Int J Gen Med.* 2018;11:91–8.

45. Mazzuco, Bruna; Bristot, Samara Felini; Dalbó, Silvia; Amaral, Patrícia de Aguiar; Citadini-Zanette, Vanilde; Rossato AE. *Pelargonium sidoides* dc. (umckaloabo): histórico do uso, aspectos taxonômicos, ecológicos, fitoquímicos, farmacológicos e toxicológicos. *Rev Tecnol e Ambient.* 2014;21.
46. Moyo M, Van Staden J. Medicinal properties and conservation of *Pelargonium sidoides* DC. *J Ethnopharmacol* [Internet]. Elsevier; 2014;152:243–55. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2014.01.009>
47. Pereira A, Bester M, Soundy P, Apostolides Z. Activity-guided isolation and identification of the major antioxidant and anticancer compounds from a commercial *Pelargonium sidoides* tincture. *Med Chem Res.* Springer US; 2015;24:3838–52.
48. Matthys H, Lehmacher W, Zimmermann A, Juliette Brandes, Kamin W. EPs 7630 in Acute Respiratory Tract Infections – A systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Clinical Trials. *J Lung, Pulm Respir Res.* 2016;3:4–15.
49. Shankar SS, Ahmad A, Sastry M. Geranium Leaf Assisted Biosynthesis of Silver Nanoparticles. *Biotechnol Prog.* 2003;19:1627–31.
50. Karatoprak GŞ, Göger F, Yerer MB, Koşar M. Chemical composition and biological investigation of *Pelargonium endlicherianum* root extracts. *Pharm Biol* [Internet]. Informa Healthcare USA, Inc; 2017;55:1608–18. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/13880209.2017.1314511>
51. Neill JO'. Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations The Review on Antimicrobial Resistance Chaired. 2014;
52. Siddiqi KS, Husen A, Rao RAK. A review on biosynthesis of silver nanoparticles and their biocidal properties. *J Nanobiotechnology* [Internet]. BioMed Central; 2018;16. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0334-5>
53. Holt KB, Bard AJ. Interaction of Silver(I) Ions with the Respiratory Chain of *Escherichia coli*: An Electrochemical and Scanning Electrochemical Microscopy Study of the Antimicrobial Mechanism of Micromolar Ag⁺. *Biochemistry.* 2005;44:13214–23.
54. Shai Y. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Biopolym - Pept Sci Sect.* 2002;66:236–48.
55. Martins, Cláudia; Ferreira, José; Ferreira, Luiz; L Siqueira, Luiz; Bazzo M luíza. Técnica de coloração de Gram. Ministério da Saúde. 1997;
56. Singh N, Rajwade J, Paknikar KM. Transcriptome analysis of silver nanoparticles treated *Staphylococcus aureus* reveals potential targets for biofilm inhibition. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* [Internet]. Elsevier; 2019;175:487–97. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.12.032>
57. Daum michael ZD and RS. Treatment of *Staphylococcus aureus* Infections. *Curr Top Microbiol Immunol* [Internet]. 2017;409:325–83. Available from: http://books.google.com/books?id=_DDwCqx6wpcC&printsec=frontcover&dq=unwritten+rules+of+phd+research&hl=&cd=1&source=gbs_api%255Cnpapers2://publication/uuid/48967E01-55F9-4397-B941-310D9C5405FA%255Cnhttp://medcontent.metapress.com/index/A65RM03P4874243N.p
58. Balasubramanian D, Harper L, Shopsin B, Torres VJ. *Staphylococcus aureus* pathogenesis in diverse host environments. *Pathog Dis.* 2017;75:1–13.

