



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA,  
INOVAÇÃO E TECNOLOGIA PARA A AMAZÔNIA –  
CITA



**SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA A PARTIR  
DO EXTRATO DE *Humirianthera ampla* VISANDO AÇÃO  
ANTITUMORAL CONTRA CÉLULAS HEPG2**

**ANTONIA ELIANE COSTA SENA**

RIO BRANCO, AC  
01/2024

**ANTONIA ELIANE COSTA SENA**

**SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA A PARTIR  
DO EXTRATO DE *Humirianthera ampla* VISANDO AÇÃO  
ANTITUMORAL CONTRA CÉLULAS HEPG2**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia, da Universidade Federal do Acre, como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências e Inovação Tecnológica**.

**Orientador: ANSELMO FORTUNATO RUIZ RODRIGUEZ**

RIO BRANCO, AC  
01/2024

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da UFAC

---

S474s Sena, Antonia Eliane Costa, 1989 -

Síntese de nanopartículas de prata a partir do extrato de *Humirianthera ampla* visando ação antitumoral contra células HEPG2 / Antonia Eliane Costa Sena; orientador: Prof. Dr. Anselmo Fortunato Ruiz Rodriguez. – 2024.

63 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Acre, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Inovação Tecnológica para a Amazônia (CITA). Rio Branco, 2024.

Inclui referências bibliográficas.

1. Nanopartículas Metálicas. 2. Bioquímica. 3. Síntese orgânica. I. Rodriguez, Anselmo Fortunato Ruiz (orientador). II. Título.

CDD: 509

---

Bibliotecária: Alanna Santos Figueiredo – CRB 11º/1003.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA, INOVAÇÃO E  
TECNOLOGIA PARA A AMAZÔNIA – CITA**

**SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA A PARTIR DO  
EXTRATO DE *Humirianthera ampla* VISANDO AÇÃO  
ANTITUMORAL CONTRA CÉLULAS HEPG2**

**ANTONIA ELIANE COSTA SENA**

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 06/02/2024

---

**ANSELMO FORTUNATO RUIZ RODRIGUEZ  
UFAC**



---

**JASON JERRY ATOCHE MEDRANO  
UNIVERDIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA**

---

**MARCELO RAMON DA SILVA NUNES  
IFAC**

Dedico este trabalho a todos que sempre estiveram ao meu lado, incentivando, aconselhando e que me deram forças para superar cada obstáculo que surgiu.

## AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial, ao meu filho Sávio Costa Sena Kalinsky, pela compreensão em todos esses anos pelo qual, muitas vezes, tive que estar ausente na dedicação dessa pesquisa.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos que me ajudou muito em toda pesquisa.

Aos meus amigos Maurício Souza e Bruno Roseno pelo apoio e muitas vezes incentivo que me permitiu manter firme nesse longo caminho de desafios que surgiram no decorrer do mestrado.

Uma pessoa especial nesse caminho foi meu amigo Tiago Henrique, que sempre apoiou, incentivou e colaborou em diversos momentos, sempre presente e disponível nessa jornada, uma pessoa que levarei no meu coração.

À Dagmar Soares, que nunca soltou a minha mão em diversos momentos da pesquisa e na ajuda a procura de parceiros que contribuíram significativamente com a pesquisa.

Ao meu orientador Dr. Anselmo Fortunato, por sua disponibilidade que possibilitou desenvolver essa pesquisa.

À professora Madge, que prestou apoio psicológico em um momento de dificuldade e fraqueza, levado ao esclarecimento e a não desistir dessa jornada que é um passo tão importante na minha vida profissional.

E a todos que colaboraram em algum momento da minha trajetória, meus sinceros agradecimentos. Obrigada por estarem presentes, cada apoio, cada palavra foi de grande valor e incentivo.

## **EPÍGRAFE**

Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a mim decidir entre rir ou chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar. Porque descobri, no caminho incerto da vida, que o mais importante é decidir.

Cora Coralina

## RESUMO

As nanopartículas metálicas, especialmente as nanopartículas de prata (NPS-Ag), têm sido amplamente estudadas devido à sua comprovada ação antibacteriana. As NPS-Ag obtidas através da síntese verde demonstram vantagens significativas nesse campo, quando comparadas com a síntese inorgânica tradicional. A síntese verde é caracterizada pelo uso de matérias-primas naturais, como extratos de plantas e metabólitos de fungos e bactérias. As nanopartículas de prata têm também sido extensivamente investigadas como agentes antitumorais, devido às suas propriedades físicas e químicas únicas, incluindo alta superfície específica, estabilidade e capacidade de penetrar em células cancerosas. O carcinoma hepatocelular, um tipo de câncer hepático, é uma das doenças malignas que afetam muitas pessoas ao redor do mundo, originando-se das células epiteliais parenquimatosas do fígado. A revisão da literatura mostrou que existem estudos sobre a síntese verde de nanopartículas, muitos deles realizados no Brasil e publicados nos últimos dois anos. A caracterização das nanopartículas de prata sintetizadas pela rota verde utilizando extrato de *Humirianthera ampla* (cassimirela) revela uma abordagem promissora. Esta síntese abre caminhos para estudos com outras plantas, visando o aprimoramento e desenvolvimento de nanopartículas estáveis, capazes de combater células cancerígenas. Além disso, a análise antitumoral através do ensaio de MTT foi realizada com o extrato da planta isolado na mesma concentração utilizada na síntese, com a solução de nitrato de prata na mesma concentração utilizada na síntese, e, finalmente, com as NPs-Ag. Esses experimentos demonstraram a eficácia potencial das nanopartículas de prata em comparação com os componentes individuais, sublinhando a importância da síntese verde na obtenção de agentes terapêuticos eficazes.

**Palavras-chave:** Nanopartículas de prata; síntese verde; ação antitumoral.

## ABSTRACT

Metallic nanoparticles, especially silver nanoparticles (NPS-Ag), have been widely studied due to their proven antibacterial action. NPS-Ag obtained through green synthesis demonstrate significant advantages in this field when compared to traditional inorganic synthesis. Green synthesis is characterized by the use of natural raw materials such as plant extracts and metabolites from fungi and bacteria. Silver nanoparticles have also been extensively investigated as antitumor agents due to their unique physical and chemical properties, including high specific surface, stability, and ability to penetrate cancer cells. Hepatocellular carcinoma, a type of liver cancer, is one of the malignancies that affect many people around the world, originating from the parenchymal epithelial cells of the liver. The literature review showed that there are studies on the green synthesis of nanoparticles, many of them carried out in Brazil and published in the last two years. The characterization of silver nanoparticles synthesized by the green route using *Humirianthera ampla* extract (cassimirella) reveals a promising approach. This synthesis opens the way for studies with other plants, aiming at the improvement and development of stable nanoparticles, capable of fighting cancer cells. In addition, the antitumor analysis through the MTT assay was performed with the isolated plant extract at the same concentration used in the synthesis, with the silver nitrate solution at the same concentration used in the synthesis, and, finally, with the NPs-Ag. These experiments demonstrated the potential efficacy of silver nanoparticles compared to the individual components, underlining the importance of green synthesis in obtaining effective therapeutic agents.

**Keywords:** Silver nanoparticles; green synthesis; antitumor action.

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
Figura 1. Fluxograma contendo síntese de etapas realizadas	21
Figura 2. Países de publicação associados a frequência relativa	23
Figura 3. Ano de publicação e frequência relativa associada	24
Figura 4. Área temática e frequência relativa associada, em destaque, a área escolhida para estudo	24
Figura 5. Síntese de resultados encontrados, correlacionando espécie/tratamento, com finalidade de aplicação obtida	28
Figura 6. Mudança na coloração das nanopartículas com o passar das horas	39
Figura 7. Análise de UV-VIS das nanopartículas de síntese orgânica de extratos vegetais e inorgânica	40
Figura 8. Análise de intensidade pelos tamanhos das nanopartículas de síntese orgânica de extratos vegetais e inorgânica	41
Figura 9. Tamanho médio das nanopartículas de síntese orgânica de extratos vegetais e inorgânica	42
Figura 10. Processo de secagem e equipamento moinho de facas	49
Figura 11. Imagem de síntese	51
Figura 12. Gráfico de UV-Vis	52
Figura 13. Índice de polidispersão	53
Figura 14. Distribuição de Tamanho de partículas	53
Figura 15. Distribuição de partículas por volume	54
Figura 16. Potencial Zeta	54
Figura 17. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão - MET	55
Figura 18. FTIR	56
Figura 19. Difração de Raio X	57
Figura 20. Espectroscopia RAMAN	58
Figura 21. Ensaio de MTt	60

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

		<b>Pág.</b>
Tabela 1.	Descritores e resultados associados na pesquisa	21
Tabela 2.	Estudos obtidos de Ciências da Saúde, classificados por título, autoria e ano	24
Tabela 3	Atividade antimicrobiana de extrato vegetal, óleo essencial, nanopartícula produzida por síntese orgânica e inorgânica	44

## LISTA DE ABREVIATURAS

BHI – Brain Heart Infusion

DLS – Espalhamento Dinâmico de Luz

DRX- Difração de Raio X

DXR – Doxorubicina

FTIR- Infravermelho por Transformada de Fourier

Inorg – Inorgânico

MTT- 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difwniltetrazólio

NPs – Nanopartículas

NPs-Ag – Nanopartículas de Prata

Org – Orgânica

UV-Vis – Espectroscopia no Ultravioleta Visível

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>15</b>
<b>REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>16</b>
<b>Estudo das nanopartículas .....</b>	<b>16</b>
<b>Foco em células tumorais .....</b>	<b>16</b>
<b>CAPÍTULO I .....</b>	<b>18</b>
<b>NANOPARTÍCULAS DE PRATA OBTIDAS ATRAVÉS DE SÍNTESE VERDE PARA ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE ANTITUMORAL: REVISÃO SISTEMÁTICA DE APLICAÇÕES .....</b>	<b>18</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>18</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>18</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>19</b>
<b>2. MÉTODOS .....</b>	<b>20</b>
<b>2.1 DESCRITORES .....</b>	<b>20</b>
<b>2.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO COMO RESULTADOS .....</b>	<b>20</b>
<b>2.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO COMO DISCUSSÕES .....</b>	<b>20</b>
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>21</b>
<b>3.1 RESULTADOS .....</b>	<b>21</b>
<b>3.1.1 Descritores .....</b>	<b>21</b>
<b>4. CONCLUSÕES .....</b>	<b>28</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>29</b>
<b>CAPÍTULO II .....</b>	<b>32</b>
<b>SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISE ANTIMICROBIANA DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA OBTIDAS ATRAVÉS DA ROTA VERDE COM EXTRATOS VEGETAIS E SÍNTESE INORGÂNICA .....</b>	<b>32</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>32</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>33</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>33</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>35</b>
<b>Preparação das amostras vegetais .....</b>	<b>35</b>
<b>Extração de óleo essencial .....</b>	<b>36</b>
<b>Síntese e caracterização das nanopartículas orgânicas e inorgânicas .....</b>	<b>36</b>
<b>Meios de cultura .....</b>	<b>36</b>
<b>Microrganismos teste .....</b>	<b>36</b>

<b>Ensaio microbiológico</b> .....	37
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	38
<b>CONCLUSÃO</b> .....	44
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	44
<b>CAPÍTULO III</b> .....	46
<b>SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA A PARTIR DO EXTRATO DE</b> <b><i>Humirianthera ampla</i> VISANDO AÇÃO ANTITUMORAL CONTRA CÉLULAS</b> <b>HEPG2</b> .....	46
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	47
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	49
<b>Cadastro SisBio</b> .....	49
<b>Preparação da amostra vegetal</b> .....	49
<b>Uv-Vis</b> .....	50
<b>Espalhamento dinâmico de luz - DLS</b> .....	50
<b>Microscopia eletrônica de transmissão - MET</b> .....	50
<b>Infravermelho por transformada de Fourier - FTIR</b> .....	51
<b>Difração de raio X - DRX</b> .....	51
<b>Espectroscopia RAMAN</b> .....	51
<b>Ensaio de MTT – análise antitumoral</b> .....	51
<b>RESULTADOS</b> .....	52
<b>DISCUSSÃO</b> .....	61
<b>CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	63
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	64

## INTRODUÇÃO GERAL

A nanociência vem ganhando espaço com o decorrer dos anos, os avanços da tecnologia contribuem para o sucesso visando novas descobertas e diversas aplicações. A nanociência estuda de materiais e compostos em escala nanométrica, enquanto a nanotecnologia é a aplicação do resultado do estudo (BAYDA *et al.*, 2020).

A nanotecnologia surgiu da necessidade de aprimoramento das tecnologias já existentes, como uma forma de melhorar a sua utilização em uma escala de tamanho menor (SILVA; PINTO, 2020). É possível encontrar a nanotecnologia em diversos ramos, como na indústria de alimentos (JUNGES, 2022), nos cosméticos e fármacos, como por exemplo no tratamento do câncer de mama (FREITAS, 2020)

As nanopartículas metálicas, em especial as nanopartículas de prata (NPS-Ag), estão constantemente sendo estudadas devido a sua ação antibacteriana comprovada (SENA *et al.*, 2021). As NPS-Ag obtidas através da síntese verde, demonstram possibilidades nesse campo de estudo, se comparado com a síntese inorgânica, por exemplo (SENA *et al.*, 2022). A síntese verde se caracteriza pela utilização de matéria prima encontrada na natureza como extratos de plantas, metabólitos de fungos e bactérias.

O câncer é uma problemática global, os cientistas constantemente estão em busca de novos tratamentos e métodos visando a profilaxia ou cura. O fígado é o órgão responsável pelo metabolismo de diversas substâncias, é o maior órgão glandular do corpo humano, estruturalmente é organizado em células parenquimatosas (hepatócitos, que constitui a maior parte) e não parenquimatosas (SANTELLO, 2020).

O câncer hepático ou carcinoma hepatocelular é uma das doenças malignas que afetam grande parte de pessoas pelo mundo, sendo um tumor que surge das células epiteliais parenquimatosas do fígado (LOPES, 2022).

As nanopartículas de prata têm sido amplamente estudadas como agentes antitumorais, devido às suas propriedades físicas e químicas únicas, incluindo sua alta superfície específica, estabilidade e capacidade de penetrar em células cancerosas (WEI, 2015).

A pesquisa tem como foco a ação antitumoral, pois o câncer além de ser uma problemática global, a cada ano mais casos surgem, o que se faz necessário estudos nessa área, uma vez que as nanopartículas sintetizadas através da rota verde, possui em

suas características substâncias bem toleradas e menos tóxicas pois dispensa o uso de estabilizantes químicos.

## REVISÃO DA LITERATURA

### *Estudo das nanopartículas*

A nanotecnologia é um campo da ciência que associa conhecimentos de física, química e biologia para sintetizar partículas com dimensões de 1 a 100 nanômetros. As nanopartículas (NPs) apresentam características específicas como tamanho, morfologia, composição que compõe propriedades melhoradas, tornando estratégias de pesquisas aprimoradas com o passar dos anos, em áreas como informática, química e farmacêutica (SILVA *et al.*, 2017).

Dentre as sínteses de nanopartículas, existem as que utilizam metais nobre como ouro e prata, essas NPs são obtidas por métodos químicos e físicos, e atuam na terapia do câncer, através de fatores que atuam na ruptura da cadeia respiratória mitocondrial e uma série de reações que causam a morte da célula tumoral (OVAIS *et al.*, 2018).

Diversos estudos em torno das nanopartículas veem sendo mostrado promissores, principalmente com a utilização de espécie de fungos para a obtenção das nanopartículas (ROQUE, 2023). Nesse tipo de síntese a ação redutora ocorre com a utilização de agente redutores, que podem ser metabólitos secundários, produzidos pelo próprio fungo, dentre vários fatores, esse mecanismo pode ocorrer a presença de proteínas que evitam a agregação e auxiliam na estabilidade da síntese (BALLOTIN *et al.*, 2016).

### *Foco em células tumorais*

A pesquisa utilizando nanopartículas de prata visando ação antitumoral se mostra promissora em diversos estudos, apresentando baixa toxicidade em células normais e induzindo a morte celular em células tumorais (BETRAN PINEDA *et al.*, 2023; LIANG *et al.*, 2017).

As propriedades das nanopartículas de prata têm sido amplamente estudadas como agentes antitumoral, devido as suas propriedades físicas e químicas únicas,

incluindo sua alta superfície específica, estabilidade e capacidade de penetração em células cancerosas.

