



**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO PIAUÍ
CAMPUS TERESINA-CENTRAL
CURSO MESTRADO EM ENGENHARIA DE MATERIAIS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE MATERIAIS**

GECIVALDO BENICIO DA CRUZ SILVA

**POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA AgNP's
ESTABILIZADA EM EXTRATO AQUOSO DE *Bauhinia forficata***

TERESINA

2023

GECIVALDO BENICIO DA CRUZ SILVA

**POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA AgNP's
ESTABILIZADA EM EXTRATO AQUOSO DE *Bauhinia forficata***

Dissertação de Mestrado apresentada como exigência parcial para obtenção do diploma do Curso de Engenharia de Materiais do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí, Campus Teresina-Central.

Orientadora: Profa. Dra. Deuzuita dos Santos Freitas Viana.

Coorientador: Prof. Dr. Vicente Galber Freitas Viana

TERESINA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

S586p Silva, Gecivaldo Benício da Cruz
Potencial antimicrobiano de nanopartículas de prata AgNPs estabilizada em extrato aquoso de Bauhinia forficata. / Gecivaldo Benício da Cruz Silva. - 2023.
79 f.: il. color.

Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí, Campus Teresina Central, 2023.

Orientadora : Profa Dra. Deuzuita dos Santos Freitas Viana.
Coorientador : Prof Dr. Vicente Galber Freitas Viana.

1. Nanopartículas de prata (AgNPs) - potencial antimicrobiano. 2. Extrato de Bauhinia forficata. 3. Microorganismos resistentes a antibióticos. 4. Combate a agentes patogênicos. I. Título.

CDD - 620.1

Elaborado por Sindya Santos Melo CRB 3/1085

GECIVALDO BENICIO DA CRUZ SILVA

POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA AgNP's
ESTABILIZADA EM EXTRATO AQUOSO DE *Bauhinia forficata*

Dissertação de Mestrado apresentada como exigência parcial para obtenção do diploma do Curso de Engenharia de Materiais do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí, Campus Teresina-Central.

Aprovada em: 01/11/2023.

Prof. Dra. Deuzuita dos Santos Freitas Viana (Orientadora)
Universidade Estadual do Maranhão-UEMA/FACID

Prof. Dr. Vicente Galber Freitas Viana (Coorientador)
Instituto Federal do Piauí-IFPI

Prof. Dr. Haroldo Reis Alves de Macêdo
Instituto Federal do Piauí-IFPI

Prof. Dra. Girlene Soares Figueiredo
Universidade Federal do Piauí-UFPI

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação de mestrado aos meus pais, Adriana Benicio da Cruz
Silva e Edivaldo Batista da Silva.

Dedico também aos meus pais científicos, Prof. Dra. Deuzuita dos Santos
Freitas Viana e Prof. Dr. Vicente Galber Freitas Viana.

Ao meu avô Lourenço Batista de Oliveira, *in memoriam*.

A saúde de todos que sofrem com infecções causadas por microrganismos
patogênicos.

AGRADECIMENTO

Agradeço primeiramente a Deus, que me deu força, coragem e sabedoria em todos os momentos e por ter permitido que eu chegasse até aqui, através de suas graças gloriosas e dolorosas. Minha vitória és tua. Em especial quero agradecer a poderosa intercessão de Nossa Senhora na minha vida, gratidão divina mestra.

Agradeço a todos os âmbitos do Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Piauí- IFPI, campus Teresina central.

Ao grupo do laboratório de Química-IFPI pela parceria e execução da metodologia da pesquisa. Em especial aos meus amigos (Teresa, Ezequiel, Liduína e Lucas) e meus colegas de turma pelo apoio necessário ao longo do curso.

Agradeço minha mãe, Adriana Benicio e meu pai Edivaldo Batista pelo amor incondicional, pela minha formação humana, emocional e espiritual, e a todos da minha família, vocês são meu alicerce.

Agradeço minha orientadora Prof.^a. Dra. Deuzuita dos Santos Freitas Viana e meu coorientador Prof.^o Dr. Vicente Galber Freitas Viana, minha gratidão por toda paciência, dedicação e ensinamentos tanto para a formação pessoal quanto para a formação acadêmica e profissional.

Agradeço a todos os professores e colaboradores do programa de pós-graduação em engenharia de materiais-PPGEM, em especial ao Prof.^o Dr. Gilvan Moreira por todos os saberes que envolvem o processo de desenvolvimento e aprendizagem.

Ao Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal do Piauí-UFPI, em especial ao Laboratório de Microbiologia e a Prof.^a. Dra. Girlene Soares pela parceria na execução dos testes de atividade antimicrobiana.

Ao Departamento de Química da Universidade Federal do Piauí-UFPI pela parceria na realização de algumas análises em especial ao professor Dr. Janildo Magalhães.

Por fim agradeço a todos que contribuíram de forma direta e indireta para a concretização da minha pesquisa.

RESUMO

O aumento no número de microrganismos resistentes aos antibióticos é considerado uma problemática de saúde global e com impactos devastadores na sociedade. A expansão desse problema consiste no uso incorreto dos medicamentos disponíveis pelas indústrias farmacêuticas, tendo como consequência a dificuldade no tratamento de doenças infecciosas que se espalham aceleradamente. O número de mortes por infecções não tratáveis causadas por esses agentes patogênicos resistentes evidencia a necessidade de desenvolver novos tratamentos, rotas sintéticas e possibilidades para combater a resistência antimicrobiana. Nesse sentido, o objetivo dessa pesquisa é sintetizar nanopartículas de prata (AgNPs) preparadas pelo método de síntese verde utilizando extrato aquoso de *Bauhinia Forficata*; caracterizá-las através de espectroscopia na região do ultravioleta visível (UV-VIS), difração de raios-x (DRX), espectroscopia na região do infravermelho (FTIR), espalhamento dinâmico de luz (DLS) e potencial Zeta; além disso avaliar seu potencial efeito toxicológico e antimicrobiano. Na caracterização por espectroscopia na região do ultravioleta visível (UV-VIS) e difração de raios-x (DRX) identificou-se o material; sua interação com o extrato foi analisada pela espectroscopia na região do infravermelho (FTIR); através do espalhamento dinâmico de luz (DLS) e potencial Zeta foi mensurado o raio hidrodinâmico e avaliado a estabilidade das nanopartículas de prata formadas; em seguida foram aplicadas contra cepas bacteriana: *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e espécie fúngica: *Candida albicans* e ensaio toxicológico com *Artemia salina*. Os resultados mostram pico de absorção máxima de 438 nm, estabilidade após 1 dia e 7 dias da síntese e pico de difração máximo em 38°. O material formado se manteve eletronicamente estável com potencial Zeta médio de 32,1 mV, PDI de 1,5 e tamanho hidrodinâmico médio de 21,2 nm. O teste de susceptibilidade de difusão em poço comprova atividade antimicrobiana significativa das AgNPs frente às cepas bacterianas e fúngica com a formação de halos de inibição de 29 mm nas culturas testadas.

Palavras-chave: Microrganismo patogênico; Nanopartículas metálicas, Ação antimicrobiana.

ABSTRACT

The increase in the number of microorganisms resistant to antibiotics is considered a global health problem with devastating impacts on society. The expansion of this problem consists of the incorrect use of medicines available by pharmaceutical industries, resulting in difficulties in treating infectious diseases that spread rapidly. The number of deaths from untreatable infections caused by these resistant pathogens highlights the need to develop new treatments, synthetic routes and possibilities to combat antimicrobial resistance. In this sense, the objective of this research is to synthesize silver nanoparticles (AgNPs) prepared by the green synthesis method using aqueous extract of *Bauhinia Forficata*; characterize them through spectroscopy in the visible ultraviolet region (UV-VIS), x-ray diffraction (XRD), spectroscopy in the infrared region (FTIR), dynamic light scattering (DLS) and zeta potential; in addition to evaluate its potential antimicrobial effect. Characterization by spectroscopy in the ultraviolet visible region (UV-VIS) and x-ray diffraction (XRD) identified the material; its interaction with the extract was analyzed by infrared spectroscopy (FTIR); through dynamic light scattering (DLS) and zeta potential, the hydrodynamic radius was measured and the stability of the silver nanoparticles formed was evaluated; then they were applied against bacterial strains: *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* and fungal species: *Candida albicans* and toxicological test. The results show a maximum absorption peak of 438 nm, stability after 1 day and 7 days of synthesis and a maximum diffraction peak at 38°. The material formed remained electronically stable with an average zeta potential of 32,1 mV, PDI of 1,5 and average hydrodynamic diameter of 21,2 nm. Furthermore, the diffusion susceptibility test in the well proves significant antimicrobial activity of AgNPs against bacterial strains and fungal infection with the formation of 29 mm inhibition halos in the tested cultures.

Keywords: Pathogenic microorganism; Metallic nanoparticles; Antimicrobial action.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	- Mecanismo de resistência microbiana	21
Figura 2	- Mecanismo de interação entre nanopartículas de prata e patógeno.....	22
Figura 3	- Mecanismo de biossíntese nanopartículas de prata	24
Figura 4	- Planta <i>Bauhinia forficata</i>	26
Figura 5	- Fluxograma do procedimento experimental	29
Figura 6	- Fluxograma de preparação do extrato aquoso Bauhinia Forficata.....	30
Figura 7	- Preparação do extrato aquoso Bauhinia Forficata (a); extrato preparado (b)	30
Figura 8	- Fluxograma de síntese da nanopartícula de prata	31
Figura 9	- Preparação da Síntese (a); Síntese da nanopartícula de prata (b).....	32
Figura 10	- Equipamento de Espectroscopia Ultravioleta- Visível	33
Figura 11	- Equipamento de Espectroscopia no Infravermelho por transformada de Fourier	34
Figura 12	- Equipamento de Difração de Raios-x.....	35
Figura 13	- Equipamento de Espalhamento de Luz Dinâmico.....	36
Figura 14	- Ensaio toxicológico do extrato aquoso <i>Bauhinia Forficata</i>	38
Figura 15	- Espectro de absorção Ultravioleta Visível das soluções: extrato <i>Bauhinia forficata</i> ; AgNPs + citrato de sódio e extrato <i>Bauhinia forficata</i> + AgNPs + citrato de sódio	41
Figura 16	- Síntese das nanopartículas de prata com mudança de coloração.....	43
Figura 17	- Espectro de absorção Ultravioleta Visível das soluções: Extrato Bauhinia forficata AgNPs + citrato de sódio e extrato Bauhinia forficata + AgNPs + citrato de sódio	44
Figura 18	- Espectrofotometria na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) do extrato; AgNPs e extrato e AgNPs, extrato e citrato.....	46
Figura 19	- Espectro de distribuição de tamanho em intensidade do extrato aquoso obtida por DLS.....	51
Figura 20	- Espectro de distribuição de tamanho em intensidade de AgNPs e extrato obtida por DLS.....	52
Figura 21	- Espectro de distribuição de tamanho em intensidade de AgNPs e citrato obtida por DLS.....	52
Figura 22	- Espectro de potencial Zeta do extrato vegetal Bauhinia forficata obtida	