59. Blount ZD. The unexhausted potential of *E. coli*. *Elife*. 2015;4:1–12.
60. Poirel, aurent; Madec, Jean-Yves; Lupo, Agnese; Schink, Anne; Kieffer N. Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. *Microbiology Spectr*. 2018;1–27.
61. Mielko KA, Jabłoński SJ, Milczewska J, Sands D, Łukaszewicz M, Młynarz P. Metabolomic studies of *Pseudomonas aeruginosa*. *World J Microbiol Biotechnol* [Internet]. Springer Netherlands; 2019;35:1–11. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2739-1>
62. Kang C, Kim S, Kim H, Park S, Choe Y, Oh M, et al. *Pseudomonas aeruginosa* Bacteremia: Risk Factors for Mortality and Influence of Delayed Receipt of Effective Antimicrobial Therapy on Clinical Outcome . *Clin Infect Dis*. 2003;37:745–51.
63. Babich T, Naucner P, Valik JK, Giske CG, Benito N, Cardona R, et al. Ceftazidime , carbapenems , or piperacillin-tazobactam as single definitive therapy for *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection - a multi-site retrospective study Corresponding author : Dafna Yahav , Infectious Diseases Unit , Rabin Medical Center ,. 2019.
64. Echeverri LM, Catano JC. *Klebsiella pneumoniae* as nosocomial pathogens: epidemiology and resistance. *Atreia*. 2010;23:240–9.
65. Graciela M, Faria I. *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase : um problema sem solução? *Brazilian J Surg Clin Res*. 2015;9:45–48.
66. Centers for Disease Control and Prevention. CDC. Facility Guidance for Control of Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE). *Natl Cent Emerg Zoonotic Infect Dis* [Internet]. 2015;24. Available from: https://www.osha.gov/SLTC/ebola/control_prevention.html
67. Gavronski S. Investigação da resistência aos carbapenêmicos em enterobactérias isoladas em um hospital de Blumenau/SC: detec o laboratorial e aspectos epidemiol gicos. *Hilos Tensados*. 2019.
68. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54:969–76.
69. Hanna Pereira G, Garcia DO, Mostardeiro M, Fanti KSVN, Levin AS. Outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: Two-year epidemiologic follow-up in a tertiary hospital. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2013;108:113–5.
70. David S, Reuter S, Harris SR, Glasner C, Feltwell T, Argimon S, et al. Epidemic of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Europe is driven by nosocomial spread. *Nat Microbiol*. 2019;4:1919–29.
71. Arnold RS, Thom KA, Sharma S, Phillips M, Kristie Johnson J, Morgan DJ. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *South Med J*. 2011;104:40–5.
72. Mendes CAC, Burdmann EA. Polimixinas: revisão com ênfase na sua nefrotoxicidade. *Rev Assoc Med Bras*. 2009;55:752–9.
73. Mattos KPH, Gouvêa IR, Quintanilha JCF, Cursino MA, Vasconcelos PENS, Moriel P. Polymyxin B clinical outcomes: A prospective study of patients undergoing intravenous treatment. *J Clin Pharm Ther*. 2019;44:415–9.

74. Ministério da Saúde-MS. Plano de ação nacional de prevenção e controle da resistência aos antimicrobianos no âmbito da Saúde Única. Diário da República, 1ª série — N° 96 18 maio 2018 [Internet]. :2211–2. Available from: <https://data.dre.pt/eli/port/141/2018/05/18/p/dre/pt/htm>
75. Pulit-Prociak J, Stokłosa K, Banach M. Nanosilver products and toxicity. *Environ Chem Lett*. 2014;13:59–68.
76. Asharani P V, Wu YL, Gong Z. Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models. *Nanotechnology*. 2008;19.
77. Abramenko NB, Demidova TB, Abkhalimov E V, Ershov BG, Yu E, Kustov LM. Ecotoxicity of different-shaped silver nanoparticles: Case of zebrafish embryos. *J Hazard Mater*. 2018;347:89–94.
78. D'Costa A, Shepherd IT. Zebrafish development and genetics: Introducing undergraduates to developmental biology and genetics in a large introductory laboratory class. *Zebrafish*. 2009;6:169–77.
79. Guidelines O, The FOR, Of T. *Oecd guidelines for the testing of chemicals*. 2013;1–22.
80. Cáceres-Vélez PR, Fascineli ML, Sousa MH, Grisolia CK, Yate L, de Souza PEN, et al. Humic acid attenuation of silver nanoparticle toxicity by ion complexation and the formation of a Ag³⁺ coating. *J Hazard Mater* [Internet]. Elsevier; 2018;353:173–81. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.04.019>
81. Ministério da Saúde-MS AN de VS-A. *Farmacopeia Brasileira*, 6ª edição. Farm Bras 6ª edição. 2019;1:60–9, 72–85.
82. Mota B de FO. Avaliação de diferentes processos extrativos utilizando Ipê Roxo (*Handroanthus impetiginosus*) (Mart. ex DC.) Mattos como droga vegetal. 2018.
83. Matos FJ de A. *Dados do Livro*. Ed. Fortaleza. 1997.
84. Vernon L. Singleton; Rudolf Ortopher; Lamuela-ravents RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteaus reagent. 1999. p. 152–78.
85. Malina D, Sobczak-kupiec A, Wzorek Z, Kowalski Z. Silver nanoparticles synthesis with different concentrations of polyvinylypyrrolidone. *Dig J Nanomater Biostructures*. 2012;7:1527–34.
86. Patel J.B., Cockerill R.F., Bradford A.P., Eliopoulos M.G., Hindler A.J., Jenkins G.S., Lewis S.J., Limbago B., Miller A.L., Nicolau P.D., Pwell M., Swenson M.J., Traczewski M.M., Turnidge J.D. WPMZLB. M07-A10: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard. CLSI (Clinical Lab Stand Institute). 2015;
87. Yilmaz M, Turkdemir H, Kilic MA, Bayram E, Cicek A, Mete A, et al. Biosynthesis of silver nanoparticles using leaves of *Stevia rebaudiana*. *Mater Chem Phys* [Internet]. Elsevier B.V.; 2011;130:1195–202. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.matchemphys.2011.08.068>
88. Wang H, Qiao X, Chen J, Wang X, Ding S. Mechanisms of PVP in the preparation of silver nanoparticles. 2005;94:449–53.

