

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

KAROLINE DE BRITTO ROCILDES ABREU

SÍNTESE E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE
NANOPARTÍCULAS METÁLICAS E BIMETÁLICAS A PARTIR DE
PLANTAS DO GÊNERO *CUCURBITA*

BRASÍLIA

2022

KAROLINE DE BRITTO ROCILDES ABREU

SÍNTESE E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE
NANOPARTÍCULAS METÁLICAS E BIMETÁLICAS A PARTIR DE
PLANTAS DO GÊNERO *CUCURBITA*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Paulino da Silva

Brasília

2022

FOLHA DE APROVAÇÃO

Karoline de Britto Rocildes Abreu

SÍNTESE E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS E BIMETÁLICAS A PARTIR DE PLANTAS DO GÊNERO *CUCURBITA*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 16 de Dezembro de 2022

Banca Examinadora:

Presidente: Prof. Dr. Luciano Paulino da Silva – Embrapa

Membro 1: Prof. Dra. Vera Lúcia Perussi Polez – Embrapa

Membro 2: Prof. Dra. Maria de Fátima Borin – Universidade de Brasília

Suplente: Prof. Dra. Claire Nain Lunardi Gomes – Universidade de Brasília

“Per aspera ad astra”

Agradecimentos

À minha família pelo apoio incondicional. Em especial aos meus pais, Elaine e Marcos, pelo incentivo incessante e por fazerem dos meus sonhos os de vocês também. Sem vocês eu com certeza não chegaria até aqui. À minha irmã, Fernanda Abreu, pela paciência nos momentos difíceis e por todo companheirismo.

À minha avó Edna e ao meu avô Everaldo por sempre se interessarem e perguntarem sobre o trabalho com todo amor e atenção.

Às minhas amigas de longa data Amanda de Castro, Fernanda Vieira, Letícia Correa e Letícia Lucena por todos os momentos leves e palavras de apoio e incentivo durante esse período.

À Cinthia Bonatto pelo apoio durante toda essa jornada. Pelas conversas, risadas, palavras de conforto e por toda ajuda.

Aos meus amigos de trabalho Bárbara, Grazielle, Laurien, Mateus, Rafaella e Suelen por toda a paciência e compreensão.

Aos meus colegas do Laboratório LNANO em especial a Beatriz, Gabriela, Lúcio, Thalita, Tatiane e Victoria pelas conversas, discussões, palavras de apoio e cafezinhos diários.

Aos meus amigos Isabela, Jean e Mari por sempre, mesmo que distantes, torcerem por mim e me apoiarem nos momentos mais difíceis.

Um agradecimento especial ao Prof. Dr. Luciano Paulino da Silva por todos os ensinamentos, palavras, apoio, paciência e incentivo durante toda essa jornada.

À Universidade de Brasília pelo ensino e espaço físico.

À EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, principalmente ao Laboratório de Nanobiotecnologia, por toda infraestrutura e apoio para a realização deste trabalho.

Às agências de fomento CAPES, CNPq e FAP-DF.

Dedico este trabalho ao meu avô José Haroldo
(*in memoriam*) com muito amor e saudade.

Resumo

Nanopartículas metálicas (NPMs) vêm sendo estudadas como uma opção aos agentes antibacterianos convencionais. Para a obtenção de NPMs por métodos *bottom-up* comumente são utilizados sais metálicos precursores de íons prata e cobre. Diversos estudos têm associado esses metais em nanopartículas bimetálicas (NPBMs) com o objetivo de unir vantagens e obter possíveis efeitos sinérgicos contra bactérias. O presente estudo teve como objetivo sintetizar quatro tipos de NPMs sendo elas: nanopartículas de cobre (CuNPs), nanopartículas de prata (AgNPs) e dois tipos de NPBMs: AgCuNPs e CuAgNPs a partir de extrato aquoso de acesso de planta do gênero *Cucurbita*. Para as reações de síntese das NPMs foi preparado extrato aquoso na concentração de 20 mg/mL, para as soluções de sais metálicos foram utilizados o nitrato de prata (AgNO_3) e sulfato de cobre (CuSO_4) ambos a 1 mM. Nas reações de síntese das NPBMs foram utilizados os produtos das reações de síntese das NPMs com ajustes de volume. Para a caracterização das NPMs foram realizadas as medições de diâmetros hidrodinâmicos (HD), potenciais Zeta (PZ) e índices de polidispersividade (PdI). Foi realizado um ensaio de concentração inibitória mínima (CIM) contra cepas bacterianas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Durante as reações de síntese de AgNPs, AgCuNP e CuAgNPs observou-se visualmente uma mudança na coloração que indica a formação de NPMs. Já durante a reação de síntese de CuNPs não houve mudança de coloração. O DH das NPMs foi na faixa compreendida entre 104 e 357 nm; PdI entre 0,245 e 0,515; e PZ entre -21 e -27 mV, o que evidencia variações nas características entre as NPMs, mas que em geral foram nanométricas; levemente a moderadamente polidispersas; e com baixa a moderada estabilidade coloidal. As NPBMs apresentaram melhores resultados com relação ao ensaio de CIM a 256 μM e 128 μM contra *E. coli* e em *S. aureus*, em relação às demais NPMs. Conclui-se então que as NPBMs apresentam uma atividade antimicrobiana mais pronunciada do que as nanopartículas monometálicas avaliadas, sugerindo um efeito sinérgico dos metais.

Palavra-chave: Síntese verde; nanotecnologia; nanopartículas bimetálicas; *Cucurbita*

Abstract

Metallic nanoparticles (NPMs) have been studied as an alternative to conventional antibacterial agents. To obtain NPMs by bottom-up methods, precursor metallic salts of silver and copper ions are commonly used. Several studies have associated these metals in bimetallic nanoparticles (NPBMs) in order to combine advantages and obtain possible synergistic effects against bacteria. The present study aimed to synthesize four types of NPMs: copper nanoparticles (CuNPs), silver nanoparticles (AgNPs) and two types of NPBMs: AgCuNPs and CuAgNPs from aqueous extract of plant accession of the genus *Cucurbita*. For the synthesis reactions of NPMs, an aqueous extract was prepared at a concentration of 20 mg/mL, for metallic salt solutions, silver nitrate (AgNO₃) and copper sulfate (CuSO₄) both at 1 mM were used. In the synthesis reactions of NPBMs, the products of the synthesis reactions of NPMs with volume adjustments were used. For the characterization of NPMs, measurements of hydrodynamic diameters (HD), Zeta potentials (PZ), and polydispersity indexes (PdI) were performed. A minimum inhibitory concentration (MIC) assay was performed against bacterial strains of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. During the synthesis reactions of AgNPs, AgCuNP and CuAgNPs, a change in color was visually observed, indicating the formation of NPMs. However, during the synthesis reaction of CuNPs, there was no change in color. The DH of the NPMs was in the range between 104 and 357 nm; PdI between 0.245 and 0.515; and PZ between -21 and -27 mV, which shows variations in the characteristics between the NPMs, but which were generally nanometric; slightly to moderately polydispersed; and with low to moderate colloidal stability. The NPBMs showed better results in relation to the MIC assay at 256 µM and 128 µM against *E. coli* and in *S. aureus*, in relation to the other NPMs. It is then concluded that the NPBMs present a more pronounced antimicrobial activity than the evaluated monometallic nanoparticles, suggesting a synergistic effect of the metals.

Keywords: Green synthesis; nanotechnology; bimetallic nanoparticles; *Cucurbita*.

Lista de Figuras

- Figura 1:** Esquema representativo da biorredução para formação de nanopartículas metálicas, em que compostos orgânicos presentes em extratos de plantas atuam reduzindo sais metálicos e formando nanopartículas metálicas (NPMs) como produto do processo..... 22
- Figura 2:** Esquema representativo de parte da metodologia. Primeiro, foi feito um decocto (2) com a planta do gênero Cucurbita (1). O produto da decocção foi filtrado (3) e adicionado a uma solução iônica de AgNO_3 para as duas AgNPs sendo uma delas foi utilizada para em seguida formar Cu@AgNP ; e CuSO_4 para as duas CuNPs sendo que em seguida uma delas foi utilizada em seguida para formar Ag@CuNP (4). As soluções foram colocadas em banho-maria (5) e a síntese foi monitorada por leitora de microplaca (6). Após as reações de síntese, as NPMs foram caracterizadas no DLS (7) com relação ao seu diâmetro hidrodinâmico (DH), índice de polidispersividade (PdI) e potencial Zeta (PZ). Ainda foram obtidas imagens em microscopia de força atômica (8) e analisadas com relação à atividade biológica por meios de ensaio de concentração inibitória mínima (9)..... 30
- Figura 3:** Cinética de formação de nanopartículas de prata (AgNPs) obtidas por síntese verde a partir do extrato aquoso de plantas do acesso Cucurbita 600..... 32
- Figura 4:** Cinética de formação de nanopartícula de prata (AgNP) obtidas por síntese verde a partir do extrato aquoso de plantas do acesso Cucurbita 699..... 33
- Figura 5:** Cinética de formação de nanopartícula de prata (AgNP) obtidas por síntese verde a partir do extrato aquoso de plantas do acesso Cucurbita 2924..... 33
- Figura 6:** Cinética de formação de nanopartícula de prata (AgNP) obtidas por síntese verde a partir do extrato aquoso de plantas do acesso Cucurbita 1582..... 34
- Figura 7** Cinética de formação de nanopartícula de prata (AgNP) obtidas por síntese verde a partir do extrato aquoso de plantas do acesso Cucurbita 457..... 35
- Figura 8:** Cinética de formação de nanopartículas bimetálicas Ag@CuNP obtidas por síntese

verde a partir do extrato aquoso de plantas do acesso Cucurbita 600. O monitoramento das reações de síntese foi realizado por espectrofotometria no comprimento de onda de 450 nm em função do tempo em horas..... 37

Figura 9: Cinética de formação de nanopartículas bimetálicas Ag@CuNP obtidas por síntese verde a partir do extrato aquoso de plantas do acesso Cucurbita 699. O monitoramento das reações de síntese foi realizado por espectrofotometria no comprimento de onda de 450 nm em função do tempo em horas..... 37

Figura 10: Cinética de formação de nanopartículas bimetálicas Ag@CuNP obtidas por síntese verde a partir do extrato aquoso de plantas do acesso Cucurbita 2924. O monitoramento das reações de síntese foi realizado por espectrofotometria no comprimento de onda de 450 nm em função do tempo em horas..... 38

Figura 11: Cinética de formação de nanopartículas bimetálicas Ag@CuNP obtidas por síntese verde a partir do extrato aquoso de plantas do acesso Cucurbita 1582. O monitoramento das reações de síntese foi realizado por espectrofotometria no comprimento de onda de 450 nm em função do tempo em horas..... 39

Figura 12: Cinética de formação de nanopartículas bimetálicas Ag@CuNP obtidas por síntese verde a partir do extrato aquoso de plantas do acesso Cucurbita 457. O monitoramento das reações de síntese foi realizado por espectrofotometria no comprimento de onda de 450 nm em função do tempo em horas..... 39

Figura 13: Cinética de formação de nanopartículas de prata (AgNP) e nanopartículas bimetálicas (Ag@CuNP) obtidas por síntese verde a partir do extrato aquoso de plantas do acesso Cucurbita 1582. O monitoramento das reações de síntese foi realizado por espectrofotometria no comprimento de onda de 450 nm em função do tempo em horas.....40

Figura 14: Curva de síntese de nanopartículas de cobre (CuNP) e nanopartículas bimetálicas (Cu@AgNP) obtidas por síntese verde a partir do extrato aquoso de plantas do acesso Cucurbita 1582. O monitoramento das reações de síntese foi realizado por espectrofotometria no comprimento de onda de 630 nm em função do tempo em horas.....41

Figura 15: Suspensões coloidais de nanopartículas metálicas. Da esquerda para direita: Nanopartículas de prata (AgNP 600), nanopartículas de prata e cobre (Ag@CuNP 600), nanopartículas de cobre (CuNP 600) e nanopartículas de cobre e prata (Cu@AgNP 600)41

Figura 16: Curva de sínteses de nanopartículas bimetálicas Cu@AgNP obtidas por síntese verde a partir de diferentes extratos aquosos de plantas de acessos de Cucurbita (457, 600, 690, 2924 e 1582). O monitoramento da síntese foi realizado por espectrofotometria no comprimento de onda de 630 nm em função do tempo em horas 42

Figura 17: Características físico-químicas das nanopartículas de prata (AgNP) obtidas por rotas de síntese verde utilizando extratos aquosos obtidos a partir de plantas do acesso Cucurbita 2924, Cucurbita 699, Cucurbita 457, Cucurbita 1582 e Cucurbita 600. Os gráficos representam os resultados de (A) Diâmetro médio (Z-Ave), (B) Índice de polidispersividade (PdI) e (C) Potencial Zeta (PZ). Valores referentes às médias e desvios padrão da média de três leituras independentes. Diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) em relação a nanopartícula AgNP 2924 (a), AgNP 699 (b), AgNP 457 (c), AgNP 1582 (d) e AgNP 600 (e)..... 44

Figura 18: Características físico-químicas das nanopartículas de cobre (CuNP) obtidas por rotas de síntese verde utilizando extratos aquosos obtidos a partir de plantas do acesso Cucurbita 2924, Cucurbita 699, Cucurbita 457, Cucurbita 1582 e Cucurbita 600. Os gráficos representam os resultados de (A) Diâmetro médio (Z-Ave), (B) Índice de polidispersividade (PdI) e (C) Potencial Zeta (PZ). Valores referentes às médias e desvios padrão da média de três leituras independentes. Diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) em relação a nanopartícula CuNP 2924 (a), CuNP 699 (b), CuNP 457 (c), CuNP 1582 (d) e CuNP 600 (e).....46

Figura 19: Características físico-químicas das nanopartículas bimetálicas do tipo Ag@CuNP obtidas por rotas de síntese verde utilizando extratos aquosos obtidos a partir de plantas do acesso Cucurbita 2924, Cucurbita 699, Cucurbita 457, Cucurbita 1582 e Cucurbita 600. Os gráficos representam os resultados de (A) Diâmetro médio (Z-Ave), (B) Índice de polidispersividade (PdI) e (C) Potencial Zeta (PZ). Valores referentes às médias e desvios padrão da média de três leituras independentes. Diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) em relação a nanopartícula Ag@CuNP 2924 (a), Ag@CuNP 699 (b), Ag@CuNP 457 (c), Ag@CuNP 1582 (d) e Ag@CuNP 600 (e).....48

Figura 20: Características físico-químicas das nanopartículas bimetálicas do tipo Cu@AgNP obtidas por rotas de síntese verde utilizando extratos aquosos obtidos a partir de plantas

do acesso Cucurbita 2924, Cucurbita 699, Cucurbita 457, Cucurbita 1582 e Cucurbita 600. Os gráficos representam os resultados de (A) Diâmetro médio (Z-Ave), (B) Índice de polidispersividade (PDI) e (C) Potencial Zeta (PZ). Valores referentes às médias e desvios padrão da média de três leituras independentes. Diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) em relação a nanopartícula Cu@AgNP 2924 (a), Cu@AgNP 699 (b), Cu@AgNP 457 (c), Cu@AgNP 1582 (d) e Cu@AgNP 600 (e).....49

Figura 21: Imagem obtida por microscopia de força atômica em modo dinâmico da suspensão coloidal de Ag@CuNP 699.....53

Lista de Tabelas

Tabela 1: Avaliação espectrofotométrica das sínteses de nanopartículas de cobre (CuNPs) por rotas de síntese verde utilizando extratos aquosos obtidos a partir de plantas de cinco diferentes acessos de Cucurbita, durante 24 horas em comprimento de onda de 630 nm..... 35

Tabela 2: Concentração inibitória mínima (CIM) das nanopartículas de prata (AgNP) contra as bactérias *Escherichia. coli* e *Staphylococcus. aureus*. Valores representados a condição na qual ocorreu a inibição em pelo menos duas réplicas. - : Nenhuma Atividade..... 51

Tabela 3: Concentração inibitória mínima (CIM) das nanopartículas bimetálicas (Ag@CuNPs) contra as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Valores representados a condição na qual ocorreu a inibição em pelo menos duas réplicas. - : Nenhuma Atividade..... 51

Tabela 4: Concentração inibitória mínima (CIM) das nanopartículas bimetálicas (Cu@AgNPs) contra as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Valores representados a condição na qual ocorreu a inibição em pelo menos duas réplicas. - : Nenhuma Atividade..... 52

Lista de Abreviaturas e Siglas

AgNP.....	Nanopartícula de prata
AuNP.....	Nanopartícula de ouro
Ag@CuNP...	Nanopartícula de prata e cobre
CIM.....	Concentração inibitória mínima
CuNP.....	Nanopartícula de cobre
Cu@AgNP...	Nanopartículas de cobre e prata
DH.....	Diâmetro hidrodinâmico
DLS.....	Espalhamento de luz dinâmico
LB.....	Luria Bertani
MFA.....	Microscopia de força atômica
NNI.....	Nacional Nanotechnology Initiative
NP.....	Nanopartículas
NPBM.....	Nanopartículas bimetálicas
NPMM.....	Nanopartículas monometálicas
NPM.....	Nanopartículas metálicas
PdI.....	Índice de polidispersividade
PVP.....	Polivinilpirrolidona
PZ.....	Potencial Zeta
RAM.....	Resistência bacteriana a antimicrobianos
RPS.....	Ressonância plasmônica de superfície
Z-Ave.....	Z-average

Sumário

1 Introdução	16
1.1. Resistência bacteriana	16
1.2. Sistemas nanoestruturados.....	18
1.3. Nanopartículas metálicas.....	19
1.4. Síntese verde.....	21
1.4.1. Cucurbitaceae.....	22
2 Objetivos	24
2.1. Objetivo geral.....	24
2.2. Objetivo específico.....	24
3 Material e métodos	255
3.1. Equipamentos e materiais.....	25
3.2. Produção do extrato vegetal.....	25
3.3. Solução de íons metálicos.....	26
3.4. Síntese de Nanopartículas de Prata (AgNPs).....	26
3.5. Síntese de Nanopartículas de Cobre (CuNPs).....	27
3.6. Síntese de Nanopartículas bimetálicas (Ag@CuNP e Cu@AgNP).....	27
3.7. Caracterização das NPM por espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial zeta (PZ).....	28
3.8. Concentração inibitória mínima.....	28
3.9. Microscopia de Força Atômica.....	29
3.10. Análise dos dados.....	30
3.11. Referências Bibliográficas.....	30
4 Resultados e discussão	31
4.1. Síntese das nanopartículas.....	31
4.2. Diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersividade e potencial zeta das NP.....	42
4.3. Concentração Mínima Inibitória.....	50
4.4. Microscopia de Força Atômica.....	52
5 Conclusão	54
6 Referências	56

1. Introdução

1.1. Resistência bacteriana

A resistência bacteriana a antimicrobianos (RAM) emergiu como uma das principais ameaças à saúde pública do século XXI (Murray et al., 2022). A RAM diminui a eficácia na prevenção e tratamento de uma gama cada vez maior de infecções e é um problema cada vez mais sério em relação à saúde pública global que requer ação imediata, pois afeta todas as partes do mundo devido aos novos mecanismos de resistência que surgem e se espalham rapidamente (World Health Organization, 2014).