## CAPÍTULO I

### NANOPARTÍCULAS DE PRATA OBTIDAS ATRAVÉS DE SÍNTESE VERDE PARA ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE ANTITUMORAL: REVISÃO SISTEMÁTICA DE APLICAÇÕES

#### SILVER NANOPARTICLES OBTAINED THROUGH GREEN SYNTHESIS FOR CYTOTOXICITY AND ANTITUMOR ACTIVITY ASSAYS: SYSTEMATIC REVIEW OF APPLICATIONS

Antonia Eliane Costa Sena<sup>1</sup>, Tiago Henrique da Costa Viana<sup>1</sup>, Anselmo Fortunato Ruiz Rodriguez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Acre, Rio Branco, Ac, Brasil

### NANOPARTÍCULAS DE PRATA OBTIDAS ATRAVÉS DE SÍNTESE VERDE PARA ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE ANTITUMORAL: REVISÃO SISTEMÁTICA DE APLICAÇÕES

#### RESUMO

As técnicas de obtenção de extratos para fármacos têm evoluído através da modernidade, destacando-se com a síntese verde. Buscando verificar as aplicações realizadas através da síntese verde para obtenção de nanopartículas, se desenvolve o presente estudo. Através de revisão sistemática em uma base de dados indexada, utilizando a interação entre descritores-base e operadores booleanos, foi possível pesquisar e catalogar os resultados, bem como filtrar para os estudos específicos da área de Ciências da Saúde. Os resultados mostraram prevalência de estudos do Brasil, nos últimos dois anos, 2021 e 2022, sendo destes, 18% de estudos relacionados a Ciências da Saúde. A discussão apontou uma série de espécies sendo utilizadas como base para obtenção de nanopartículas de prata que têm apresentado indícios antimicrobianos, antifúngicas, antibacterianos e até mesmo anticancerígenos.

Palavras-chave: Análise; Amazônia; Aplicações.

#### ABSTRACT

The techniques for obtaining extracts for drugs have evolved through modernity, standing out with the green synthesis. Seeking to verify the applications carried out through green synthesis to obtain nanoparticles, the present study is developed. Through a systematic review in an indexed database, using the interaction between base descriptors and Boolean operators, it was possible to search and catalog the results, as well as filter for specific studies in the area of Health Sciences. The results showed a prevalence of studies in Brazil, in the last two years,

2021 and 2022, with 18% of these being studies related to Health Sciences. The discussion pointed to a series of species being used as a basis for obtaining silver nanoparticles that have shown antimicrobial, antifungal, antibacterial and even anticancer.

Keywords: Analysis; Amazon; Applications.

## 1. INTRODUÇÃO

A produção e obtenção de extratos e compostos permeia grandes arcos evolutivos da humanidade. Durante esse percurso, tendências modernas, aliando a sustentabilidade, com o aprimoramento dos produtos obtidos, em sua forma geral, farmacêuticos. Espécies como *Astrocaryum aculeatum* ou *Eucalyptus grandis*, tem sido sinais expoentes das aplicações de métodos de síntese verde, propondo aplicações medicinais de extratos naturais, com base em análises e ensaios sobre suas efetividades (OLIVEIRA et al., 2023; SANTOS et al., 2023).

Paralelamente ao avanço do estudo da síntese verde, se desenvolve a aplicabilidade das nanopartículas, no contexto dos tratamentos farmacêuticos. Quando uma gama se abre na nova vertente experimental, as nanopartículas surgem trazendo a inovação aliada ao contexto tecnológico. Referências disso, se espelham em tratamentos com nanopartículas obtendo nanocompósitos baseados em óxidos de ferro e que apresentam propriedades antitumorais no desenvolvimento (VELOSO et al., 2023). Ainda, o desenvolvimento de produtos com origens naturais, envolvendo tratamento com menores riscos de efeitos colaterais, como os biofilmes de celulose incorporados a nanopartículas de prata, que apresentam atividade antibacteriana (PEREIRA et al., 2023).

No percurso do desenvolvimento de novos fármacos, seja aliando a aplicação das nanopartículas, ou através da síntese verde, é notório que novos resultados que visam os tratamentos antitumorais, são mais visados, dado suas dimensionalidades e proporções acarretadas na saúde. Nessa perspectiva, estão estudos que buscam derivados mais leves e com menos efeitos colaterais, dos fármacos existentes, como ciclodextrina e oxazolidina, com grandes reforços de tratamentos, ainda que com ressalvas a apontarem novas afirmativas (SILVA et al., 2023). Ou ainda se destacam estudos que buscam, em uma nova vertente, fármacos de origem com menor toxicidade, de forma a também alavancar resultados antitumorais (ANDRADE et al., 2022). Tais

estudos, ainda que de diferentes formas, constroem um panorama vasto a cerca dessa necessidade de aplicação.

Com a necessidade dos tratamentos antitumorais, verificando métodos através da síntese verde, aliando a utilização das nanopartículas, se desenvolve o presente estudo. Que objetiva revisar, de forma sistemática, os estudos mais relevantes sobre nanopartículas de prata, obtidas através de síntese verde, voltadas ao tratamento antitumoral. Verificando as perspectivas adotadas nos estudos encontrados, mas ainda filtrando os estudos de Ciências da Saúde, que apresentem as aplicações mais relevantes acerca da abrangência do tema discorrido de maneira similar às temáticas dos estudos abordados.

## **2. MÉTODOS**

### **2.1 Descritores**

Foram escolhidos quatro descritores-base para a pesquisa na base indexada da plataforma *Scielo*. Os descritores-base foram: “*nanoparticles*”, “*Silver nanoparticles*”, “*Green synthesis*” e “*Cytotoxicity and antitumor activity assays*”. Além dos descritores-base selecionados, foi aplicado o operador booleano “and” para gerar curvas de intersecção entre os estudos, direcionando-os para o foco buscado em questão.

### **2.2 Critérios de inclusão como resultados**

A partir da pesquisa dos descritores-base e de suas intersecções, a pesquisa buscou catalogar os resultados, conforme: i. correspondências de resultados aos descritores; ii. ano de publicação; iii. país de publicação e iv. áreas temáticas de publicação.

### **2.3 Critérios de inclusão como discussões**

A partir da pesquisa dos descritores-base e de suas intersecções referentes à área temática de Ciência da Saúde, a pesquisa se voltou exclusivamente para analisar os estudos referentes à essa área, buscando através da leitura integral dos estudos, classificar aplicações realizadas e espécies desenvolvidas.

A Figura 1 ilustra a síntese de etapas executadas na revisão sistemática.

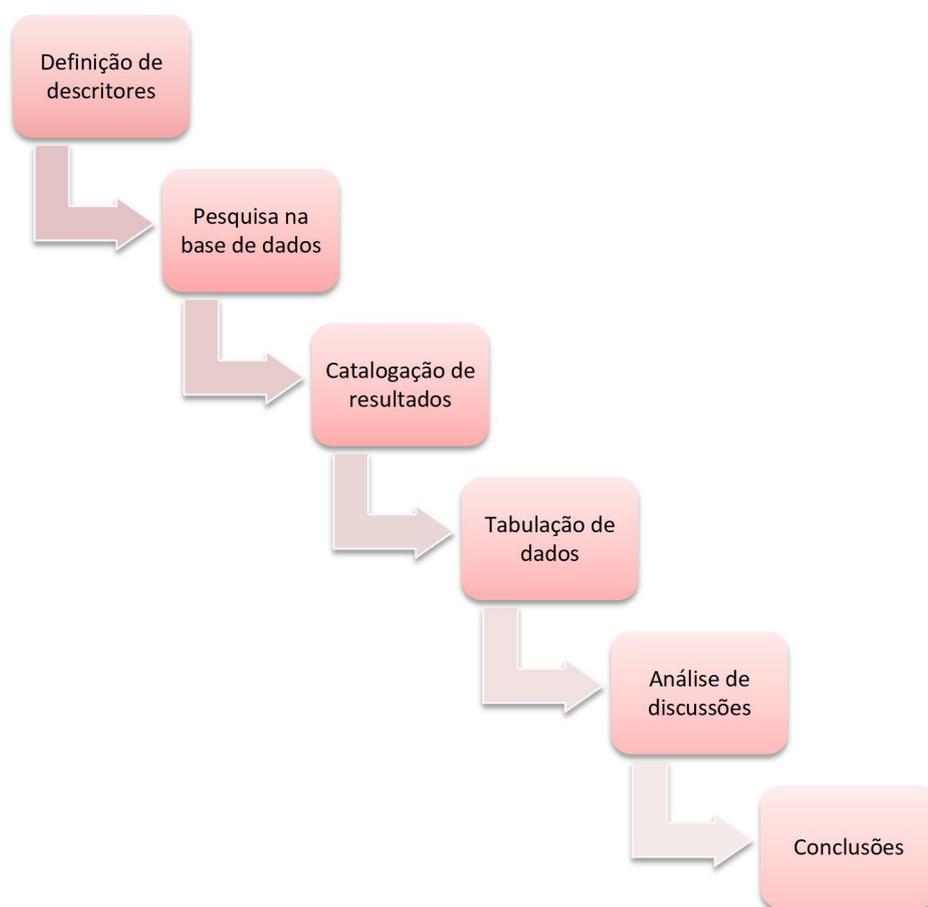


Figura 0- 1 – Fluxograma contendo síntese de etapas realizadas

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÕES**

#### **3.1 Resultados**

##### **3.1.1 Descritores**

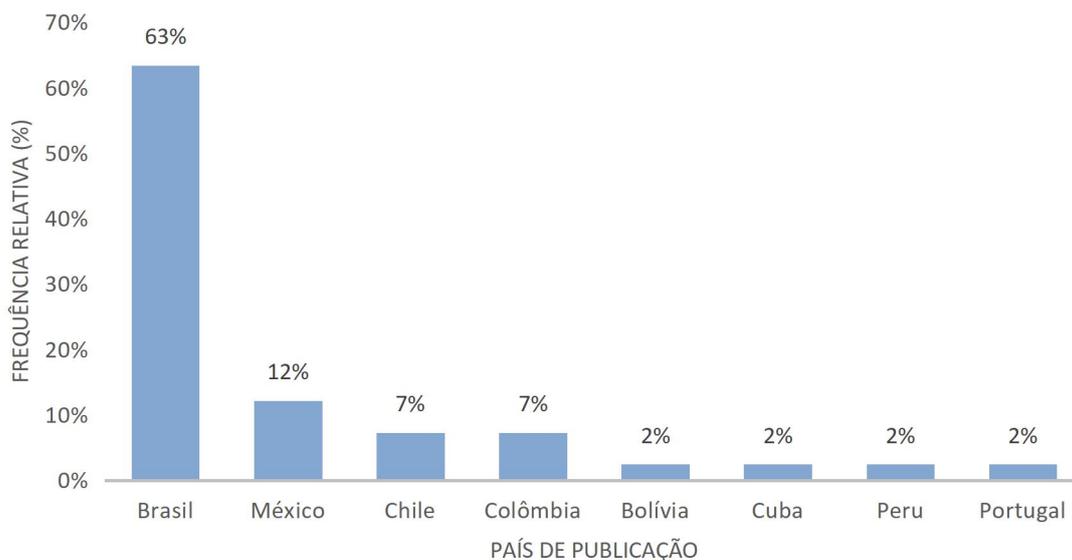
Na Tabela 1 são expressos os resultados da pesquisa de dados indexada, correlacionando o descritor e respectivo resultado, expresso em frequência absoluta. Os primeiros três descritores são generalistas, portanto, não analisados de maneira isolada. O quarto é restritivo, portanto, não analisado. Das três interações subsequentes, “*Silver nanoparticles and Green synthesis*”, oferece a melhor intersecção de estudos focado no objetivo em questão, sendo escolhido como fonte dos resultados posteriores.

Tabela 1 – Descritores e resultados associados na pesquisa

<b>Descritor</b>	<b>Resultados</b>
<i>Nanoparticles</i>	1819
<i>Silver nanoparticles</i>	273
<i>Green synthesis</i>	294
<i>Cytotoxicity and antitumor activity assays</i>	4
<i>Silver nanoparticles and Green synthesis</i>	41
<i>Silver nanoparticles and Cytotoxicity and antitumor activity assays</i>	0
<i>Green synthesis and Cytotoxicity and antitumor activity assays</i>	0

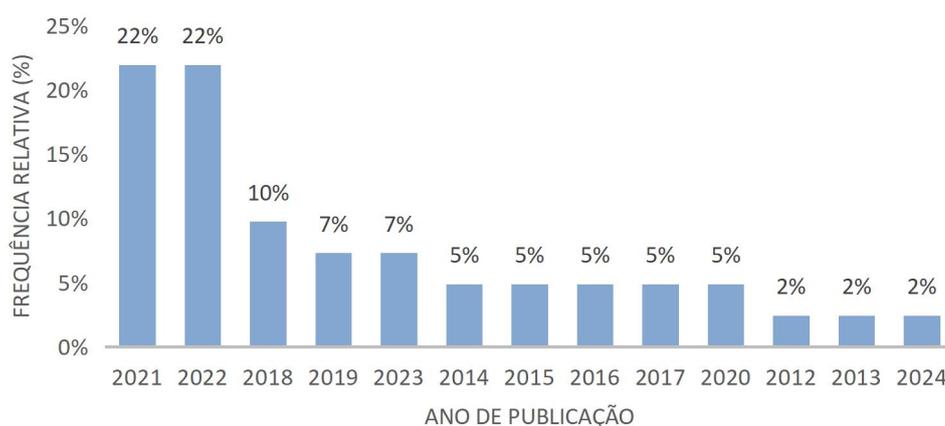
Na Figura 2 a seguir, são expressos a relação entre estudos e país de publicação, em termos de frequência relativa. Nota-se a superioridade quantitativa de estudos do Brasil, sendo maior que a soma dos demais países de publicação, em confronto com países latino-americanos como Bolívia, Cuba e Peru, além de países europeus como Portugal, que oferecem menor proporcionalidade de estudos.

Figura 2 – Países de publicação associados a frequência relativa



Na Figura 3 a seguir, são expressos a relação entre estudos e anos de publicação, em termos de frequência relativa. Nota-se a crescente dos últimos anos, 2021 e 2022, somando quase a metade dos resultados encontrados. Em confronto a menor proporção encontrada na década passada, 2012 e 2013, com menor frequência. O ano de 2024 é apresentado na pesquisa por contar como pré-publicação.

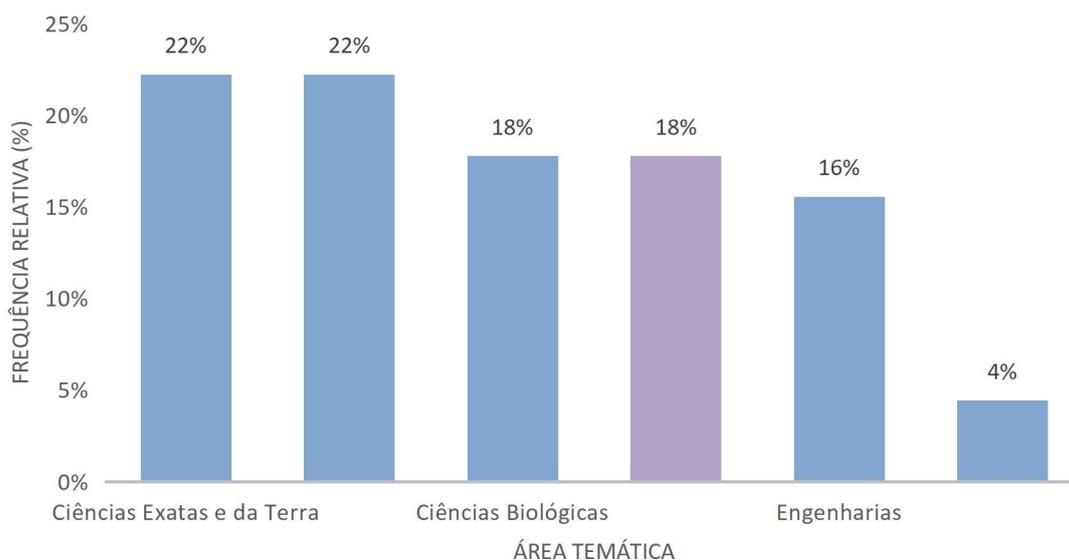
Figura 3 – Ano de publicação e frequência relativa associada



Na Figura 4 a seguir, são expressos a relação entre estudos por área temática de publicação, em termos de frequência relativa. Nota-se a crescente de estudos da área Multidisciplinar e Ciências Exatas e da Terra, somando quase a metade dos resultados

encontrados. Em confronto a menor proporção encontrada na área de Ciências Agrárias com menor frequência. A área de Ciência da Saúde tem representação 18%. A área correspondente a ela no gráfico expressa sua escolha para análise detalhada de estudos nas discussões.

Figura 4 – Área temática e frequência relativa associada, em destaque, a área escolhida para estudo



Na Tabela 2 a seguir, são expressos os estudos encontrados dentro da área temática de Ciências da Saúde, conforme título, autores e ano de publicação. Os estudos estão identificados sob um código de referenciamento adotado no presente estudo para possibilitar identificação ao longo das discussões estabelecidas.