89. Martins PM, Thorat BN, Lanchote AD, Freitas LAP. Green extraction of glycosides from *Stevia rebaudiana* (Bert.) with low solvent consumption: A desirability approach. *Resour Technol* [Internet]. Elsevier B.V.; 2016;2:247–53. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2405653716301671>
90. Gasmalla MAA, Yang R, Musa A, Hua X, Ye F. Influence of sonication process parameters to the state of liquid concentration of extracted rebaudioside A from *Stevia rebaudiana bertonii* leaves. *Arab J Chem* [Internet]. King Saud University; 2017;10:726–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.06.012>
91. Liu J, Li Jwei, Tang J. Ultrasonically assisted extraction of total carbohydrates from *Stevia rebaudiana* Bertoni and identification of extracts. *Food Bioprod Process* [Internet]. Institution of Chemical Engineers; 2010;88:215–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2009.12.005>
92. Geoffroy TR, Fortin Y, Stevanovic T. Hot-water extraction optimization of sugar maple (*Acer saccharum* Marsh.) and red maple (*Acer rubrum* L.) bark applying principal component analysis. *J Wood Chem Technol* [Internet]. Taylor & Francis; 2017;0:1–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/02773813.2017.1279631>
93. Oliveira VB, Zuchetto M, Oliveira CF, Paula CS, Duarte AFS, Miguel MD, et al. Efeito de diferentes técnicas extrativas no rendimento, atividade antioxidante, doseamentos totais e no perfil por cladeada de *Dicksonia sellowiana* (Presl.). Hook, dicksoniaceae. *Rev Bras Plantas Med.* 2016;18:230–9.
94. Şeker Karatoprak G, Aydin G, Altinsoy B, Altinkaynak C, Koşar M, Ocsoy I. The Effect of *Pelargonium endlicherianum* Fenzl. root extracts on formation of nanoparticles and their antimicrobial activities. *Enzyme Microb Technol.* 2017;97:21–6.
95. R. E. Bruns, I. S. Scarmino, B. de Barros Neto. *Statistical Design - Chemometrics*. Elsevier; 2006.
96. Vellaichamy B, Periakaruppan P. Silver nanoparticle-embedded RGO-nanosponge for superior catalytic activity towards 4-nitrophenol reduction. *RSC Adv.* 2016;6:88837–45.
97. Candido ACL, da Silva MPG, da Silva EG, de Abreu FC. Electrochemical and spectroscopic characterization of the interaction between β -lapachone and PAMAM derivatives immobilized on surface electrodes. *J Solid State Electrochem. Journal of Solid State Electrochemistry*; 2018;22:1581–90.
98. Silva MPG da, Oliveira YM de, Candido ACL, Araújo-Júnior JX de, Rodrigues ÉE da S, Monteiro KLC, et al. Electrochemical Evaluation of Aminoguanidine Hydrazone Derivative with Potential Anticancer Activity: Studies of Glassy Carbon/CNT and Gold Electrodes Both Modified with PAMAM. *J Biomater Nanobiotechnol.* 2020;11:33–48.
99. Zborowska M, Stachowiak-Wencek A, Waliszewska WPA. Colorimetric and FTIR spectroscopy studies of degradative effects of ultraviolet light on the surface of exotic ipe (*Tabebuia* sp.) wood. *Cellul Chem Technol Color.* 2016;50:71–6.
100. Kumar A, Dixit CK. Methods for characterization of nanoparticles. *Adv Nanomedicine Deliv Ther Nucleic Acids.* 2017;44–58.
101. Huynh KA, Chen KL. Aggregation kinetics of citrate and polyvinylpyrrolidone coated silver nanoparticles in monovalent and divalent electrolyte solutions. *Environ Sci Technol.* 2011;45:5564–71.