A compreensão tradicional da resistência aos antibióticos trata de como esse mecanismo ocorre dentro de uma célula microbiana individual. Historicamente, a maioria das pesquisas tem sido focada na ação celular e inclui mecanismos clássicos como: inativação via hidrólise (por exemplo, via β -lactamase) ou modificação (por exemplo, resistência a aminoglicosídeos); alteração do sítio de ligação dentro das células, tornando-os irreconhecíveis para o medicamento (por exemplo, por mutação de DNA girase em resistência à fluoroquinolona) ou contornar o alvo do medicamento; o uso de barreiras de permeação, evitando acesso da substância ao alvo (por exemplo, a membrana externa Gram negativa); e efluxo ativo do antibiótico para fora da célula através de transportadores ligados à membrana (World Health Organization, 2014; Penesyan et al., 2015; Nikaido, 1998).

O desenvolvimento de resistência celular ocorre como resultado de mutações em genes endógenos, e via transferência lateral de genes determinantes de resistência de outros microrganismos. Avanços recentes em genômica e metagenômica revelaram que muitos ecossistemas naturais, incluindo diversos ambientes como o intestino humano e o solo, contêm grande número de genes cujas funções podem ser cooptadas para conferir resistência aos antimicrobianos. Esses genes são conhecidos coletivamente como o resistoma (D’Costa et al., 2006; Martínez et al., 2015; Perry et al., 2014; Plata et al., 2009; Sommer et al., 2009; Wright, 2007;).

No pool genético das enterobactérias, a *Escherichia coli* atua como uma doadora e como receptora de genes de resistência e, assim, pode adquiri-los de outras bactérias, mas também pode transmitir seus genes a outras bactérias e por isso representa um importante

reservatório de genes de resistência que podem ser responsáveis por falhas de tratamentos na medicina humana e veterinária. Um número crescente de genes de resistência foram identificados e isolados em *E. coli* durante as últimas décadas, e muitos desses genes foram adquiridos pelo mecanismo de transferência horizontal de genes.

A resistência antimicrobiana em *E. coli* é considerada um dos maiores desafios em humanos e animais em escala mundial e precisa ser considerada como uma preocupação de saúde pública visto que é uma bactéria que pode causar infecções graves em humanos e animais, mas que também representa uma parte expressiva da microbiota autóctone em diferentes hospedeiros. Uma das principais preocupações é a possível transmissão de *E. coli* virulenta e/ou resistente entre animais e humanos por meio de várias vias, como contato direto, contato com excreções de animais ou via a cadeia alimentar (Agbo et al., 2022).

Diferentemente da *E. coli*, *Staphylococcus aureus* é uma bactéria Gram positiva que apesar de colonizar assintomaticamente aproximadamente 30% dos indivíduos pode causar uma variedade de doenças em humanos e animais, incluindo abscessos cutâneos, pneumonia, endocardite e osteomielite (Plata et al., 2009). *S. aureus* é amplamente encontrada no meio ambiente, na pele e superfícies mucosas de humanos e animais; no entanto, está documentado que sua eliminação é desafiadora. Além disso, cepas multirresistentes geralmente levam a uma taxa de mortalidade alta e representam ameaças sérias à saúde de humanos e animais (Agbo et al., 2022; Ford et al., 2020).

Em função de características estruturais e composição de suas paredes celulares, as bactérias são tradicionalmente divididas em dois grupos principais, sendo elas Gram negativas (*E. coli*) e Gram positivas (*S. aureus*), com base em sua coloração de Gram. Em comparação com as bactérias Gram positivas, as bactérias Gram negativas são mais resistentes aos anticorpos por causa de sua parede celular difícil de ser penetrada, devido a uma membrana externa adicional (Poirel et al., 2018).

Esse fato aumentou o interesse em estudos de compostos alternativos com potencial bactericida. Nesse contexto, o uso de nanopartículas (NPs) vem sendo amplamente estudado como uma opção de potenciais agentes antibacterianos pelas suas propriedades físico-químicas contra infecções clínicas (Rezk et al., 2022).

1.2. Sistemas nanoestruturados

A nanotecnologia é um ramo moderno da pesquisa e inovação científica que consiste, entre outros aspectos, na síntese e manipulação de partículas com estruturas em escala nanométrica. As NPs exibem propriedades baseadas em características específicas como o tamanho, distribuição de tamanhos e morfologia, e são definidas como naturais, acidentais ou materiais fabricados que contenham partículas, no estado não ligado, como agregado ou aglomerado em que 50% das partículas, ou mais na distribuição de tamanho numérico, em uma ou mais dimensões externas, está na faixa tipicamente de 1-100 nm (Hood, 2004; The European Commission, 2011).

O prefixo ‘nano’ é referido a um prefixo grego que significa ‘anão’ ou algo muito pequeno e representa um bilionésimo de um metro (10^{-9} m). A Nanotecnologia começou a ser discutida em 1959, pelo físico Richard Feynman, mas só pôde ter avanços realmente expressivos em suas aplicações a partir da década de 80 do século XX com o desenvolvimento de microscópios especiais (Bayda et al., 2019; Instituto Inovação, 2005).

A Nacional Nanotechnology Initiative (NNI) nos Estados Unidos da América (EUA) definiu a nanotecnologia como “uma ciência, engenharia, e tecnologia conduzida em nanoescala (1 a 100 nm), onde fenômenos únicos permitem novas aplicações em uma ampla gama de campos, desde química, física e biologia, até medicina, engenharia e eletrônica”.

Esta definição sugere a presença de duas condições para a nanotecnologia. A primeira é uma questão de escala: a nanotecnologia se preocupa em utilizar estruturas controlando sua forma e tamanho em escala nanométrica. A segunda questão tem a ver com a novidade: a nanotecnologia deve lidar com coisas pequenas de uma forma que aproveite algumas propriedades por causa da nanoescala (Allhoff, 2007; Bayda et al., 2019).

As aplicações se encontram em diversas áreas, tais como: medicina, cosmetologia, química, agricultura, materiais, ciências dos alimentos, meio ambiente, energia, segurança, eletrônica, entre outras (Bowman, 2007). A síntese de NPs pode ser realizada por duas abordagens, sendo elas *top-down* e *bottom-up*.

Os métodos *top-down* envolvem a redução mecânica, do macro para o nano por meio de técnicas como ablação a laser. Estes métodos tendem a gerar pós nanoestruturados, entretanto esta abordagem possibilita menos controle sobre parâmetros físicos importantes, como o tamanho e a forma finais das partículas (Fabrega et al., 2011). Os métodos *bottom-up*

envolvem a formação de nanoestruturas a partir da agregação ou aglomeração de átomos ou moléculas, possibilitando um controle fino do tamanho e/ou com base nas condições reacionais como temperatura e concentração de reagentes. Sistemas nanoestruturados apresentam características físico-químico-biológicas dependentes da sua composição, tamanho e forma, sendo que um exemplo deles são as nanopartículas metálicas (NPMs) (Bruna et al., 2021; Silva et al., 2017). A síntese de NPMs foi realizada de modo intencional pela primeira vez em 1857, quando o físico e químico Michael Faraday produziu nanopartículas de ouro (AuNPs) dispersas em suspensão coloidal (Albernaz, 2014). Para a obtenção das NPMs são utilizados sais metálicos que, de acordo com as suas propriedades, determinam as características de cada partícula, como é o caso das de prata e cobre. Tipicamente por meio de métodos *bottom-up*, NPMs são formadas pela dissolução de sais metálicos como por exemplo o nitrato de prata (AgNO_3) em um meio reacional (solvente), seguida da adição de um agente redutor e posteriormente de um agente estabilizante para possibilitar a formação de nanopartículas de prata (AgNPs) (Reidy et al., 2013).

1.3. Nanopartículas metálicas (NPMs)

A prata em todas as suas formas têm sido historicamente utilizada como agente antimicrobiano por si só ou combinada com outras tecnologias (Bruna et al., 2021). A utilização da prata remonta desde cerca de 4000 anos a.C., sobretudo na Grécia e Roma. Este metal era rotineiramente utilizado devido, sobretudo, às suas propriedades antimicrobianas. Embora nesta altura não se soubesse que eram o foco das infecções e, portanto, o uso da prata fosse empregado de forma empírica por conhecimento tradicional, sabe-se que a prata era muito utilizada em recipientes para o armazenamento de água potável, bem como em suturas para fechar feridas e evitar infecções. Tendo por base os benefícios da prata, juntamente com os avanços da nanotecnologia, surgem então as AgNPs (Sousa et al., 2022).

As AgNPs são de grande interesse científico-tecnológico por conta de suas propriedades únicas (por exemplo, tamanho e forma, que influenciam em propriedades ópticas, elétricas e biológicas) e tem chamado atenção de muitos pesquisadores por conta de suas adequações às diferentes áreas como a eletrônica, ciência de materiais e a medicina. A prata é reconhecida como tendo efeitos inibitórios em microorganismos (Ahamed et al., 2010). O potencial das AgNPs como agente antimicrobiano está relacionado aos seus diversos mecanismos de ação, que atuam nos microrganismos em múltiplas estruturas simultaneamente

conferindo-lhes a capacidade de inibir o crescimento de vários tipos de bactérias (Cheng et al., 2016).

Alguns mecanismos das AgNPs se resumem em afetar a permeabilidade bacteriana ligando-se à superfície da membrana celular e modificando o potencial celular; podem causar dano oxidativo pela produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Kim et al., 2007; Xu et al., 2012); podem interagir com os grupos tióis de proteínas de membrana e proteínas intracelulares bacteriana; e podem ainda interagir com os resíduos de fosfato em DNA, interferindo assim com a síntese e função de proteínas e divisão celular (Durán et al., 2016).

Outro metal reconhecido por suas propriedades antimicrobianas, o cobre por sua vez, quando entra em contato com os microrganismos, leva à distorção repentina da parede e disruptura da membrana celular. Além disso, pode inibir a função de enzimas respiratórias próximas das membranas celulares, ligando-se aos seus grupamentos tiol. Alguns estudos demonstraram que a ação antimicrobiana do cobre (inclusive na forma nanoparticulada) tem sido associada a toxicidades múltiplas em bactérias, como a geração de EROs, a peroxidação lipídica, a oxidação proteica e a degradação do DNA demonstrado em bactérias Gram negativas como *E. coli* (Costa, 2018) e propriedades inibitórias principalmente contra bactérias Gram positivas, como *S. aureus* (Keihan et al., 2017).

Além das NPMs de metais puros ou nanopartículas monometálicas (NPMMs), as nanopartículas bimetálicas (NPBMs) têm despertado mais interesse porque apresentam melhor ou variadas propriedades química (Sao-Joao et al., 2005), magnética (Dupuis et al., 2004; Zeng et al., 2004; Zhang et al., 2007), óptica (Basu et al., 2006; Gaudry et al., 2003) e catalítica (Harada et al., 1993; Wang et al., 2009) em comparação com NPMMs (Banik et al., 2018). Estudos recentes têm associado sais de prata e cobre no desenvolvimento de NPBMs com o objetivo de associar vantagens e obter um efeito mais pronunciado contra bactérias, visto que alguns compostos apresentam propriedades contra diferentes microrganismos e, sobretudo, por diferentes mecanismos.

As NPBMs são formadas pela combinação de dois diferentes metais (Sharma et al., 2017), podendo ser classificadas em: (I) ligas bimetálicas, cujos componentes estão uniformemente distribuídos, de forma ordenada ou aleatória; (II) dímeros bimetálicos, contendo aglomerados de diferentes composições químicas, por exemplo, NPMs de elementos imiscíveis; (III) estruturas core-shell, sendo um núcleo interno de forma arbitrária (metal M)

revestido com um invólucro de outro metal (N) (Gilroy et al., 2016; Januszewska et al., 2015; Kovács et al., 2017; Liu, 2012; Sharma et al., 2017) tipicamente denotado por M@N; e (IV) sistema multicamada (Olekszyszen, 2019).

É sabido que NPMs podem ser sintetizadas por diferentes métodos de síntese, dentre eles os físicos e os químicos, os quais agora vêm dividindo espaço com a síntese biológica, que demanda um menor custo efetivo, além de gerar menos impacto ao meio ambiente (Silva et al., 2017; Ovais et al., 2018).

Métodos químicos são muito utilizados na síntese de NPMs, são exemplos de técnicas desse tipo a redução, técnicas eletroquímicas e a redução fotoquímica. No entanto, nessas metodologias costuma-se utilizar solventes orgânicos e é comum a produção de resíduos potencialmente tóxicos e prejudiciais à saúde humana e ao meio ambiente. Por notável necessidade de abordagens mais sustentáveis, nos últimos anos houve o desenvolvimento da síntese de NPMs utilizando meios biológicos, chamada de síntese verde.

1.4. Síntese verde

A ideia de química verde foi desenvolvida inicialmente como uma resposta à Lei de Prevenção da Poluição de 1990, a qual declarou que a política nacional dos EUA deveria eliminar a poluição por meio de um *design* aprimorado, incluindo mudanças econômicas em produtos, processos, uso de matérias-primas renováveis e reciclagem, em vez de tratamento e descarte (Paris, 2000).

A síntese verde vem se destacando nos últimos anos principalmente pelo seu custo de produção mais baixo e pelo uso de recursos biológicos (como plantas, algas, fungos e bactérias), que promove uma baixa na utilização de solventes tóxicos e justifica o fato de ser uma via com menor impacto ambiental (Silva et al., 2017; Ovais et al., 2018), recebendo uma maior atenção como alternativa adequada aos procedimentos químicos e físicos, além de estar sempre em expansão devido à variedade de espécies disponíveis.

Essa rota de produção biológica é uma de abordagem *bottom-up* que emprega um sistema biológico ou seus componentes para a formação de NPs, onde no caso de NPMs a principal reação é a biorredução do metal para a formação das NPs. O processo acontece devido à presença de substâncias na planta (metabólitos primários e secundários), como a presença de biomoléculas como proteínas, aminoácidos, vitaminas, polissacarídeos,

polifenóis, terpenóides e ácidos orgânicos, incluindo citratos, por exemplo (Baker, 2013), que atuam como agentes não apenas biorredutores, mas também estabilizantes das NPMs.

As moléculas presentes nos extratos de plantas podem atuar tanto como agentes biorredutores e como agentes estabilizantes na síntese de NPMs. A biorredução de NPMs por combinações de biomoléculas encontradas em extratos de plantas é ambientalmente benigna, mas quimicamente complexa (Iravani, 2011). Essa complexidade também é considerada devido à variedade de compostos disponíveis em cada espécie de planta utilizada.