por DLS	53
Figura 23 - Espectro de potencial Zeta de AgNPs pH<10 obtida por DLS	55
Figura 24 - Esquema representativo do raio hidrodinâmico e potencial Zeta para partículas esféricas por DLS.....	56
Figura 25 - Espectro de potencial Zeta de AgNPs com adição de citrato obtida por DLS	58
Figura 26 - Difratoograma de raios-X das AgNPs preparadas por síntese verde	61
Figura 27 - Fluxograma DL50.....	63
Figura 28 - Gráfico da variação entre as médias de vivos e mortos.....	64
Figura 29 - Teste de difusão em poços contendo soluções testes contra Staphylococcus aureus (A), Escherichia coli (B) e, Candida albicans (C)	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tamanho hidrodinâmico partículas.....	53
Tabela 2 - Tamanho hidrodinâmico e potencial Zeta.....	59
Tabela 3 - PDI valores e características.....	60
Tabela 4 - Amostra do material frente as culturas testada.....	65
Tabela 5 - Média do halo teste triplicata: Cepas dos microrganismos e halos de inibição de crescimento microbiano frente AgNPs.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AgNO ₃	Nitrato de prata
AgNPs	Nanopartículas de prata
Kcps	Contagem por segundo
CIM	Concentração inibitória mínima
CN	Controle negativo
DNA	Ácido desoxirribonucleico
IM	Índice mitótico
mmol	milimol
CP	Controle positivo
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>C. albi.</i>	<i>Cândida albicans</i>
UFC/mL	Unidade formadora de colônia por mililitro
NMs	Nanopartículas metálicas
OMS	Organização Mundial de Saúde
UV-VIS	Ultravioleta Visível
DLS	Espalhamento Dinâmico de Luz
IFPI	Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Piauí
SPR	Ressonância Plasmônica de Superfície Localizada

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
$\lambda_{\max}$	Máximo comprimento de onda
μl	Microlitro
mV	Milivolt
nm	Nanômetro
NPs	Nanopartículas
$\mu\text{g/mL}$	Micrograma por mililitro
mmol/L	Milimol por litro
PDI	Índice de polidispersão
pH	Potencial hidrogeniônico
PZ	Potencial Zeta
V	volume
m	massa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 OBJETIVOS	18
1.1.1 Geral:	18
1.1.2 Específicos:	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA	19
2.2 NANOPARTÍCULA DE PRATA: AÇÃO ANTIMICROBIANA	21
2.3 NANOPARTÍCULA DE PRATA: MÉTODO DE SÍNTESE	23
2.4 EXTRATO VEGETAL: <i>BAUHINIA FORFICATA</i>	25
3. METODOLOGIA	29
3.1 PREPARAÇÃO DO EXTRATO AQUOSO	29
3.2 SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA AgNPs	31
3.3 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA AgNPs	
ESPECTROSCOPIA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA- VISÍVEL	33
3.3.1 Espectroscopia região do infravermelho	34
3.3.2 Difração de raios-x	35
3.3.3 Espalhamento dinâmico de luz e potencial Zeta	36
3.4 BIOENSAIO TOXICOLÓGICO DO EXTRATO AQUOSO	38
3.5 PRERARO DO ÍNOCULO DAS CEPAS MICROBIANAS	39
3.6 PRERARO DO ÍNOCULO DAS CEPAS	39
3.7 TESTE DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	40
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1 ANÁLISE NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA VISÍVEL (UV-VIS)	41
4.2 ANÁLISE ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	46
4.3 ANÁLISE DO ESPALHAMENTO DINÂMICO DE LUZ (DLS)	50
4.4 ANÁLISE DO POTENCIAL ZETA (PZ)	54
4.5 ANÁLISE DA DIFRAÇÃO DE RAIOS-X	60
4.6 ENSAIO TOXICOLÓGICO DO EXTRATO AQUOSO DA PLANTA	62
4.7 TESTE DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA AgNPs	65
5. CONCLUSÃO	70

REFERÊNCIAS.....	71
-------------------------	-----------

1. INTRODUÇÃO

A Organização Mundial de Saúde (OMS) alerta para o elevado número de mortes causadas por infecções resistentes aos antibióticos. Considerado um problema de saúde mundial e com impactos devastadores para os sistemas de saúde e para a qualidade de vida das pessoas, a resistência antimicrobiana é responsável por cerca de 700 mil mortes por ano em todo o mundo, em razão de infecções causadas por microrganismos resistentes. As estimativas apontam que a resistência antimicrobiana pode matar 10 milhões de pessoas por ano até 2050, isso representa uma morte a cada 3 segundos (OMS, 2022).

A resistência antimicrobiana causa mais mortes do que a AIDS e malária no continente americano. Segundo a OMS (2022) as infecções respiratórias, sanguíneas, intra-abdominais e infecções do trato urinário são responsáveis pela maioria das mortes relacionadas a resistência antimicrobiana. Os patógenos bacterianos *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* são responsáveis por cerca de 452 mil mortes em todo o continente americano no ano de 2019. Isso implica em tratamento com antibióticos ineficientes, aumentando assim a taxa de mortalidade através da resistência antimicrobiana.

Os principais fatores que influenciam na resistência antimicrobiana são: o uso excessivo de antibióticos combinado com a escassez de novas substâncias químicas e materiais capazes de inibir o desenvolvimento desses patógenos ou até mesmo matá-los. Esses dois aspectos contribuem diretamente para intensificar essa problemática como uma das maiores ameaças à saúde global em ascensão e com consequências irreversíveis para a humanidade (Andrade; Darini, 2018).

A resistência aos antibióticos envolve questões desafiadoras tanto para a comunidade científica quanto para a sociedade, tendo em vista que as infecções comuns se tornam cada vez mais resistentes aos antibióticos convencionais como: a penicilina, metilicina e vancomicina utilizados nos tratamentos de doenças infecciosas. A resistência antimicrobiana limita a ciência e revela-se uma ameaça coletiva e mundial (Opas, 2022).

Segundo a OMS (2022) as últimas décadas foram marcadas por grandes epidemias; doenças antigas, como a cólera, a peste e a febre amarela, voltaram a afligir a humanidade, além disso novas doenças têm surgido, como grandes surtos de gripe, a síndrome respiratória aguda severa e a síndrome respiratória do Oriente

Médio, o ebola, zica e o covid. Os cientistas têm feitos muitas descobertas nos últimos anos, entretanto a cura e o tratamento efetivo ainda não são uma realidade.

Diante desse contexto é necessário novos estudos e pesquisas científicas com a finalidade de compreender como ocorre esses mecanismos de resistência antimicrobiana e propor novos agentes antimicrobiano, tratamentos e alternativas para que se possa combater essa problemática (Brito et al., 2020).

As pesquisas científicas na área de nanociência e nanotecnologia revelam evidências de que nanoestruturas metálicas especificamente nanopartículas de prata preparadas pelo método de síntese verde, o qual consiste na utilização de agentes redutores de baixo custo e agentes estabilizadores de baixa toxicidade torna o método um procedimento econômico, sustentável e promissor no combate de agentes infecciosos (Huq *et al.*, 2022).

A síntese de nanopartículas metálicas (MsNPs) tem atraído a atenção dos pesquisadores também em virtude de suas propriedades físicas e químicas definidas pela dimensão nanométrica. Tais características não são encontradas em materiais com outras dimensões. Isso lhes permite diversas aplicações em vários campos da ciência como a medicina diagnóstica e terapêutica, farmácia, informática e engenharia de materiais (Brito et al., 2020).

Essas propriedades consistem numa elevada área superficial por unidade de volume ou massa, bem como propriedades catalíticas, ópticas, elétricas e magnéticas potencializadas pela dimensão e morfologia particular das nanopartículas. Com grande superfície de contato por proporção, as nanopartículas de prata exibem notável atividade antimicrobiana, mesmo em uma baixa concentração (Huq *et al.*, 2022).

A prata é utilizada como agente antimicrobiano há anos no tratamento de uso tópico, como por exemplo, nas queimaduras, ferimentos, alergias e para combater infecções bacterianas e fúngicas (Rai *et al.*, 2019). Isso reflete na elevada capacidade de interação entre células e tecidos humanos o que lhes confere um nanomaterial eficiente no tratamento alternativo no combate de microrganismos patogênicos (Muraro *et al.*, 2020; Meira, 2021).

As nanopartículas de prata são utilizadas em inúmeras pesquisas visando sobretudo a sua ação antimicrobiana frente aos diversos microrganismos como bactérias e fungos super-resistentes. As características das nanopartículas de prata dependente essencialmente da forma e do tamanho e principalmente das técnicas de

síntese. A ação antimicrobiana das AgNPs resulta de diversos fatores inclusive a dimensão, geometria, composição, cristalinidade e estrutura, em comparação às suas formas iniciais (De Brito; Viana; Viana, 2022). Pelo potencial efeito antimicrobiano, as nanopartículas de prata despertam grande interesse na utilização biomédica (Freire *et al.*, 2018).

Os compostos químicos orgânicos encontrados nos vegetais são responsáveis pelo efeito estabilizador, os quais são adsorvidos nas superfícies das nanopartículas metálicas e evita a sua interação entre si. Os agentes estabilizadores eficientes mais utilizados são os polímeros, pois possuem sítios eletrônicos em suas estruturas e cadeias orgânicas que geram efeito de impedimento estérico impossibilitando interações entre as partículas (Muraro *et al.*, 2020).

Outras moléculas orgânicas presente nos vegetais também evitam não somente a aglomeração entre as partículas de prata, como também favorece a síntese de prata metálica em apenas uma etapa, além disso suas propriedades farmacológicas são objeto de estudo de várias pesquisas científicas, no que se refere a síntese de nanopartículas metálicas de prata estabilizada em extrato vegetal (Ribeiro, 2019).