102. Goia D V., Matijević E. Preparation of monodispersed metal particles. *New J Chem.* 1998;22:1203–15.
103. Das G, Patra JK, Debnath T, Ansari A, Shin HS. Investigation of antioxidant, antibacterial, antidiabetic, and cytotoxicity potential of silver nanoparticles synthesized using the outer peel extract of *Ananas comosus* (L.). *PLoS One.* 2019;14:1–20.
104. Kim JS, Kuk E, Yu KN, Kim JH, Park SJ, Lee HJ, et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med.* 2007;3:95–101.
105. K p F ,  o kun ay S, Duman F. Biosynthesis of silver nanoparticles using leaf extract of *Aesculus hippocastanum* (horse chestnut): Evaluation of their antibacterial, antioxidant and drug release system activities. *Mater Sci Eng C [Internet]. Elsevier B.V.;* 2020;107:110207. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110207>
106. Gogoi N, Babu PJ, Mahanta C, Bora U. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using alcoholic flower extract of *Nyctanthes arbortristis* and in vitro investigation of their antibacterial and cytotoxic activities. *Mater Sci Eng C [Internet]. Elsevier B.V.;* 2015;46:463–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2014.10.069>
107. Pereira TM, Polez VLP, Sousa MH, Silva LP. Modulating physical, chemical, and biological properties of silver nanoparticles obtained by green synthesis using different parts of the tree *Handroanthus heptaphyllus* (Vell.) Mattos. *Colloids Interface Sci Commun [Internet]. Elsevier;* 2020;34:100224. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.colcom.2019.100224>
108. Bindhu MR, Umadevi M, Esmail GA, Al-Dhabi NA, Arasu MV. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles from *Moringa oleifera* flower and assessment of antimicrobial and sensing properties. *J Photochem Photobiol B Biol [Internet]. Elsevier B.V.;* 2020;205. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111836>
109. De Paula CC, De Oliveira Martins DT, Arunachalam K, Balogun SO, Borges QI, Picone MG, et al. Antimicrobial screening of medicinal plants popularly used in Mato Grosso for treating infections: Advances on the evaluation of *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist in vitro and in vivo antibacterial activities. *Pharmacogn J.* 2018;10:S152–66.
110. Dipankar C, Murugan S. The green synthesis, characterization and evaluation of the biological activities of silver nanoparticles synthesized from *Iresine herbstii* leaf aqueous extracts. *Colloids Surfaces B Biointerfaces [Internet]. Elsevier B.V.;* 2012;98:112–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.04.006>
111. Sondi I, Salopek-Sondi B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: A case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *J Colloid Interface Sci.* 2004;275:177–82.
112. Parvataneni R. Biogenic synthesis and characterization of silver nanoparticles using aqueous leaf extract of *Scoparia dulcis* L. and assessment of their antimicrobial property. *Drug Chem Toxicol [Internet]. Taylor & Francis;* 2019;43:307–21. Available from: <https://doi.org/10.1080/01480545.2018.1505903>
113. Yun'an Qing LC, Li R, Liu G, Zhang Y, Tang X, Wang J, et al. Potential antibacterial mechanism of silver nanoparticles and the optimization of orthopedic implants by advanced modification technologies. *Int J Nanomedicine.* 2018;13:3311–27.