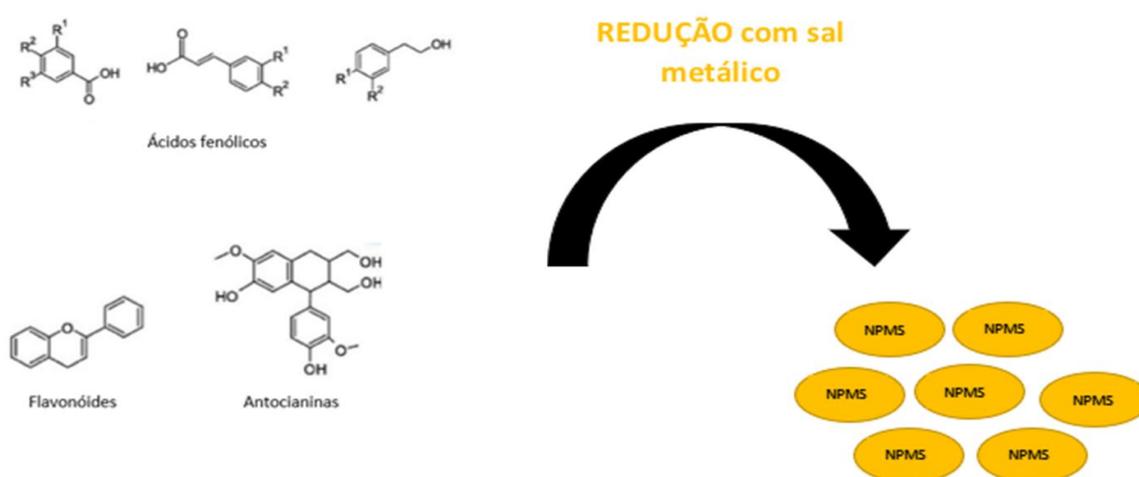


Figura 1: Esquema representativo da biorredução para formação de nanopartículas metálicas, em que compostos orgânicos presentes em extratos de plantas atuam reduzindo sais metálicos e formando nanopartículas metálicas (NPMs) como produto do processo.

1.4.1. Cucurbitaceae

A família Cucurbitaceae compreende aproximadamente 118 gêneros e 825 espécies, com distribuição predominantemente tropical, sendo que destes, nove gêneros e 30 espécies são cultivados. Abóboras (*Cucurbita*), chuchus (*Sechium edule*), melancias (*Citrullus lanatus*), melões (*Cucumis melo*), pepinos (*Cucumis sativus*), bucha-vegetal (*Luffa cylindrica*), porongos e cabaças (*Lagenaria siceraria*), e outras culturas menos expressivas, como kino ou kiwano (*Cucumis metuliferus*), maxixe (*Cucumis anguria*), melão-de-cheiro (*Sicana odorifera*) e melão-de-são caetano (*Momordica charantia*) são cultivados no Brasil para fins alimentares, ornamentais ou como fonte de matérias primas (Heiden et al., 2007).

As *Cucurbitas* são trepadeiras herbáceas, sensíveis ao gelo, rastejantes e com gavinhas, com grandes folhas palmadas e frutos proeminentes. A maioria das espécies de *Cucurbita* são mesófitas, têm sistemas radiculares fibrosos e são monóicas, com grandes, flores intensamente amarelo-alaranjadas, produtoras de néctar, unissexuais que são forrageadas por abelhas. A *Cucurbita* é uma das espécies economicamente mais importantes do gênero de hortaliças, com três de suas espécies amplamente distribuídas no cultivo (Paris, 2000).

O presente estudo utilizou acessos da coleção de base da Embrapa (Colbase) do gênero *Cucurbita* disponibilizados na forma de plantas pelo Laboratório de Sementes da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Desenvolver nanopartículas de cobre (CuNPs), nanopartículas de prata (AgNPs) e dois tipos de nanopartículas bimetálicas (NPBMs) a partir de extrato de acesso vegetal de espécie do gênero Cucurbita e avaliar quanto a atividades biológicas.

2.2. Objetivos específicos

- Sintetizar e caracterizar fisicoquimicamente e estruturalmente AgNPs, CuNPs e NPBMs obtidas por rotas de síntese verde a partir de extratos aquosos de plantas do gênero Cucurbita;
- Avaliar o possível efeito sinérgico quanto à associação de dois sais metálicos na síntese de NPMs por rotas de síntese verde utilizando extratos vegetais;
- Avaliar e comparar a atividade antimicrobiana *in vitro* das NPMs sintetizadas contra bactérias Gram negativa e Gram positiva.

3. Material e métodos

3.1. Equipamentos e materiais

Agitador magnético com aquecimento (modelo Q261, Quimis, Brasil); Autoclave (modelo Idealclave, Stermax, Brasil); Balança analítica (Quimis, Brasil); Banho Maria (Quimis, Brasil); Biofotômetro (modelo Plus, Eppendorf, Alemanha); Capela de fluxo laminar unidirecional (modelo CFLV 12, Veco); Copos de Becker de vidro com capacidade para 5, 50 e 200 mL; Estufa de secagem e esterilização (Lucadema, Brasil); Estufa bacteriológica (Lucadema, Brasil); Frascos do tipo Erlenmeyer de 200 mL; Funil de vidro; Incubadora (modelo shaker Luca-222, Lucadema, Brasil); Leitora de microplacas (modelo EL808, BioTek, Estados Unidos); Microplacas de 96 poços de fundo chato; Microscópio de força atômica (modelo SPM 9600, Shimadzu, Japão); Papel filtro qualitativo 80GR (Qualy, Brasil); ZetaSizer Nano ZS (Malvern, Reino Unido).

3.2. Produção do extrato vegetal

Para a síntese das NPMs foram preparados extratos aquosos na concentração inicial de 20 mg/mL (equivalente em material fresco em água), a partir de material botânico congelado proveniente de cinco acessos vegetais do gênero *Cucurbita* disponibilizados a partir de testes de germinação realizados pela equipe da Colbase (Coleção de base) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, os acessos foram identificados por meio de códigos: 00141096-8; 00141688-2; 00141804-5; 00141934-0 e 001416701-2 nos quais podem ser consultados por meio do link <https://alelo.cenargen.embrapa.br/> Cada acesso vegetal na forma de planta foi pesado e cortado em tamanhos menores, a fim de obter um aumento da superfície de contato para um maior proveito na extração dos compostos orgânicos que são úteis como redutores de íons e estabilizantes de NPMs.

Em uma chapa pré-aquecida, foi colocado um béquer com volume de água calculado para a concentração inicial de extrato de 20 mg/mL a partir do peso obtido previamente do material biológico de cada acesso vegetal. A água em ebulição foi adicionada ao béquer, em que a planta já estava cortada, e colocado novamente na chapa de aquecimento por 2 minutos para produção de um extrato.

Após o tempo de decocção para extração dos compostos orgânicos em água, o extrato foi filtrado com auxílio de papel filtro qualitativo (80 GR) com auxílio de um funil em frasco

de vidro Erlenmeyer. Após filtrado, o extrato foi separado e foi utilizado o volume de acordo com cada tipo de NPM a ser sintetizada. Foi utilizado 1 mL de extrato inicial para as NPBMs e ao finalizar a primeira reação de síntese, sendo elas AgNPs e CuNPs, separadamente. Em seguida para cada uma foi adicionado mais 1 mL do extrato para finalizar a reação de síntese de NPBMs alternando a solução de íons metálicos a ser adicionada. Sendo assim foi realizado o seguinte fluxo para o uso de extrato nas NPBMs:

- 1mL de extrato + 2 mL solução de sal metálico $\text{AgNO}_3 = \text{AgNP}^*$

$\text{AgNP}^* + 1\text{mL de extrato} + 2 \text{ mL de solução de sal metálico } \text{CuSO}_4 = \text{Cu@AgNP}$

- 1mL de extrato + 2 mL solução de sal metálico $\text{CuSO}_4 = \text{CuNP}^*$

$\text{CuNP}^* + 1\text{mL de extrato} + 2 \text{ mL de solução de sal metálico } \text{AgNO}_3 = \text{Ag@CuNP}$

Para as NPMs foram utilizados 2 mL de extrato em tubo de ensaio. Seguindo o seguinte fluxo:

- 2 mL de extrato + 2 mL de solução de íon metálico $\text{AgNO}_3 = \text{AgNP}$

- 2 mL de extrato + 2 mL de solução de íon metálico $\text{CuSO}_4 = \text{CuNP}$

3.3. Soluções de íons metálicos

No preparo das soluções de íons metálicos foram utilizados o nitrato de prata (AgNO_3) e sulfato de cobre (CuSO_4). Primeiramente, os sais AgNO_3 e o CuSO_4 foram pesados separadamente em balança analítica e o volume de água ultrapura (tipo I) ajustado para a obtenção de soluções com concentração final de 2 mM. O material pesado foi transferido para um béquer, com o volume de água já ajustado para concentração desejada, e reservado. Foi separado um volume da solução como um controle com 2 mL da solução iônica e 2 mL de água tipo I para cada um dos compostos.

3.4. Síntese de Nanopartículas de Prata (AgNPs)

Foram colocados em um tubo de ensaio de vidro, 2 mL da solução de AgNO_3 a 2 mM e 2 mL de extrato a 20 mg/mL e em outro tubo de ensaio 2 mL de solução de AgNO_3 e 1 mL de extrato para síntese de AgNPs que foram utilizadas na síntese da NPBMs, conforme será descrito no item 3.6. A solução final foi colocada em banho-maria a 75°C e a síntese foi monitorada espectrofotometricamente em uma leitora de microplaca no comprimento de onda

de 450 nm, nos tempos 0 h (T0); 0,5 h (T1); 1 h (T2); 1,5 h (T3); 2 h (T4) e 2,5 h (T5). Para tal, 200 µL de cada amostra foram adicionados em uma placa de 96 poços. A primeira leitura (T0) foi realizada antes da incubação das amostras em banho-maria e a última leitura (T5) após a conclusão do tempo de reação de síntese. Como controles do processo de síntese, os mesmos volumes, da solução de extrato ou de AgNO₃ foram substituídos por água ultrapura (tipo I).

Foram preparados dois tipos adicionais de controle sendo um de extrato e o outro da solução de AgNO₃. Para o controle de extrato foi colocado em um tubo de ensaio 2 mL de extrato a 20 mg/mL e 2 mL de água ultrapura (tipo I), para o controle de metal foi adicionado em outro tubo de ensaio 2 mL de solução de AgNO₃ a 2 mM e 2 mL de água ultrapura (tipo I). Ambos os controles foram expostos às mesmas condições que as reações para síntese de AgNPs.

Após a última análise em leitora de microplacas, as amostras e os controles foram acondicionados em geladeira (4°C) até o uso para as etapas de caracterização e ensaios de atividade antimicrobiana.

3.5. Síntese de Nanopartículas de Cobre (CuNPs)

Para as reações de síntese de CuNPs, 2 mL da solução de CuSO₄ a 2 mM e 2 mL de extrato aquoso a 20 mg/mL foram adicionados em um tubo de ensaio de vidro, sendo que em outro tubo foram adicionados 2 mL da solução de CuSO₄ e 1 mL de extrato para a síntese de CuNPs que foram utilizadas na síntese de NPBM descrita no item 3.6. Posteriormente, os tubos foram acondicionados em banho-maria a 75°C por 10 minutos. Após esse período, a solução foi transferida para uma incubadora à temperatura de 25°C por 24 horas (*overnight*). Como controles do processo de síntese foram colocados em tubo de ensaio para controle de extrato 2 mL de água ultrapura (tipo I) e 2 mL do extrato vegetal a 20 mg/mL. Para controle de metal 2 mL da solução de CuSO₄ foram colocados junto a 2 mL de água ultrapura (tipo I).

3.6. Síntese de Nanopartículas Bimetálicas (Ag@CuNPs e Cu@AgNPs)

Para a síntese das NPBM de Ag@CuNPs foram utilizados os produtos da reação de síntese das CuNPs com 1 mL de extrato e adicionados 2 mL AgNO₃ e mais 1 mL de extrato conforme descrito no item 3.2. Dessa forma as NPBM tiveram o mesmo volume final de extrato adicionado para a síntese que as NPMs, variando entre elas apenas a adição da

solução de íons metálicos.. Após a adição da solução de AgNO₃ o tubo de ensaio de vidro foi mantido em banho-maria a 75°C durante 2,5 h, tendo sido realizadas leituras em microplacas em comprimentos de onda de 450 nm e 630 nm nos tempos 0 h (T0); 0,5 h (T1); 1 h (T2); 1,5 h (T3); 2 h (T4) e 2,5 h (T5).

Para a síntese das NPBMs de Cu@AgNPs foram utilizados os produtos da reação de síntese das AgNPs com 1 mL de extrato e adicionados 2 mL da solução de CuSO₄ e mais 1 mL de extrato, conforme descrito no item 3.2. Sendo assim, as NPBMs tiveram o mesmo volume de extrato para a síntese que as NPMs variando apenas a adição da solução de íons metálicos de acordo com cada NPM.. Após a adição da solução de CuSO₄, o tubo de ensaio foi incubado em banho-maria a 75°C por 10 min e em seguida deixado *overnight* em temperatura de 25°C em incubadora de bancada.

3.7. Caracterização das NPMs por espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial Zeta (PZ)

As medições de diâmetros hidrodinâmicos (DH), potenciais Zeta (PZ) e índices de polidispersividade (PdI) foram realizadas utilizando o instrumento ZetaSizer Nano ZS (Malvern, Reino Unido) com laser He-Ne (4 mW) operado a 633 nm para o espalhamento de luz dinâmico (DLS), técnica para determinação de DH e PdI; e mobilidade eletroforética visando a determinação do PZ, utilizando célula capilar (DTS1070). Para cada análise, as amostras foram diluídas em água tipo I na proporção de 1:10. As amostras foram analisadas em triplicata, o número de passos em automático e o ângulo de espalhamento fixado em 173° a 25°C. Os dados foram analisados usando o software ZetaSizer 8.00.4813 (ZetaSizer, Malvern) que acompanha o equipamento.

3.8. Concentração inibitória mínima (CIM)

Para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) das NPMs, cepas bacterianas de *Escherichia coli* (ATCC[®]8739) e *Staphylococcus aureus* (ATCC[®]25923) foram cultivadas em meio líquido Luria Bertani (LB) líquido por 12 h a 37°C. As suspensões celulares foram ajustadas para obter DO₆₀₀= 0,05 com um biofotômetro (Eppendorf). Em seguida, as bactérias foram expostas a diferentes concentrações de NPMs (16, 32, 64, 128, 256 µM) em microplaca de 96 poços de fundo chato. Água destilada esterilizada foi utilizada como controle negativo, além de controles de meio LB e antibiótico penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100

$\mu\text{g/mL}$). Para as NPBMs foram feitos controles de osmolaridade com duas concentrações diferentes, sendo elas em 128 e 256 μM . A CIM foi testada em três réplicas e uma réplica foi considerada um poço na microplaca. As microplacas foram seladas com plástico filme e mantidas a 37°C em estufa por até 72 h. As placas foram avaliadas por inspeção visual diariamente nos tempos de 24, 48 e 72 h e a CIM foi considerada quando não foi observado crescimento visual.

3.9. Microscopia de Força Atômica (MFA)

Para realização das análises de microscopia de força atômica (MFA) foi selecionada uma amostra dentre todas as sintetizadas, sendo que se utilizou como critério de seleção uma das NPMs que apresentou maior efeito bactericida no ensaio de CIM. Para cada análise, 1 μL da suspensão de NPMs diluída 10 \times em água tipo I foi depositada sobre a superfície de mica muscovita recém clivada, e deixou-se secar ao ar em ambiente protegido da deposição de partículas atmosféricas. Posteriormente, a amostra foi montada em porta-amostra metálico em formato de moeda utilizando fita dupla-face e acondicionada na base do equipamento. As análises foram realizadas utilizando um microscópio de força atômica SPM-9600 (Shimadzu) em modo de operação dinâmico (fase-viscoelasticidade) utilizando um *cantilever* (haste) retangular integrado com ponteira cônica de silício com constante mola de 10-130 N/m (tipicamente em torno de 42 N/m) e frequência de ressonância de 204-497 kHz (tipicamente em torno de 250 kHz), e utilizando frequência de varredura de 1 Hz. As imagens foram adquiridas em resolução de 512 \times 512 pixels e processadas no próprio software do equipamento (SPM Manager 3.0, Shimadzu) para correção do plano de varredura. As distribuições do diâmetro (altura) foram determinadas por meio da especificação da altura média, dado representativo para nanopartículas esféricas.

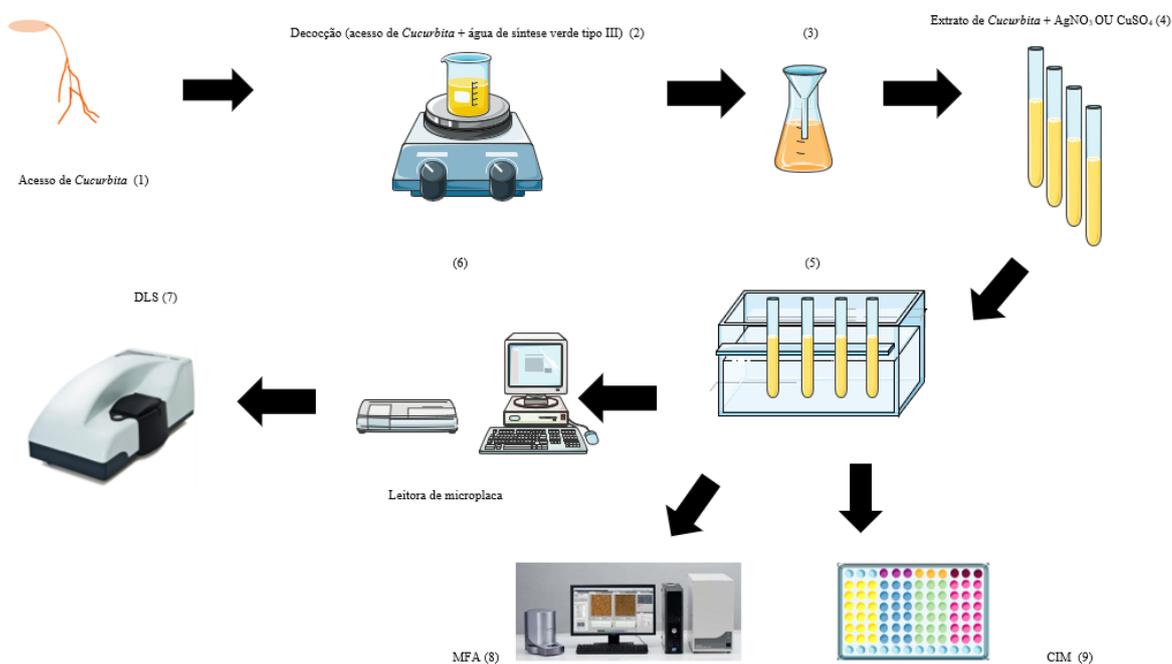


Figura 2: Esquema representativo de parte da metodologia. Primeiro, foi feito um decocto (2) com a planta do gênero *Cucurbita* (1). O produto da decoção foi filtrado (3) e adicionado a uma solução iônica de AgNO₃ para as duas AgNPs sendo uma delas foi utilizada para em seguida formar Cu@AgNP; e CuSO₄ para as duas CuNPs sendo que em seguida uma delas foi utilizada em seguida para formar Ag@CuNP (4). As soluções foram colocadas em banho-maria (5) e a síntese foi monitorada por leitora de microplaca (6). Após as reações de síntese, as NPMs foram caracterizadas no DLS (7) com relação ao seu diâmetro hidrodinâmico (DH), índice de polydispersividade (PdI) e potencial Zeta (PZ). Ainda foram obtidas imagens em microscopia de força atômica (8) e analisadas com relação à atividade biológica por meios de ensaio de concentração inibitória mínima (9).