Tabela 2 – Estudos obtidos de Ciências da Saúde, classificados por título, autoria e ano

CÓDIGO	TÍTULO	AUTORIA	ANO
E01	<i>Green synthesis of silver nanoparticles using leaf extracts of Mentha arvensis Linn. and demonstration of their in vitro antibacterial activities</i>	Thiyagarajan, Santhanamari, Kanchana, Subramanian	2022

E02	<i>Calendula officinalis L. flower extract-mediated green synthesis of silver nanoparticles under LED light</i>	Santos, Angélica Panichi, Gonçalves, Melissa Marques, Justus, Barbara, Fardin, Daniele Priscila da Silva, Toledo, Ana Cristina Oltramari, Budel, Jane Manfron, Paula, Josiane Padilha de	2022
E03	<i>Synthesis and characterization of Sophora alopecuroides L. green synthesized of Ag nanoparticles for the antioxidant, antimicrobial and DNA damage prevention activity</i>	Seçkin, Hamdullah, Meydan, Ismet	2022
E04	<i>In vitro anti-inflammatory, anti-arthritic and anti-proliferative activity of green synthesized silver nanoparticles - Phoenix dactylifera (Rothan dates)</i>	Khader, Syed Zameer Ahmed, Ahmed, Sidhra Syed Zameer, Mahboob, Mohamed Rafi, Prabakaran, Selva Barathi, Lakshmanan, Shanmugasundaram Olapalayam, Kumar, Kishore Ramesh, David, Daniel	2022
E05	<i>Green Synthesis, Characterization and Antimicrobial Evaluation of Silver Nanoparticles for an Intracanal Dressing</i>	Bruniera, João Felipe Bonatto, Gabriel-Silva, Leonardo, Goulart, Rafael Silva, Silva-Sousa, Yara Teresinha Corrêa, Lara, Marilisa Guimarães, Pitondo-Silva, André, Miranda, Carlos Eduardo Saraiva	2020
E06	<i>Preparation and characterization of liposomes loaded with silver nanoparticles obtained by green synthesis</i>	Espinoza, Joel Toribio, Novak, Robson Schimandero, Magalhães, Cássia Gonçalves, Budel, Jane Manfron, Justus, Barbara, Gonçalves, Melissa Marques, Boscardin, Patricia Mathias Döll, Farago, Paulo Vitor, Paula, Josiane de Fátima	2020

E07	<p style="text-align: center;"><i>ANTIFUNGAL ACTIVITY OF SILVER NANOPARTICLES OBTAINED BY GREEN SYNTHESIS</i></p>	<p>MALLMANN, Eduardo José J., CUNHA, Francisco Afrânio, CASTRO, Bruno N.M.F., MACIEL, Auberson Martins, MENEZES, Everardo Albuquerque, FECHINE, Pierre Basílio Almeida</p>	2015
E08	<p style="text-align: center;"><i>Silver nanoparticle production by the fungus Fusarium oxysporum: nanoparticle characterisation and analysis of antifungal activity against pathogenic yeasts</i></p>	<p>Ishida, Kelly, Cipriano, Talita Ferreira, Rocha, Gustavo Miranda, Weissmüller, Gilberto, Gomes, Fabio, Miranda, Kildare, Rozentel, Sonia</p>	2014

### 3.2 Discussões

Estudos que demonstram potencial diretamente associado à inibição no desenvolvimento de bactérias e micróbios destacam-se pelo caráter de maior atualidade, se relacionando também com potencial de tratamento associado. Nanopartículas de prata obtidas de folha de *Mentha arvensis Linn* apresentaram desempenho inibitório contra bactérias (THIYAGARAJAN; KANCHANA, 2022). Nanopartículas de prata obtidas da flor de *Calendula officinalis L.* apresentaram estabilidade nas análises realizadas, indicando potencial antimicrobiano (SANTOS et al., 2022). Assim, se verificou que, para as duas espécies citadas, foi comprovada a ação antibactericida e antimicrobiana, respectivamente, analisadas.

Outros estudos buscaram comparar as atividades entre propostas de obtenção a partir da síntese verde, com a atividade comercial de tratamentos comerciais existentes. Propriedades de nanopartículas de prata obtidas da folha de *Sophora alopecuroides L.* demonstraram ação antioxidante melhorada, atividade antimicrobiana contra seis cepas e ação mais eficiente do que os antibióticos a base de neomicina (SECKIN; MEYDAN,

2022). Portanto, se verificou que, para a espécie citada, foi comprovada a ação antibiótica melhorada em relação à comercial verificada

Em uma perspectiva distinta às anteriores, o tratamento anticancerígeno foi investigado a partir do estudo das características dos produtos obtidos ao longo da síntese adotada. Nanopartículas de prata obtidas da semente de *Phoenix dactylifera* obteve indicativos a partir da caracterização realizada com vários tipos de análises, que expressaram potencial anticancerígeno (KHADER et al., 2022).

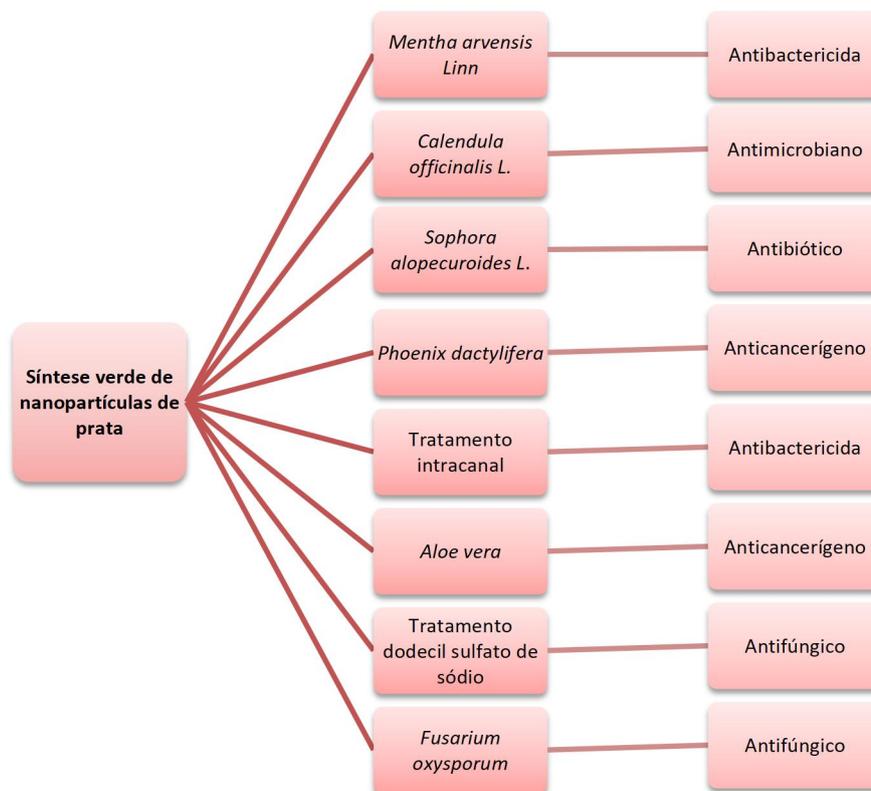
Paralelamente ao estudo anterior, com uma nova perspectiva associada, aliada ao tratamento dentário, foi investigado o potencial enquanto tratamento voltado ao método dental em cirurgias do tipo canal. Nanopartículas de prata demonstraram concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima contra cinco cepas, indicando potencial de uso contra curativo intracanal (BRUNIERA et al., 2020). Assim, se verificou que, para o tratamento citado, foi comprovado a ação antibactericida intracanal, respectivamente, analisada.

Outros produtos puderam ser obtidos ao longo da aplicação da síntese, como quando associados a demais compostos com baixas pegadas de resíduos ambientais. Lipossomas sintetizados e aliados a nanopartículas de prata obtidas do extrato de gel de *Aloe vera*, tiveram indicativos, a partir dos ensaios de caracterização, de potencial de encapsulamento e manipulação (ESPINOZA et al., 2020). Contudo, se verificou que, para a espécie citada, foi comprovado o indício da ação anticancerígena, respectivamente, analisada.

Ao fim, uma outra aplicação pertinente encontrada, verificou a ação do tratamento inibitório para a ação fungicida. Nanopartículas de prata tratadas com ribose e dodecil sulfato de sódio, tiveram ação contra duas cepas fúngicas, revelando potencial no tratamento de infecções fúngicas (MALLMANN et al., 2015). Nanopartículas de prata obtidas do fungo filamentoso *Fusarium oxysporum* tiveram resposta inibitória a duas cepas de fungos patogênicos, revelando potencial ativo associado a diminuição do desenvolvimento desses patógenos (ISHIDA et al., 2014). Portanto, se verificou que, para os tratamentos citados, foi comprovada a ação antifúngica, respectivamente, analisadas.

A Figura 5 traz um fluxograma que ilustra a disposição dos estudos encontrados, relacionando os descritores-base, as espécies/tratamentos de estudo e os obtidos.

Figura 5 – Síntese de resultados encontrados, correlacionando espécie/tratamento, com finalidade de aplicação obtida



#### 4. CONCLUSÕES

A partir da revisão sistemática com os descritores indicados, foi possível notar existência de 41 estudos acerca da síntese verde de nanopartículas. Sendo desses, majoritariamente do Brasil e tendo sido publicado nos últimos dois anos. Destacam-se 18% dos estudos, referentes a Ciências da Saúde, onde foi revelado uma aplicação maciça de obtenção de nanopartículas a partir de uma diversidade de espécies vegetais, demonstrando efeitos de propriedades inibitória a agentes fúngicos, bactericidas e até microbianos, dentre outros. O objetivo foi satisfatoriamente alcançado, mostrando um panorama das espécies utilizadas e aplicações propostas relacionadas.

## REFERÊNCIAS

ANDRADE, Maria Helena P. S. de; AGUIAR, Jaciana S.; SILVA, Teresinha G. da; SANTOS, Jandyson M.; SILVA, Wagner E.; BELIAN, Mônica F. Estudo Da Atividade Antitumoral De Um Novo Complexo De Ru<sup>3+</sup>: Uma Proposta Para O Design De Metalofármacos De Baixa Toxicidade. **Química Nova**, Volume 45, N. 8, Páginas 906 - 912. 2022.

BRUNIERA, João Felipe Bonatto; SILVA, Leonado Gabriel; GOULART, Rafael Silva; SILVA-SOUSA, Yara Teresinha Corrêa; LARA, Marilisa Guimarães; PITONDO-SILVA, André; MIRANDA, Carlos Eduardo Saraiva. - Green Synthesis, Characterization and Antimicrobial Evaluation of Silver Nanoparticles for an Intracanal Dressing - **Brazilian Dental Journal**; 31(5); 485-492; 2020-09

ESPINOZA, Joel Toribio; NOVAK, Robson Schimandei; MAGALHÃES, Cássia Gonçalves; BUDEL, Jane Manfron; JUSTUS, Barbara; GONÇALVES, Melissa Marques; BOSCARDIN, Patricia Mathias Döll; FARAGO, Paulo Vitor; PAULA, Josiane de Fátima Padiha De. - Preparation and characterization of liposomes loaded with silver nanoparticles obtained by green synthesis - **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**; 56(); -; 2020

ISHIDA, Kelly; CIPRIANO, Talita Ferreira; ROCHA, Gustavo Miranda; WEISSMÜLLER, Gilberto; GOMES, Fabio; MIRANDA, Kildare; ROZENTAL, Sonia. - Silver nanoparticle production by the fungus *Fusarium oxysporum*: nanoparticle characterisation and analysis of antifungal activity against pathogenic yeasts - **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**; 109(2); 220-228; 2014-04

KHADER, Syed Zameer Ahmed; AHMED, Sidhra Syed Zameer; MAHBOOB, Mohamed Rafi; PRABAHARAN, Selva Barathi; LAKSHMANAN, Shanmugasundaram Olapalayam; KUMAR, Kishore Ramesh; DAVID, Daniel. - In vitro anti-inflammatory, anti-arthritic and anti-proliferative activity of green synthesized silver nanoparticles - *Phoenix dactylifera* (Rothan dates) - **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**; 58(); -; 2022

MALLMANN, Eduardo José J.; CUNHA, Francisco Afrânio; CASTRO, Bruno N.M.F.; MACIEL, Auberson Martins; MENEZES, Everardo Albuquerque; FECHINE, Pierre Basílio Almeida. - ANTIFUNGAL ACTIVITY OF SILVER NANOPARTICLES OBTAINED BY GREEN SYNTHESIS - **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**; 57(2); 165-167; 2015-04

OLIVEIRA, Lucas M. F.; SILVA, Ueveton P. da; BRAGA, João Pedro V.; TEIXEIRA, Álvaro V. N. C.; RIBON, Andréa O. B.; VAREJÃO, Eduardo V. V.; COELHO, Eduardo A. F.; FREITAS, Camila S. de; TEIXEIRA, Róbson R.; MOREIRA, Renata P

L. Green Synthesis, Characterization and Antibacterial and Leishmanicidal Activities of Silver Nanoparticles Obtained from Aqueous Extract of *Eucalyptus grandis*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. Volume 34, N. 4, Páginas 527 – 536, 2023.

PEREIRA, Arthur B. D.; SILVA, Rafael R. A.; MARQUES, Clara S.; NASCIMENTO, Mayra Aparecida; SOARES, Nilda de Fatima F.; LOPES, Renata P. Green Synthesis of Cellulose-Based Biofilms Doped with AgNPs with Antibacterial Activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Volume 34, N. 3, Páginas 366 - 376. 2023.

SANTOS, Angélica Panichi; GONÇALVES, Melissa Marques; JUSTUS, Barbara; FARDIN, Daniele Priscila da Silva; TOLEDO, Ana Cristina Oltramari; BUDEL, Jane Manfron; PAULA, Josiane Padilha de. - *Calendula officinalis* L. flower extract-mediated green synthesis of silver nanoparticles under LED light - **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**; 58(); -, 2022

SANTOS, Sidney S. dos; COUTO, Ricardo A. A. de; SILVA, Ingrid R. da; AOUADA, Marcia Regina M.; COSTANTINO, Vera R. L.; COSTA, Luiz P. da; PEROTTI, Gustavo F. Production of Silver Nanoparticles Mediated by Aqueous Extracts of Tucumã (*Astrocaryum aculeatum*) Pulp. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. Volume 34, N. 5, Páginas 705 – 712, 2023.

SEÇKIN, Hamdullah; MEYDAN, Ismet. - Synthesis and characterization of *Sophora alopecuroides* L. green synthesized of Ag nanoparticles for the antioxidant, antimicrobial and DNA damage prevention activity - **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**; 2022.

SILVA, Rafael Ramos; AMORIM, César Augusto da Cruz; LIMA, Maria do Carmo Alves; RABELLO, Marcelo Montenegro; HERNANDES, Marcelo Zaldini; RÊGO, Moacyr Jesus Barreto de Melo; PITTA, Maira Galdino da Rocha; OLIVEIRA, Maria Danielly Lima de; ANDRADE, César Augusto Souza de. Development of inclusion complex based on cyclodextrin and oxazolidine derivative. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, Volume 59. 2023.

THIYAGARAJAN, Santhanamari; KANCHANA, Subramanian. - Green synthesis of silver nanoparticles using leaf extracts of *Mentha arvensis* Linn. and demonstration of their in vitro antibacterial activities - **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**; 58(); -, 2022

VELOSO, Gabriela; FERREIRA, Roberta; ROBERTO, Wanderley; SILVA, Sidney Nicodemos da. Development of core-shell nanocomposites containing iron oxide, silica and samarium for potential application in cancer treatments involving brachytherapy and magnetic hyperthermia. **REM - International Engineering Journal**, Volume 76, N. 2, Páginas 177 - 186. 2023.



## CAPÍTULO II

### SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISE ANTIMICROBIANA DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA OBTIDAS ATRAVÉS DA ROTA VERDE COM EXTRATOS VEGETAIS E SÍNTESE INORGÂNICA

#### 1. INTERFACES CIENTÍFICAS - SAÚDE E AMBIENTE

Antonia Eliane Costa Sena<sup>1,3</sup>, Alex Bruno Maia Lopes Paiva<sup>3</sup>, Katlen Luiza da Costa Silva<sup>3</sup>, Wilame Germano Florêncio<sup>1</sup>, Anselmo Fortunato Ruiz Rodriguez<sup>2</sup>, Edeltrudes de Oliveira Lima<sup>4</sup>, Clarice Maia Carvalho<sup>2</sup>, Lília Raquel Fé da Silva<sup>3</sup>.

<sup>1</sup> Programa de Pós-graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia, Universidade Federal do Acre, Rio Branco, Acre, Brasil.

<sup>2</sup> Centro de Ciências Biológicas e da Natureza, Universidade Federal do Acre, Rio Branco, Acre, Brasil.

<sup>3</sup> Centro Universitário Uninorte, Rio Branco, Acre, Brasil.

<sup>4</sup> Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Campus I - Cidade Universitária, João Pessoa - PB

#### RESUMO

O aumento da resistência bacteriana tem levado a busca pela descoberta de novos antibióticos e a potencialização de classes de antibióticos já existentes. A síntese verde ganha espaço nessa área por utilizar componentes orgânicos que reduz o custo do processo e produz uma abordagem menos danosa ao meio ambiente. A pesquisa objetivou comparar as diferentes sínteses de nanopartículas de prata e avaliar a atividade antimicrobiana. Foram utilizadas sete amostras vegetais de espécies encontradas na Amazônia: Cassimirela (*Humirianthera ampla*), Copaíba (*Copaifera officinalis* L), Sacaca (*Croton cajucara* BENTH), Maclura (*Maclura tinctoria*), Quina-quina (*Cinchona officinalis*) e Pimenta Longa (*Piper longum*). A extração do óleo essencial das plantas se deu através da técnica de arraste a vapor. A síntese de nanopartículas ocorreu através da rota verde utilizando extratos de plantas como agente redutor (Nps Ag orgânica) e borohidreto como agente redutor na síntese química (Nps Ag Inorganica). Para caracterização das nanopartículas sintetizadas foram realizadas análises espectroscópicas de UV-Vis seguido da análise por espalhamento dinâmico de Luz (DLS). Os diferentes extratos analisados no ensaio não demonstraram ter ação antimicrobiana nas diferentes cepas utilizadas, porém as nanopartículas sintetizadas a partir da utilização do extrato como agente redutor obteve resultado em três sínteses copaíba, cassimirela e sacaca.