O aumento nos níveis de resistência microbiana aos antibióticos e a elevação no número de mortes por infecções não tratáveis, mostra a importância da realização de pesquisas científicas sobre o potencial antimicrobiano da prata em escala nanométrica. A ação dessas nanopartículas é apontada como tratamento alternativo significativo para infecções geradas por patógenos como bactérias e fungos que se mostram resistentes aos antibióticos convencionais (Freire *et al.*, 2018).

A atividade antibiótica da prata contra bactérias e fungos decorrente de suas propriedades físicas, químicas e biológicas otimizadas em escala nanométrica tendo como consequência diversas aplicações para a medicina, biomedicina, biotecnologia e engenharia de materiais, bem como sua possível utilização na composição de materiais compósitos como biomaterial (De Brito; Viana; Viana, 2022).

A necessidade de aprimorar e ou desenvolver biomateriais inovadores e acessíveis para a sociedade baseado em conhecimento da nanociência e nanotecnologia aliado a funções terapêuticas de plantas na prevenção e tratamentos de doenças é cientificamente expressivo (Muraro *et al.*, 2020). Baseado nesse contexto, o desenvolvimento de um biomaterial biocompatível com propriedades antimicrobianas será eficaz para combater a proliferação de cepas resistentes. A

síntese de nanopartículas AgNPs, estabilizadas em extrato de *Bauhinia forficata* apresenta propriedades antimicrobianas, permitindo a sua utilização para remediação, além de propiciar um novo modelo de desenvolvimento de medicações de baixo custo, acessíveis e de alto índice terapêutico para a população.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Geral:

- Sintetizar as nanopartículas de prata estabilizadas no extrato aquoso de *Bauhinia forficata*.

1.1.2 Específicos:

- Caracterizar as nanopartículas de prata através das técnicas de caracterização de Espectroscopia na região do Ultravioleta Visível (UV-VIS);
- Monitorar a estabilidade das nanopartículas de prata após a síntese através das técnicas de caracterização de Espectroscopia na região do Ultravioleta Visível (UV-VIS);
- Analisar a toxicidade do extrato aquoso da *Bauhinia forficata* através de ensaio com espécie aquática *Artemia Salina*;
- Avaliar o potencial antimicrobiano das nanopartículas de prata estabilizada em extrato aquoso de *Bauhinia forficata* contra cepas padrão de bactérias e fungos para potencial aplicação como biomaterial.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

Os antibióticos são substâncias químicas de origem natural ou sintética capazes de combater ou inibir a proliferação de microrganismos patogênicos. Eles são utilizados nos tratamentos de infecções causadas por micróbios e são classificados conforme a sua estrutura química e mecanismo de atuação no organismo vivo (Jensen; Zhu; Van Opijnen, 2017).

Os antibióticos também são classificados como medicamentos comumente prescritos pelos profissionais de saúde, porém em muitos casos são considerados desnecessários. Isso é considerado um dos fatores que fomenta a resistência antimicrobiana, além da duração e posologia do medicamento (Cusssolim; Junior; Melo, 2021). O consumo abusivo de antibióticos ocorre em diversas áreas como na agricultura, pecuária, veterinária e várias indústrias o que implica em micróbios resistentes encontrados em todos os ambientes físicos seja no solo, nas águas, no ar e até mesmo nos seres humanos (Oms, 2022).

A utilização desordenada de antibióticos nos seres humanos consiste principalmente no seu uso equivocado, isto é, quando uma infecção viral é tratada com fármacos bactericidas; administração incorreta das dosagens e tempo de tratamento impróprio. Esses fatores contribuem para a seleção e disseminação de microrganismos resistentes e com elevada capacidade de mutação e adaptação (Duarte, 2022).

O crescimento no número de casos que envolve infecções ocasionadas por cepas multirresistentes em consequência da alta resistência aos fármacos e das poucas opções terapêuticas disponíveis tem potencializado a busca por novas estratégias e ferramentas de pesquisa, as quais favorecem o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos que inclui o descobrimento de novos compostos com mecanismos de ação contra bactérias e fungos (Toledo *et al.*, 2020).

A resistência aos antibióticos ocorre principalmente pela facilidade de adaptação ao ambiente em que as bactérias e fungos estão inseridos (Opas, 2022). A bactéria *Staphylococcus aureus* é um dos principais patógenos associados a infecção hospitalar e demonstra resistência a diversos antibióticos (Pang *et al.*, 2019). Outros microrganismos patógenos que também apresentam elevado poder de resistência

bacteriana são: *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. Em termos de resistência fúngica os que mais se destacam são: *Candida albicans*, *Candida. tropicalis*, *Candida. glabrata*, *Aspergillus flavus*, e *Aspergillus. fumigatus* (Subedi; Vijay; Willcox, 2018).

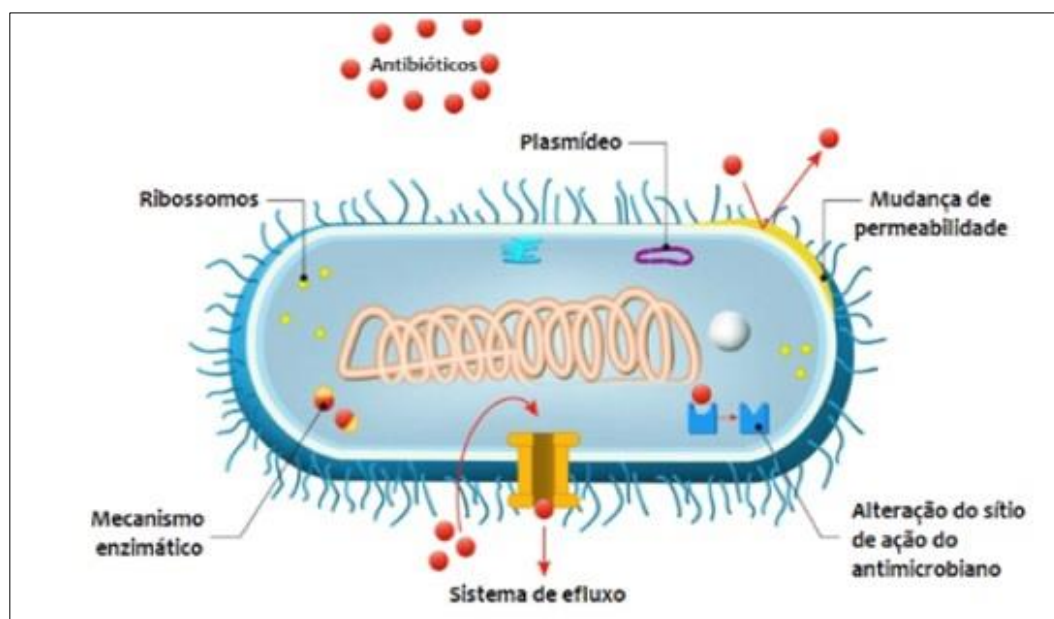
A indústria farmacêutica responsável por desenvolver e introduzir na sociedade novos fármacos encontra-se diante de diversos desafios que envolvem o tratamento clínico de doenças infecciosas não tratáveis. Isso é devido ao uso indiscriminado de antibióticos que ocasionam a resistência desses microrganismos, além da ineficácia na prevenção e tratamento de infecções por bactérias, vírus, protistas, fungos e parasitas (Da Costa; Silva Junior, 2017).

O uso racional dos antibióticos aliado ao desenvolvimento de novos antibióticos, bem como novos tratamentos alternativos fazem parte de algumas estratégias utilizadas para minimizar a evolução de microrganismos resistentes. Contudo, a produção de novos antibióticos requer bastante tempo e um elevado custo e isso reflete na perda de interesse pelas indústrias farmacêuticas no que se refere à síntese de novos fármacos (Roca *et al.*, 2015).

Nessa perspectiva a resistência aos antibióticos é considerada um problema de saúde pública no mundo, tendo em vista que o seu uso excessivo e indevido coloca a sociedade no centro de grandes diálogos, discussões, reflexões e debates pela comunidade científica. As pesquisas biomédicas e de engenharia de materiais atualmente apontam para uma dicotomia entre o uso incorreto de medicamentos e a resistência microbiana (Da Costa; Silva Junior, 2017).

Os medicamentos convencionais se tornam ineficientes diante das infecções e contribuem para a propagação de doenças e altas taxas de morte. A resistência antimicrobiana representa uma ameaça crescente para a humanidade. Os antibióticos atualmente disponíveis não são capazes de impedir a multiplicação de patógenos (Opas, 2022). Isso contribui para novos mecanismos de resistência (Figura 1) e incapacidade de tratar infecções comuns.

Figura 1- Mecanismo de resistência microbiana



Fonte: Anvisa (2023).

Por isso os patógenos resistentes são resultados da resistência antimicrobiana ao longo do tempo através de alterações genéticas e fatores externos (Roca *et al.*, 2015). Conforme relatórios emitidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS), nota-se um aumento gradual nos níveis de resistência em diversas bactérias e fungos que causam infecções triviais entre a população. Isso implica em difícil combate de bactérias e fungos por meio de antibióticos comuns, além de tratamentos limitados e ineficientes (Cussolim *et al.*, 2021). Os principais mecanismos de resistência microbiana são divididos de acordo com a forma de inativação do antibiótico: produção de enzimas que degradam ou modificam antibióticos; redução da permeabilidade da membrana externa; sistemas de efluxo hiperexpressos; alteração do sítio alvo de ligação do antibiótico e bloqueio ou proteção do sítio alvo do antibiótico (Anvisa, 2023).

2.2 NANOPARTÍCULA DE PRATA: AÇÃO ANTIMICROBIANA

As nanopartículas (NPs) são aglomerados de átomos com tamanho na ordem de 1 a 100 nm, dentre estas NPs, as nanopartículas de prata (AgNPs) possuem alta eficiência contra doenças causadas por bactérias como: (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*) e fungos que causam infecções de pele como por exemplo: (*Candida albicans*). Essas nanopartículas apresentam melhores

atividades quando comparadas ao uso isolado de compostos bioativos (Viana *et al.*, 2021).

As nanopartículas de prata apresentam características específicas como: condutividade eletrônica e térmica, maleabilidade, atividade química, catalítica e antimicrobiana e principalmente baixo custo de preparação. As nanopartículas de prata devido sua versatilidade é empregada em vários ramos da sociedade como biomateriais, agentes antibióticos, anti-inflamatórios, antitumorais, regeneradores, biossensores e catalisadores. Elas estão presentes em produtos na indústria de alimentos, têxtil, perfumaria, farmacêutica, agrícola, higiene, produtos de limpeza, tintas, eletroeletrônicos, entre outras aplicações (Durán *et al.*, 2018).