114. Monteiro DR, Gorup LF, Takamiya AS, de Camargo ER, Filho ACR, Barbosa DB. Silver Distribution and Release from an Antimicrobial Denture Base Resin Containing Silver Colloidal Nanoparticles. *J Prosthodont*. 2012;21:7–15.
115. Liao C, Li Y, Tjong SC. Bactericidal and cytotoxic properties of silver nanoparticles. *Int J Mol Sci*. 2019;20.
116. Durán N, Durán M, de Jesus MB, Seabra AB, Fávaro WJ, Nakazato G. Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med* [Internet]. Elsevier Inc.; 2016;12:789–99. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2015.11.016>
117. Hameed E. Phytochemical Studies and Evaluation of Antioxidant, Anticancer and Antimicrobial Properties of *Conocarpus erectus* L. Growing in Taif, Saudi Arabia. *European J Med Plants*. 2012;2:93–112.
118. Félix FM. Elaboração de nanopartículas de prata empregando extrato de pelargoniumsidoide: síntese, caracterização e avaliação da atividade antimicrobiana. Trabalho de Conclusão de Curso, FCE/UnB, 2019.
119. Jekabsone A, Sile I, Cochis A, Makrecka-Kuka M, Laucaityte G, Makarova E, et al. Investigation of antibacterial and antiinflammatory activities of proanthocyanidins from pelargonium sidoides dc root extract. *Nutrients*. 2019;11.
120. Borges A, Ferreira C, Saavedra MJ, Simões M. Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria. *Microb Drug Resist*. 2013;19:256–65.
121. Şeker Karatoprak G, Aydın G, Altinsoy B, Altinkaynak C, Koşar M, Ocsoy I. The Effect of Pelargonium endlicherianum Fenzl. root extracts on formation of nanoparticles and their antimicrobial activities. *Enzyme Microb Technol* [Internet]. Elsevier Inc.; 2017;97:21–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2016.10.019>
122. Mathur P, Jha S, Ramteke S, Jain NK. Pharmaceutical aspects of silver nanoparticles. *Artif Cells, Nanomedicine Biotechnol* [Internet]. Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group; 2018;46:115–26. Available from: <https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1414825>
123. Conrad A, Jung I, Tioua D, Lallemand C, Carrapatoso F, Engels I, et al. Extract of Pelargonium sidoides (EPs®7630) inhibits the interactions of group A-streptococci and host epithelia in vitro. *Phytomedicine*. 2007;14:52–9.
124. Janecki A, Conrad A, Engels I, Frank U, Kolodziej H. Evaluation of an aqueous-ethanolic extract from Pelargonium sidoides (EPs 7630) for its activity against group A-streptococci adhesion to human HEp-2 epithelial cells. *J Ethnopharmacol* [Internet]. Elsevier Ireland Ltd; 2011;133:147–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2010.09.018>
125. Kolodziej H. Aqueous ethanolic extract of the roots of Pelargonium sidoides - New scientific evidence for an old anti-infective phytopharmaceutical. *Planta Med*. 2008;74:661–6.
126. Souza RC de, Dabul ANG, Boralli CM dos S, Zuvanov L, Camargo ILB da C. Dissemination of blaKPC-2 in an NTEKPC by an IncX5 plasmid. *Plasmid* [Internet]. Elsevier Inc; 2019;106:102446. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2019.102446>

127. N. Aligiannis; E. Kalpoutzakis; Sofia Mitaku; Ioanna B. Chinou. Composition and Antimicrobial Activity of two *Origanum* species. *J Agric Food Chem.* 2001;49:4168–41770.
128. Ramos-Castañeda JA, Ruano-Ravina A, Barbosa-Lorenzo R, Paillier-Gonzalez JE, Saldaña-Campos JC, Salinas DF, et al. Mortality due to KPC carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* infections: Systematic review and meta-analysis: Mortality due to KPC *Klebsiella pneumoniae* infections. *J Infect [Internet]. Elsevier Ltd;* 2018;76:438–48. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2018.02.007>
129. Zhang W, Ke S, Sun C, Xu X, Chen J, Yao L. Fate and toxicity of silver nanoparticles in freshwater from laboratory to realistic environments: a review. *Environ Sci Pollut Res. Environmental Science and Pollution Research;* 2019;26:7390–404.
130. McGillicuddy E, Murray I, Kavanagh S, Morrison L, Fogarty A, Cormican M, et al. Silver nanoparticles in the environment: Sources, detection and ecotoxicology. *Sci Total Environ [Internet]. Elsevier B.V.;* 2017;575:231–46. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.10.041>

ANEXOS

CEUA


Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 08 de agosto de 2018.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado **"ESTUDO TERMODINÂMICO DA DISSOLUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA OBTIDAS POR MEIO DE SÍNTESES ASSISTIDAS POR MICRO-ONDAS E AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA EM PEIXES ZEBRAFISH."** Protocolo n.º 56/2018, sob responsabilidade do Professor Marcelo Henrique Sousa foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de: *Danio rerio* (48 adultos e 1296 embriões). A presente aprovação é válida pelo período de: 01/08/2018 a 01/12/2021.




Prof. Dr. Cássio José da Silva
Coordenador da CEUA – UnB



*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.