3.10. Análises dos dados

As análises gráficas dos dados obtidos nas descrições dos tópicos anteriores foram realizadas utilizando o software SciDAVis (versão 5.2.3). Os fluxogramas ou imagens ilustrativas foram construídos utilizando programa Word (versão Office16). Para a obtenção de médias e desvios foi utilizado o programa Microsoft Excel (versão Office16). Para a análise estatística foi utilizado o software Past (versão 4.09) por análise de variância (ANOVA).

3.11. Referências bibliográficas

As referências apresentadas nesse documento foram processadas e geradas utilizando o software Mendeley Reference Manager (versão 2.77.0).

4. Resultados e discussão

4.1. Síntese das nanopartículas metálicas (NPMs)

As AgNPs, CuNPs, Ag@CuNPs e Cu@AgNPs foram obtidas por síntese verde utilizando extrato aquoso obtido a partir de plantas de cinco acessos de amostras biológicas do gênero *Cucurbita*, sendo que eles foram identificados como *Cucurbita* 457; *Cucurbita* 600; *Cucurbita* 699; *Cucurbita* 1582 e *Cucurbita* 2924. Cada acesso corresponde a uma espécie do gênero, neste trabalho as NPMs serão identificadas com base no número dos acessos.

As reações entre os extratos aquosos das plantas de diferentes acessos e as diferentes soluções de sais metálicos acarretaram mudanças na coloração dos meios reacionais. Para as reações de síntese das AgNPs ocorreu mudança na coloração das reações de translúcida para marrom-acastanhado, sendo que as intensidades das colorações variaram de acordo com o acesso utilizado, indicando a formação das NPMs para todos os acessos testados. A fim de caracterizar as NPMs a partir do perfil de absorção de cada uma delas foi utilizada a técnica de espectroscopia na região ultravioleta-visível.

A espectroscopia na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) é uma das técnicas analíticas mais utilizadas em estudos envolvendo a caracterização de NPMs porque é muito versátil e possibilita detectar vários tipos de moléculas com base no perfil de absorção. Na espectroscopia UV-Vis, a radiação eletromagnética no intervalo UV-Vis (geralmente com comprimento de onda entre 200 e 800 nm) é transmitida através de uma amostra e a transmissão da luz por uma amostra é medida. A partir da transmissão, a absorbância pode ser calculada. Um espectro de absorbância da amostra é comumente então obtido em diferentes comprimentos de onda, assim, a intensidade da absorbância em cada comprimento de onda pode ser relacionada à estrutura química das moléculas presentes na amostra (Rodrigues, 2022; Perkampus, 1992). Com base nisso, análises espectroscópicas podem ser utilizadas para detecção de um metal quando este se encontra estruturado sob a forma metálica como NPMs, sendo representado por um pico de absorção característico resultante que envolve a excitação coletiva dos elétrons presentes na superfície em um fenômeno denominado ressonância plasmônica de superfície. Sendo assim, a espectroscopia UV-Vis tem sido utilizada como um parâmetro indicativo do rendimento da formação de NPMs.

De fato, diferentes estudos relatam que durante o processo de síntese verde ocorrem fenômenos visíveis a olho nu que indicam a síntese de NPMs como uma função do efeito de

ressonância plasmônica de superfície. A ressonância plasmônica de superfície (RPS) é um fenômeno físico que ocorre com materiais que apresentam uma nuvem eletrônica maleável e de dimensões específicas, tais que, as ondas eletromagnéticas da luz visível são maiores do que as partículas (Mattos, 2022). O sucesso na etapa de síntese pode ser observado visualmente pela mudança de coloração das soluções que, com o passar do tempo, sendo expostas a temperaturas mais elevadas, formam NPMs (Veisi et al., 1983). Estudos demonstram que CuNPs apresentam espectro de absorção nos comprimentos de onda de 580 a 610 nm (Rajesh et al., 2018; Ramyadevi et al., 2012); enquanto para as AgNPs o espectro de absorção está entre 400 e 500 nm (Araujo et al., 2020).

A AgNP 600, dentre os cinco acessos testados, foi a que apresentou o maior aumento de absorção no comprimento de onda de 450 nm durante o período de síntese, indicando uma formação de NPMs mais pronunciada ou com forma diferente das demais. A Figura 3 corresponde ao gráfico de desempenho do acesso Cucurbita 600 durante o período de síntese e como controle foi realizada a curva do extrato e da solução com AgNO_3 a fim de demonstrar a interação entre o acesso e os íons do sal metálico.

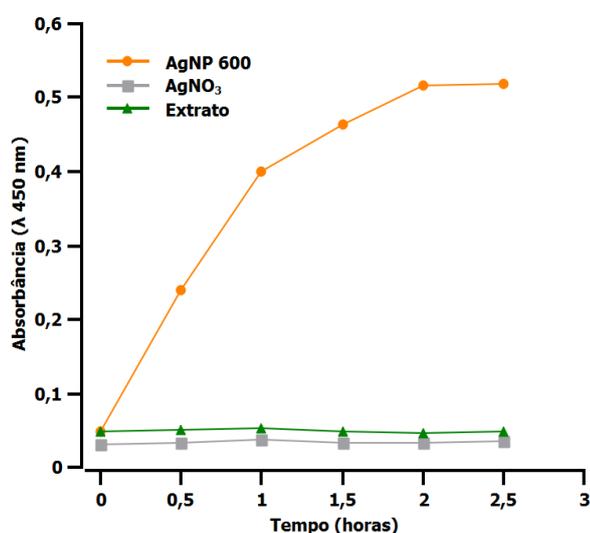


Figura 3: Cinética de formação de nanopartículas de prata (AgNPs) obtidas por síntese verde a partir do extrato aquoso de plantas do acesso Cucurbita 600.

Para a AgNP 699 a síntese teve um bom desempenho, porém, inferior ao da Cucurbita 600. A Figura 4 representa a curva cinética de síntese da AgNP 699. Pode-se observar que a curva de absorbância não foi linear como a AgNP 600 apresentando um decaimento ao longo do intervalo de tempo de síntese. Pode-se inferir que a diminuição da taxa de síntese no período de 2 h pode ser devido às características do perfil fitoquímico do extrato aquoso obtido a partir do acesso de Cucurbita 699, o que não ocorreu, por exemplo, com o de

Cucurbita 600, possivelmente por características distintas do extrato, mas que precisarão ser futuramente compreendidas em outros estudos.

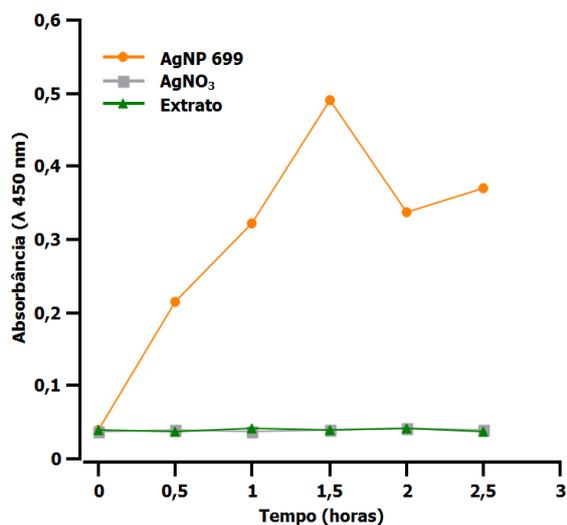


Figura 4: Cinética de formação de nanopartícula de prata (AgNP) obtidas por síntese verde a partir do extrato aquoso de plantas do acesso Cucurbita 699.

Dentre os extratos de plantas dos acessos utilizados para a síntese de NPMs, o acesso Cucurbita 2924 apresentou um desempenho inferior aos que já foram demonstrados anteriormente, como pode ser observado na Figura 5 em que representa por meio de um gráfico a curva de síntese da AgNP 2924 ao longo do período de 2,5 h. A ascensão da curva é observada, porém durante o período de síntese a absorbância não teve valor tão expressivo se comparado aos gráficos demonstrados nas Figuras 3 e 4.

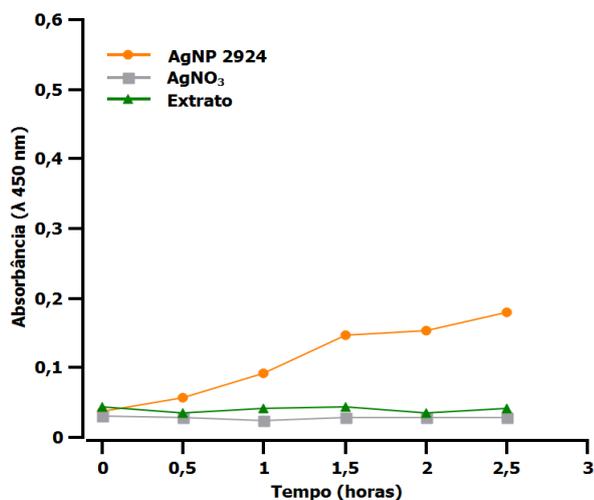


Figura 5: Cinética de formação de nanopartícula de prata (AgNP) obtidas por síntese verde a partir do extrato aquoso de plantas do acesso Cucurbita 2924.

A AgNP 1582, referente às AgNPs produzidas com o extrato das plantas do acesso de Cucurbita 1582 teve sua síntese com resultado superior àquele observado para a AgNP 2924, mas ainda inferior às AgNP 600 e AgNP 699. Ao final do período de síntese, a AgNP 1582 teve sua absorvância máxima no comprimento de onda de 450 nm em 0,345. A Figura 6 demonstra o gráfico de curva de síntese da AgNP 1582, com os controles de extrato e solução de AgNO₃ para fins de comparação.

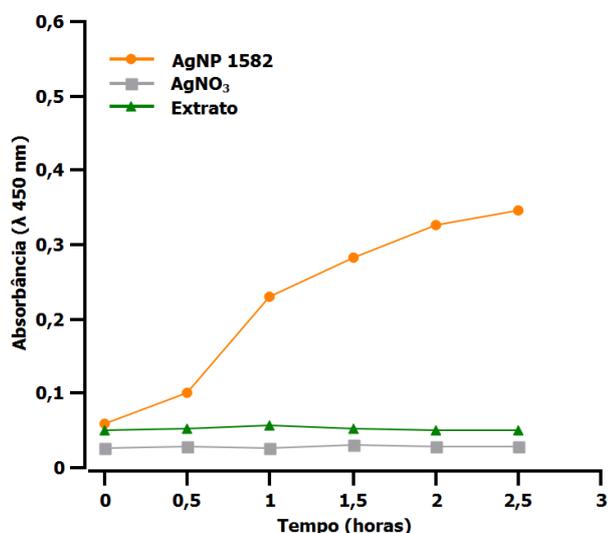


Figura 6: Cinética de formação de nanopartícula de prata (AgNP) obtidas por síntese verde a partir do extrato aquoso de plantas do acesso Cucurbita 1582.

A AgNP 457 teve ao final do período de síntese uma absorvância de 0,232 no comprimento de onda de 450 nm. A Figura 7 representa o gráfico de síntese da AgNP 457 em decorrência do tempo de reação em horas, comparada à absorvância dos controles de extrato e da solução de AgNO₃.

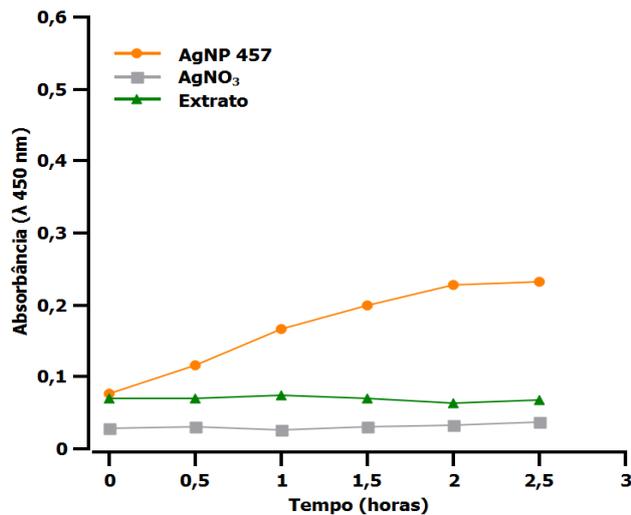


Figura 7: Cinética de formação de nanopartícula de prata (AgNP) obtidas por síntese verde a partir do extrato aquoso de plantas do acesso Cucurbita 457.

A Tabela 1 sumariza os resultados das absorbâncias das CuNPs no tempo inicial (0 h) e final da síntese (24 h) no comprimento de onda de 630 nm que tipicamente apresenta próximo da máxima de absorção desse tipo de NPM. Por meio dos resultados obtidos é possível inferir que o potencial de síntese das CuNPs a partir do precursor metálico CuSO₄, quando em incubado com extratos aquosos de plantas dos acessos do gênero Cucurbita, é baixo quando comparado aos resultados obtidos para as reações de síntese utilizando AgNO₃.

Tabela 1: Avaliação espectrofotométrica das sínteses de nanopartículas de cobre (CuNPs) por rotas de síntese verde utilizando extratos aquosos obtidos a partir de plantas de cinco diferentes acessos de Cucurbita, durante 24 horas em comprimento de onda de 630 nm.

	CuNP 600	CuNP 699	CuNP 2924	CuNP 1582	CuNP 457
0h	0,056	0,042	0,038	0,046	0,036
24h	0,052	0,089	0,039	0,049	0,053

Dentre os acessos utilizados, o acesso Cucurbita 699 demonstrou um pouco mais de potencial para síntese de CuNPs quando comparado aos demais acessos, ainda que incipiente. Já o acesso Cucurbita 600, que havia demonstrado um alto potencial para a síntese de AgNPs, não teve efeito expressivo para síntese de CuNPs, inclusive demonstrando um decaimento no valor de absorbância se comparado ao valor em 0 h.

A síntese das NPMs deste estudo consiste na dissolução de sais metálicos, no caso AgNO_3 e CuSO_4 , em um meio reacional (solvente) e adição de um agente redutor. O cobre (Cu) tem um maior potencial oxidante do que a prata (Ag), isso que explica os diferentes potenciais biorredutores e estabilizantes dos extratos para a formação de NPMs quando associados com os sais metálicos. Isso porque cada extrato é composto por diferentes biomoléculas (como metabólicos primário e secundários) e cada uma deles pode interagir de maneira distinta com o AgNO_3 e CuSO_4 , sendo o potencial de síntese dependente desta interação molecular.

Estudos recentes demonstram que além da reação de síntese ser dependente da interação entre o agente oxidante e o agente redutor, o meio reacional no qual a síntese está condicionada também interfere em sua cinética de formação. Biswal et al., 2020 relatam que o pH das soluções afetam a estabilidade, influenciando a formação, a forma e o tamanho delas. Fernando et al. também relata sobre o impacto do pH nas características das NPMs tendo alteração na carga de superfície das NPMs. Em pH ácido e neutro, as partículas foram desestabilizando, resultando em maior taxa de agregação enquanto em meio alcalino as condições das partículas foram reestabilizadas devido à presença de íons hidroxila resultando em suspensões mais estáveis.

Além de NPMMs como as AgNPs e CuNPs, NPBMs têm despertado interesse crescente, pois apresentam variadas características magnéticas, químicas, ópticas e catalíticas quando comparadas a NPMMs (Banik et. al, 2018). No presente estudo foram sintetizados dois tipos de NPBMs sendo elas Ag@CuNPs e Cu@AgNPs com plantas de cinco diferentes acessos de Cucurbita como mencionado no item 3.