Essas propriedades são definidas como confinamento quântico ou efeito quântico pelo tamanho decorrente do tipo de ligação química da partícula. Essa diversidade em termos de aplicação deve-se basicamente aos efeitos quânticos dos materiais em escala nanométrica pois as suas propriedades físico-química são otimizadas e isso reflete em elevada condução elétrica e térmica, resistência mecânica e química além de propriedades magnéticas e ópticas diferenciadas (Solomon *et al.*, 2017).

As pesquisas científicas apontam que o uso de nanopartículas de prata é variado e inclui diversos tratamentos alternativos em alguns tipos de câncer e avaliação de toxicidade destas nanoestruturas (Viana *et al.*, 2021). O diâmetro das partículas confere facilidade de interação com as células e tecidos (Figura 2) facilitando diagnósticos e tratamentos. As nanopartículas de prata podem ser incorporadas em diversas espécies químicas agregando propriedades para formular novos materiais com aplicação de biomaterial (Muraro *et al.*, 2020).

Figura 2- Mecanismo de interação entre nanopartículas de prata e patógeno



Fonte: Salleh (2023).

A atividade antimicrobiana das nanopartículas de prata possui ampla aplicação contra microrganismos patogênicos como: vírus, fungos, bactérias gram-positivas e gram-negativas. Em escala nanométrica a prata diminui sua toxicidade (Durán *et al.*, 2019). Assim, as AgNPs têm a capacidade de penetrar no interior das células e causar danos ao interagir com o fósforo e enxofre presentes no DNA e nas proteínas dos patógenos (Gomes *et al.*, 2020).

O elevado poder antimicrobiano das nanopartículas de prata em sistemas biológicos como tecidos e células humanas reflete na necessidade de controlar a toxicologia do nanomaterial, no que se refere aos danos gerados ao organismo. Isso estabelece conexão com os métodos químicos de sua preparação e produção e pressupõe controle de resíduos tóxicos formados em meio reacional ou adsorção de sua superfície (Meira, 2021).

O surgimento de microrganismos cada vez mais resistentes aos múltiplos antibióticos contribui para o desenvolvimento e aprofundamento de pesquisas científicas na área de nanomateriais, em especial no que se refere a atividade antimicrobiana das nanopartículas de prata (Freire *et al.*, 2018).

2.3 NANOPARTICULA DE PRATA: MÉTODO DE SINTESE

Nos métodos físicos, também conhecidos como *top down*, utilizam-se de processos físicos, como moagem, têmpera e a fotolitografia, a decomposição térmica, a irradiação, a difusão, entre outras; os métodos químicos são denominados *bottom up* e envolvem espécies moleculares em reações químicas para gerar o crescimento dos aglomerados como, síntese eletroquímica, uso de elementos biológicos para essa síntese, solvo termal e hidrotermal (Naikoo *et al.*, 2021).

O processo químico consiste na redução dos íons Ag^+ pelos agentes redutores geralmente o citrato de sódio ou boro hidreto de sódio em contato com a espécie química Ag^+ e assim produzir a nanopartícula de Ag; O citrato de sódio não é tóxico e é até mesmo utilizado como aditivo em alimentos. No processo biológico utiliza-se bactérias, fungos ou extrato de plantas vegetais para reduzir os íons de prata (Iravani *et al.*, 2014).

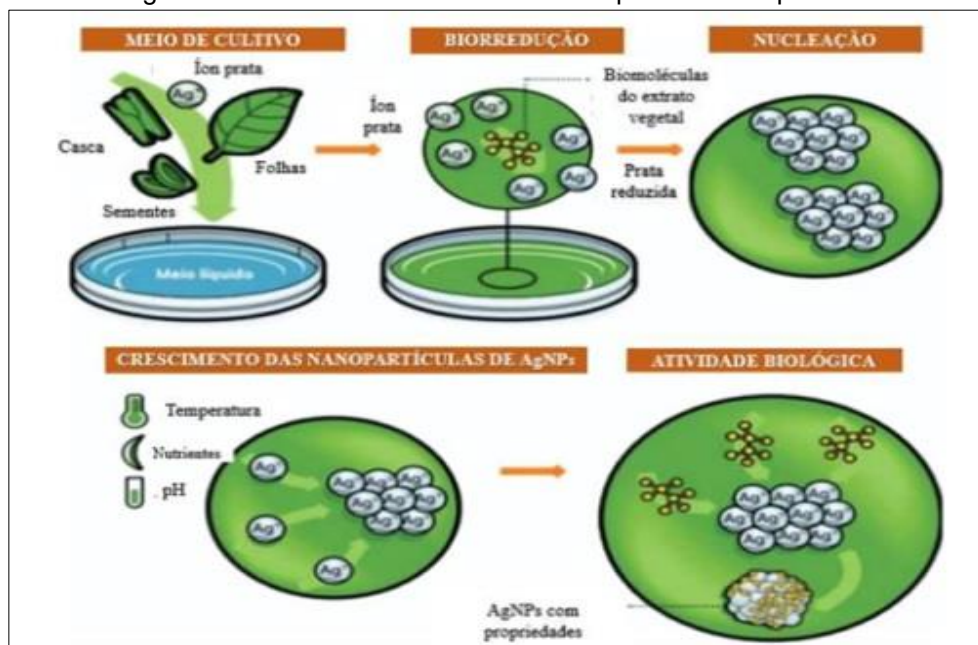
A funcionalidade e a estabilidade da nanopartícula dependem de vários parâmetros que ultrapassam o tamanho e a forma das partículas e das condições experimentais de síntese que contribuem para a termodinâmica da superfície das

nanopartículas. O método de síntese verde, assim como a concentração dos reagentes, velocidade e temperatura do sistema devem ser controlados rigorosamente a fim de obter nanoestruturas (Balasooriya *et al.*, 2017).

Esses parâmetros termodinâmicos e cinéticos de síntese das nanopartículas refletem na sua toxicidade. Como por exemplo: a dimensão das nanopartículas, isto é, quanto menor forem as nanoestruturas mais fácil de adentrar as células (Mittal; Christi; Banerjee, 2013). O estado de aglomeração é favorecido pela agregação das partículas através da coalescência da ligação metálica, área e carga superficial da nanopartícula também influencia. O agente estabilizador impede a oxidação da nanopartícula além de provocar impedimento estérico evitando assim sua própria interação e isso favorece a sua estabilidade (Iravani *et al.*, 2014).

A síntese biológica (Figura 3) é econômica e quimicamente sustentável. Com o uso de técnicas de preparação ambientalmente compatíveis nanopartículas de prata têm sido obtidas via biossíntese usando materiais naturais como extrato de plantas, microrganismos e biomoléculas (Balasooriya *et al.*, 2017).

Figura 3- Mecanismo de biossíntese nanopartículas de prata



Fonte: Silva (2015).

As vantagens em utilizar a síntese verde na preparação das nanopartículas de prata consiste no seu baixo custo, alta disponibilidade, e variedades de vegetais, dependendo das características da região e da época do ano. A utilização de extratos

de plantas como agente redutor na síntese verde das nanopartículas de prata se destaca por valorizar os recursos naturais amplamente cultivadas no Brasil e principalmente em utilizar os constituintes fitoquímicos presente na própria planta que contribuem para potencializar o efeito antimicrobiano da prata devido suas propriedades farmacológicas e medicinais (Naikoo *et al.*, 2021).

2.4 EXTRATO VEGETAL: *Bauhinia forficata*

Os produtos naturais oriundos de plantas com atividades biológicas têm sido investigados como potenciais novos meios de tratamento e contenção das doenças infecciosas. Ao longo dos anos, estudos que envolvem a ação antimicrobiana de fitoterápicos em especial os óleos extraídos de algumas plantas como o girassol (*Helianthus annuus*) que é cultivado comercialmente no mundo todo (Hiltunen; Virta; Laine, 2017).

A fitoterapia em sua função identifica espécies químicas em vegetais a fim de compreender suas características biológicas, químicas e físicas determinando assim seus potenciais e limitações no que diz respeito ao uso e efeitos em organismos vivos. Os profissionais de saúde recorrem aos compostos ativos da planta que apresentam efeitos terapêuticos significativos para o corpo humano. Esses compostos são denominados de fitoterápicos e são usados para combater patologias (Ribeiro, 2019).

Para a síntese de nanopartículas de prata tem-se considerado o uso da biodiversidade vegetal devido à disponibilidade de fotoquímicos existentes em vários extratos vegetais como exemplo tem-se o girassol (Lemos *et al.*, 2021). O tratamento através de plantas medicinais na cura de doenças, deve-se ao fato de que muitos compostos químicos desempenham funções bioativas com efeitos terapêuticos. A fitoterapia é definida como uma técnica baseada em métodos científicos que se dedica ao estudo e análise de biomoléculas. Essas moléculas são sintetizadas naturalmente pela própria planta e estão presentes na raiz, caule, folhas e flores do vegetal (Sena, 2019).

Nos vegetais, as substâncias químicas da planta são responsáveis pelo seu crescimento, desenvolvimento e reprodução. Nos seres humanos os fitoterápicos manifestam propriedades anti-inflamatória, antioxidante, antibactericida, antifúngica e estimulam o sistema imunológico dentre outras. Os medicamentos fitoterápicos dependem de pesquisas científicas que os evidenciem para que seus benefícios e

malefícios sob o corpo humano sejam de conhecimento da sociedade. A fitoterapia como tratamento alternativo é considerada significativa, pois além dos compostos químicos presente na planta apresenta-se uma vasta biodiversidade disponível com poucos efeitos colaterais (Ribeiro, 2019).

A escolha das amostras vegetais é feita segundo as avaliações que envolvem variedades de ações terapêuticas e constituintes químicos presente na planta. De acordo com trabalhos descritos por Sena (2019), Teixeira *et al.* (2019) Masoumian e Zandi (2017) que avaliaram a *Humirianthera ampla*, quimicamente contendo alcaloides, que são compostos fitoquímicos importantes capazes de possuir ação farmacológica, dentre outras propriedades.