Cálculo de CL50 - AgNP(Quim)

| | Probabilidade | Limites de confiança de 95% para concentração | | | Limites de confiança de 95% para log(concentração) ^a | | |
|--------|---------------|--|-----------------|-----------------|--|-----------------|-----------------|
| | | Estimativa | Limite inferior | Limite superior | Estimativa | Limite inferior | Limite superior |
| PROBIT | 0,01 | 0,372 | 0,117 | 0,693 | -0,429 | -0,931 | -0,159 |
| | 0,02 | 0,481 | 0,17 | 0,847 | -0,318 | -0,77 | -0,072 |
| | 0,03 | 0,565 | 0,215 | 0,963 | -0,248 | -0,668 | -0,016 |
| | 0,04 | 0,638 | 0,256 | 1,061 | -0,195 | -0,592 | 0,026 |
| | 0,05 | 0,705 | 0,295 | 1,149 | -0,152 | -0,53 | 0,06 |
| | 0,06 | 0,767 | 0,333 | 1,23 | -0,115 | -0,477 | 0,09 |
| | 0,07 | 0,826 | 0,37 | 1,306 | -0,083 | -0,432 | 0,116 |
| | 0,08 | 0,882 | 0,407 | 1,379 | -0,054 | -0,391 | 0,14 |
| | 0,09 | 0,937 | 0,443 | 1,449 | -0,028 | -0,354 | 0,161 |
| | 0,1 | 0,99 | 0,479 | 1,517 | -0,004 | -0,32 | 0,181 |
| | 0,15 | 1,246 | 0,661 | 1,84 | 0,095 | -0,18 | 0,265 |
| | 0,2 | 1,495 | 0,849 | 2,154 | 0,175 | -0,071 | 0,333 |
| | 0,25 | 1,748 | 1,048 | 2,478 | 0,243 | 0,02 | 0,394 |
| | 0,3 | 2,011 | 1,261 | 2,821 | 0,304 | 0,101 | 0,45 |
| | 0,35 | 2,291 | 1,49 | 3,196 | 0,36 | 0,173 | 0,505 |
| | 0,4 | 2,592 | 1,737 | 3,615 | 0,414 | 0,24 | 0,558 |
| | 0,45 | 2,922 | 2,006 | 4,093 | 0,466 | 0,302 | 0,612 |
| | 0,5 | 3,286 | 2,299 | 4,648 | 0,517 | 0,362 | 0,667 |
| | 0,55 | 3,696 | 2,621 | 5,306 | 0,568 | 0,419 | 0,725 |
| | 0,6 | 4,166 | 2,979 | 6,104 | 0,62 | 0,474 | 0,786 |
| | 0,65 | 4,713 | 3,381 | 7,092 | 0,673 | 0,529 | 0,851 |
| | 0,7 | 5,369 | 3,844 | 8,352 | 0,73 | 0,585 | 0,922 |
| | 0,75 | 6,179 | 4,39 | 10,019 | 0,791 | 0,642 | 1,001 |
| | 0,8 | 7,225 | 5,062 | 12,336 | 0,859 | 0,704 | 1,091 |
| | 0,85 | 8,67 | 5,943 | 15,812 | 0,938 | 0,774 | 1,199 |
| | 0,9 | 10,906 | 7,223 | 21,754 | 1,038 | 0,859 | 1,338 |
| | 0,91 | 11,528 | 7,565 | 23,516 | 1,062 | 0,879 | 1,371 |
| | 0,92 | 12,243 | 7,952 | 25,602 | 1,088 | 0,9 | 1,408 |
| | 0,93 | 13,081 | 8,398 | 28,119 | 1,117 | 0,924 | 1,449 |
| | 0,94 | 14,085 | 8,923 | 31,235 | 1,149 | 0,95 | 1,495 |
| | 0,95 | 15,324 | 9,556 | 35,229 | 1,185 | 0,98 | 1,547 |
| | 0,96 | 16,919 | 10,353 | 40,601 | 1,228 | 1,015 | 1,609 |
| | 0,97 | 19,111 | 11,416 | 48,375 | 1,281 | 1,057 | 1,685 |
| | 0,98 | 22,469 | 12,986 | 61,12 | 1,352 | 1,113 | 1,786 |
| | 0,99 | 29 | 15,882 | 88,525 | 1,462 | 1,201 | 1,947 |

a: Base de logaritmo = 10

Cálculo de CL50 - AgNP(Ipê)