**Palavras-chave:** Agente redutor; Compostos fitoquímicos; Copaíba; Cassimirela; Sacaca.

## ABSTRACT

The increase in bacterial resistance has led to the search for the discovery of new antibiotics and the potentiation of existing classes of antibiotics. Green synthesis gains space in this area by using organic components that reduce the cost of the process and produce a less harmful approach to the environment. The research aimed to compare the different syntheses of silver nanoparticles and to evaluate the antimicrobial activity. Seven plant samples of species found in the Amazon were used: Cassimirela (*Humirianthera longa*), Copaíba (*Copaifera officinalis L*), Sacaca (*Croton cajucara BENTH*), Maclura (*Maclura tinctoria*), Quina-quina (*Cinchona officinalis*) and Pimenta Longa (*Piper longum*). The extraction of essential oil from the plants was carried out using the steam drag technique. The synthesis of nanoparticles occurred through the green route using plant extracts as reducing agent (Nps Ag organic) and borohydride as reducing agent in chemical synthesis (Nps Ag Inorganic). To characterize the synthesized nanoparticles, UV-Vis spectroscopic analysis was performed followed by dynamic light scattering (DLS) analysis. The different extracts analyzed in the assay did not demonstrate antimicrobial action in the different strains used, but the nanoparticles synthesized from the use of the extract as a reducing agent resulted in three syntheses of copaíba, cassimirela and sacaca.

**Keywords:** Reducing agent; Phytochemical compounds; Copaiba; Cassimirela; Sacaca.

## INTRODUÇÃO

As bactérias e fungos são microrganismos que podem ser encontrados em diversos ambientes. Além disso, estão presentes no revestimento da pele, mucosas e microbiota intestinal, sendo este último o local onde vivem a maioria dos microrganismos inofensivos, ou seja, benéficos ao seu hospedeiro (BRITO; TREVISAN, 2021). O uso indiscriminado dos antibióticos na medicina, na agricultura e na produção de alimentos para animais, tem contribuído para o aumento do mecanismo de defesas das bactérias, causando resistência bacteriana (DE FREITAS SOUZA; DIAS; DE OLIVEIRA, 2022).

Os antibióticos são uma classe de medicamentos indispensáveis, porém a eficácia deles está ameaçada pela resistência bacteriana, não somente a um fármaco, mas a inúmeras classes deles (BRITO; TREVISAN, 2021). A resistência aos antibióticos ocorre pela facilidade que as bactérias têm de se adaptar rapidamente às mudanças que os fármacos provocam ao ambiente onde elas estão inseridas (TEIXEIRA et al., 2019).

*Staphylococcus aureus* é um dos principais patógenos associados a infecção hospitalar e vêm apresentando problemas na comunidade, e demonstra resistência a oxacilina, cefoxitina, que são marcadores da resistência aos beta-lactâmicos (GELATTI, et al., 2009).

Também há necessidade de redefinir estratégias existentes para minimizar a resistência antimicrobiana de *Staphylococcus epidermidis* (OROZCO et al., 2017), *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* (FIGUEREDO et al., 2021; POOL et al., 2021), e antifúngicas de *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus* (LEITE et al., 2019; LIMA, et al, 2020; QUILES-MELERO; GARCÍA-RODRÍGUEZ, 2021; RESEND et al., 2022).

O aumento da resistência bacteriana, principalmente entre patógenos perigosos, tem levado a busca de novos antibióticos, ou à necessidade de potencializar classes de antibióticos já existentes (BRITO; CORDEIRO, 2012).

As nanopartículas metálicas são utilizadas em pesquisas visando sua ação bactericida em diversos microrganismos. A prata é utilizada como agente antimicrobiano há anos, um exemplo é a associação com sua forma de nitrato com a sulfonamida apresentado como sulfadiazina de prata para o tratamento de uso tópico, como por exemplo, nas queimaduras para combater possíveis infecções bacterianas (RAI et al., 2009).

As nanopartículas de prata podem ser utilizadas em diferentes áreas, sua aplicabilidade varia desde a indústria farmacêutica até indústria alimentar e suas características físico-químicas como condutividade elétrica e flexibilidade abrem espaço para suas diversas aplicabilidades (SENA; RAMOS; FARIA, 2019). A síntese verde ganha espaço nessa área por utilizar componentes orgânicos que reduz o custo do processo e produz uma abordagem menos danosa ao meio ambiente, pois dispensa o uso de estabilizadores químicos e agentes redutores externos (SENA et al., 2021). A utilização de plantas como agente redutor na síntese verde valoriza os recursos naturais presentes na Amazônia, onde há uma diversidade de plantas a serem estudadas, de vários gêneros e espécies com constituintes fotoquímicos que contribuem para suas ações bactericidas, antifúngicas, anti-inflamatórias, diuréticas, laxativas entre outras propriedades medicinais (SENA; DA SILVA; MARQUES, 2019).

Com base no exposto, o objetivo do estudo foi comparar as diferentes sínteses de nanopartículas de prata e sua ação antimicrobiana em diferentes cepas bacterianas e fúngicas.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Preparação das amostras vegetais

Foram utilizadas sete amostras vegetais das espécies encontradas na Amazônia Cassimirela (*Humirianthera ampla*), Copaíba (*Copaifera officinalis* L), Sacaca (*Croton cajucara* Benth), Maclura (*Maclura tinctoria*), Quina-quina (*Cinchona officinalis*) e Pimenta Longa (*Piper longum*). Foram coletadas folhas para preparação de extrato vegetal por decocção e extração de óleo essencial de sacaca e copaíba por arraste a vapor.

A escolha das amostras vegetais foi feita de acordo com as avaliações descritas por Sena e colaboradores (2019), que avaliam *Humirianthera ampla*, conhecida como Cassimirela, como contendo alcaloides, que são compostos fitoquímicos importantes capazes de possuir ação farmacológica, seguindo o mesmo princípio utilizou-se a quina-quina, popularmente utilizada para tratar malária e conter alcaloides em sua composição (WAZEL-UCAY; WAZEL-HAIAT, 2019).

As amostras vegetais foram coletadas e as folhas foram limpas usando água destilada e secas em estufa a 40 °C, após a secagem foram preparados os respectivos extratos por decocção na proporção 1:10 por um período de aquecimento de 3 a 5 minutos, em seguida realizado a filtração. O produto da filtração foi colocado em freezer a -80 °C para congelar e colocado no liofilizador onde permaneceu por um período de 72h aproximadamente. As amostras vegetais liofilizadas foram guardadas em geladeira a uma temperatura de 2 a 8 °C, em recipiente fechado e embalado preservando seus compostos e sua integridade.

As amostras vegetais foram preparadas e as respectivas nanopartículas de prata foram sintetizadas e caracterizadas.

### **Extração de óleo essencial**

A extração do óleo essencial das plantas se deu através da técnica de arraste a vapor, no qual os vapores do solvente, no caso a água, retiram o óleo essencial que é volátil do interior das células das folhas previamente limpas e secas em estufa à 40 °C (MELO et al., 2021).

### **Síntese e caracterização das nanopartículas orgânicas e inorgânicas**

A síntese e caracterização das nanopartículas de prata seguiu a metodologia descrita por Sena e colaboradores (2019), onde foi realizado a reação de redução pela rota de síntese verde nanopartícula orgânica (NPs-Ag Org) no qual utilizou os extratos liofilizados das amostras vegetais como agente redutor e a síntese química para preparar as nanopartículas inorgânicas (NPs-Ag Inorg) utilizando boroidreto como agente redutor.

Para caracterização das nanopartículas sintetizadas foram realizadas análises espectroscópicas de UV-Vis seguido da análise por espalhamento dinâmico de Luz (DLS).

### **Meios de cultura**

Os meios de cultura utilizados nos ensaios foram caldo Brain Heart Infusion (BHI) para as bactérias e meio RPMI 1640 com L-glutamina e sem bicarbonato para os fungos (adquiridos da Difco Laboratories Ltd, USA, France e INLAB, São Paulo, Brasil). Todos os meios foram preparados conforme as descrições dos fabricantes.

### **Microrganismos teste**

Para os ensaios de atividade biológica dos produtos testes, foram utilizadas as bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25853, *P. aeruginosa* ATCC 9027 e *Escherichia coli* ATCC 18739, os fungos leveduriformes *Candida albicans* ATCC 90028, *C. albicans* CBS 562, *C. tropicalis* ATCC 13803, *C. glabrata* ATCC 90030, e

os fungos filamentosos *Aspergillus flavus* ATCC 13013, *Aspergillus fumigatus* ATCC 40640.

Os microrganismos pertencem a Micoteca do Laboratório de Micologia, Departamento de Ciências Farmacêuticas (DCF), Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). As cepas foram mantidas em BHI/bactérias e os fungos em ASD/fungos à temperatura de 4 °C. Foram utilizados para os ensaios, repiques de 24-48 h em BHI ou ASD, respectivamente, para bactérias e leveduras, incubados a  $35 \pm 2$  °C.

### **Ensaio microbiológico**

Os ensaios de atividade antimicrobiana foram realizados de acordo com protocolos já estabelecidos (CLEELAND; SQUIRES, 1991; ELOFF, 1998; CLSI, 2008). A determinação da concentração inibitória mínima das amostras em relação as cepas bacterianas e fúngicas foram realizadas através da técnica de microdiluição em caldo, com placa para cultura de células contendo 96 poços com fundo em “U”. Inicialmente, foram distribuídos 100 µL de caldo RPMI/BHI duplamente concentrado nos poços das placas. Em seguida, 100 µL dos produtos solubilizados foram dispersos nas cavidades da primeira linha da placa, e por meio de uma diluição seriada a razão de dois, foram obtidas concentrações de 1024 a 8 µg/mL. Por fim, foi adicionado 10 µL das suspensões das cepas bacterianas e fúngicas no poços, onde cada coluna da placa refere-se, especificamente, a uma espécie. Seguindo foram aplicados os controles: microrganismos (CBHI + bactérias e RPMI + leveduras/fungos filamentosos), para comprovação da viabilidade das linhagens microbianas, meio de cultura (CBHI/RPMI), para comprovação da esterilidade e controle com antimicrobianos: cloranfenicol (50 µg/mL) para inibição de bactéria e fluconazol (25 µg/mL) para inibição de fungos. As placas preparadas foram assepticamente fechadas e submetidas à incubação numa temperatura de  $35 \pm 2$  °C por 24- 48 h para os ensaios com bactérias e leveduras e a temperatura ambiente (28-30 °C) para os fungos filamentosos.

No caso do ensaio biológico com as bactérias, após 24 h de incubação, foi adicionado 20 µL de solução do corante resazurina a 0,01% (INLAB), reconhecido como um indicador colorimétrico de óxido-redução (MANN; MARKAN, 1998). O ensaio foi incubado a  $35 \pm 2$  °C por 24 - 48 h. Após a mudança de coloração do corante



Clorafenicol	50	50	50	50	50	-	-	-	-	-	-
Fluconazol	-	-	-	-	-	25	25	25	25	25	25

*Afl* = *Aspergillus flavus* ATCC 13013; *Afu* = *Aspergillus fumigatus* ATCC 40640; *Cal* = *Candida albicans* ATCC 90028; *Calb* = *C. albicans* CBS 562; *Ctr* = *C. tropicalis* ATCC 13803; *Cgl* = *C. glabrata* ATCC 90030; *Eco* = *Escherichia coli* ATCC 18739; *Pae* = *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25853; *Paer* = *P. aeruginosa* ATCC 9027; *Sau* = *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; *Sep* = *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.

Os diferentes extratos utilizados no ensaio não demonstraram ter ação antimicrobiana nas diferentes cepas analisadas, porém, as nanopartículas sintetizadas a partir da utilização do extrato como agente redutor teve resultado positivo de inibição microbiana em três sínteses, copaíba, cassimirela e sacaca (Tabela 1). As plantas têm sua ação redutora através dos seus diferentes metabólitos, porém não são todos os metabólitos nem toda espécie de planta utilizada na síntese verde é capaz de auxiliar na promoção dessa atividade antimicrobiana como pode ser observado de acordo com o resultado da pesquisa.

A princípio a formação das nanopartículas é observada quando ocorre a mudança na coloração, de incolor para amarelo âmbar (Figura 1) com o passar das horas devido ao efeito plasmônico das nanopartículas de prata (EVANOFF-JÚNIOR, 2005).

**Figura 1.** Mudança na coloração das nanopartículas com o passar das horas

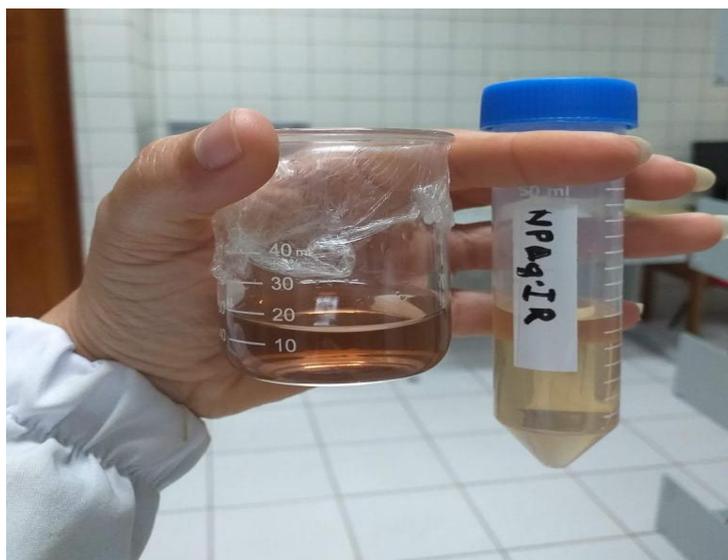
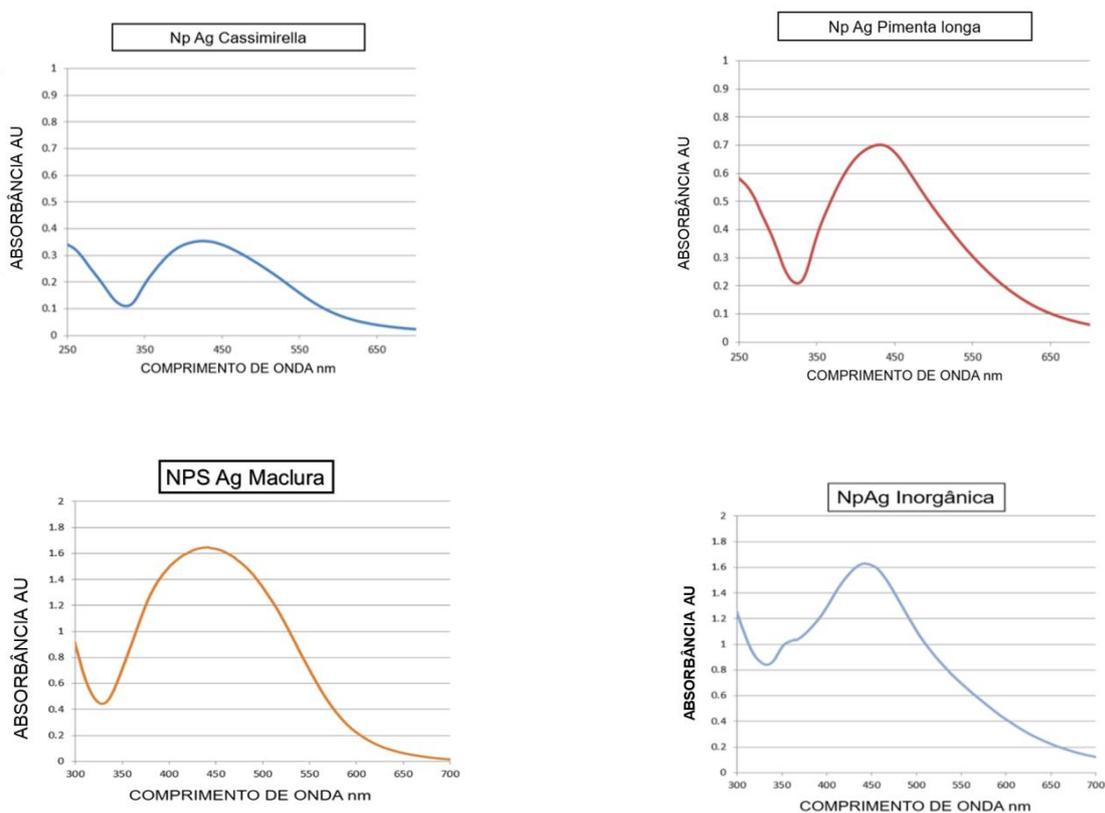
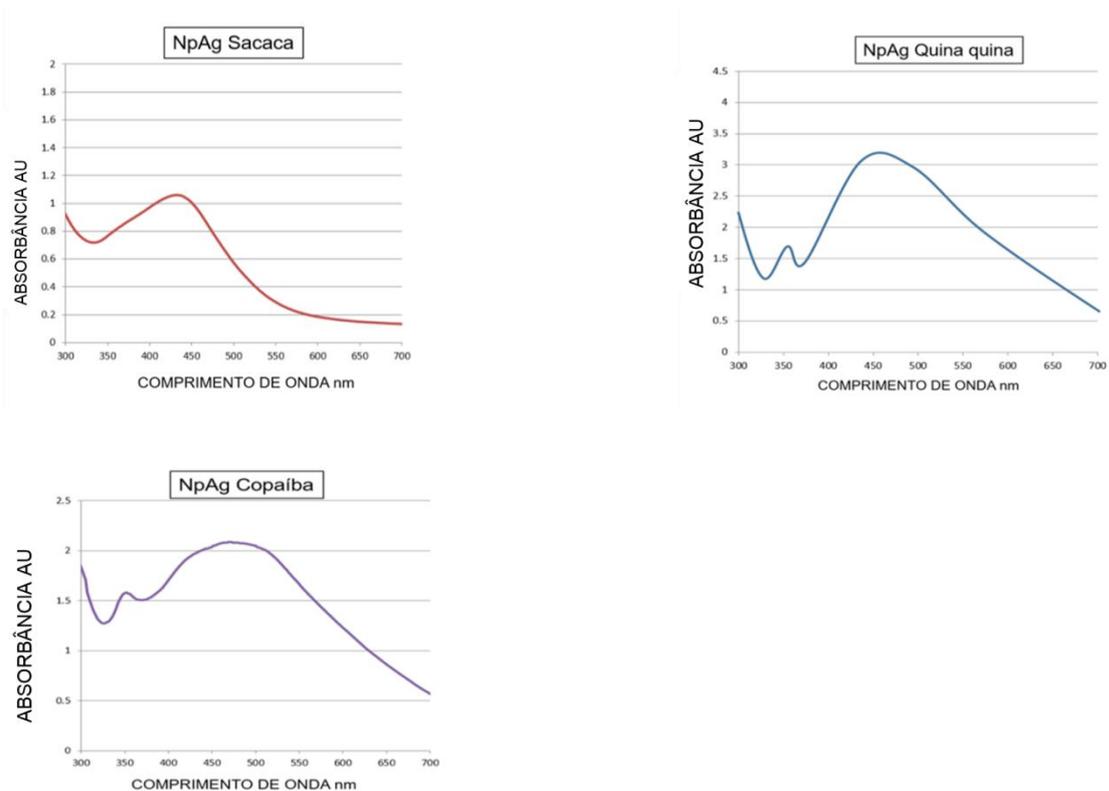