Baseando-se no mesmo princípio utilizou-se a *Bauhinia forficata* popularmente utilizada por tratar pacientes com diabetes, diminuir a taxa de triglicerídeos no sangue, acelerar o metabolismo de carboidratos, atuar como antioxidante e diurético, impedir a coagulação do sangue, combater problemas estomacais, controlar o aumento da pressão arterial e contribuir para a prevenção e tratamento do câncer além do seu potencial antimicrobiano, além de conter biomoléculas como flavonoides, esteroides, terpenoides lectinas e alcaloides em sua composição química (Carvalho, 2003).

A espécie vegetal *Bauhinia forficata* (Figura 4) é uma das 71 plantas selecionadas pelo Ministério da Saúde como de interesse ao Sistema Único de Saúde (SUS). Com elevado poder antimicrobiano a *Bauhinia forficata* da família das *Fabaceae* é popularmente conhecida como “pata de vaca.” A *Bauhinia forficata* apresenta flores brancas, tronco espinhoso e são árvores de pequeno porte com alturas entre 2 e 8 metros nativa da região da mata Atlântica também está presente em outros biomas (Carvalho, 2003).

Figura 4: Planta *Bauhinia forficata*



Fonte: Guião (2021).

Conhecida pelo seu potencial terapêutico é utilizada na medicina popular em tratamento de doenças infecciosas causadas por fungos e bactérias (López; Santos, 2015). A literatura científica destaca diversos agentes químicos localizados na *Bauhinia forficata* como: flavonoides, esteroides, terpenoides, alcaloides, ácidos orgânicos, glicídios dentre outros compostos químicos. As atividades biológicas da *Bauhinia forficata* incide em propriedades anti-inflamatórias, diuréticas cicatrizantes, digestivas, expectorantes, analgésicas e hipoglicemiante, associada ao combate ao diabetes mellitus, bem como colaborar por propriedades diuréticas, antimicrobianas e antiproliferativas (Carvalho, 2003).

Os seus principais componentes biologicamente ativos incluem biomoléculas flavonoides que são responsáveis por suas propriedades farmacológicas. As folhas, as flores e as cascas do caule da *Bauhinia forficata* têm sido usadas na medicina popular para o tratamento de diferentes tipos de patologias como diabetes, dores e processos inflamatórios (Brito *et al.*, 2020). A espécie *Bauhinia forficata* apresenta características químicas e exibe importante atividade aglutinante sobre diversos tipos de células podendo inibir a adesão de bactérias ou células cancerosas aos tecidos humano e interferir no curso de uma infecção ou progressão tumoral (Carvalho, 2003).

A relevância do extrato aquoso de *Bauhinia forficata* pode ser comprovada em diversas pesquisas científicas. O extrato é capaz de neutralizar a coagulação induzida por veneno das cobras *Bothrops* e *Crotalus*, demonstrando possuir atividade anticoagulante e antifibrinogênica (Oliveira *et al.*, 2018) e do veneno de escorpião *Tityus serrulatus* (Vasconcelos *et al.*, 2014). O extrato da folha *Bauhinia forficata* em pequenas frações apresenta efeitos vasorelaxantes pois seus compostos majoritários exercem essa propriedade, o qual foi avaliado em anéis aórticos de ratos. A atividade antimicrobiana dos extratos e frações de *Bauhinia forficata* também foi avaliada, através do método de difusão radial em agar com espécies de bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (De Souza *et al.*, 2006).

As propriedades farmacológicas da *Bauhinia forficata* são comprovados mediante diversas pesquisas entretanto, o mecanismo de ação da planta e as biomoléculas responsáveis por esses efeitos ainda são alvo de investigações científicas (Vasconcelos *et al.*, 2014). Segundo estudos de avaliação do potencial antibacteriano da *Bahuina forficata*, a menor concentração inibitória atua em cepas padrão de bactérias: *Enterococcus faecalis* e multirresistentes de origem hospitalar: *Acinetobacter baumannii* e *Staphylococcus aureus* (Sousa *et al.*, 2019).

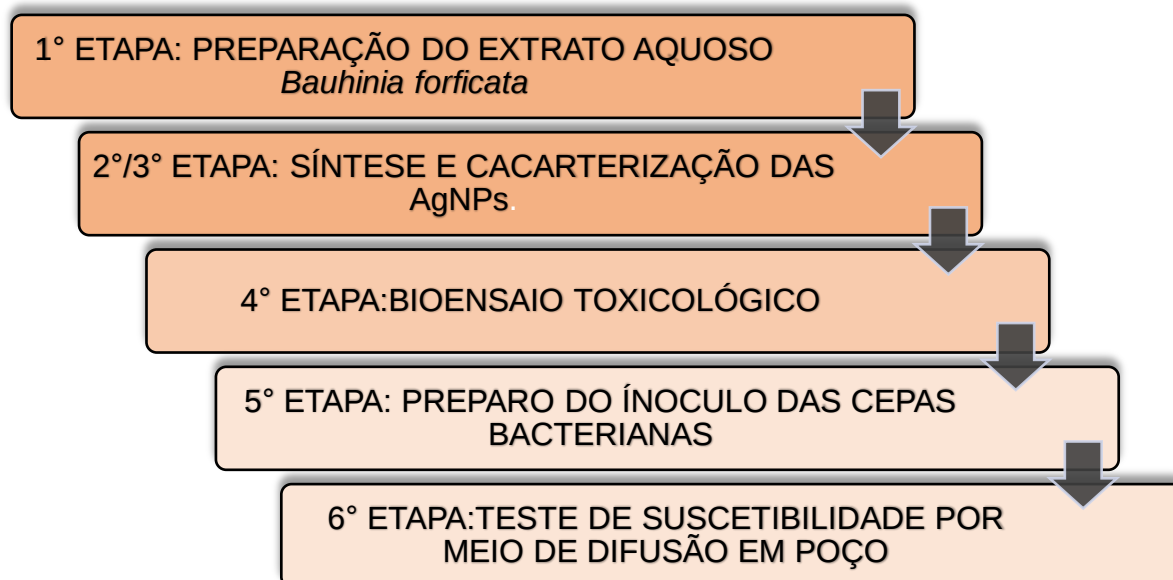
Sobretudo, são comprovados cientificamente efeitos significativos da fração rica em flavonóides das folhas de *Bahuina forficata* contra a toxicidade intestinal em células intestinais em camundongos (Souza *et al.*, 2018). A atividade antioxidante da espécie *Bauhinia forficata* se deve aos compostos fenólicos dos flavonoides que diminuem a formação de radicais livres. Esses compostos fenólicos podem auxiliar na prevenção e reparação de células expostas a potenciais mutagênicos (Düsman *et al.*, 2013).

Diante do contexto atual de doenças infecciosas não tratáveis por antibióticos convencionais, ao estabelecer estratégias de intervenção e combate à resistência bacteriana, a nanociência aliada com a nanotecnologia mostrar-se uma ferramenta relevante na composição de biomateriais e com potencial aplicabilidade. Outra classe de material promissor são as biomoléculas encontradas nos extratos vegetais, as quais podem ser incorporadas às nanopartículas de prata e serem utilizadas como tratamento alternativo na antibioticoterapia (Naikoo *et al.*, 2021; Hiltunen; Virta; Laine, 2017).

3 METODOLOGIA

No fluxograma (Figura 5) está esquematizado a metodologia utilizada nessa pesquisa. O estudo foi realizado no Laboratório de Físico-Química do Instituto Federal do Piauí, onde foram realizados: a preparação do extrato aquoso da planta *Bauhinia Forficata*; bioensaio de toxicidade do extrato; síntese das nanopartículas de prata; caracterização das nanopartículas de prata por espectrofotometria na região do ultravioleta visível, bem como os ensaios microbiológicos. Os testes antimicrobianos pelo método de difusão em poço e microdiluição em caldo foram realizados no Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal do Piauí.

Figura 5 - Fluxograma do procedimento experimental

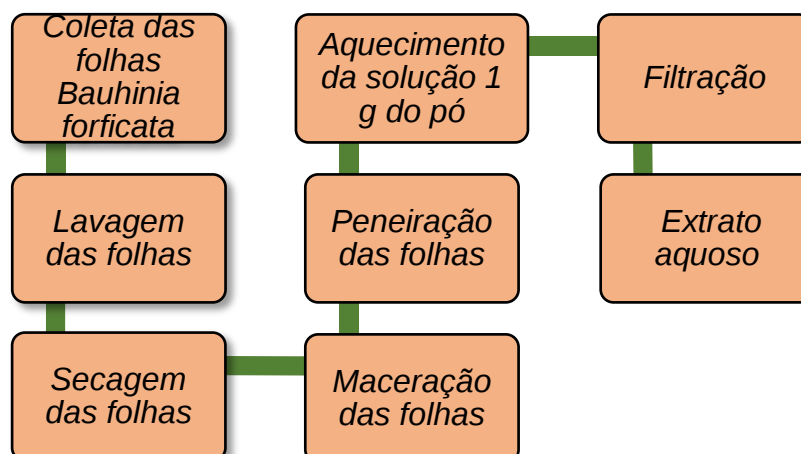


Fonte: Autor (2023).

3.1 PREPARAÇÃO DO EXTRATO AQUOSO

A planta utilizada foi coletada na localidade em propriedade particular (latitude -5.0265; longitude -42.8046) no município de Teresina. As folhas foram extraídas de uma planta no mês de setembro de 2022, estação seca, no período da tarde. Foram colhidas aproximadamente 500 g de folhas, que foram em seguida selecionadas e limpas para a obtenção do pó fino apresentado pelo fluxograma (Figura 6) abaixo; A partir das folhas da planta *Bauhinia forficata*, algumas das folhas foram selecionadas e limpas em água destilada pelo processo de lavagem.

Figura 6- Fluxograma de preparação do extrato aquoso Bauhinia Forficata



Fonte: Autor (2023).

Em seguida as folhas foram colocadas expostas à incidência direta da luz solar durante 10 dias para sua desidratação natural. Posteriormente as folhas foram colocadas em estufa a 50° C durante 24 horas, em seguida as folhas foram submetidas ao processo de secura extrema através do dessecador e depois foram maceradas em almofariz e pistilo, logo depois passou-se pelo processo de peneiração 100 mesh, a fim de obter o pó com granulometria uniforme 0,15 mm. A solução contendo o extrato aquoso apresentado na Figura 7 foi preparada a partir da diluição de 1 g do pó da *Bauhinia forficata* dissolvido em 500 mL de água destilada.