| | | CL50= 859,804 mg/L | | | Não foi possível calcular o intervalo de confiança. | | |
|---------------|------------|---|-----------------|-----------------|---|-----------------|-----------------|
| Probabilidade | | Limites de confiança de 95% para concentração | | | Limites de confiança de 95% para log(concentração) ^b | | |
| | | Estimativa | Limite inferior | Limite superior | Estimativa | Limite inferior | Limite superior |
| PROBIT | 0,01 | 255,73 | . | . | 2,408 | . | . |
| | 0,02 | 294,774 | . | . | 2,469 | . | . |
| | 0,03 | 322,583 | . | . | 2,509 | . | . |
| | 0,04 | 345,219 | . | . | 2,538 | . | . |
| | 0,05 | 364,797 | . | . | 2,562 | . | . |
| | 0,06 | 382,334 | . | . | 2,582 | . | . |
| | 0,07 | 398,403 | . | . | 2,6 | . | . |
| | 0,08 | 413,363 | . | . | 2,616 | . | . |
| | 0,09 | 427,456 | . | . | 2,631 | . | . |
| | 0,1 | 440,852 | . | . | 2,644 | . | . |
| | 0,15 | 500,934 | . | . | 2,7 | . | . |
| | 0,2 | 554,473 | . | . | 2,744 | . | . |
| | 0,25 | 604,943 | . | . | 2,782 | . | . |
| | 0,3 | 654,169 | . | . | 2,816 | . | . |
| | 0,35 | 703,354 | . | . | 2,847 | . | . |
| | 0,4 | 753,44 | . | . | 2,877 | . | . |
| | 0,45 | 805,292 | . | . | 2,906 | . | . |
| | 0,5 | 859,804 | . | . | 2,934 | . | . |
| | 0,55 | 918,006 | . | . | 2,963 | . | . |
| | 0,6 | 981,183 | . | . | 2,992 | . | . |
| | 0,65 | 1051,054 | . | . | 3,022 | . | . |
| | 0,7 | 1130,079 | . | . | 3,053 | . | . |
| | 0,75 | 1222,038 | . | . | 3,087 | . | . |
| | 0,8 | 1333,271 | . | . | 3,125 | . | . |
| | 0,85 | 1475,769 | . | . | 3,169 | . | . |
| | 0,9 | 1676,895 | . | . | 3,225 | . | . |
| | 0,91 | 1729,45 | . | . | 3,238 | . | . |
| | 0,92 | 1788,411 | . | . | 3,252 | . | . |
| | 0,93 | 1855,565 | . | . | 3,268 | . | . |
| | 0,94 | 1933,551 | . | . | 3,286 | . | . |
| 0,95 | 2026,502 | . | . | 3,307 | . | . | |
| 0,96 | 2141,433 | . | . | 3,331 | . | . | |
| 0,97 | 2291,697 | . | . | 3,36 | . | . | |
| 0,98 | 2507,895 | . | . | 3,399 | . | . | |
| 0,99 | 2890,799 | . | . | 3,461 | . | . | |

a: É usado um fator de heterogeneidade.

b: Base de logaritmo = 10.

Cálculo de CL50 - AgNP(Pel)