Alguns estudos demonstram a síntese de NPMs com AgNO_3 e CuSO_4 de diferentes formas. Banik et al., 2020 demonstram a síntese de NPBMs do tipo Cu@AgNP por rota de síntese química com polivinilpirrolidona (PVP). Asghar et al., 2018 descreve a síntese de NPMs por via de síntese verde, mas apenas de NPMMs demonstrando separadamente a síntese de NPMs de AgNO_3 e CuSO_4 com extratos de folhas de chá preto. Dessa forma foi importante verificar o comportamento da combinação reacional de AgNO_3 e CuSO_4 quando incubados com os extratos vegetais formando NPBMs a partir de rota de síntese verde.

As Ag@CuNPs tiveram os resultados comparados com as AgNPs equivalentes (mesmos acessos) em gráficos que serão demonstrados a seguir. A Figura 8 demonstra o

resultado da síntese de Ag@CuNP 600 comparada a AgNP 600. Pode-se observar que a AgNP 600 tem uma absorbância maior no comprimento de onda de 450 nm se comparada a Ag@CuNP 600.

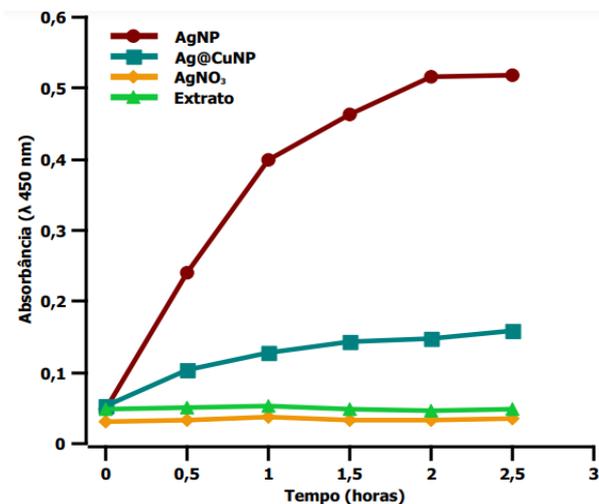


Figura 8: Cinética de formação de nanopartículas bimetálicas Ag@CuNP obtidas por síntese verde a partir do extrato aquoso de planta do acesso Cucurbita 600. O monitoramento das reações de síntese foi realizado por espectrofotometria no comprimento de onda de 450 nm em função do tempo em horas.

A Figura 9 ilustra as curvas de formação de Ag@CuNP 699 e AgNP 699 comparando as curvas entre as NPMs e os controles de extrato e de solução de AgNO₃. É possível observar, analisando o gráfico, que apesar de ter apresentado valor maior por volta de 1,5 h, a AgNP 699 teve absorbância final similar àquela observada para a Ag@CuNP 699.

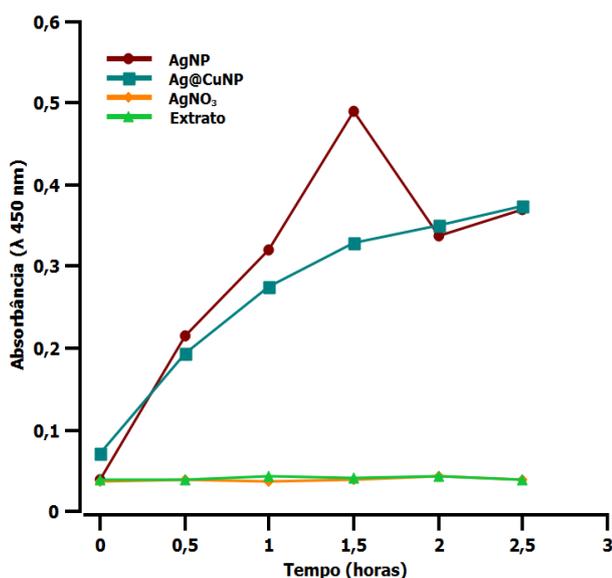


Figura 9: Cinética de formação de nanopartículas bimetálicas Ag@CuNP obtidas por síntese verde a partir do extrato aquoso de plantas do acesso Cucurbita 699. O monitoramento das reações de síntese foi realizado por espectrofotometria no comprimento de onda de 450 nm em função do tempo em horas.

Adicionalmente, a Ag@CuNP 699 teve maior absorbância se comparada a Ag@CuNP 600. Apesar da AgNP 699 ter apresentado similaridade de absorbância no ponto final, de modo geral as demais AgNPs tiveram suas curvas de formação durante as reações de síntese com valores superiores àquelas observados para as Ag@CuNPs. Apesar de ter uma melhor síntese na forma de AgNPs, o acesso 600 teve sua absorbância reduzida se comparada as demais. Banik et al., 2018 relatam que para NPMs a proporção de cada solução de íons metálicos que é adicionada confere uma curva de síntese diferente devido à propriedade de fluorescência individual ou combinada que as diferentes NPMs podem ter. A partir disso pode-se inferir que os potenciais de síntese além de estarem relacionados aos diferentes extratos, como mencionado anteriormente, também estão intimamente ligados à quantidade de solução de íons metálicos que foi disponibilizada para a formação de cada NPM. As Figuras 10, 11 e 12 demonstram os resultados das Ag@CuNP com relação às AgNPs nos demais acessos testados.

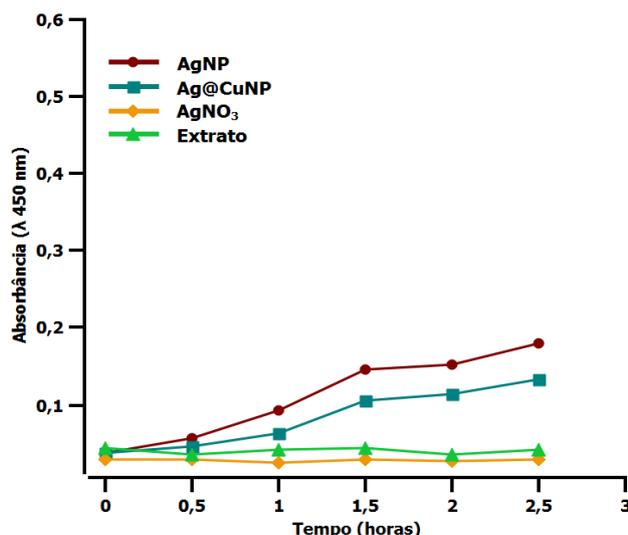


Figura 10: Cinética de formação de nanopartículas bimetálicas Ag@CuNP obtidas por síntese verde a partir do extrato aquoso de plantas do acesso Cucurbita 2924. O monitoramento das reações de síntese foi realizado por espectrofotometria no comprimento de onda de 450 nm em função do tempo em horas.

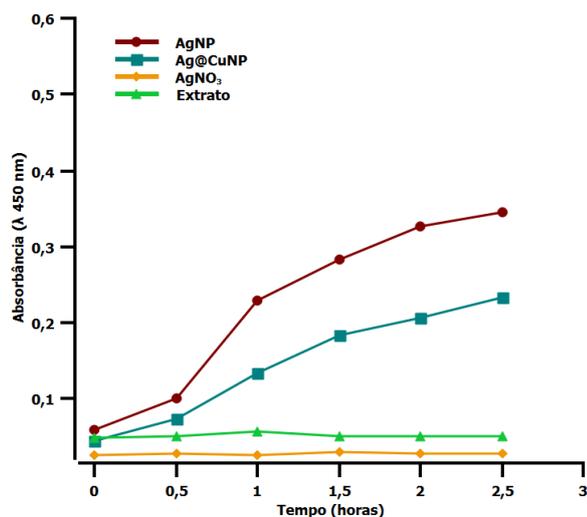


Figura 11: Cinética de formação de nanopartículas bimetálicas Ag@CuNP obtidas por síntese verde a partir do extrato aquoso de plantas do acesso Cucurbita 1582. O monitoramento das reações de síntese foi realizado por espectrofotometria no comprimento de onda de 450 nm em função do tempo em horas.

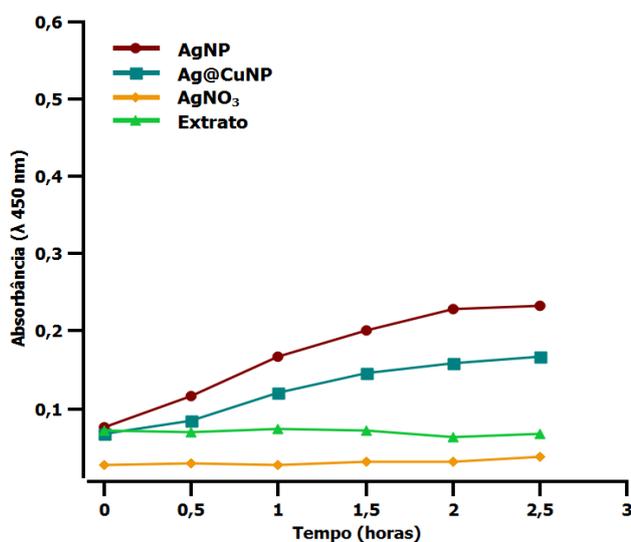


Figura 12: Cinética de formação de nanopartículas bimetálicas Ag@CuNP obtidas por síntese verde a partir do extrato aquoso de plantas do acesso Cucurbita 457. O monitoramento das reações de síntese foi realizado por espectrofotometria no comprimento de onda de 450 nm em função do tempo em horas.

Os resultados sugerem que a associação de íons prata após a síntese de CuNPs diminui o potencial de síntese das NPMs e é possível inferir que isso está associado ao fato do baixo potencial de síntese da CuNPs. A partir da inspeção visual da CuNPs observou-se que o aspecto translúcido das amostras que, ao adicionar a AgNO₃ torna a coloração mais translúcida e conseqüentemente com menor absorbância final.

Durante o período de síntese da AgNPs e de Cu@AgNPs observou-se visualmente uma mudança na coloração da solução de translúcido para marrom, o que indica a formação de NPMs. As colorações das suspensões de AgNPs ficaram levemente mais escuras, mas

pode-se observar que as curvas de síntese as AgNPs tiveram valores de absorbância maiores do que a Ag@CuNPs em que a coloração ficou amarelada, confirmando que a síntese está correlacionada com o aspecto visual das amostras. Com relação a CuNPs não houve mudança de coloração como é observado na Figura 15 em que se pode perceber visualmente a diferença entre a coloração das partículas obtidas.

A síntese pode ser observada pelas Figuras 13 e 14 que representam as curvas de formação caracterizadas pelo aumento da absorbância em comprimento de onda de 450 nm para AgNP e Ag@CuNP e em 630nm para CuNP e Cu@AgNP em decorrência do tempo em horas das NPMs de Cucurbita 1582. De acordo com a literatura, o potencial de síntese do extrato e a eficiência das NPMs formadas dependem da interação entre os constituintes bioquímicos da planta e a interação com os íons metálicos (Kumar et al., 2010).

Isso explica os diferentes resultados na síntese das NPMs demonstradas nas Figuras 13 e 14, pois apesar de terem os mesmos constituintes bioquímicos da planta devido ao extrato ser do mesmo acesso (1582), a interação é dependente da exposição ao íon metálico que variou entre CuSO_4 e AgNO_3 além do efeito sinérgico entre os dois íons quando associados na formação das NPBMs.

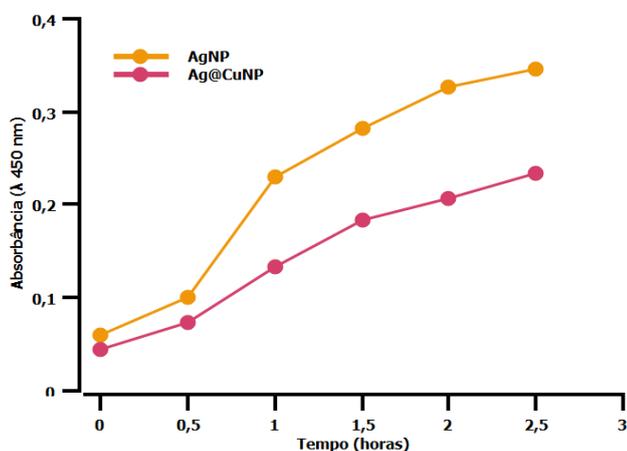


Figura 13: Cinética de formação de nanopartículas de prata (AgNP) e nanopartículas bimetálicas (Ag@CuNP) obtidas por síntese verde a partir do extrato aquoso de plantas do acesso Cucurbita 1582 . O monitoramento das reações de síntese foi realizado por espectrofotometria no comprimento de onda de 450 nm em função do tempo em horas.

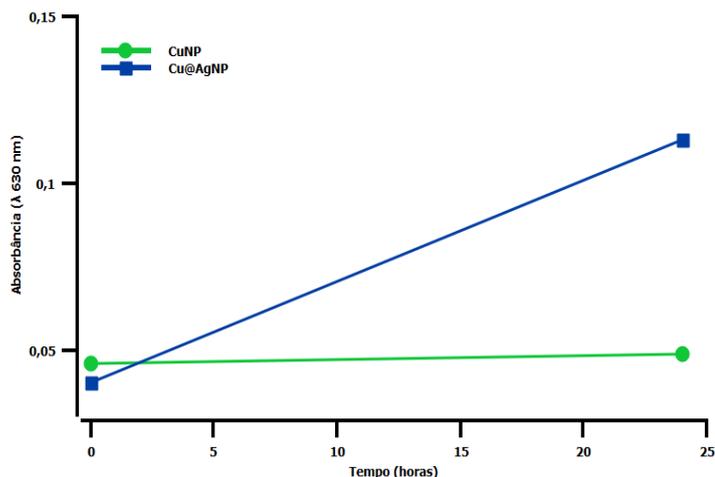


Figura 14: Curva de síntese de nanopartículas de cobre (CuNP) e nanopartículas bimetálicas (Cu@AgNP) obtidas por síntese verde a partir do extrato aquoso de plantas do acesso Cucurbita 1582. O monitoramento das reações de síntese foi realizado por espectrofotometria no comprimento de onda de 630 nm em função do tempo em horas.

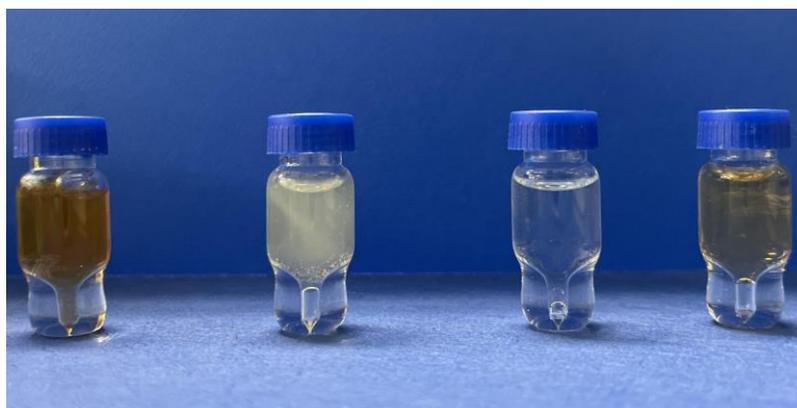


Figura 15: Suspensões coloidais de nanopartículas metálicas. Da esquerda para direita: Nanopartículas de prata (AgNP 600), nanopartículas de prata e cobre (Ag@CuNP 600), nanopartículas de cobre (CuNP 600) e nanopartículas de cobre e prata (Cu@AgNP 600).

O potencial de síntese das NPMs potencialmente revestidas por íons cobre oriundos de CuSO_4 , classificadas no estudo como Cu@AgNPs não foi tão expressivo. Pode-se inferir uma reação não significativa com os resultados da interação dos íons cobre com as biomoléculas provenientes dos acessos de Cucurbita, visto que as CuNPs não tiveram formação expressiva. Na análise do gráfico demonstrado na Figura 16, é possível perceber que algumas curvas tiveram decaimento durante o período de síntese o que demonstra uma possível alteração do ambiente reacional de modo inesperado ou de uma interação com biomoléculas presentes nos extratos de Cucurbita levando à formação de um complexo que não era nanoparticulado.

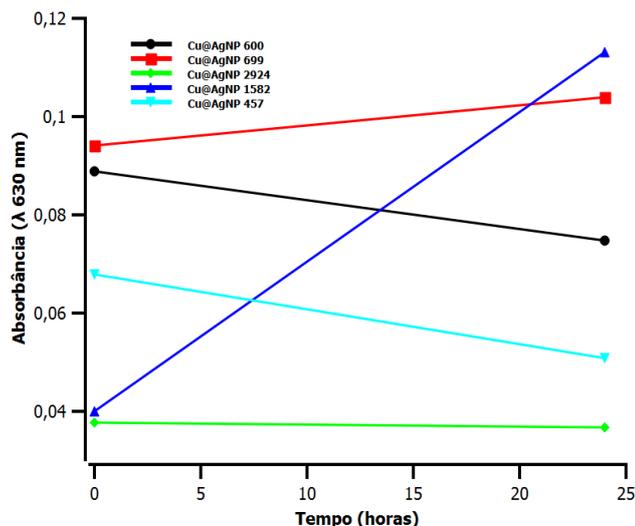


Figura 16: Curva de sínteses de nanopartículas bimetálicas Cu@AgNP obtidas por síntese verde a partir de diferentes extratos aquosos de plantas de acessos de Cucurbita (457, 600, 690, 2924 e 1582). O monitoramento da síntese foi realizado por espectrofotometria no comprimento de onda de 630 nm em função do tempo em horas.

O potencial de síntese de cada NPM sendo elas monometálicas (AgNPs e CuNPs) ou bimetálicas (Ag@CuNP e Cu@AgNP) variou de acordo com a interação das biomoléculas de cada acesso com as soluções iônicas sendo elas de nitrato de prata (AgNO_3) e sulfato de cobre (CuSO_4) adicionados de maneira isolada ou combinados.