Figura 7- Preparação do extrato aquoso Bauhinia Forticata (a); extrato preparado (b)



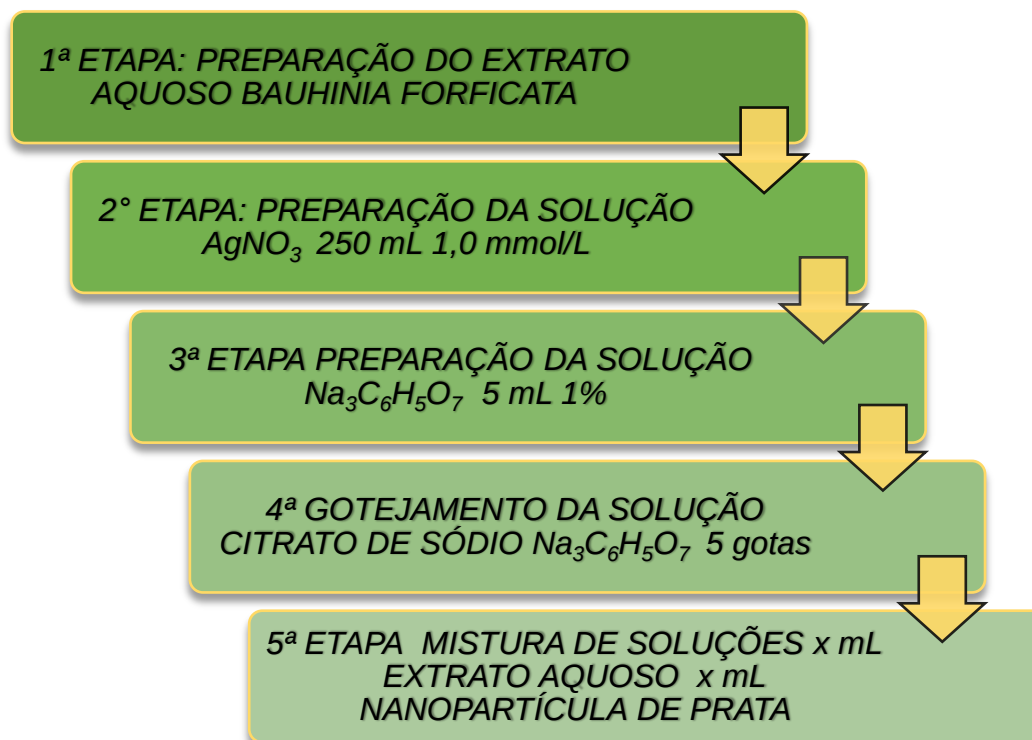
Fonte: Autor (2023).

Em seguida a solução foi aquecida (*ebulição*) e posteriormente filtrada em funil de algodão (papel filtro) e reservada para síntese das nanopartículas e ensaio toxicológico. O processo de síntese verde de nanopartículas de prata a partir do extrato vegetal aquoso também envolve a caracterização e ensaios indicativos de formação do material AgNPs através de análises quantitativas e qualitativas.

3.2 SÍNTESE DAS NANOPARTICULAS DE PRATA AgNPs

Para sintetizar as nanopartículas de prata AgNPs foi utilizado as etapas apresentadas no fluxograma (Figura 8 e 9) abaixo. Para sintetizar as nanopartículas de prata AgNPs foi utilizado na preparação da solução 250 mL de nitrato de prata 1,0 mmol/L, a qual foi aquecida 80°C com agitação magnética numa chapa aquecedora até o ponto de ebulição. As concentrações maiores do que 1×10^{-3} mol/L de AgNO_3 favorece a formação de aglomerados no meio reacional, além disso promove o deslocamento de pico de ressonância plasmônica de superfície.

Figura 8- Fluxograma de síntese da nanopartícula de prata



Fonte: Autor (2023).

Ao atingir o ponto de ebulição, foi misturado gota a gota 5 mL de solução de citrato de sódio 1% na solução de nitrato de prata. O gotejamento ocorreu numa taxa de 1 gota por segundo em aquecimento e agitação magnética constante. A solução mudou de coloração até atingir o ponto de amarelo-esverdeado e interrompeu-se o aquecimento na chapa aquecedora mantendo-se apenas a agitação magnética. Essa coloração indica a reação de redução da prata Ag com formação de nanopartículas.

Ao atingir a temperatura ambiente de 25 °C foi adicionado lentamente à mistura com nanopartículas de prata a solução contendo extrato de *Bauhinia forficata* previamente produzida. Após 15 minutos a mistura contendo nanopartículas de prata e extrato de *Bauhinia forficata* foi armazenada num frasco de vidro com tampa e acondicionado com refrigeração até o momento de caracterização e aplicação nos inóculos. A reação química de síntese das AgNPs pode ser representada pela seguinte equação química:

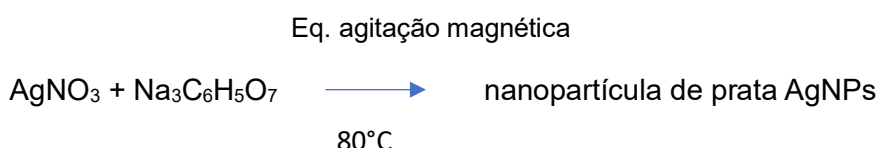
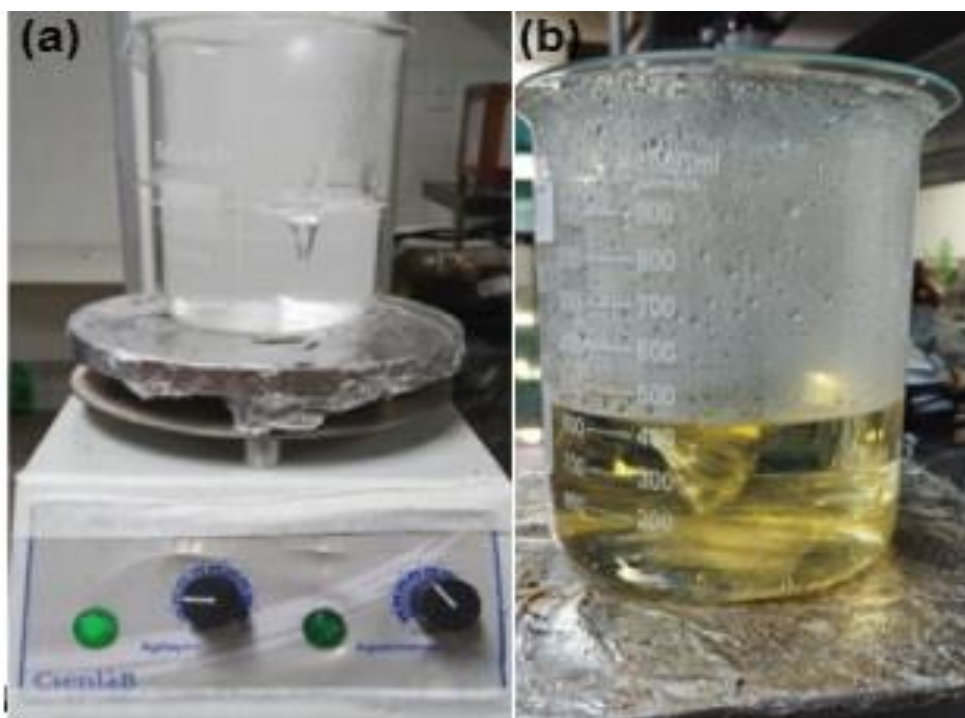


Figura 9- Preparação da Síntese (a); Síntese da nanopartícula de prata (b)



Fonte: Autor (2023).

3.3 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTICULAS DE PRATA AgNPs ESPECTROSCOPIA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA- VISÍVEL

As nanopartículas foram caracterizadas por meio de espectroscopia na região do ultravioleta-visível (Figura 10). Os espectros foram obtidos por meio de um espectrofotômetro modelo UV-VIS 6100S da Allacom com feixe duplo. Os parâmetros de análises foram em uma faixa de varredura de 1900-900 nm, abertura de fenda = 2,0 nm e solução espectral de 1,0 n. Foram utilizadas cubetas de quartzo com caminho ótico de 1,0 cm.

Figura 10- Equipamento de Espectroscopia Ultravioleta- Visível



Fonte: Autor (2023).

Esta técnica é usada para caracterizar as propriedades ópticas do material. As nanopartículas de prata podem exibir propriedades ópticas específicas incluindo a absorção e emissão de luz na região do espectro eletromagnético conhecida como ultravioleta visível (UV-Vis). A faixa do espectro UV-Vis inclui comprimentos de onda de aproximadamente 400 a 700 nanômetros (nm) faixa de luz visível ao olho humano. As nanopartículas de prata são assim descritas por sua capacidade de interagir com a luz através do chamado Efeito Plasmônico de Superfície, que ocorre quando a luz interage com partículas do metal de tamanho nanométrico que excita os elétrons na superfície das partículas de prata. Este fenômeno pode causar a absorção ou distribuição de luz de comprimentos de onda específicos (Weibel, 2021).

3.3.1 Espectroscopia região do infravermelho

As nanopartículas de prata foram caracterizadas por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (Figura 11) apresentarem propriedades ópticas interessantes como absorção e emissão de luz no infravermelho com reflexão total atenuada (FTIR-ATR). A espectroscopia de infravermelho próximo (NIR) cobre comprimentos de onda de cerca de 700 a 2500 nanômetros. O espectrômetro utilizado consiste em um modelo Alpha Bruker e adquire espectros na faixa de 500 a 4000 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} .

Quando as nanopartículas de prata são expostas à luz no espectro do infravermelho próximo, elas podem absorver parte dessa radiação, o que resulta em um aumento da energia térmica do sistema. Isso ocorre devido às propriedades plasmônicas da prata, que envolvem a oscilação coletiva dos elétrons na superfície das nanopartículas. A energia térmica gerada pela absorção de luz no NIR pelas nanopartículas de prata pode ser explorada para descrevê-las. As dispersões de AgNPs foram postas em placas Petri e secas em estufa a 60°C, e o material sólido resultante foi raspado da placa e analisado.

Figura 11- Equipamento de Espectroscopia no Infravermelho por transformada de Fourier



Fonte: Autor (2023).