Foto: autor

As análises espectroscópicas de UV-Vis (Figura 2) das nanopartículas demonstram a formação de nanopartículas polimórficas devido a apresentação de comprimento de onda entre 320~520 nanômetros (DZUL-EROSA et al., 2018). As nanopartículas são capazes de apresentar tamanhos e formas diferentes de acordo com a síntese utilizada, e a ação bactericida das nanopartículas depende da sua forma geométrica (ALSHAREEF; LAIRD; CROSS, 2017).

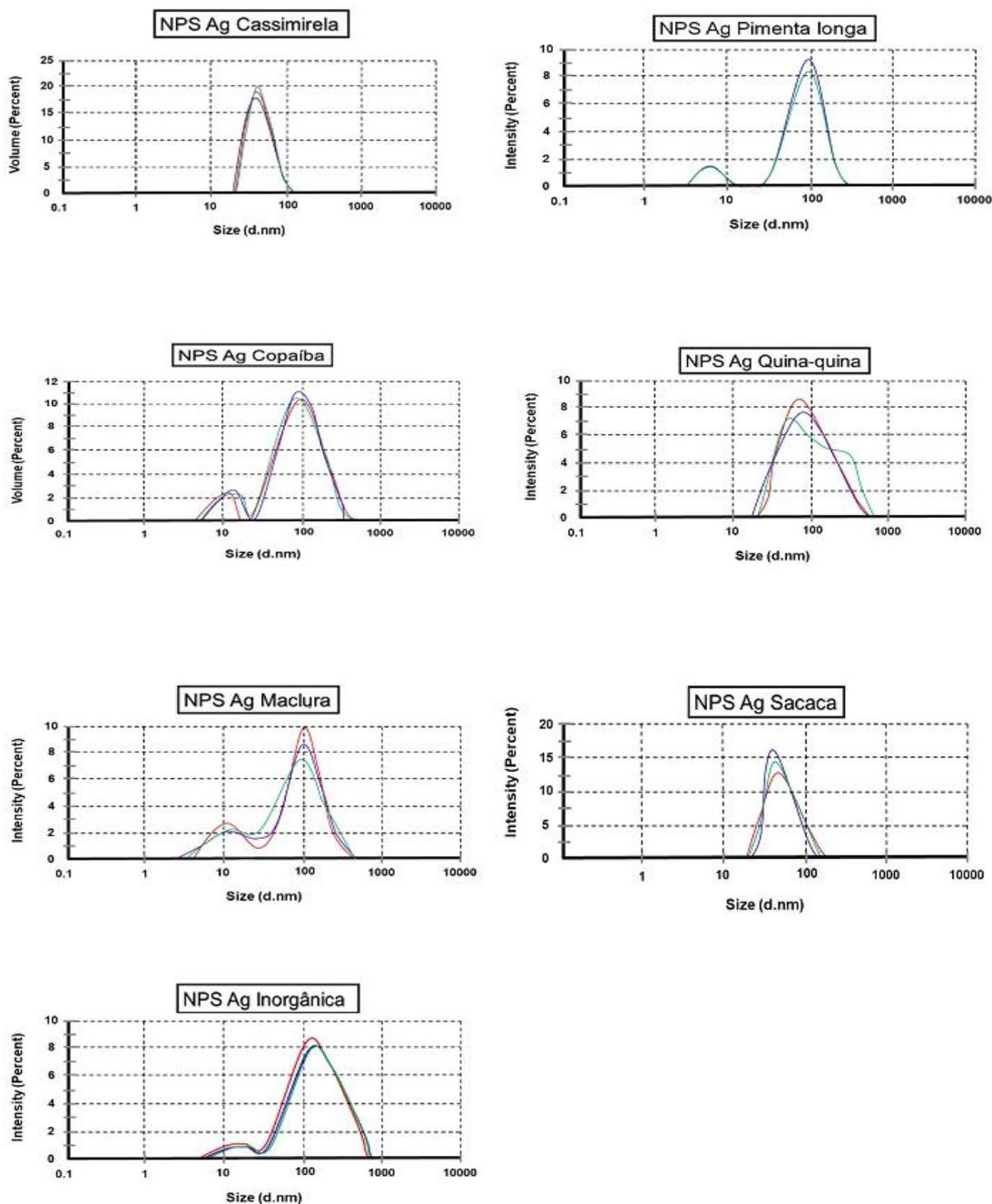
**Figura 2.** Análise de UV-VIS das nanopartículas de síntese orgânica de extratos vegetais e inorgânica





O tamanho hidrodinâmico das nanopartículas foi determinado pela técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS), a Figura 3 mostra os gráficos de intensidade onde a maioria das nanopartículas apresentam polidispersividade.

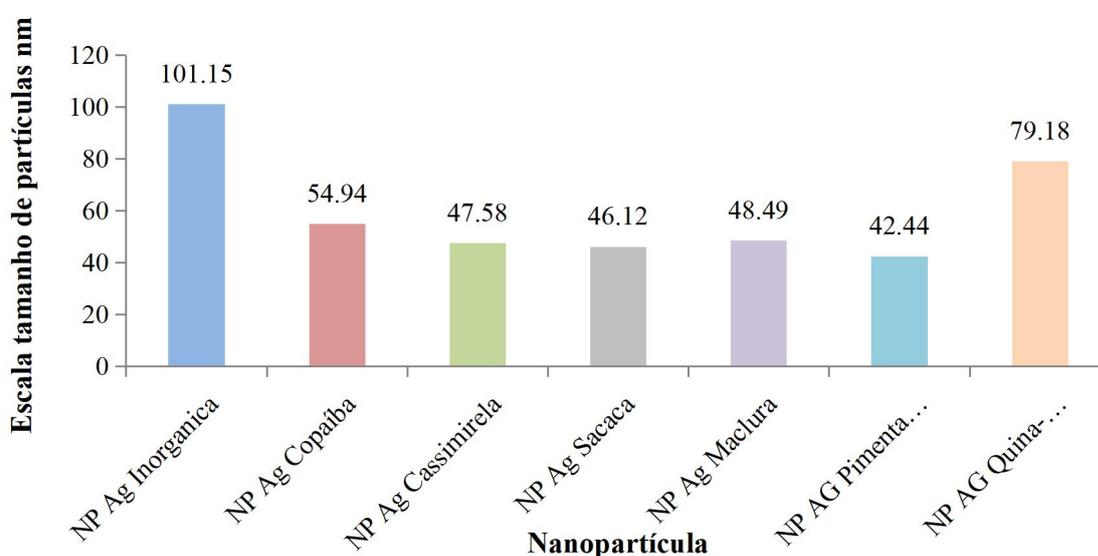
**Figura 3.** Análise de intensidade pelos tamanhos das nanopartículas de síntese orgânica de extratos vegetais e inorgânica.



As nanopartículas de síntese inorgânica e as sínteses orgânicas a partir de maclura, copaíba e pimenta longa apresentam variação de tamanhos observado dois picos, o de menor intensidade entre 3~15nm, e um volume de 7-10% da amostra. As demais sínteses orgânicas a partir de cassimirela, quina-quina e sacaca apresentam picos que variam de 7~20% o volume total da amostra.

Comparando os métodos de síntese, as nanopartículas obtidas pela rota verde obtiveram um tamanho relativamente menor ao das nanopartículas inorgânicas (Figura 4), mas vale ressaltar que nem todas apresentaram inibição de crescimento de microrganismo. O tamanho das nanopartículas está mais associado à área de contato nos microrganismos, quanto menor as partículas, maior a superfície de contato e aderência e as chances de ação antimicrobiana (PAL et al., 2007).

**Figura 4.** Tamanho médio das nanopartículas de síntese orgânica de extratos vegetais e inorgânica.



Embora algumas delas apresentem tamanhos relativamente próximos como as nanopartículas a partir da utilização de maclura, sacaca, copaíba e pimenta longa seus diferentes resultados no ensaio microbiológico demonstram que apesar de tamanhos semelhantes, outros fatores contribuem para a ação antimicrobiana, como a presença de compostos fitoquímicos capazes de potencializar essas nanopartículas em sua ação. Sena et al (2019) demonstraram em seus ensaios experimentais qualitativos que a cassimirela possui alcaloides em seus constituintes, porém a quina-quina também possui alcaloides em sua composição (CUYUBAMBA et al., 2009), observando os resultados distintos entre as duas sínteses, tanto no tamanho como no respectivo ensaio para determinar a concentração inibitória mínima.

Avaliando a partir de uma perspectiva geral as nanopartículas a partir da síntese verde (orgânica) se mostram promissoras no campo de estudo microbiológico, um tratamento melhor das nanopartículas utilizadas como o processo de liofilização para aplicar amostras mais concentradas poderiam melhorar nos resultados de concentração inibitória mínima.

## CONCLUSÃO

As nanopartículas sintetizadas através da síntese inorgânica a partir da utilização do borohidreto como agente redutor não teve atividade antimicrobiana contra os microrganismos testados. Assim, a síntese orgânica é a mais viável nesse tipo de estudo, levando em consideração a essa constante busca por novos meios de combater microrganismos patogênicos.

Os resultados apresentados demonstram potencial para estudos futuros visando uma aplicabilidade das nanopartículas a partir da síntese verde com cassimirela, copaíba e sacaca observando seu potencial na ação antimicrobiana.

## REFERÊNCIAS

ALSHAREEF, A.; LAIRD, K.; CROSS, R. B. M. Shape-dependent antibacterial activity of silver nanoparticles on *Escherichia coli* and *Enterococcus faecium* bacterium. **Applied Surface Science**, v. 424, p. 310-315, 2017.

BRITO, M. A. D.; CORDEIRO, B. C. Necessidade de novos antibióticos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial** v.48 n.4 p. 247-249, 2012.

CASTRO-OROZCO, R. C, et al. “Antimicrobial Resistance Trends in Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible *Staphylococcus Aureus* and *Staphylococcus Epidermidis* Isolates Obtained from Patients Admitted to Intensive Care Units. 2010-2015”. **Revista de La Facultad de Medicina**, vol. 67, no 3, julho de 2019, p. 409–16.

CLELAND, R.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials “*in vitro*” and in experimental animal infections. In: LORIAN, V. M. D. **Antibiotics in Laboratory Medicine**. Willians & Wilkins, p. 739-788, 1991.

CLSI - Instituto de Normas Clínicas e Laboratoriais. **Padrões de desempenho para teste de susceptibilidade antimicrobiana**; Vigésimo quinto suplemento informativo. Documento CLSI M100- S25. CLSI, Wayne, PA, EUA 2008.

- CUYUBAMBA, E. C. *et al.* Estudio químico de los tallos de *Cinchona pubescens* Vahl. **Revista de la Sociedad Química del Perú**, v. 75, n. 1, p. 54-63, 2009.
- DE BRITO, G. B.; TREVISAN, M. O uso indevido de antibióticos e o eminente risco de resistência bacteriana. **Revista Artigos.Com.** v. 30, p. e7902-e7902, 2021.
- DE FREITAS SOUZA, J.; DIAS, F. R.; DE OLIVEIRA ALVIM, H. G. Resistência bacteriana aos antibióticos. **Revista JRG de Estudos Acadêmicos.** v. 5, n. 10, p. 281-293, 2022.
- DZUL-EROSA, M. S. *et al.* Aqueous leaf extracts of *Cnidioscolus chayamansa* (Mayan chaya) cultivated in Yucatan Mexico. Part II: Uses for the phytomediated synthesis of silver nanoparticles. **Materials Science and Engineering: C**, v. 91, p. 838-852, 2018.
- ELOFF, J. N. A sensitive and quick microplate method to determine the Minimal Inhibitory Concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Medica**, v. 64, n. 8, p. 711-713, 1998.
- EVANOFF JR, D. D.; CHUMANOV, G. Synthesis and optical properties of silver nanoparticles and arrays. **ChemPhysChem**, v. 6, n. 7, p. 1221-1231, 2005.
- GELATTI, L. C. *et al.* Staphylococcus aureus resistentes à metilina: disseminação emergente na comunidade. **Anais Brasileiros de Dermatologia.** 2009, v. 84, n. 5, pp. 501-506.
- MANN, C. M.; MARKHAM, J. L. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. **Journal of Applied Microbiology**, v.84, p.538-544, 1998.
- MARCOS-CARBAJAL, P., *et al.* “Caracterización microbiológica y molecular de la resistencia antimicrobiana de *Escherichia coli* uropatógenas de hospitales públicos peruanos”. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública**, vol. 38, no 1, março de 2021, p. 119–23.
- MELO, A. M. *et al.* Extração, identificação e estudo do potencial antimicrobiano do óleo essencial de pimenta-preta (*Piper nigrum* L.), BIOMONITORADO POR *Artemia salina* Leach. **HOLOS**, v. 1, p. 1-16, 2021.
- PAL, S.; TAK, Y. K.; SONG, J. M. Does the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Depend on the Shape of the Nanoparticle? A Study of the Gram-Negative Bacterium *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 6, pág. 1712-1720, 2007.
- RAI, M.; YADAV, A.; GADE, A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. **Biotechnology advances**, v. 27, n. 1, p. 76-83. 2009.
- SENA, A. E. C. *et al.* Síntese, caracterização e análise antimicrobiana de nanopartículas de prata utilizando extrato de *Humirianthera* ampla como agente redutor. **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological**, v. 8, n. 2, p. 664-676, 2021.

SENA, A. E. C.; DA SILVA, K. L. C.; MARQUES, R. A. Análise experimental de *Humirianthera ampla*: testando positividade para alcaloides. **Scientia Naturalis**, v. 1, n. 1, p. 26-31, 2019.

SENA, A. E. C.; RAMOS, A. L.; FARIA, F. S. E. D. V. Avaliação da síntese de nanopartículas de prata sob diferentes concentrações do extrato de *Copaiba multijuga* (Heine). **Scientia Naturalis**, v. 1, n. 1. p.10-16, 2019.

SILVA, S. L., et al. “Perfil de sensibilidade antifúngica de isolados clínicos obtidos de onicomicose aos antifúngicos convencionais”. **Research, Society and Development**, vol. 9, no 8, julho de 2020.

TEIXEIRA, A. R. *et al.* Resistência bacteriana relacionada ao uso indiscriminado de antibióticos. **Revista Saúde em Foco**, v. 1, n. 11, p. 853-875, 2019.