4.2. Diâmetros hidrodinâmicos, índices de polidispersividade e potenciais Zeta das NPMs

A metodologia de DLS fornece informações quanto ao diâmetro hidrodinâmico (DH) das partículas em suspensão por meio do espalhamento de luz. Uma determinada partícula suspensa em meio líquido forma uma camada de solvatação ao seu redor. Assim, a medida do DH permite estimar um valor incluindo essa camada de solvatação e por isso pode ser um valor impreciso se comparado a técnicas que permitem determinar o diâmetro seco médio, como a MFA. As análises por DLS também fornecem informações sobre o índice de polidispersividade (PdI) das partículas medidas. O PdI avalia a dispersão dos tamanhos das NPs em uma amostra com relação a sua distribuição por intensidade, sua medida varia de 0 a 1 sendo que quanto menor o seu valor menos heterogêneo é a amostra, ou seja, mais próxima de monodispersa (Albernaz, 2014).

Além dos parâmetros de DH (Z-Ave) e PdI obtidos por DLS, comumente pode ser realizado paralelamente a medida quanto a mobilidade eletroforética fornecendo informações sobre o potencial Zeta (PZ) de superfície das NPs. Esses valores se referem à bicamada elétrica que recobre cada partícula o que se relaciona com a estabilidade coloidal da partícula

com base no valor das cargas em milivolts, sendo que quanto maior esse valor em módulo, maior é a repulsão eletrostática entre as partículas e, conseqüentemente, menor a tendência de agregação entre elas (Neumann et al., 2002).

Foram comparados os resultados obtidos por DLS com base nos parâmetros descritos anteriormente. Para cada acesso foram realizadas as leituras e comparados os resultados de acordo com o tipo de NPMs, sendo elas AgNPs, CuNPs, Cu@AgNPs e Ag@CuNPs.

A Figura 17 apresenta os valores referentes às médias e desvios padrão da média de três leituras independentes em DLS- Zeta de acordo com cada extrato utilizado na síntese das AgNPs. A AgNP 2924 apresentou o menor DH médio com $90,00 \pm 4,10$ nm e o maior da AgNP 457 com $1705,00 \pm 45,00$ nm, sendo ambos os valores maiores em relação ao apresentado em estudo realizado por Araujo et al., 2020 em que ao final da síntese de AgNPs com extrato de casca de banana o DH médio foi de $33,60 \pm 7,50$ nm essa diferença pode ser justificada pela interação entre íons prata e as biomoléculas que variam de acordo com cada extrato utilizado.

A AgNP 600 teve o menor PDI dentre as AgNPs, com o valor em $0,442 \pm 0,021$ sendo então, entre as AgNPs a menos polidispersa. Em estudo realizado por Guimarães et al. a ação estabilizante de um óleo essencial equilibrou o crescimento de AgNP pela estabilização eletrostática da dupla camada elétrica na superfície das AgNPs, conseqüentemente diminuindo o PDI. Pode-se sugerir que para a AgNP 600 o extrato de Cucurbita 600 pode apresentar também essa ação estabilizante por meio das biomoléculas presentes nesta planta.

Por ter seu maior valor em módulo de PZ com $-32,5 \pm 0,7$ mV, a AgNP 457 demonstrou ter maior estabilidade coloidal, visto que, quanto maior esse valor em módulo, maior a repulsão eletrostática e menor a tendência à agregação entre as partículas. Todos os valores de PZ para as AgNPs foram negativos, já haviam sido retratados em estudo realizado por Araujo et al. em que NPMs de casca de banana tiveram o PZ para AgNPs de -11 mV.

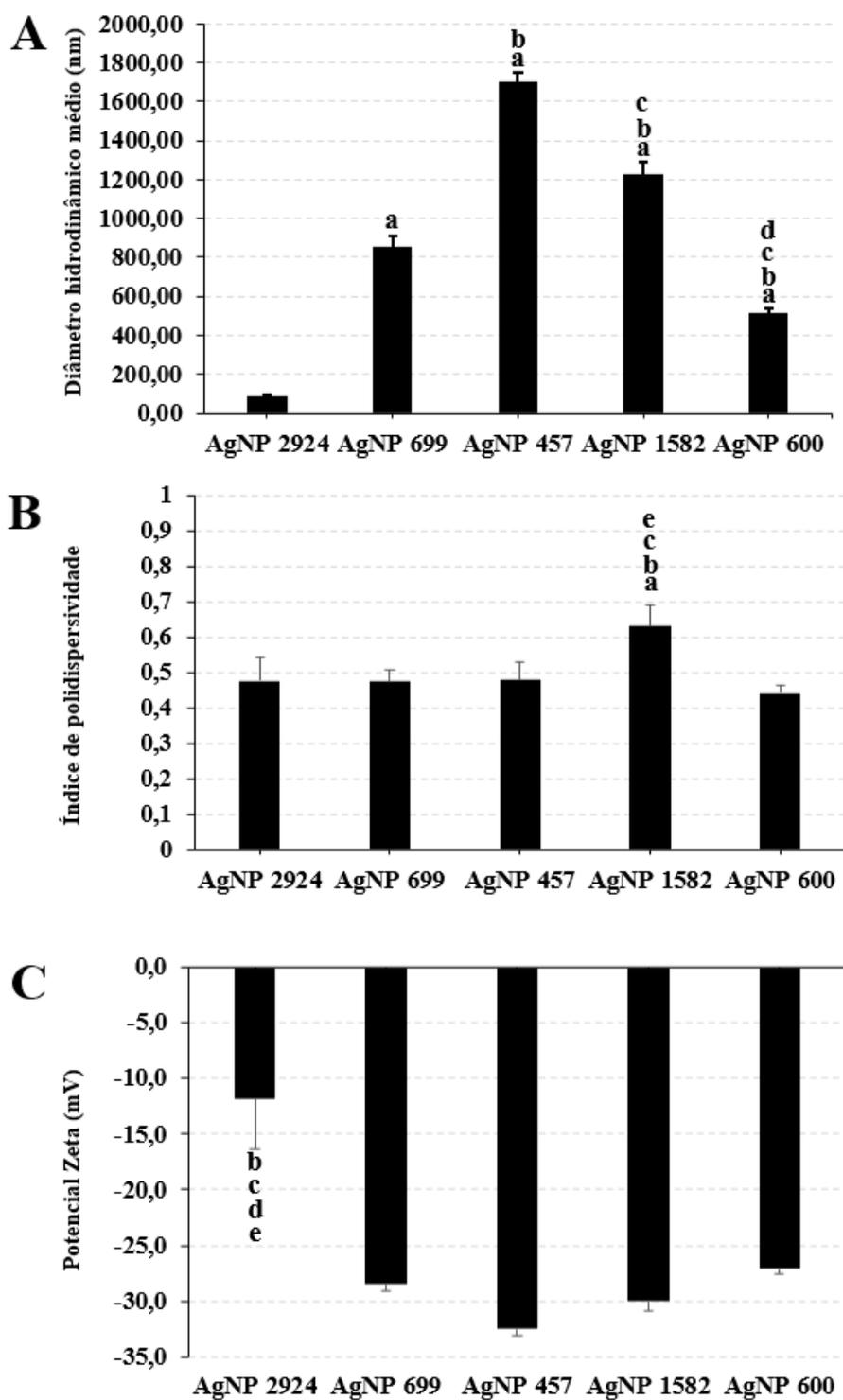


Figura 17: Características físico-químicas das nanopartículas de prata (AgNP) obtidas por rotas de síntese verde utilizando extratos aquosos obtidos a partir de plantas do acesso Cucurbita 2924, Cucurbita 699, Cucurbita 457, Cucurbita 1582 e Cucurbita 600. Os gráficos representam os resultados de (A) Diâmetro médio (Z-Ave), (B) Índice de polidispersividade (PdI) e (C) Potencial Zeta (PZ). Valores referentes às médias e desvios padrão da média de três leituras independentes. Diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) em relação a nanopartícula AgNP 2924 (a), AgNP 699 (b), AgNP 457 (c), AgNP 1582 (d) e AgNP 600 (e).

Xie et al., 2022 demonstraram a síntese de CuNPs por rota de síntese verde com extratos de *Tragopogon collinus*, sendo que os resultados de caracterização apresentaram DH em 83,31 nm, PZ de -39,91 mV e PdI de 0,193. Quando comparado as CuNPs com os acessos de *Cucurbita* é possível observar que os valores obtidos, demonstrados na Figura 18 são maiores do que os relatados no estudo com *T. collinus* e, quando comparados entre si, os resultados para parâmetros de caracterização são diferentes entre os cinco acessos de *Cucurbita* utilizados na síntese das CuNPs. Tais resultados podem ser explicados pela diversidade na classe de biomoléculas presentes nos extratos e sua interação com os íons metálicos, indicando assim as diferentes características de cada acesso com base nos seus componentes que atuam como agentes biorredutores.

A Figura 18 mostra as características físico-químicas das CuNPs obtidas por rota de síntese verde em que representa na Figura 18 A os valores de Z-Ave, em Figura 18 B o PdI e em Figura 18 C o PZ das CuNPs produzidas a partir de cada acesso, sendo eles Cucurbita 2924, Cucurbita 699, Cucurbita 457, Cucurbita 1582 e Cucurbita 600.

Em Z-Ave, todas as CuNPs demonstraram ser estatisticamente diferentes entre si ($P < 0,05$), dentre as cinco CuNPs sintetizadas a CuNP 457 demonstrou maior valor em $709,40 \pm 25,84$ nm; enquanto CuNP 699 demonstrou o menor com $385,00 \pm 10,56$ nm. O PdI das cinco CuNPs não teve variação significativa tendo os valores obtidos na faixa de $0,377 \pm 0,028$ e $0,543 \pm 0,026$. O PZ de todas as CuNPs foi negativo variando entre $-26,9 \pm 0,85$ mV para CuNP 457 e $-6,78 \pm 1,83$ mV para CuNP 2924.

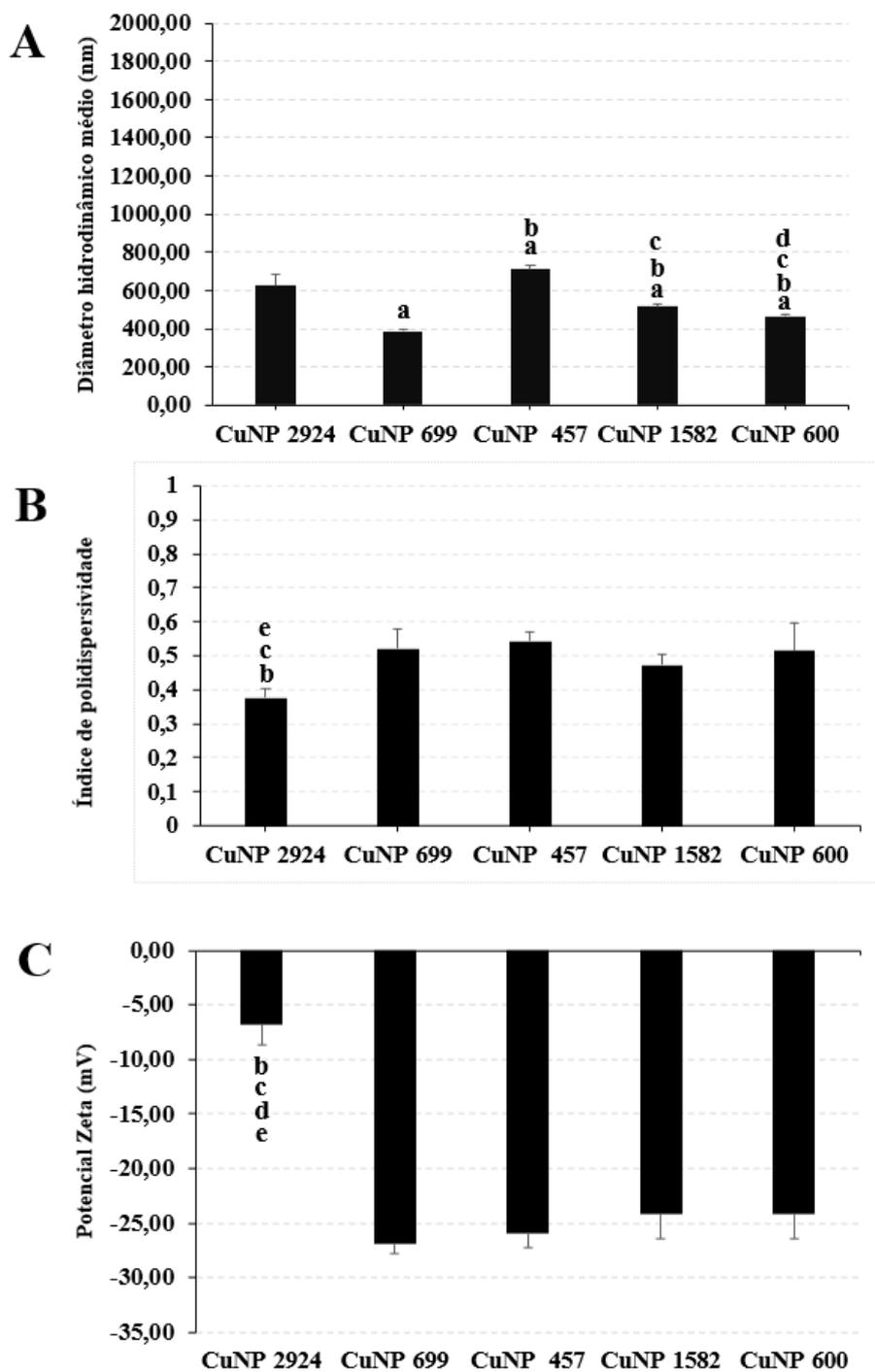


Figura 18: Características físico-químicas das nanopartículas de cobre (CuNP) obtidas por rotas de síntese verde utilizando extratos aquosos obtidos a partir de plantas do acesso Cucurbita 2924, Cucurbita 699, Cucurbita 457, Cucurbita 1582 e Cucurbita 600. Os gráficos representam os resultados de (A) Diâmetro médio (Z-Ave), (B) Índice de polidispersividade (PdI) e (C) Potencial Zeta (PZ). Valores referentes às médias e desvios padrão da média de três leituras independentes. Diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) em relação a nanopartícula CuNP 2924 (a), CuNP 699 (b), CuNP 457 (c), CuNP 1582 (d) e CuNP 600 (e).

Em estudo recente Banik et al., 2018 sintetizaram e caracterizaram NPBMs do tipo Cu@AgNP. Na caracterização das NPBMs obtiveram um resultado de PZ em -20 mV, partículas com formato esférico e DH em 100 ± 10 nm. Os resultados obtidos na caracterização das NPBMs, do tipo Ag@CuNP e Cu@AgNP, sintetizadas com acessos de *Cucurbita* quando comparadas ao estudo de Banik et al., 2018 mostraram similaridade de carga, que não teve variação significativa em valor, mas quando comparadas em tamanho demonstraram maior Z-Ave.

A diferença entre os valores obtidos na caracterização das Cu@AgNPs sintetizadas a partir de extratos obtidos de plantas de diferentes acessos de *Cucurbita* e as NPBMs do tipo Cu@AgNP demonstradas no estudo de Banik et al., 2018 pode ser decorrente das diferenças entre as rotas de síntese utilizadas nos estudos. Visto que, em rota de síntese verde a diversidade de biomoléculas interage com íons metálicos, e na rota química a redução é realizada por um componente químico, e em consequência o produto da síntese e suas características podem ser diferentes.

Na Figura 19 são apresentados os resultados das características físico-químicas das Ag@CuNPs, sendo que na Figura 19 A os resultados de Z-Ave variaram estatisticamente ($P < 0,05$) entre $251,80 \pm 0,87$ nm para Ag@CuNP 600 e $1084,00 \pm 57,55$ nm para Ag@CuNP 2924; na Figura 19 B mostra-se o PdI variando entre $0,245 \pm 0,005$ para Ag@CuNP 600 e $0,596 \pm 0,033$ para Ag@CuNP 2924; já na Figura 19 C o PZ que teve a sua variação entre $-25,50 \pm 0,56$ mV para Ag@CuNP 457 e $-16,80 \pm 1,82$ mV para Ag@CuNP 2924.

Na Figura 20 A estão os resultados de Z-Ave, sendo que a Figura 20 B apresenta o PdI e a Figura 20 C o PZ para as Cu@AgNPs. O Z-Ave variou estatisticamente ($P < 0,05$) entre $483,90 \pm 6,42$ nm para Cu@AgNP 600 e $1229,00 \pm 185,40$ nm para Cu@AgNP2924, o PdI em $0,336 \pm 0,013$ para Cu@AgNP 600 e $0,689 \pm 0,138$ para Cu@AgNP 1582 e o PZ teve a sua variação entre $-28,20 \pm 0,17$ mV para Cu@AgNP 1582 e $-11,90 \pm 1,43$ mV para Cu@AgNP 2924.