3.3.2 Difração de raios-x

As nanopartículas de prata foram caracterizadas por difração de raios-X (Figura 12) técnica analítica comumente usada para caracterizar a estrutura cristalina de materiais. Essa técnica permite obter informações sobre o arranjo dos átomos dentro das nanopartículas e determinar seu tamanho médio, forma e orientação cristalográfica. Para realizar a difração de raios-X dispersões contendo nanopartículas de prata foram espalhadas em lâminas de vidro para análise e secas em estufa a 60 °C. A amostra foi então colocada em um difratômetro. Um difratômetro emite um feixe de raios-X que atinge a amostra em vários ângulos. O feixe difratado é registrado em um detector que mede a intensidade dos raios difratados em função do ângulo de incidência. Esses dados são então processados para obter o padrão de difração.

Quando o feixe de raios incide sobre a amostra ocorre a interação com os átomos da estrutura cristalina e causa fenômenos de difração que sofrem desvios de sua trajetória. Esses desvios produzem um padrão de difração característico que pode ser medido e usado para determinar o arranjo espacial dos átomos dentro da amostra. Para nanopartículas de prata, a difração de raios-X fornece informações valiosas sobre o tamanho médio das partículas, a forma das partículas e a presença de qualquer deformação que possa estar presente na estrutura cristalina (Lunardi, 2021).

A análise de difração dos raios é particularmente útil para caracterizar nanopartículas pois suas dimensões estruturais na faixa nanométrica podem levar a padrões de difração que diferem das amostras macroscópicas. A partir do padrão de difração resultante, uma combinação de técnicas analíticas para obter as informações necessárias, como o tamanho médio dos grãos de prata.

Figura 12: Equipamento de Difração de Raios-x



Fonte: Autor (2023).

3.3.3 Espalhamento dinâmico de luz e potencial Zeta

A dispersão de luz dinâmica por nanopartículas de prata é um fenômeno óptico que ocorre quando a luz interage com partículas de prata em escala nanométrica. Essa interação espalha a luz em diferentes direções o que pode levar a uma variedade de efeitos ópticos interessantes. As nanopartículas de prata possuem propriedades ópticas únicas devido ao chamado “Efeito Plasmônico de Superfície Localizada” (Lunardi, 2021).

Essas partículas exibem ressonância de plásmon de superfície que é a oscilação coletiva de elétrons livres na superfície de partículas de prata quando excitadas por um campo eletromagnético. Esta ressonância ocorre tipicamente dentro ou perto do espectro visível. Isso significa que as nanopartículas de prata podem interagir eficientemente com a luz visível. A extensão e a direção do espalhamento dependem de vários fatores, como tamanho e forma das partículas, polarização da luz incidente e frequência da luz (Hosny et al., 2017).

Nesse sentido é possível analisar nanopartículas de prata com base em seu movimento aleatório resultante de sua interação com o solvente na dispersão. Esse movimento aleatório é chamado de movimento browniano e depende da frequência e amplitude desse deslocamento que reflete no tamanho das nanopartículas e da viscosidade do solvente. As partículas menores aumentam a frequência do movimento browniano pois esse movimento varia sua intensidade de acordo com o tamanho da partícula. Identificado por um dispositivo dinâmico (Figura 13) de dispersão de luz (Weibel, 2021).

Figura 13- Equipamento de Espalhamento de Luz Dinâmico



Fonte: Autor (2023).

Quando o dispositivo DLS emite um feixe de luz que atinge as nanopartículas presentes na dispersão gera-se o movimento browniano e o espalhamento de luz; o sinal é capturado pelo detector que repassa para o correlator, onde o sinal é traduzido na forma de dados para que assim o computador forme o espectro na forma de gráfico em função do tempo compreendido em razão do diâmetro das partículas presentes na amostra. O DLS é uma técnica amplamente utilizada porque produz resultados eficientes quando combinada com outras técnicas de caracterização para determinar o tamanho de nanopartículas (Lunardi, 2021).

O potencial Zeta (ζ) é um termo científico para o potencial eletrocinético em sistemas coloidais. O potencial elétrico presente na dupla camada interfacial que se forma quando um sólido se encontra disperso em um meio líquido, fornece a medição da magnitude de atração ou repulsão de carga eletrostática. Essa propriedade física exibida por qualquer partícula em suspensão resultante da interação com o meio é definida como a magnitude do potencial Zeta. As nanopartículas de prata são afetadas pela interação entre as partículas e o meio circundante como o solvente ou a dispersão na qual as partículas estão suspensas (Alexandrino, 2013)

Quando as nanopartículas de prata são dispersas em um líquido uma camada iônica é formada ao redor das partículas formando uma dupla camada elétrica. Essa dupla camada consiste em íons positivos provenientes da superfície das partículas e íons negativos presentes no meio circundante. O potencial Zeta é uma medida do potencial que ocorre na interface entre a dupla camada elétrica e o meio circundante. Isso indica a estabilidade potencial do sistema coloidal (Machado *et al.*, 2021).

As partículas com alto potencial Zeta tendem a se repelir e permanecer dispersas, enquanto partículas com baixo potencial Zeta podem se agregar ou sedimentar. O potencial Zeta (ζ) descreve a mudança elétrica que ocorre na superfície das partículas e as forças repulsivas entre elas. Essa mudança é afetada pelo meio em que as partículas residem e é refletida no potencial. Essa característica é usada como método de caracterização para compreensão da estabilidade de partículas dispersas (Lunardi, 2021).

As partículas com alto potencial Zeta tendem a se repelir e permanecer dispersas, enquanto partículas com baixo potencial Zeta podem se agregar ou sedimentar. O potencial Zeta (ζ) descreve a mudança elétrica que ocorre na superfície das partículas e as forças repulsivas entre elas. Essa mudança é afetada pelo meio em que as partículas residem e é refletida no potencial elétrico. Essa característica é

usada como método de caracterização para compreensão da estabilidade de partículas dispersas (Alexandrino, 2013).

3.4 BIOENSAIO TOXICOLÓGICO DO EXTRATO AQUOSO

O ensaio toxicológico apresentado na Figura 14 foi realizado utilizando a espécie aquática *Artemia salina*. A realização da análise foi feita em quintuplicata com 7 concentrações em ($\mu\text{g/mL}$) em 5 tubos de ensaio (100 mL) contendo a amostra (extrato aquoso de *Bauhinia forficata*) e solução salina. Foram definidos o controle positivo e negativo para fins estáticos do número da população de espécies vivas e de mortos.

Figura 14- Ensaio toxicológico do extrato aquoso *Bauhinia Forficata*



Fonte: Autor (2023).

Para a análise foi utilizada a metodologia de (Meyer *et al.* 1982) com algumas adaptações. Os cistos de *Artemia salina* foram incubados em uma solução aquosa de sal marinho (35 g de sal marinho dissolvidos em 1 L de água destilada) na concentração de $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ com pH ajustado entre 8-9. A cultura foi mantida em uma temperatura entre 26 e 30 °C e sob uma lâmpada de 100 W por 48 horas para a eclosão dos cistos. Após a eclosão dos cistos, a solução foi utilizada para o preparo das diluições das amostras a serem testadas.

As diluições foram realizadas para tubos de ensaio de 100mL de forma a obter as seguintes concentrações de extrato: 1000 $\mu\text{g/mL}$, 750 $\mu\text{g/mL}$, 500 $\mu\text{g/mL}$, 250 $\mu\text{g/mL}$, 200 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$ e 50 $\mu\text{g/mL}$. O controle negativo de toxicidade foi preparado utilizando água salina e o controle positivo solução de dicromato de potássio K_2CrO_4 .

Em seguida com o auxílio de uma micropipeta foram transferidas 10 larvas de espécie aquática de *Artemia salina* para os respectivos tubos contendo o extrato aquoso de *Bauhinia forficata* e solução aquosa salina.

Os tubos foram reservados e submetidos à temperatura ambiente por 24 horas. Posteriormente os tubos foram analisados a fim de registrar a quantidade de larvas vivas. A quantidade de larvas vivas em relação ao aumento da concentração do extrato em µg/mL em diferentes frações foram utilizados para avaliar a toxicidade do extrato da planta *Bauhinia forficata*.

3.5 PRERARO DO ÍNOCULO DAS CEPAS MICROBIANAS

A análise microbiológica foi desenvolvida no Laboratório de Microbiologia no Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal do Piauí-UFPI. A análise da atividade antimicrobiana das substâncias frente às bactérias e à espécie de fúngica, foi executado pelo método de difusão por poço a partir do preparo do meio e inóculo.

3.6 PRERARO DO ÍNOCULO DAS CEPAS

Foram selecionadas três amostras para avaliar a atividade antimicrobiana das substâncias: extrato (AM1), nanopartícula de prata (AM2) e extrato/nanopartícula de prata (AM3), uma espécie bacteriana gram-positiva (*Staphylococcus aureus* ATCC25923), uma espécie gram-negativa (*Escherichia coli* ATCC25922) e uma espécie de levedura (*Candida albicans* ATCC10231).

Preparou-se os inóculos das espécies microbianas a serem testadas, padronizando-se o inóculo pelo método de suspensão direta das colônias (CLSI, 2009), em solução salina esterilizada, a partir de colônias crescidas por 24 horas em meio BHI (Brain Heart Infusion ágar) para as bactérias e 48 horas em meio ágar Sabouraud para a *Candida albicans*. Todas as culturas semeadas foram incubadas à temperatura de 37° C em estufa de crescimento. A suspensão de células foi ajustada para uma concentração de 1×10^8 UFC/mL, que corresponde a solução padrão 0,5 da escala de McFarland.

3.7 TESTE DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A análise da atividade antimicrobiana das substâncias frente às bactérias e a levedura, foi executado pelo método de difusão em poço (CLSI, 2009) com adaptações. Foram realizados orifícios de 6 mm de diâmetro na superfície do meio de cultura contido nas placas de Petri com auxílio de um molde formando os poços.

As placas foram inoculadas com as suspensões bacterianas com auxílio de um swab esterilizado e então os poços foram preenchidos com 30 µL da substância testada. Após a adição da substância aos poços, as placas foram incubadas a 37°C em BOD por um período de 24 horas. Os halos de inibição do crescimento, quando formados, foram mensurados usando uma régua milimetrada. Os testes foram realizados em triplicata.