WAIZEL-BCUAY, J.; WAIZEL-HAIAT, S. Las plantas con principios amargos y su uso medicinal; Un futuro dulce? **Anales de Otorrinolaringología Mexicana**, v. 64, n. 4, p. 202-228, 2019.

### **CAPÍTULO III**

#### **SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA A PARTIR DO EXTRATO DE *Humirianthera ampla* VISANDO AÇÃO ANTITUMORAL CONTRA CÉLULAS HEPG2**

## INTRODUÇÃO

O avanço da tecnologia tem proporcionado a maximização do potencial das atividades antimicrobianas, possibilitando a integração desse material na composição de diversos outros (SCHENEIDER et al., 2021). Apesar da viabilidade na impregnação do material antimicrobiano em componentes têxteis como ferramenta de combate ao controle do vetor de transmissão de contato, ocorre o esbarro da técnica com uma limitação na implementação do mesmo: a quantidade efetiva de redução de carga microbiana, dentro daquele meio; essa questão desperta um potencial, ainda que a ser complementado por investigações futuras (SCHENEIDER et al., 2021).

Para avaliar a questão da carga de redução, surgem a inclusão de outros agentes como fatores-chave no tratamento, como as nanopartículas de prata (NPs-Ag), revelando uma camada de ação antibacteriana (SHAFIEI; MEMARPOUR; JOWKAR, 2020). Associando o pré-tratamento de NPs-Ag com fluoreto de diamina, revelou o potencial antibacteriano do tratamento, quando colocado em quadro de tratamento dental, com a adição, ainda, da característica de cicatrização e resistência no ponto de aplicação tratado ao longo das sessões (SHAFIEI; MEMARPOUR; JOWKAR, 2020). Isso possibilitou ampliar, dentro da busca pelo potencial antibacteriano desse material, como um expoente nas aplicações conjuntas de tratamentos e pré-tratamentos.

Juntamente a esse expoente de aplicações, a união de NPs-Ag com liga de titânio através de plasma, originando filme de carbono semelhante a diamante (DLC), representa um potencial quando a reparação óssea é uma expectativa (ANKHA et al., 2019). A incorporação de diferentes teores de NPs-Ag com a referida liga no composto de DLC em questão, possibilitou expandir o horizonte da aplicação nas alternativas de tratamento para condições ósseas, conseguindo, além de a osseointegração in vivo, estabelecer propriedades de alto controle da atividade bacteriana e a corrosão com liberação de íons na área da região da mandíbula, analisada através de estudo (ANKHA et al., 2019). Assim, o potencial agregado à utilização das NPAg segue com reflexos em comportamentos diversos.

Na vertente da utilização enquanto medida de controle à microrganismos bucais, o uso de NPAg como cariostático tem comprovado a eficácia do comportamento

antibactericida (SCARPELLI et al., 2017). A propriedade inicial da microdureza (MD) avaliada para as NPAg no tratamento cariostático, observado e comprovado, em testes microbiológicos conjuntos, resultou em uma supressão de 100% dos microrganismos presentes nas cepas indicadas ao longo do tratamento, além de possibilitar a remineralização dental, associando o resultado, com o encontrado por demais estudos correlacionados (SCARPELLI et al., 2017). Os efeitos descritos, conforme se analisam diferentes cenários, permitem a criação de um entendimento sobre o funcionamento das NPs-Ag.

O horizonte de possibilidades de aplicação da atividade antibacteriana da NPs-Ag pode ser ampliado quando se consideram a ação conjunta com outros compostos, como as nanopartículas de dióxido de titânio (MAHENDRA et al., 2021). Na comparação direta entre os compostos das ligas produzidas, a ação conjunta possibilitou incremento de resistência e eficácia antibacteriana, ainda que o potencial isolado das NPs-Ag seja superior ao potencial isolado do composto da liga de titânio, o comportamento demonstrado é ainda superior aos dispostos como alternativas comerciais (MAHENDRA et al., 2021).

É importante notar, ainda, que quando se estabelece um parâmetro comparativo entre potenciais antibacteriano para nanocompósitos, diferentes conclusões podem ser tecidas, a ponto de decidir aplicações de diferentes materiais (YASSEI et al., 2020). Quando comparados nanocompósitos de óxido de cobre, óxido de prata, óxido de zinco, hidroxiapatita e nanopartículas de óxido de titânio, para diferentes concentrações, o panorama de resultados apontou diferenças significativas de desempenho, colocando a alternativa da disposição do agente de nanopartícula de óxido de prata como alternativa que demonstra eficácia dentre os demais destacando ainda, que embora seja uma pequena diferença significativa, aponta caráter relevante na análise em questão (YASSEI et al., 2020).

Com os resultados dos estudos paralelos obtidos, interações que potencializam o potencial das NPs-Ag com revestimento de dióxido de silício despontam como o destaque mais elevado (AGUIAR et al., 2022). Quando analisados os efeitos da junção acima referida, sobre a população de *S. mutans*, os apontamentos indicaram a maior redução significativa, demonstrando que além da aplicação antibacteriana explicitada em panoramas anteriores, resultados em populações específicas conseguem alertar como

sinais de alerta para utilização, ampliando, ainda mais, a gama de alvos de controle na sua implementação (AGUIAR et al., 2022).

Pensando no enfoque vasto do potencial das NPs-Ag e sua viabilidade, surge a problemática na sua obtenção, quanto aos métodos sustentáveis, se verificando, então, o método da síntese verde como um caminho promissor (BRUNIERA et al., 2020).

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Cadastro SisBio

O cadastro foi realizado para obter autorização de coleta e transporte de amostras vegetais, o número do cadastro obtido foi 85014-1, através do site ICMBio.

### Preparação da amostra vegetal

As folhas foram coletadas e lavadas com água corrente, em seguida foram secadas em estufa a 40°C (Figura 1a) por um período de 48h. Passado o período de secagem as folhas foram trituradas utilizando um moinho de facas (Figura 1b).



Figuras 1a e 1b: Processo de secagem e equipamento moinho de facas

Os extratos foram preparados através do método de decocção utilizando a proporção 1:10 (a cada 1g de pó 10mL de água foi adicionado), foram utilizados 20g de pó seco e triturado das folhas e 200ml de água destilada mantendo sob aquecimento e agitação após alcançar 70°C por um período de 5 minutos. O “chá” foi filtrado e congelado para posterior liofilização.

A liofilização ocorreu mantendo a amostra por um período de 48 horas há  $-60^{\circ}\text{C}$  e pressão em torno de  $120\mu\text{Hg}$ .

#### Síntese de nanopartículas de Prata NPs-Ag

Para obter as nanopartículas de prata, inicialmente foi preparado uma solução de nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) a 1mM, em seguida separado 10ml da solução em tubos falcon (de 50ml), em cada tubo falcon foi adicionado as soluções de extrato (5ml de solução) sob gotejamento utilizando agitador vórtex por 5 minutos, nas concentrações  $100\mu\text{g/mL}$ ,  $150\mu\text{g/mL}$ ,  $200\mu\text{g/mL}$ ,  $250\mu\text{g/mL}$  e  $300\mu\text{g/mL}$ . Após a mistura, as amostras foram armazenadas sob abrigo da luz a uma temperatura de aproximadamente  $25^{\circ}\text{C}$  por um período de 24 horas, que ao final do processo as amostras adquiriram uma coloração castanho-avermelhada indicando a formação das nanopartículas.

#### Uv-Vis

As análises de UV-Vis foram realizadas utilizando espectrofotômetro JENWAY 6705, com resolução de 1nm na faixa de 200 a 600nm, com o auxílio de uma pipeta automática cerca de 2mL de cada amostra foram utilizados para a realização da leitura, utilizando uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 10nm, a uma temperatura de aproximadamente  $23^{\circ}$ , em um período de 24h após a síntese.

#### Espalhamento dinâmico de luz - DLS

A análise de espalhamento dinâmico de luz foi realizada utilizando o equipamento Malvern zetaser nano- ZS90. Após um período de 24h de realização da síntese as amostras foram submetidas a leitura no equipamento, utilizando 1mL de cada síntese nas concentrações de  $100\mu\text{g/mL}$ ,  $150\mu\text{g/mL}$ ,  $200\mu\text{g/mL}$ ,  $250\mu\text{g/mL}$  e  $300\mu\text{g/mL}$  para avaliar o tamanho das partículas (diâmetro hidrodinâmico) e polidispersividade.

#### Microscopia eletrônica de transmissão - MET

As imagens de microscopia foram obtidas através de parceria com a Fiocruz da Bahia, que dispõe de um laboratório de microscopia, na ocasião foi utilizado o microscópio eletrônico de transmissão modelo JEM – 1230 JEOL, que funciona em tensão variada de até 120Kv, e câmera CCD para capturar as imagens.

### **Infravermelho por transformada de Fourier - FTIR**

Para a detecção de grupos funcionais presentes nas amostras foi realizado utilizando a microscopia de infravermelho por transformada de Fourier, utilizando equipamento Frontier FT-IR/NIR número de série 98117, que realiza 16 varreduras com intervalo de varredura padrão de 4000 a 450  $\text{cm}^{-1}$ .

### **Difração de raio X - DRX**

O ensaio de DRX ocorreu a partir de utilização de difratômetro, com radiação de  $\text{Cu-K}\alpha$  ( $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$ ) obtida com tensão de 30 kV, corrente de filamento de 30 mA no modo contínuo com velocidade de varredura de  $1^\circ/\text{min}$ .

Essa técnica consiste em avaliar a estrutura cristalina de materiais, quando aplicada a nanopartículas de prata ela pode fornecer informações relativas ao tamanho, forma e organização das partículas em nível atômico.

### **Espectroscopia RAMAN**

Utilizando espectrômetro micro Raman modelo Witec alpha300 RA que possui uma capacidade de imageamento espectral de 1  $\mu\text{m}$ , com três linhas de laser (633 nm, 532 nm e 457 nm), um detector de última geração do tipo EMCCD, e um sistema de microscopia de força atômica (AFM) que permite a criação de imagens topográficas, foi possível realiza as análises das amostras de extratos e nanopartículas.

### **Ensaio de MTT – análise antitumoral**

A avaliação de atividade antitumoral ocorreu utilizando linhagem de células do banco de amostras do laboratório de cultura de células no complexo BIONORTE. A técnica consiste em incubação das células em meio de cultura suplementando soro enriquecido. Posteriormente o subcultivo das células foi semeado em microplacas de 96 poços e então as nanopartículas incorporadas, e o resultado final foi submetido a leitor de placas que mostra a viabilidade celular (SOUZA, 2018).

O ensaio de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difwniltetrazólio) é um ensaio colorimétrico que se baseia na reação de redução do MTT, formando o produto formazan, por ação da enzima mitocondrial succinato desidrogenase (MOSMANN, 1983).

As células HEPG2 (carcinoma hepatocelular, câncer de fígado) foram encubadas em meio de cultura DMSO contendo soro bovino fetal. Após período de incubação das células, o meio de cultura foi removido e as células foram tratadas com o extrato isolado, a solução de nitrato de prata isolado e a solução de NPs-Ag, em diferentes concentrações, e para o controle positivo foi utilizado o DXR (doxorubicina).

Para análise dos dados obtidos foram aplicados teste de ANOVA.

## RESULTADOS

O primeiro sinal de que ocorreu a síntese é a mudança na coloração das amostras, que passam de uma solução translúcida para um amarelo âmbar, devido ao efeito de plasmons na superfície das partículas (Figura 2).

Imagem de síntese

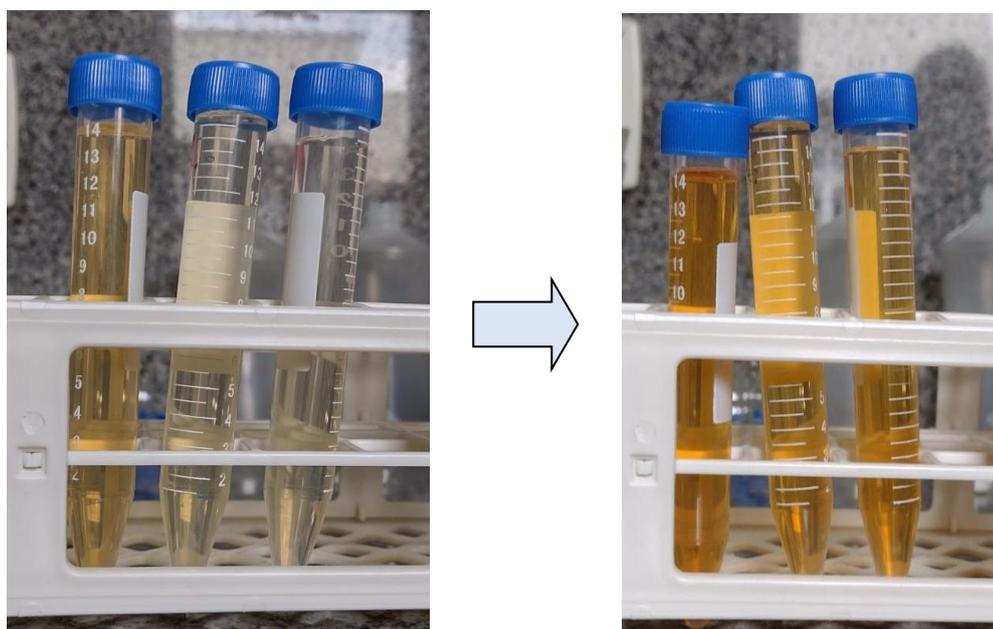


Figura 2: Mudança na coloração com o passar das horas da síntese.

As análises espectroscópicas de UV-Vis mostram que houve a formação das nanopartículas em todas as concentrações, evidenciado pelo pico intenso na faixa de 280 a 350 nm.

Gráfico de UV-Vis

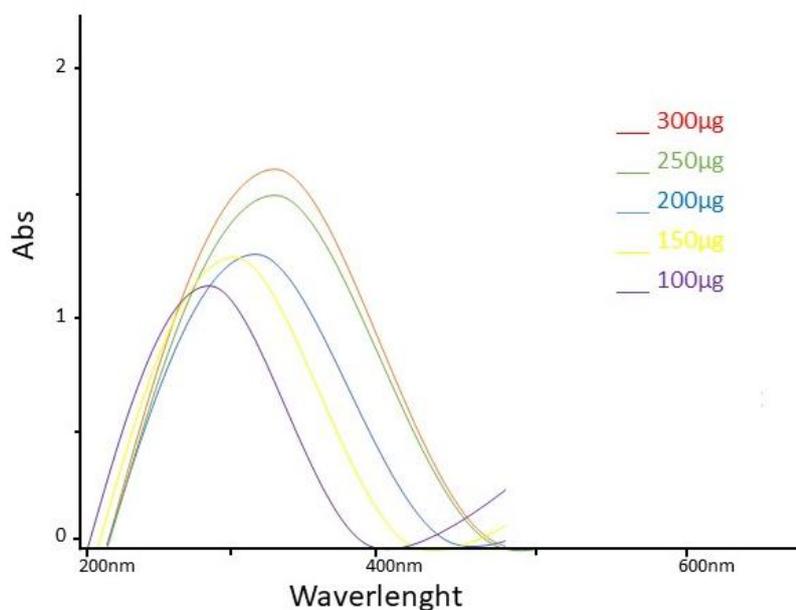


Gráfico 1. Uv-Vis mostrando comprimento de onda da síntese de nanopartículas nas concentrações 100µm a 300 µm

Para a análise de espalhamento dinâmico de luz (DLS) através da utilização do zeta-sizer foi possível selecionar a melhor concentração de síntese através dos dados de PDI (polidispersão) e tamanho de partículas conforme mostrado nos gráficos abaixo (gráficos 2 e 3).