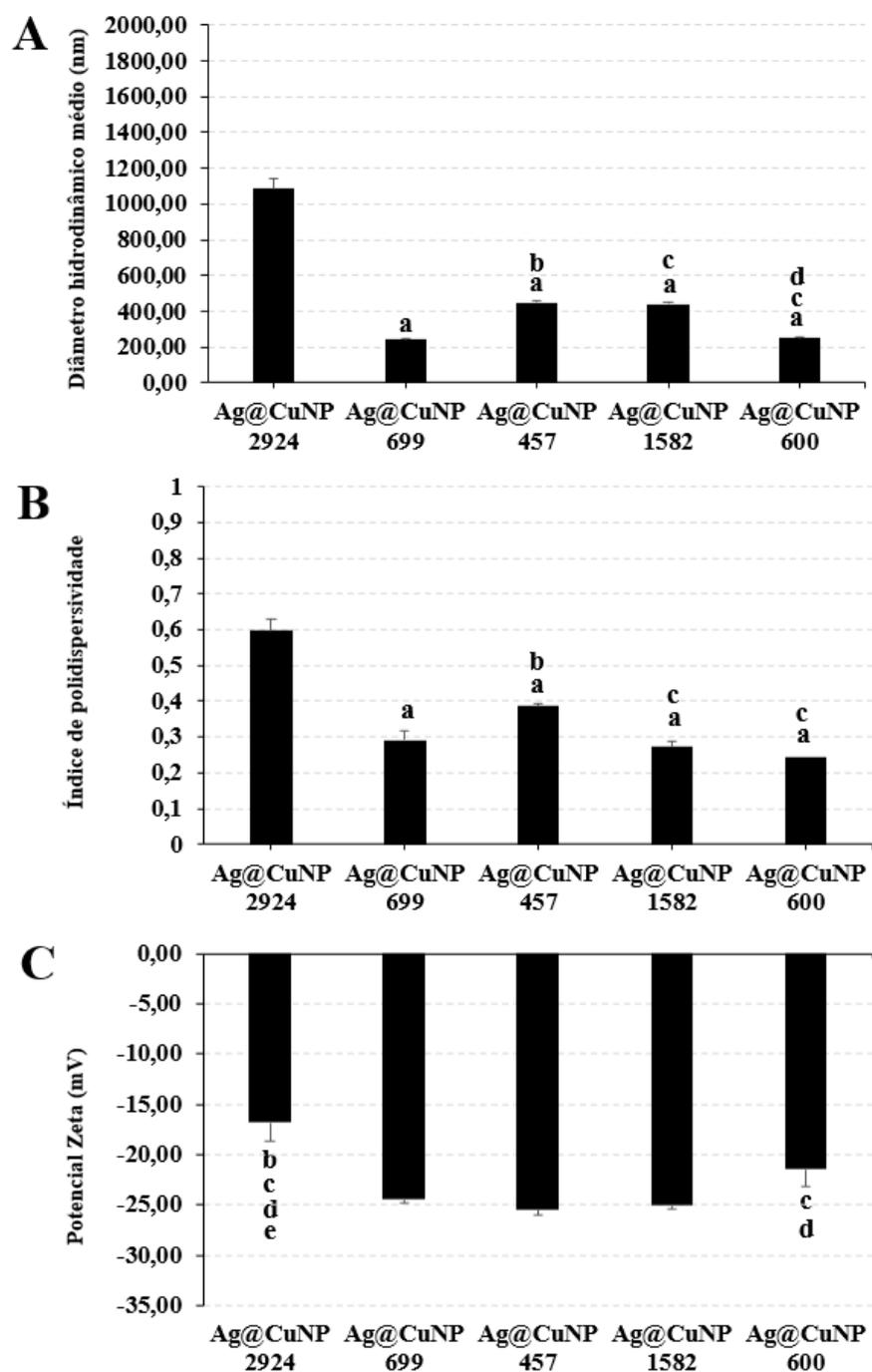


Figura 19: Características físico-químicas das nanopartículas bimetálicas do tipo Ag@CuNP obtidas por rotas de síntese verde utilizando extratos aquosos obtidos a partir de plantas do acesso Cucurbita 2924, Cucurbita 699, Cucurbita 457, Cucurbita 1582 e Cucurbita 600. Os gráficos representam os resultados de (A) Diâmetro médio (Z-Ave), (B) Índice de polidispersividade (PdI) e (C) Potencial Zeta (PZ). Valores referentes às médias e desvios padrão da média de três leituras independentes. Diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) em relação a nanopartícula Ag@CuNP 2924 (a), Ag@CuNP 699 (b), Ag@CuNP 457 (c), Ag@CuNP 1582 (d) e Ag@CuNP 600 (e).

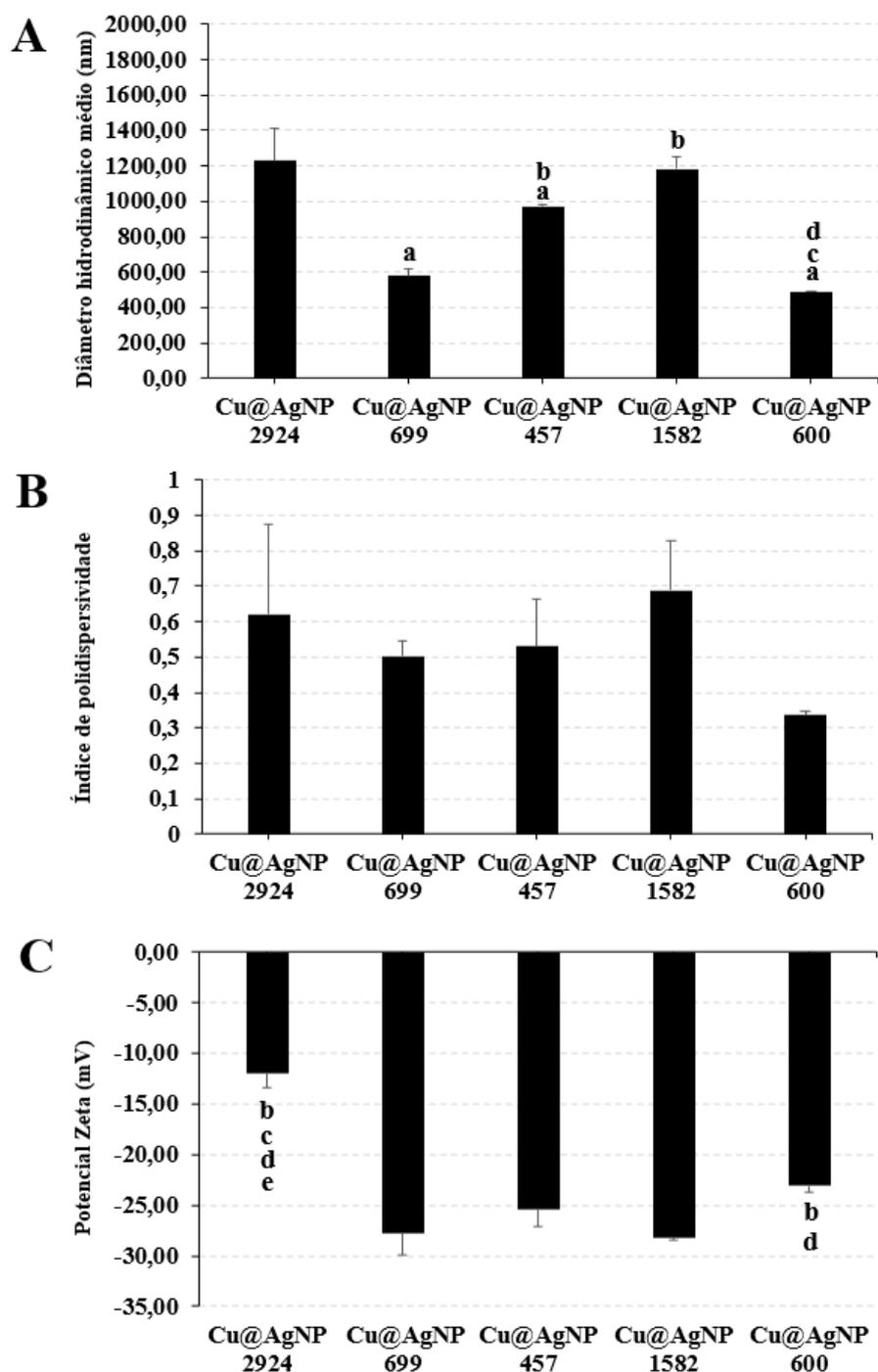


Figura 20: Características físico-químicas das nanopartículas bimetálicas do tipo Cu@AgNP obtidas por rotas de síntese verde utilizando extratos aquosos obtidos a partir de plantas do acesso Cucurbita 2924, Cucurbita 699, Cucurbita 457, Cucurbita 1582 e Cucurbita 600. Os gráficos representam os resultados de (A) Diâmetro médio (Z-Ave), (B) Índice de polidispersividade (PdI) e (C) Potencial Zeta (PZ). Valores referentes às médias e desvios padrão da média de três leituras independentes. Diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) em relação a nanopartícula Cu@AgNP 2924 (a), Cu@AgNP 699 (b), Cu@AgNP 457 (c), Cu@AgNP 1582 (d) e Cu@AgNP 600 (e).

4.3. Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Para a síntese de NPBMs como descrito no item 3.6. foi utilizada a mesma quantidade de extrato aquoso das plantas de cada acesso que nas NPMs e, por conta da maior quantidade de solução iônica adicionada, sendo elas de CuSO_4 e AgNO_3 , a concentração final das NPBMs foi de 0,6 mM enquanto das NPMs foi de 1 mM. As quantidades adicionadas foram as mesmas com o intuito de não condicionar as reações de síntese em um cenário ideal e verificar o potencial de síntese e atividade biológica dos extratos testados.

Essa diferença na concentração não interferiu nos resultados de CIM que foram ajustados para as concentrações efetivamente testadas. A AgNP 1582 e AgNP 699 inibiram o crescimento de *E.coli* após 72 h na concentração de 128 μM e de *S. aureus* em 256 μM . Não foi observada atividade antibacteriana para nenhuma das CuNPs sintetizadas. Em contrapartida quando em associação com AgNPs formando Ag@CuNP ou Cu@AgNP, estas NPBMs tiveram atividade antibacteriana sendo, Ag@CuNP 699 e Ag@CuNP 1582 com atividade bactericida em *E.coli* e *S. aureus* na concentração de 128 μM . Ao associar CuSO_4 e AgNO_3 na formação das Ag@CuNPs obtiveram nas Ag@CuNP 699 e 1582 atividade antibacteriana em 128 μM para *S. aureus*, sendo mais expressiva até mesmo do que a atividade de AgNP produzidas com o mesmo acesso. É possível inferir que houve um efeito sinérgico na atividade da NPBM, melhorando o resultado da atividade em *S. aureus* se comparada às demais NPMs sintetizadas.

Cada acesso representa uma espécie do gênero *Cucurbita*. Em pesquisa realizada na Plataforma Alelo Recursos Genéticos foi identificado que a espécie referente ao acesso 1582 é referente à abóbora *Cucurbita moschata*, sendo essa espécie foi documentada como apresentando um grande teor de fenólicos totais e potencial antioxidante (Guimarães et al., 2019), o que pode explicar o melhor desempenho na avaliação da CIM contra bactérias nas NPMs obtidas com esse acesso.

Na Tabela 2 estão os resultados de AgNP para cada acesso testado tanto para *E. coli* quanto para *S. aureus*. Ao analisar a tabela é possível perceber que AgNP 699 e AgNP 1582 tiveram efeito antibacteriano com CIM para *E. coli* na concentração de 128 μM e *S. aureus* na concentração de 256 μM .

Tabela 2: Concentração inibitória mínima (CIM) das nanopartículas de prata (AgNP) contra as bactérias *Escherichia. coli* e *Staphylococcus. aureus*. Valores representados a condição na qual ocorreu a inibição em pelo menos duas réplicas. - : Nenhuma Atividade.

	Concentração (μM)	
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
AgNP 600	-	-
AgNP 699	128	256
AgNP 2924	-	-
AgNP 1582	128	256
AgNP 457	-	-

Para as Ag@CuNP, as NPBMs produzidas com os extratos aquosos de plantas dos acessos 699 e 1582 tiveram CIM de 128 μM para ambas as bactérias testadas, enquanto o acesso 2924 teve CIM de 256 μM para *E. coli*, conforme mostra a Tabela 3.

Tabela 3: Concentração inibitória mínima (CIM) das nanopartículas bimetálicas (Ag@CuNPs) contra as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Valores representados a condição na qual ocorreu a inibição em pelo menos duas réplicas. - : Nenhuma Atividade.

	Concentração (μM)	
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
Ag@CuNP 600	-	-
Ag@CuNP 699	128	128
Ag@CuNP 2924	256	-
Ag@CuNP 1582	128	128
Ag@CuNP 457	-	-

Os resultados das NPBMs Cu@AgNP demonstraram que tanto o acesso 699 quanto o acesso 1582 tiveram CIM de 256 μM para as duas bactérias e foram os únicos acessos com atividade antibacteriana nas NPMs do tipo Cu@AgNP, como consta na Tabela 4.

Tabela 4: Concentração inibitória mínima (CIM) das nanopartículas bimetálicas (Cu@AgNPs) contra as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Valores representados a condição na qual ocorreu a inibição em pelo menos duas réplicas. - : Nenhuma Atividade

	Concentração (µM)	
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
Cu@AgNP 600	-	-
Cu@AgNP 699	256	256
Cu@AgNP 2924	-	-
Cu@AgNP 1582	256	256
Cu@AgNP 457	-	-

Após análise dos resultados de CIM das NPMs produzidas com os acessos testados sendo elas NPMMs ou NPBMs é possível inferir que houve um efeito sinérgico entre cobre e prata quando associados na forma de NPBMs.

Ag@CuNP 699 e a Ag@CuNP 1582 tiveram os mesmos resultados de CIM em ambas as bactérias testadas. Com relação ao parâmetro de DLS Ag@CuNP 699 teve um menor Z-Ave e por isso foi a NPM selecionada para ensaio de microscopia de força atômica a fim de comparar os resultados de DH médio (Z-Ave) com o seu diâmetro seco, além de avaliar a forma das NPs.

4.4. Microscopia de Força Atômica (MFA)

Sempre que houver a necessidade de dispersar ou aglomerar partículas em líquidos, ou para transportar as partículas de um lugar para outro, há a necessidade de compreender a maneira como as partículas se comportam e como o líquido modifica esse comportamento (Hodges, 2002).

Como maneira de compreender esse comportamento por meio da investigação morfológica qualitativa e quantitativa, a MFA proporciona medidas de das características de superfície de maneira notável. Para a realização dessa técnica foi selecionada Ag@CuNP 699 por ter seu menor Z-ave entre as NPMs que tiveram a melhor resposta com relação à atividade antibacteriana na realização do ensaio de CIM. A Figura 21 mostra uma imagem

representativa obtida por MFA da Ag@CuNP 699, onde é possível notar que as NPMs em sua maioria têm formato esférico. O diâmetro seco da Ag@CuNP 699 em MFA foi de $82,76 \pm 27,05$ nm que corresponde à altura média da partícula, quando comparado ao diâmetro hidrodinâmico médio de 251,2 d.nm. Conforme descrito no estudo realizado em 2015 por Popiolski quanto mais clara é a região, maior é a altura do ponto observado. Em estudo prévio, Kokila et al. demonstraram que quanto menor o PDI e menor Z-Ave, maior é o potencial antimicrobiano, os resultados obtidos pela Ag@CuNP 699 vão de encontro ao estudo, visto que, sua CIM após 72 h foi de 128 μ M tanto para *E. coli* quanto para *S. aureus* sendo, dentre as demais nanopartículas, a melhor em CIM e dentre as bimetálicas a com o menor Z-Ave.

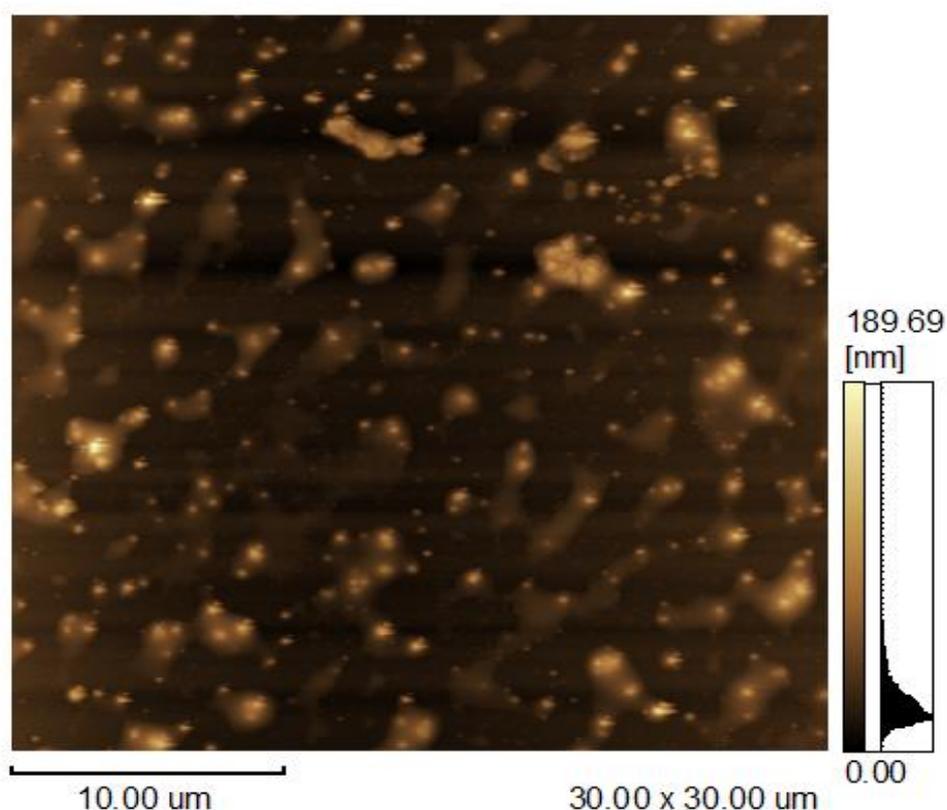


Figura 21: Imagem obtida por microscopia de força atômica em modo dinâmico da suspensão coloidal de Ag@CuNP 699.