| | | CL50= | 528,587 mg/L | | intervalo de confiança | (442,1-610,142) | |
|--------|---------------|---|-----------------|-----------------|---|-----------------|-----------------|
| | Probabilidade | Limites de confiança de 95% para concentração | | | Limites de confiança de 95% para log(concentração) ^a | | |
| | | Estimativa | Limite inferior | Limite superior | Estimativa | Limite inferior | Limite superior |
| PROBIT | 0,01 | 219,398 | 111,181 | 297,253 | 2,341 | 2,046 | 2,473 |
| | 0,02 | 243,21 | 131,752 | 320,805 | 2,386 | 2,12 | 2,506 |
| | 0,03 | 259,64 | 146,687 | 336,819 | 2,414 | 2,166 | 2,527 |
| | 0,04 | 272,728 | 158,993 | 349,466 | 2,436 | 2,201 | 2,543 |
| | 0,05 | 283,86 | 169,733 | 360,161 | 2,453 | 2,23 | 2,556 |
| | 0,06 | 293,691 | 179,421 | 369,57 | 2,468 | 2,254 | 2,568 |
| | 0,07 | 302,591 | 188,348 | 378,065 | 2,481 | 2,275 | 2,578 |
| | 0,08 | 310,789 | 196,697 | 385,874 | 2,492 | 2,294 | 2,586 |
| | 0,09 | 318,437 | 204,594 | 393,152 | 2,503 | 2,311 | 2,595 |
| | 0,1 | 325,643 | 212,124 | 400,005 | 2,513 | 2,327 | 2,602 |
| | 0,15 | 357,256 | 246,117 | 430,118 | 2,553 | 2,391 | 2,634 |
| | 0,2 | 384,556 | 276,55 | 456,363 | 2,585 | 2,442 | 2,659 |
| | 0,25 | 409,633 | 305,177 | 480,881 | 2,612 | 2,485 | 2,682 |
| | 0,3 | 433,544 | 332,868 | 504,83 | 2,637 | 2,522 | 2,703 |
| | 0,35 | 456,945 | 360,128 | 529,018 | 2,66 | 2,556 | 2,723 |
| | 0,4 | 480,317 | 387,283 | 554,148 | 2,682 | 2,588 | 2,744 |
| | 0,45 | 504,067 | 414,553 | 580,925 | 2,702 | 2,618 | 2,764 |
| | 0,5 | 528,587 | 442,1 | 610,142 | 2,723 | 2,646 | 2,785 |
| | 0,55 | 554,3 | 470,069 | 642,75 | 2,744 | 2,672 | 2,808 |
| | 0,6 | 581,708 | 498,632 | 679,937 | 2,765 | 2,698 | 2,832 |
| | 0,65 | 611,462 | 528,06 | 723,256 | 2,786 | 2,723 | 2,859 |
| | 0,7 | 644,466 | 558,812 | 774,856 | 2,809 | 2,747 | 2,889 |
| | 0,75 | 682,085 | 591,684 | 837,959 | 2,834 | 2,772 | 2,923 |
| | 0,8 | 726,564 | 628,073 | 917,928 | 2,861 | 2,798 | 2,963 |
| | 0,85 | 782,085 | 670,595 | 1024,976 | 2,893 | 2,826 | 3,011 |
| | 0,9 | 858,008 | 725,006 | 1182,783 | 2,933 | 2,86 | 3,073 |
| | 0,91 | 877,425 | 738,392 | 1225,078 | 2,943 | 2,868 | 3,088 |
| | 0,92 | 899,017 | 753,068 | 1272,99 | 2,954 | 2,877 | 3,105 |
| | 0,93 | 923,373 | 769,382 | 1328,115 | 2,965 | 2,886 | 3,123 |
| | 0,94 | 951,355 | 787,837 | 1392,828 | 2,978 | 2,896 | 3,144 |
| | 0,95 | 984,305 | 809,216 | 1470,874 | 2,993 | 2,908 | 3,168 |
| | 0,96 | 1024,478 | 834,82 | 1568,656 | 3,011 | 2,922 | 3,196 |
| | 0,97 | 1076,12 | 867,075 | 1698,473 | 3,032 | 2,938 | 3,23 |
| | 0,98 | 1148,821 | 911,398 | 1888,843 | 3,06 | 2,96 | 3,276 |
| | 0,99 | 1273,507 | 984,952 | 2235,281 | 3,105 | 2,993 | 3,349 |

a: Base de logaritmo = 10

Cite this: *RSC Adv.*, 2020, 10, 20676

Evaluation of the antimicrobial activity of silver nanoparticles obtained by microwave-assisted green synthesis using *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC.) Mattos underbark extract†

Renata Pascoal Illanes Tormena,^a Eliane Vieira Rosa,^{ab} Bruna de Fátima Oliveira Mota,^c Juliano Alexandre Chaker,^a Christopher William Fagg,^d Daniel Oliveira Freire,^e Paula Melo Martins,^c Izabel Cristina Rodrigues da Silva^d and Marcelo Henrique Sousa^{ia}

We describe here a green method for the preparation of silver nanoparticles (AgNPs), by a microwave-assisted synthesis route using *Handroanthus impetiginosus* underbark extract, with antibacterial activity. After optimizing the synthesis parameters with a Box–Behnken designed experiment, samples were characterized by powder XRD, TEM, UV-Vis spectroscopy, FTIR and zetametry. Using the overall optimized conditions of synthesis – time of reaction 15 min at 200 °C and plant extract/AgNO₃ volume ratio equal to 10% – highly crystalline ~13.4 nm-sized spherical AgNPs in a well-dispersed colloidal state were obtained. It was also proved that the plant extract compounds act as reductant and capping agents during synthesis to functionalize AgNPs, resulting in a negatively charged surface with high values of zeta potential in a wide range of pH, from acidic to alkaline media. Biological activity tests against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* and cell viability experiments showed that synthesized AgNPs were not toxic to HaCaT mammalian cells and presented a high efficiency against Gram-positive bacteria (*S. aureus*). This was associated with the synergistic combination of AgNP silver cores with the capping layer containing natural compounds with antimicrobial properties and considered an alternative to the AgNPs commonly obtained from conventional routes that present antibacterial effectiveness preferentially against Gram-negative strains.

Received 10th April 2020
Accepted 18th May 2020

DOI: 10.1039/d0ra03240a

rsc.li/rsc-advances