Gráfico 02 - Índice de polidispersão

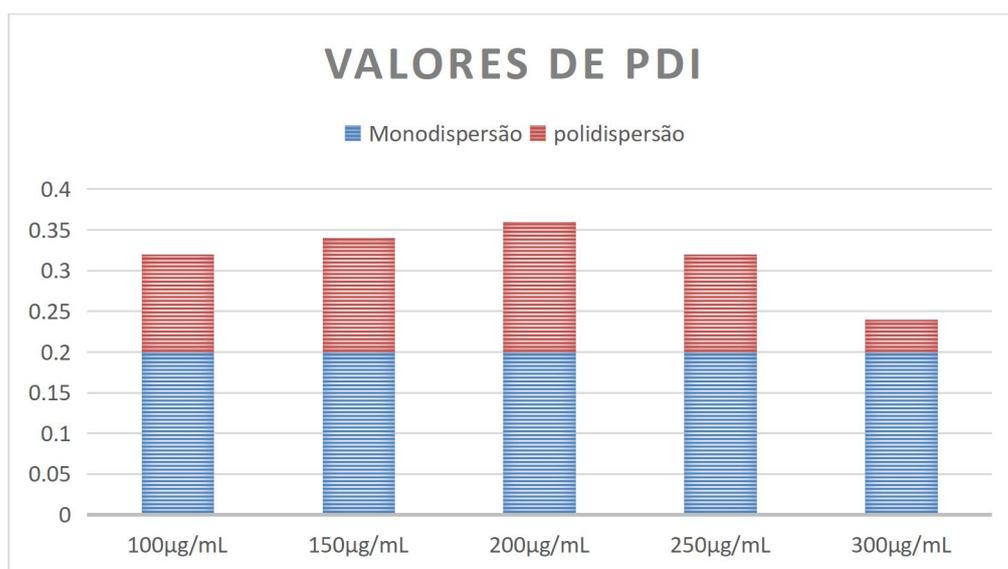
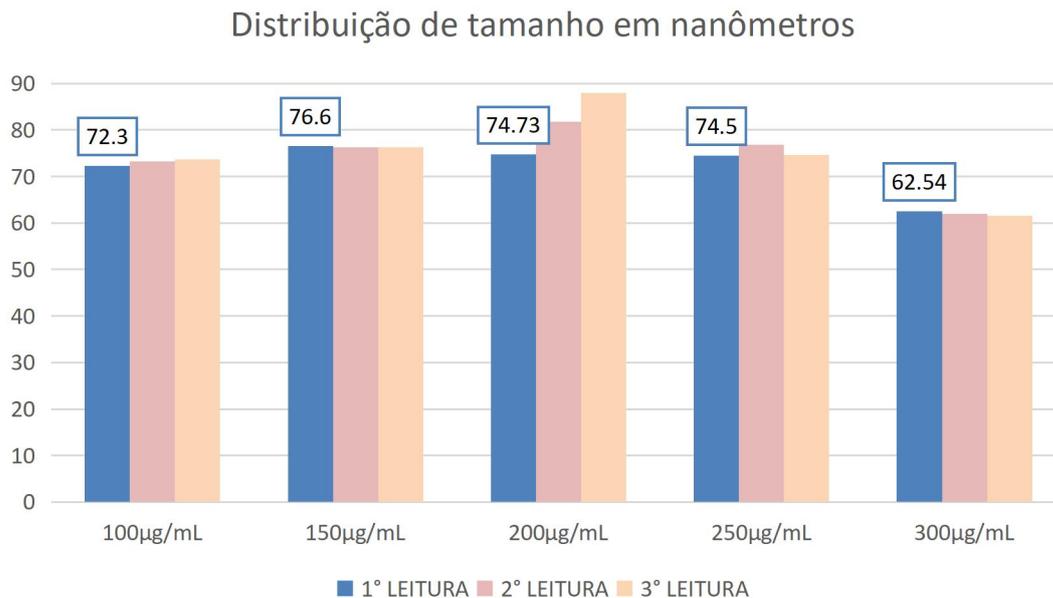


Gráfico 03 - Distribuição de Tamanho de partículas

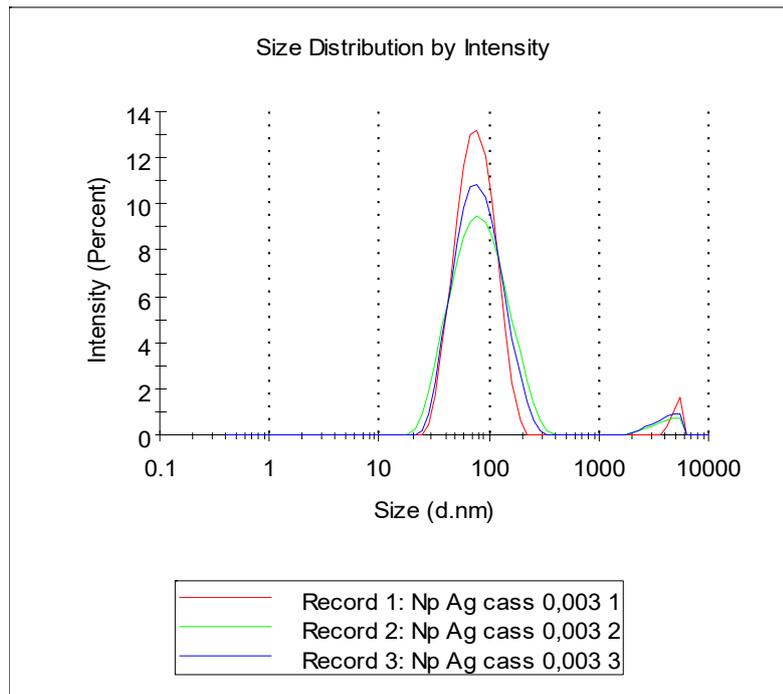


O gráfico 2 demonstra índice de polidispersão de acordo com as concentrações utilizadas na síntese, refletindo no tamanho das nanopartículas expressas no gráfico 3.

Com base nos dados coletados a síntese utilizando a concentração de 300µg/ml de extrato obteve melhor prognóstico para as próximas análises levando em consideração a estabilidade e índice de polidispersão.

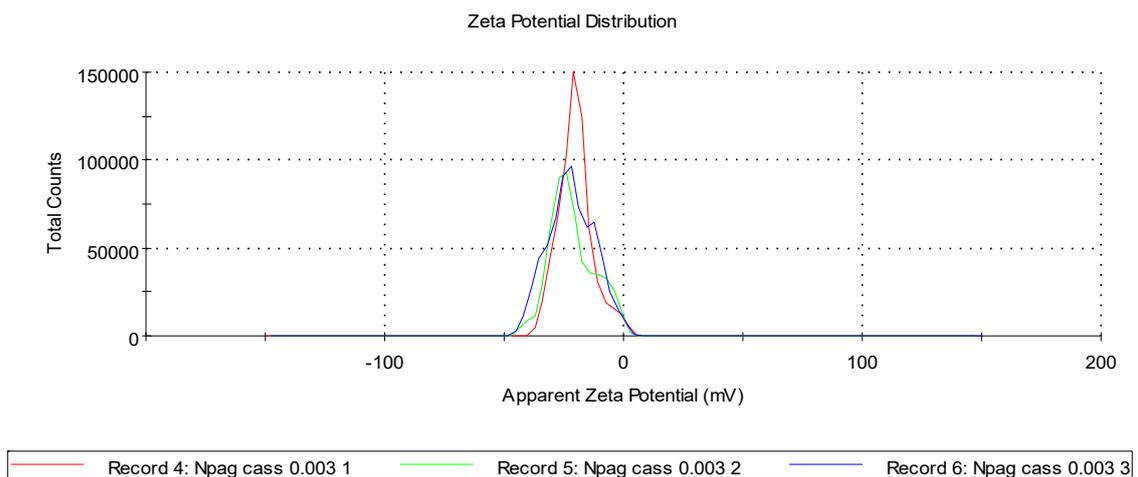
O gráfico 04 demonstra a distribuição por volume de partícula na concentração de 300µg/ml de extrato.

Gráfico 04 - Distribuição de partículas por volume



O potencial Zeta das amostras mostram sistemas carregados que contribuem para a estabilidade coloidal, uma vez que as partículas carregadas superficialmente se repelem mantendo a dispersão das partículas em solução (gráfico 5).

Gráfico 05 - potencial Zeta



A microscopia eletrônica de transmissão (MET) revelou imagens de nanopartículas de tamanhos variados, com formato esférico e dispersas, a dispersão ocorre através da motilidade das partículas através da carga (Figura 3).

## Imagens MET

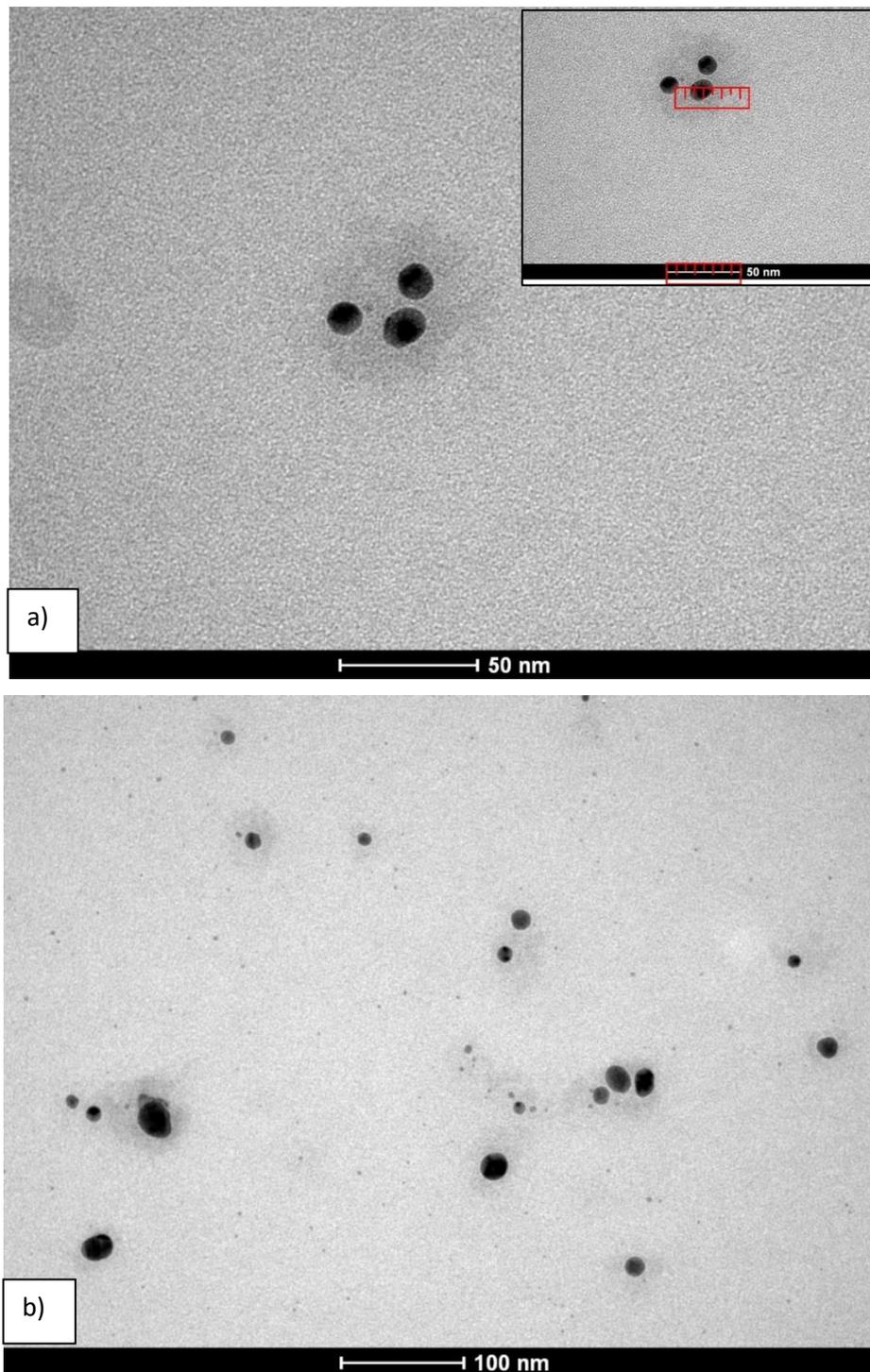
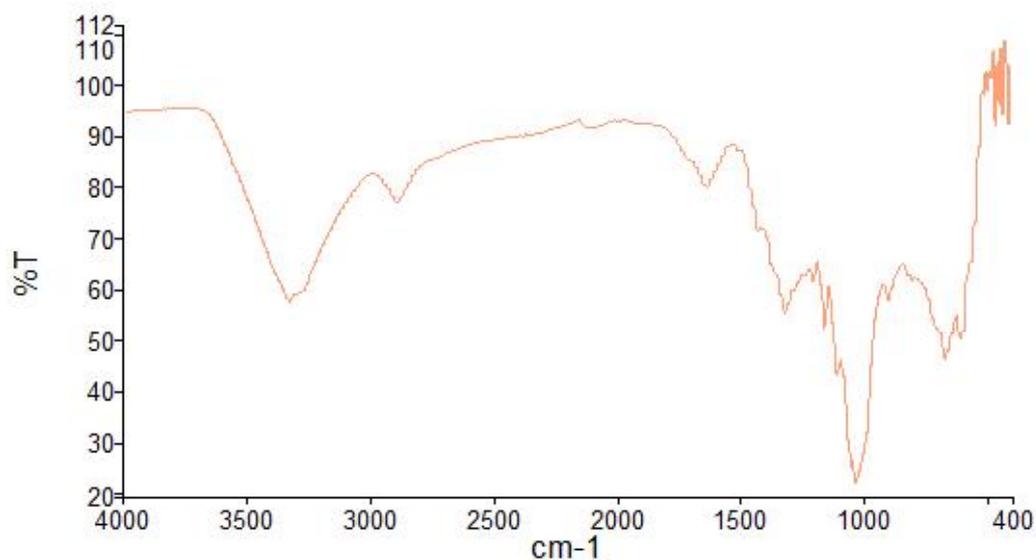


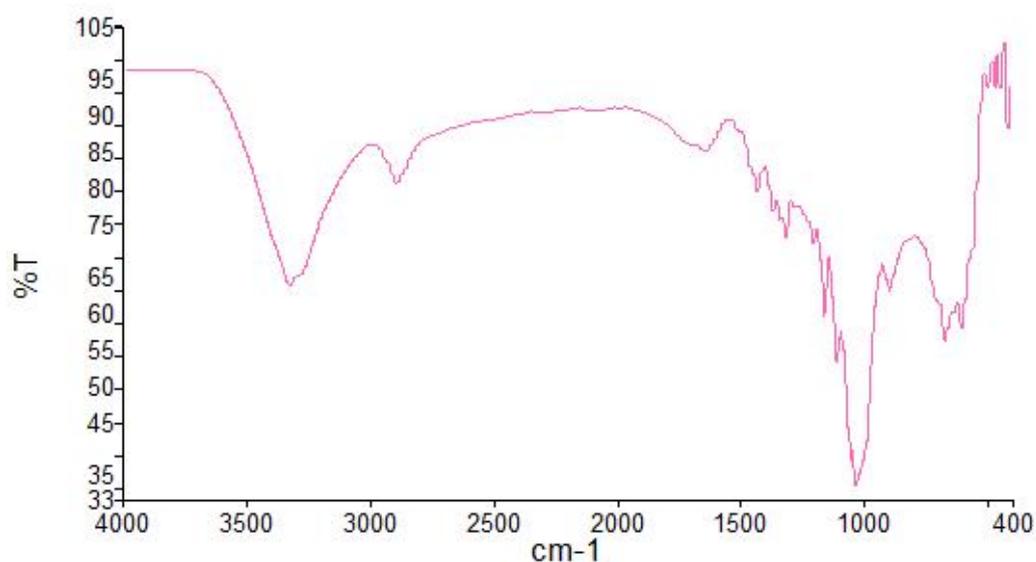
Figura 3: Imagens com resolução óptica de 50nm (a) e 100nm (b)

FTIR

FTIR – NPs-Ag



FTIR- Extrato isolado

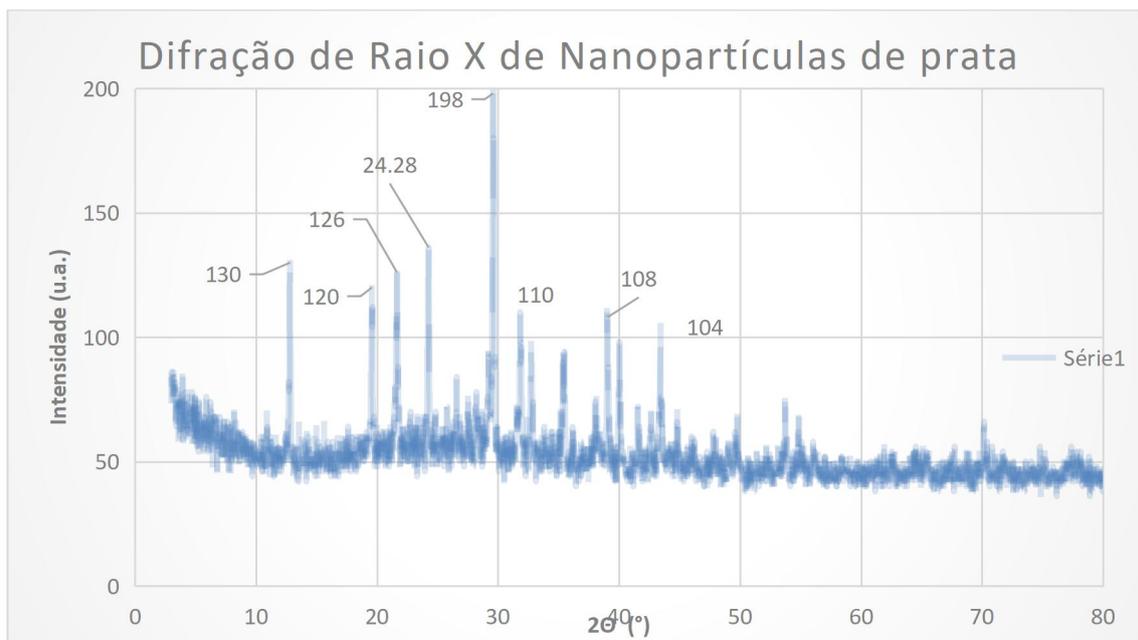


As análises de FTIR mostram a similaridade do extrato isolado e das nanopartículas sintetizadas com o extrato, apresentando bandas com valores aproximados e transmitância com pouca divergência de intensidade. Picos de  $3335\text{ cm}^{-1}$  indicam ligação O-H, bandas com  $2899\text{ cm}^{-1}$  ligação C-H,  $1638 - 1641\text{ cm}^{-1}$  ligações características de grupo amida (C=O), bandas de  $600 - 500\text{ cm}^{-1}$  absorção de prata (BALLOTTIN, 2014).