5. Conclusão

No presente estudo foram sintetizados quatro diferentes tipos de NPMs sendo elas monometálicas (AgNPs e CuNPs) e bimetálicas (Ag@CuNP e Cu@AgNP) a partir de cinco diferentes extratos aquosos de plantas do gênero *Cucurbita*. As biomoléculas presentes nos extratos de *Cucurbita* foram responsáveis pela biorredução dos íons metálicos para formação das NPMs sendo cada acesso vegetal responsável por determinar as características finais das NPs devido à variabilidade de compostos presentes em cada extrato.

Os processos de síntese utilizados estão de acordo com os princípios de química verde sendo uma alternativa de baixo custo e ecoamigável. As reações de síntese foram realizadas com monitoramento de acordo com cada protocolo e as partículas caracterizadas de acordo com parâmetros de DLS, tendo como resultado mais expressivo, entre as partículas sintetizadas, considerando as características físico-químicas, o Z-Ave da AgNP 2924 com valor de 86,68 d.nm sendo o menor entre as NPMs sintetizadas, o maior PZ em módulo foi AgNP 457, ou seja, com menor potencial de agregação entre as partículas, já o menor PDI foi 0,250 na Ag@CuNP 600.

Foram realizados ensaios de CIM em que as NPMs com melhor desempenho foram Ag@CuNP 699 e Ag@CuNP 1582 demonstrando efeito sinérgico quando o cobre está associado à prata visto que quando em forma de CuNPs não teve atividade antimicrobiana para nenhuma das bactérias testadas.

O desempenho da Ag@CuNP 699 vai de encontro a estudos realizados em que o potencial antimicrobiano das NPMs está associado ao seu tamanho, visto que, sua concentração inibitória mínima após 72 h foi de 128 μ M tanto para *E. coli* quanto para *S. aureus* sendo, dentre as demais NPMs, a melhor em CIM e dentre as bimetálicas a com o menor Z-Ave que corresponde ao diâmetro médio da partícula.

Dessa forma é possível concluir que os diferentes acessos de plantas do gênero *Cucurbita* utilizados para as sínteses tem influência direta com as características físico-químicas que as NPMs apresentaram devido aos distintos e variados compostos orgânicos presentes em cada um dos acessos de *Cucurbita*. Além dos compostos orgânicos, o sal metálico no qual atua como agente oxidante durante a síntese também influencia nas características das NPMs por conta da interação com os compostos orgânicos e pode alterar a taxa de síntese das NPMs por meio de seu potencial oxidante.

Foi possível observar um efeito sinérgico entre cobre e prata quando associados aos compostos orgânicos de cada acesso de Cucurbita para formar NMPs visto que no ensaio de CIM obtiveram efeito bactericida a Ag@CuNP 699, Ag@CuNP 1582, Cu@AgNP 699 e Cu@AgNP 1582 quando comparadas as CuNPs que não tiveram efeito bactericida em nenhuma concentração após as 72 h de ensaio.

6. Referências

AGBO, E. *et al.* Isolation and Analysis of the Biological Characteristics of a Novel Bacteriophage vB_SauP_P992 Against *Staphylococcus aureus*. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 15, n. 3, 1 mar. 2022.

AHAMED, M. *et al.* **Silver nanoparticle applications and human health**. **Clinica Chimica Acta**, 14 dez. 2010.

ALBERNAZ, V.L. **Síntese verde de nanopartículas de prata com extrato aquoso de folhas de *Brosimum gaudichaudii*, caracterização físicoquímica, morfológica e suas aplicações no desenvolvimento de um nanobiossensor eletroquímico**. 2014. 122 p. Dissertação (Mestrado em Nanociência e Nanotecnologia) Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

ALLHOFF, F. **Nanotechnology & Society**. Springer, Dordrecht. 2009. 3 p.

ANVISA. **Modelo 3: Resistência Microbiana: Mecanismos e Impacto Clínico**. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo3/mec_animacao.htm. Acesso em Nov.2022

ARAUJO, T. F. *et al.* Enzymatic Browning Modulates Properties of Silver Nanoparticles Produced with Banana Peel Extract. **Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials**, v. 30, n. 9, p. 3702–3708, 1 set. 2020.

ARAUJO NETO, L. A. **Desenvolvimento de nanopartículas magnéticas modificadas superficialmente com carboidratos para o cultivo celular de microorganismos**. 2019. 94 p. Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2019.

ASGHAR, M. A. *et al.* Iron, copper and silver nanoparticles: Green synthesis using green and black tea leaves extracts and evaluation of antibacterial, antifungal and aflatoxin B1 adsorption activity. **LWT**, v. 90, p. 98–107, 1 abr. 2018.

ASSUNÇÃO, R. C. **Revestimentos à base de cobre e a sua influência no comportamento das bactérias**. 2018. p 77. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – Engenharia, Universidade da Beira Interior, Covilhã, 2018.

BAKER, S. *et al.* Plants: Emerging as nanofactories towards facile route in synthesis of nanoparticles. **BioImpacts**, 2013.

BANIK, M. *et al.* A simple robust method of synthesis of copper-silver core-shell nanoparticle: Evaluation of its structural and chemical properties with anticancer potency. **Nanotechnology**, v. 29, n. 32, 6 jun. 2018.

BASU, S. *et al.* Optical properties of nanocomposites with iron core-iron oxide shell structure. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 352, n. 5, p. 380–385, 1 maio 2006.

BAYDA, S. *et al.* The history of nanoscience and nanotechnology: From chemical-physical applications to nanomedicine. **Molecules**, 25(1):112, Jan. 2020.

BISWAL, A. K. *et al.* Biosynthesis and characterization of silver nanoparticles for prospective application in food packaging and biomedical fields. **Materials Chemistry and Physics**, v. 250, 1 ago. 2020.

BOWMAN, D. M. Patently obvious: Intellectual property rights and nanotechnology. **Technology in Society**, v. 29, n. 3, p. 307–315, ago. 2007.

BRUNA, T. *et al.* Silver nanoparticles and their antibacterial applications. **International Journal of Molecular Sciences**, 1 jul. 2021.

CHENG, G. *et al.* Antimicrobial drugs in fighting against antimicrobial resistance. **Frontiers in Microbiology** Frontiers Media S.A., 8 abr. 2016.

D’COSTA, V. M. *et al.* Sampling the antibiotic resistome. **Science**, v. 311, n. 5759, p. 374–377, 20 jan. 2006.

DUPUIS, V. *et al.* Magnetic assembled nanostructures from pure and mixed Co-based clusters. **Journal of Physics Condensed Matter**. 9 jun. 2004.

DURÁN, N. *et al.* Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**. Elsevier Inc. 1 abr. 2016.

FABREGA, J. *et al.* Silver nanoparticles: Behaviour and effects in the aquatic environment. **Environment International**. Elsevier Ltd 2011.

FERNANDO, I. *et al.* Impact of pH on the stability, dissolution and aggregation kinetics of silver nanoparticles. **Chemosphere**, v. 216, p. 297–305, 1 fev. 2019.

FORD, C. A. *et al.* Antivirulence Strategies for the Treatment of Staphylococcus aureus Infections: A Mini Review. **Frontiers in Microbiology**. Frontiers Media S.A., 14 jan. 2021.

GAUDRY, M. *et al.* Size and composition dependence in the optical properties of mixed (transition metal/noble metal) embedded clusters. **Physical Review B - Condensed Matter and Materials Physics**, v. 67, n. 15, 25 abr. 2003.

GILROY, K. D. *et al.* Bimetallic nanocrystals: Syntheses, properties, and applications. **Chemical Reviews**, v. 116, n. 18, p. 10414–10472, 28 set. 2016.

GUIMARÃES, A.A. *et al.* Compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante em extrato etanólico de abóbora (*Cucurbita moschata*). **R. Interd.** v.12, n. 3, p.47-53, jul. ago. set. 2019

HARADA, M. *et al.* Catalytic Activity and Structural Analysis of Polymer-Protected Au/Pd Bimetallic Clusters Prepared by the Successive Reduction of H_{Au}C₁₄ and PdCl₂. **J. Phys. Chem.** 1993, 97, 19, 5103–5114

HEIDEN, G. Chave para a identificação das espécies de abóboras (*Cucurbita*, *Cucurbitaceae*) cultivadas no Brasil / Gustavo Heiden, Rosa Lia Barbieri, Raquel Silviana Neitzke. **Embrapa Clima Temperado. Documentos,197**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2007. 31 p.

HODGES, C. S. Measuring forces with the AFM: polymeric surfaces in liquids. **Adv Colloid Interface Sci.** 2002 Sep 16;99(1):13-75.

IRAVANI, S. Green synthesis of metal nanoparticles using plants. **Green Chemistry**, v. 13, n. 10, p. 2638–2650, 10 jan. 2011

JANICK, J. **Horticultural reviews**. Wiley, 2001 Volume 25.

JANUSZEWSKA, A. *et al.* Spontaneous Chemical Ordering in Bimetallic Nanoparticles. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 119, n. 34, p. 19817–19825, 27 ago. 2015.

KEIHAN, A. H *et al.* Green synthesis and characterization of spherical copper nanoparticles as organometallic antibacterial agent. **Applied Organometallic Chemistry**, v. 31, n. 7, 1 jul. 2017.

KHAN, W. Green chemistry. Paquistão. 2022. 9 p.

KIM, J. S. *et al.* Antimicrobial effects of silver nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 3, n. 1, p. 95–101, mar. 2007.

KOKILA, T. *et al.*, Biosynthesis of silver nanoparticles from Cavendish banana peel extract and its antibacterial and free radical scavenging assay: a novel biological approach. **Applied Nanoscience**, 5, 911, Jan. 2015.

KOVÁCS, G. *et al.* Versatile Optimization of Chemical Ordering in Bimetallic Nanoparticles. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 121, n. 20, p. 10803–10808, 25 maio 2017.

KUMAR, V. *et al.* *Syzygium cumini* leaf and seed extract mediated biosynthesis of silver nanoparticles and their characterization. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 85, n. 10, p. 1301–1309, out. 2010.

LIU, X. *et al.* Bimetallic nanoparticles: Kinetic control matters. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 51, n. 14, p. 3311–3313, 2 abr. 2012

MALVERN. Zetasizer Nano Series User Manual. User Manuals, England, 2004. Disponível em: http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/files/Zetasizer_Nano_user_manual_Man0317-1.1.pdf. Acesso em Jun. 2022.

MANSOORI, G. A. *et al.* Nanotechnology-An Introduction for the Standards Community. **Journal of ASTM International**, Chicago, Vol. 2, n. 6, 2(6):1-21, Jun. 2005.

MARTÍNEZ, J. L. *et al.* What is a resistance gene? Ranking risk in resistomes. **Nature Reviews Microbiology**. Nature Publishing Group, 16 Feb. 2015.

MATTOS, E.A. **Compósitos de Fluoretos de Terras Raras em Hidroxipropilmetilcelulose com conversão ascendente intensificada por ressonância plasmônica de superfície**. Dissertação (Mestrado em Química) Instituto de Química, Universidade de São Paulo. São Paulo, p. 85. 2022.

BANIK, M. *et al.* A simple robust method of synthesis of copper–silver core–shell nanoparticle: evaluation of its structural and chemical properties with anticancer potency. **Nanotechnology**. IOP Publishing Ltd, Vol. 29, n. 32, Jun. 2018.

MURRAY, C. J. *et al.* Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. **The Lancet**, v. 399, n. 10325, p. 629–655, 12 fev. 2022.

NIKAIDO, H. Multiple antibiotic resistance and efflux. **Current opinion in microbiology**. vol. 1(5):516-23, Out. 1998.

National Nanotechnology Initiative (NNI). Disponível online: www.nano.gov

OLEKSZYSZEN, D.N. **Avaliação do modo de ação de nanopartículas bimetálicas paládio/cobre em reações de acoplamento do tipo Sonogashira**. Tese (Doutorado em Química - Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2020.

OVAIS, M. *et al.* Biosynthesis of metal nanoparticles via microbial enzymes: A mechanistic approach. **International Journal of Molecular Sciences**. MDPI AG, 2018

PARK, B. *et al.* Hyperspectral microscope imaging methods to classify gram-positive and gram-negative foodborne pathogenic bacteria. **Transactions of the ASABE**, v. 58, n. 1, p. 5–16, 2015.

PENESYAN, A. *et al.* Antibiotic discovery: Combatting bacterial resistance in cells and in biofilm communities. **Molecules**. MDPI AG, 1 abr. 2015.

PERKAMPUS, H.H. UV-VIS Spectroscopy and Its Applications. **Springer**, Berlin Heidelberg, 1992.

PERRY, J. A. *et al.* Forces shaping the antibiotic resistome. **BioEssays**, v. 36, n. 12, p. 1179–1184, 1 dez. 2014.

PLATA, K. *et al.* Staphylococcus aureus as an infectious agent: overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity. **Acta Biochim Pol.** 2009;56(4):597-612. Epub 2009 Dec 11

POIREL, L. *et al.* Antimicrobial Resistance in Escherichia coli. **Microbiology Spectrum**, v. 6, n. 4, 27 jul. 2018.

The European Commission, 2011. **Commission recommendation of 18 October 2011 on the definition of nanomaterial**. Off. J. Eur. Union 696, 38–40

RAJESH, K. M. *et al.* Assisted green synthesis of copper nanoparticles using Syzygium aromaticum bud extract: Physical, optical and antimicrobial properties. **Optik**, v. 154, p. 593–600, 1 fev. 2018.

RAMYADEVI, J. *et al.* Synthesis and antimicrobial activity of copper nanoparticles. **Materials Letters**, v. 71, p. 114–116, 15 mar. 2012.

REIDY, B. *et al.* Mechanisms of silver nanoparticle release, transformation and toxicity: A critical review of current knowledge and recommendations for future studies and applications. **Materials**, v. 6, n. 6, p. 2295–2350, 2013.

REZK, N. *et al.* New formula of the green synthesised Au@Ag core@shell nanoparticles using propolis extract presented high antibacterial and anticancer activity. **AMB Express**, v. 12, n. 1

SAO-JOAO, S. *et al.* Structure and deformations of Pd-Ni core-shell nanoparticles. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 109, n. 1, p. 342–347, 13 jan. 2005.

SHARMA, G. *et al.* Novel development of nanoparticles to bimetallic nanoparticles and their composites: A review. **Journal of King Saud University – Science**. Elsevier B.V., 1 abr. 2019.

SINGH, H. *et al.* Ecofriendly synthesis of silver and gold nanoparticles by *Euphrasia officinalis* leaf extract and its biomedical applications. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, v. 46, n. 6, p. 1163–1170, 18 ago. 2018.

SINGH, P. *et al.* The development of a green approach for the biosynthesis of silver and gold nanoparticles by using *Panax ginseng* root extract, and their biological applications. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, v. 44, n. 4, p. 1150–1157, 18 maio 2016.

SOMMER, M. O. A. *et al.* Functional characterization of the antibiotic resistance reservoir in the human microflora. **Science**, v. 325, n. 5944, p. 1128–1131, 2009.

SOUSA, A. *et al.* Nanopartículas de prata. **Revista de Ciência Elementar**, v. 10, n. 3, 30 set. 2022.

VEISI, H. *et al.* Biosynthesis of CuO nanoparticles using aqueous extract of herbal tea (*Stachys Lavandulifolia*) flowers and evaluation of its catalytic activity. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, 1 dez. 2021.

Xie, L., *et al.* Green fabrication of copper oxide nanoparticles by *Tragopogon collinus* leaf extract: Characterization and exploring their selective anticancer effects against human leukemia cell line, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, Volume 72,2022.

XU, H. *et al.* Role of reactive oxygen species in the antibacterial mechanism of silver nanoparticles on Escherichia coli O157:H7. **BioMetals**, v. 25, n. 1, p. 45–53, fev. 2012.

WANG, S. *et al.* Controlled synthesis of dendritic Au@Pt core-shell nanomaterials for use as an effective fuel cell electrocatalyst. **Nanotechnology**, v. 20, n. 2, 14 jan. 2009.

World Health Organization.(2014).Antimicrobial resistance: global report on surveillance. World Health Organization. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/112642>

WRIGHT, G. D. Antibiotic resistance in the environment: A link to the clinic? **Current Opinion in Microbiology**, vol. 13,5 (2010): 589-94 Out. 2010.

WRIGHT, G. D. The antibiotic resistome: The nexus of chemical and genetic diversity. **Nature Reviews Microbiology**, mar. 2007

ZHANG, J. *et al.* Preparation and optical properties of silica@Ag-Cu alloy core-shell composite colloids. **Journal of Solid State Chemistry**, v. 180, n. 4, p. 1291–1297, abr. 2007.

ZENG, H. *et al.* Tailoring magnetic properties of core/shell nanoparticles. **Applied Physics Letters**, v. 85, n. 5, p. 792–794, 2 ago. 2004.