DRX

O difratograma da amostra de nanopartículas liofilizadas apresenta picos de aproximadamente  $39^\circ$  e  $43^\circ$  que condiz com o perfil da prata, podendo ser identificado através da ficha *code* – 44387 a partir de dados do *Inorganic Crystal Structure Database* – ICSD, demonstrando uma fase cristalina.

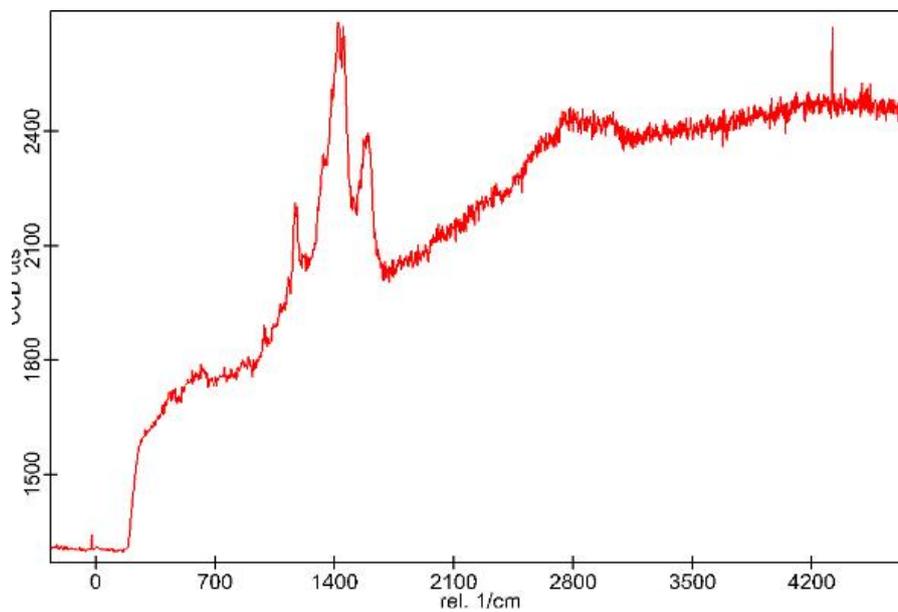
Gráfico Drx



RAMAN

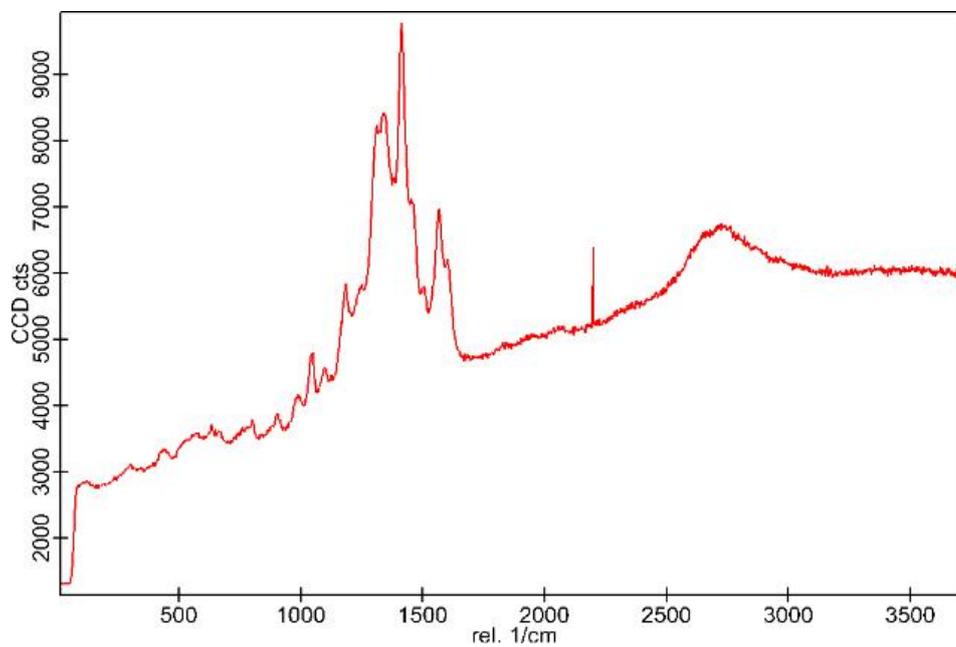
Espectros Raman 457nm 9mV

NPs-Ag

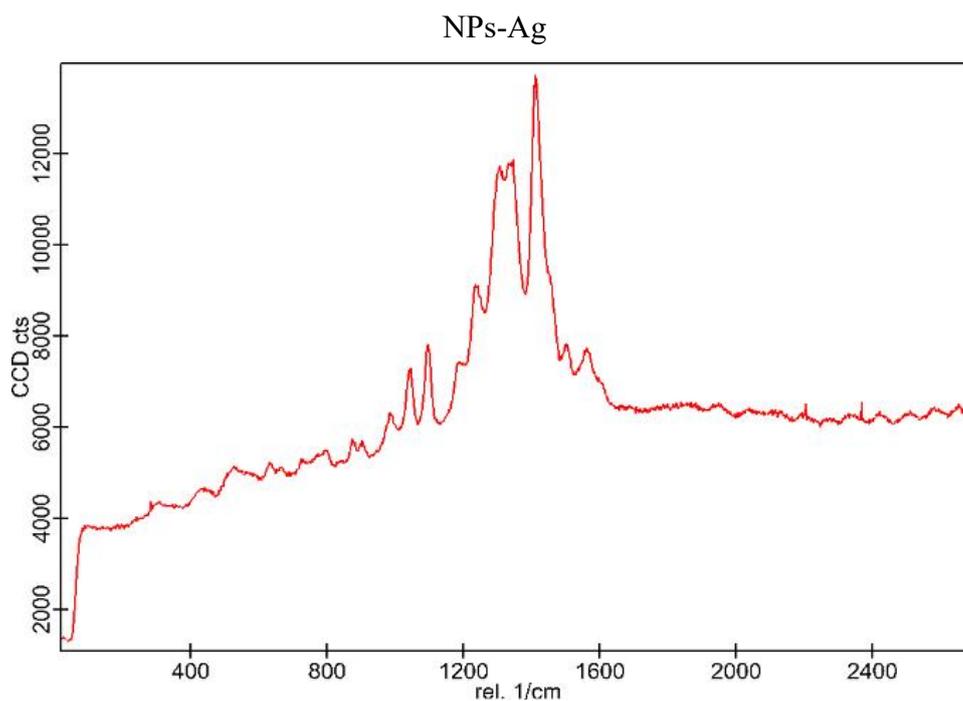


Espectros Raman 532nm 9Mv

NPs-Ag



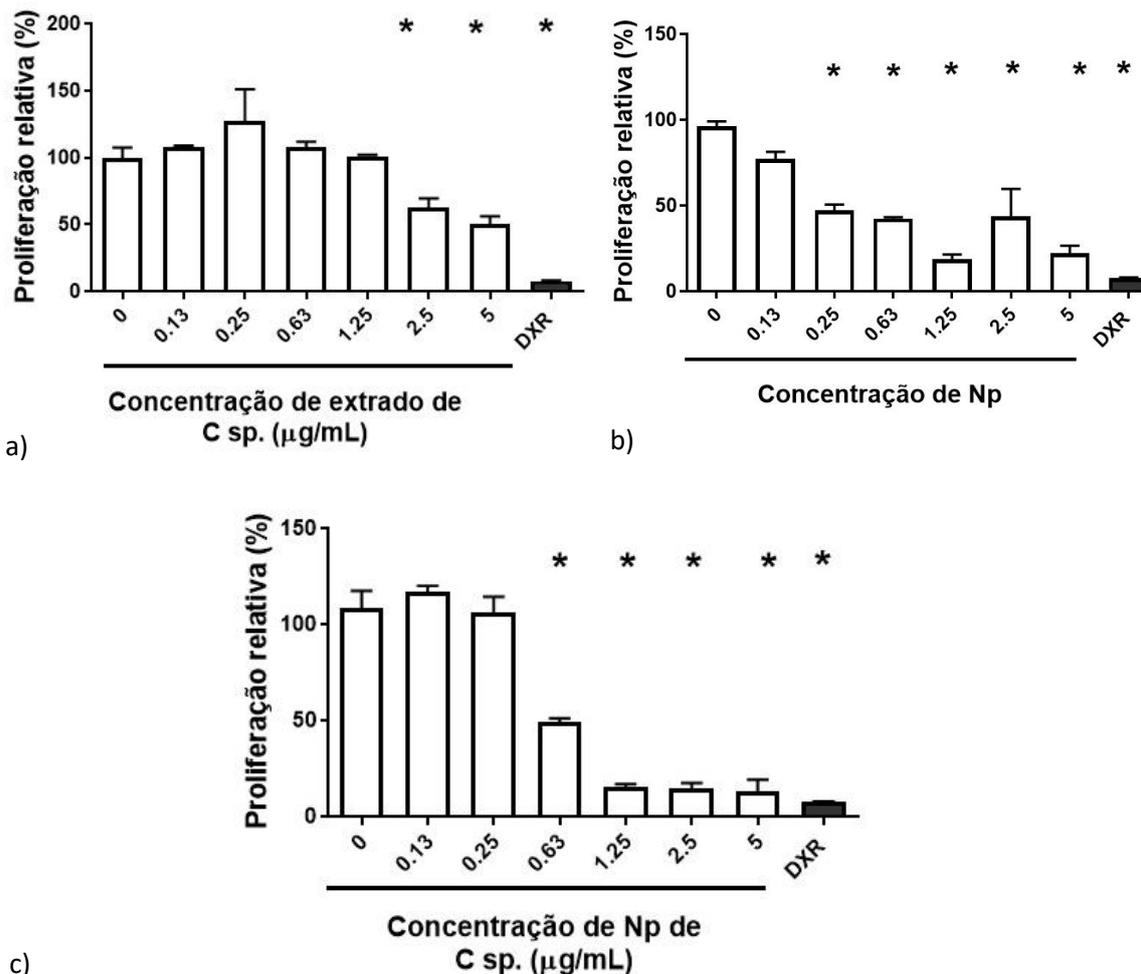
Espectros Raman 633nm 9Mv



Os espectros RAMAN, demonstram vibrações de grupamento amida e amina (BALLOTTIN, 2014). O gráfico de espectroscopia Raman das nanopartículas de prata sintetizadas utilizando o extrato de *Humirianthera ampla* mostra características vibracionais que podem ser atribuídas a interações entre a prata e os compostos orgânicos presentes no extrato (IVANOV, 2019). A presença de picos na região de  $1200-1500\text{ cm}^{-1}$  é particularmente indicativa de modos vibracionais de moléculas orgânicas (GUO *et al*, 2015). Este espectro sugere uma síntese promissora, com potenciais aplicações em estudos antitumorais e antimicrobianos.

#### ENSAIO MTT

A análise antitumoral através do ensaio de MTT, realizado com o extrato da planta isolado na mesma concentração utilizada na síntese, com a solução de nitrato de prata, na mesma concentração utilizada em síntese e por fim, com a NPs-Ag.



a) Teste apenas com o extrato de cassimirela b) Teste apenas com o nitrato de prata c) Teste com a nanopartícula sintetizada com o extrato.

## DISCUSSÃO

A cor observada ao final da síntese das nanopartículas de prata está diretamente relacionada à frequência da ressonância de plasmons da superfície das partículas resultante das propriedades ópticas e eletrônicas das nanopartículas de prata, que dependem do tamanho e da forma das partículas (CRESSeschi, SANTOS 2021).

A análise espectroscópica de UV-Vis é essencial para caracterização das nanopartículas metálicas através de sua frequência de ressonância emitida, os resultados de comprimento de onda detectados são similares a outros trabalhos também relacionado a nanopartículas de prata sintetizadas pela rota verde como descreve SENA e colaboradores (2019).

O índice de polidispersão sugere que uma amostra apresente características homogênea, com valores próximos a 0,2, o sistema apresenta partículas monodispersas, dentre as amostras a que mais se aproximou desse índice foi a concentração de 300 $\mu\text{g/mL}$ , a mesma concentração obteve o menor tamanho de partículas. As partículas monodispersas são aquelas que apresentam maior estabilidade onde as partículas carregadas se repelem evitando aglomeração e precipitação, formando um sistema estável.

As imagens de microscopia revelam nanopartículas esféricas e dispersas, que vai de acordo com as análises prévias. Na figura 3 (a) é possível ter uma dimensão de tamanhos a partir da comparação com a régua posicionada no canto superior direito, mostrando partículas menores que 50nm.

As análises de FTIR demonstram que a presença dos grupos funcionais do extrato permanece nas nanopartículas, possivelmente pela ligação que ocorre entre as proteínas e as nanopartículas através do grupamento amino livre, que também podemos observar no espectro RAMAN, através do aumento da intensidade da banda SERS, em aproximadamente 1231  $\text{cm}^{-1}$  possivelmente de presença de grupo amida como sugerido por BALLOTIN (2014).

O ensaio de MTT, revelou após análise que a solução de nitrato de prata possui toxicidade em quase todas as concentrações, o extrato isolado possui toxicidade nas concentrações de 2,5  $\mu\text{g/ml}$  e 5 $\mu\text{g/ml}$  e em forma de nanopartícula de prata possui toxicidade nas concentrações de 1,25 $\mu\text{g/ml}$ , 2,25 $\mu\text{g/ml}$  e 5 $\mu\text{g/ml}$ .

## CONCLUSÕES GERAIS

A prata já possui uma toxicidade que já é conhecida, que podemos evidenciar com os resultados obtidos a partir da potencial ação antimicrobiana, assim como no ensaio de MTT, visando ação antitumoral.

A caracterização das nanopartículas de prata sintetizadas pela rota verde utilizando extrato de *Humirianthera ampla* demonstra uma síntese promissora, abrindo campo para estudo com outras plantas visando melhoramento e aprimoramento de nanopartículas estáveis capazes de combater células cancerígenas.

Estudar a rota de síntese verde em outros tipos de células cancerígenas, com diferentes tamanhos e formulações, é um campo interessante para pesquisas futuras. Considerando os dados obtidos, o tamanho e a área de superfície dessas nanopartículas indicam que elas podem penetrar nas células com maior facilidade, causando apoptose nas células alvo. Além disso, sua ação antimicrobiana poderia ser útil na prevenção de infecções secundárias.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- SILVA, L. P. et al. Nanotecnologia verde para síntese de nanopartículas metálicas. **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria** - Vol. 4. p. 967–1012, 2017.
- OVAIS, M. et al. Multifunctional theranostic applications of biocompatible greensynthesized colloidal nanoparticles. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 102, n. 10, p. 4393–4408, 2018.
- SOUZA, J. A. S. et al. Green synthesis of silver nanoparticles combined to calcium glycerophosphate: antimicrobial and antibiofilm activities. **Future microbiology**, v. 13, n. 3, p. 345-357, 2018.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v.65, p. 55-63, 1983.
- GRASSESCHI, Daniel; SANTOS, Diego P. dos. Nanomateriais plasmônicos: parte i. fundamentos da espectroscopia de nanopartículas e sua relação com o efeito sers. **Química Nova**, v. 43, p. 1463-1481, 2021.
- Rogero, S. O., Quintino, M. T., ALMEIDA, P. R. D., Dias, R. R., Lugão, A. B., Rogero, J. R.. Toxicidade da nanopartícula de prata (NPAg): estudo comparativo entre suspensões de NPAg obtidas por diferentes métodos. 2015.
- BALLOTITIN, D. Et al. Elucidating protein involment in the stabilization of the biogenic silver nanoparticles. **Nanoscale Reserch Letters**, v.11, p.313, 2016.
- BALLOTTIN, Daniela Pott Marinho. Caracterização de nanopartículas de prata e sua aplicação na produção de tecidos antimicrobianos. 2014. Tese de Doutorado. [sn].
- LIANG, Ping et al. Silver nanoparticles enhance the sensitivity of temozolomide on human glioma cells. **Oncotarget**, v. 8, n. 5, p. 7533, 2017.
- IVANOV, Evandro. **Deteção de pesticidas por espectroscopia Raman intensificada por superfície (SERS) com nanopartículas de prata funcionalizadas**. 2019. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

GUO, H., Zhang, Z., Xing, B., Mukherjee, A., Musante, C., White, J. C., He, L. Analysis of silver nanoparticles in antimicrobial products using surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS). **Environmental science & technology**, v. 49, n. 7, p. 4317-4324, 2015.

ROQUE, Gabriella Sales Calaço. **Estudo da ação antitumoral de nanopartículas de prata biogênicas**. 2023. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

BELTRÁN PINEDA, Mayra Eleonora; LIZARAZO FORERO, Luz Marina; SIERRA, y Cesar A. Mycosynthesis of silver nanoparticles: A review. **BioMetals**, v. 36, n. 4, p. 745-776, 2023.