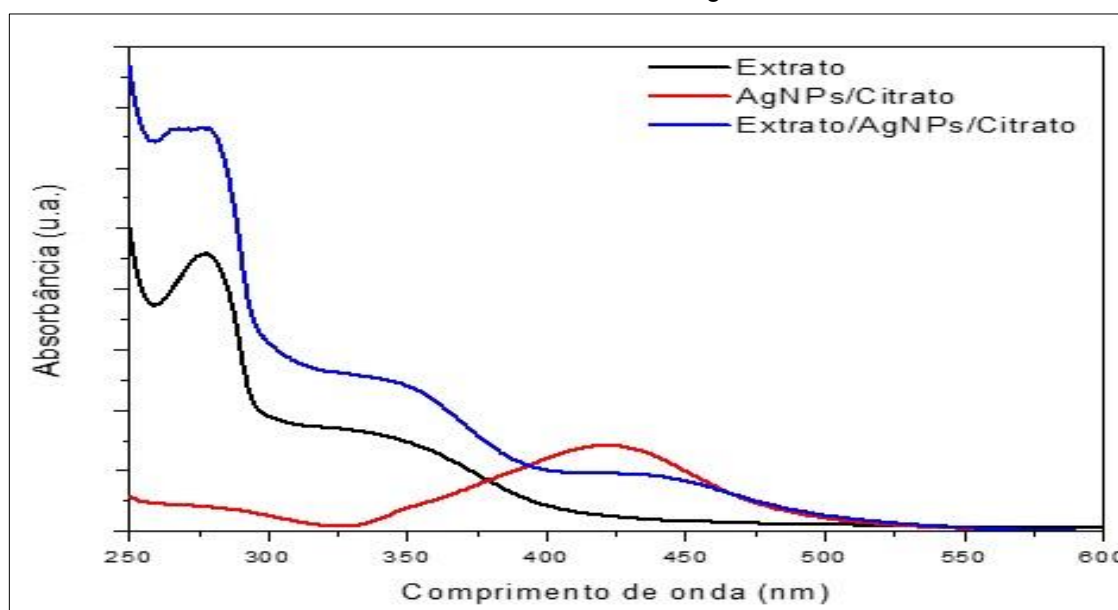
Os resultados foram analisados através da análise de variância (ANOVA) ao nível de 95% de significância. A análise estatística e os gráficos foram realizados utilizando-se o programa computacional Excel.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ANÁLISE NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA VISÍVEL (UV-VIS)

No espectro de UV-VIS (Figura 15) exibe bandas do extrato aquoso da planta *Bauhinia Forficata*, além disso representa as bandas dos componentes utilizados na biossíntese das nanopartículas de prata. No estudo espectrofotométrico o extrato da planta apresentou picos de absorção máxima entre 250 e 300 nm de comprimento na região do ultravioleta visível. Em função do tempo o extrato vegetal de *Bauhinia Forficata* atua como um bom agente estabilizador das nanopartículas de prata e na (Figura 15).

Figura 15- Espectro de absorção Ultravioleta Visível das soluções: extrato *Bauhinia forficata*; AgNPs + citrato de sódio e extrato *Bauhinia forficata* + AgNPs + citrato de sódio



Fonte: Autor (2023).

Através da análise por espectroscopia UV-Vis do extrato *Bauhinia forficata* na (Figura 15) entende-se que a estabilização das nanopartículas de prata ocorre devido seu elevado poder redutor e estabilizador. Segundo estudos de Santos *et al.* (2016) esse fato é evidenciado pela presença de biomoléculas como compostos fenólicos e flavonoides presente no extrato vegetal, o qual reflete na incapacidade de interação e agregação entre as partículas de prata. Assim a composição química do extrato vegetal e sua baixa toxicidade potencializa a formação das nanopartículas de prata.

Os resultados encontrados estão de acordo com Ali *et al.* (2016) que confirmam a possibilidade de sintetizar nanopartículas de prata estabilizada em extratos vegetal devido suas atividades redutoras e estabilizadoras dispensando o uso de solventes tóxicos e consequentes nocivos ao meio ambiente e aos seres vivos.

A primeira evidencia de formação de nanopartículas de prata AgNPs a partir do agente precursor sal do metal (AgNO_3), agente redutor (citrato de sódio), agente estabilizante (extrato vegetal) e solvente (meio aquoso), consiste no aspecto visual da mudança de coloração da solução coloidal. A caracterização visual pressupõe o controle dos parâmetros de síntese das nanopartículas de prata, bem como a concentração das espécies química, temperatura, pH e agitação da solução coloidal (Viana *et al.*, 2021).

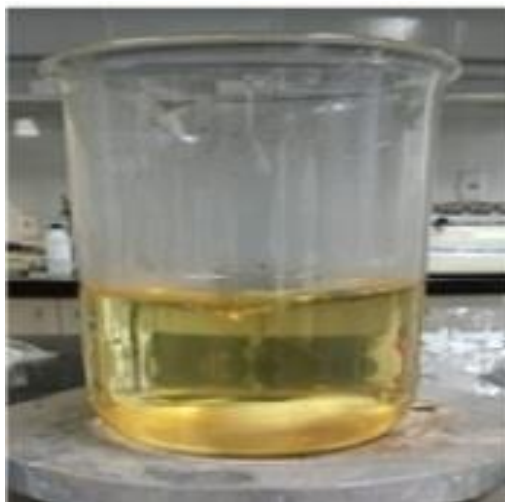
Segundo estudos de Oliveira *et al.* (2018) o tempo de mudança de coloração e a intensidade da cor dependem do método de síntese. Através do método de síntese verde foi possível identificar visualmente a presença de nanopartículas de prata comprovada pela variação de cor da solução inicialmente transparente e em seguida amarelo acastanhado representado conforme (Figura 16).

A mudança de coloração da mistura de transparente para amarelo durante a síntese das nanopartículas de prata ocorre devido a excitação dos elétrons na superfície das partículas de prata. Isso pode fazer com que certos comprimentos de onda de luz sejam temporariamente absorvidos ou dispersos. Conforme Dada *et al.* (2019) as nanopartículas de prata quando dispersas em determinado meio elas desenvolvem cores características dependendo do tamanho e forma das partículas.

A coloração é o resultado da absorção seletiva e dispersão da luz visível pelas partículas. A cor observada nas nanopartículas de prata pode depender de diversos fatores como: tamanho, forma, concentração e ambiente de dispersão dessas partículas, contudo outros elementos associados a nanopartículas de prata podem alterar este padrão (Riaz *et al.*, 2021).

A mudança de coloração após a adição do extrato vegetal e a variação de intensidade dependente do tempo também é causada pelo fenômeno de excitação dos elétrons na superfície. De acordo com Gomes *et al.* (2020) o espectro de ressonância de plásmom desloca as bandas plasmônica para outras regiões do espectro com comprimento de onda elevados. Esse efeito é evidenciado pela ação do agente redutor e agente estabilizador (Rani *et al.*, 2020).

Figura 16- Síntese das nanopartículas de prata com mudança de coloração



Fonte: Autor (2023).

As nanopartículas de prata foram caracterizadas pelo espectro de absorção na região do ultravioleta visível (UV-vis) (Figura 16). As nanopartículas de prata apresentam propriedades biológicas, químicas e físicas específicas quando comparadas com o metal em outras escalas que não seja a nanométrica. Essas propriedades são adquiridas devido o fenômeno de ressonância plasmônica de superfície localizada (SPR) que as definem como material especial e com diversas aplicações tecnológicas (Rani *et al.*, 2020).

A ressonância plasmônica de superfície localizada (SPR) ocorre quando a frequência de oscilação dos elétrons de superfície das nanopartículas metálicas entra em ressonância com a frequência da luz incidente, isto é o campo elétrico da radiação eletromagnética da luz incidente provoca a oscilação da nuvem eletrônica das nanopartículas (Riaz *et al.*, 2021).

Essa ressonância das nanopartículas de prata é evidenciada na região da luz visível o que lhes confere coloração característica. A espectroscopia de ultravioleta visível nos possibilita analisar as nanopartículas de prata em solução coloidal. No espectro de absorção óptica máximo verifica-se as bandas de superposição dessas frequências de SPR das nanopartículas analisadas. O espectro resultante contém bandas de absorção característico das nanopartículas de prata.

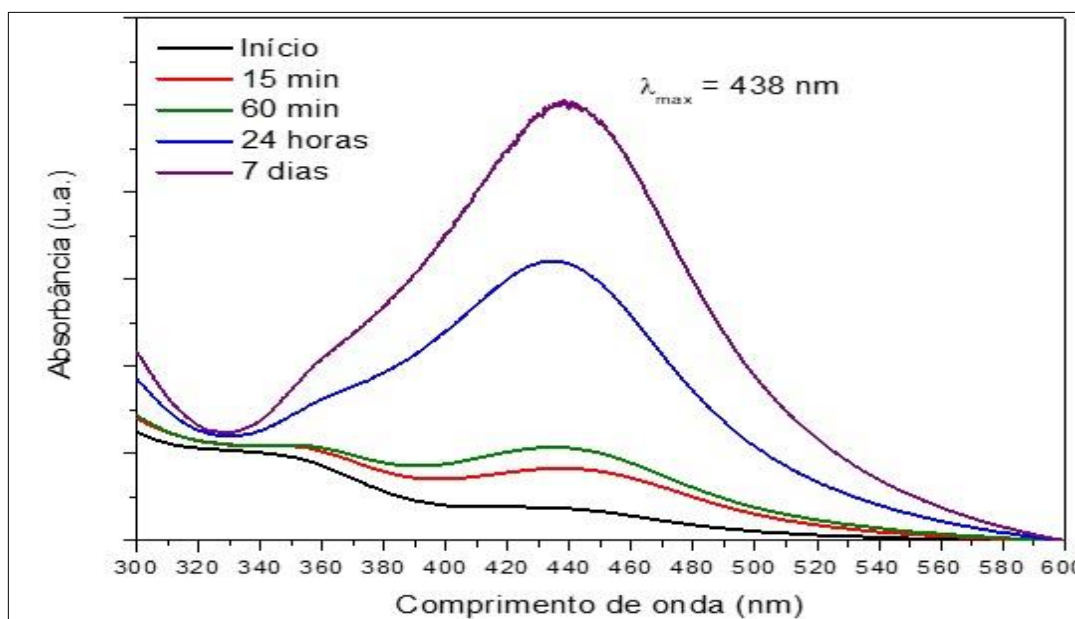
Através da análise dessas bandas em termos de largura, posição e formato é possível estabelecer uma conexão com a frequência de ressonância, as quais estão relacionadas com o tamanho, a forma e a organização das nanopartículas de prata,

além disso a variação dessas propriedades reflete em diferentes frequências de ressonância para nanopartículas de mesma natureza (De Brito; Viana; Viana 2022).

As análises espectroscópicas do UV-Vis demonstram a formação de nanopartículas de prata com picos de absorção em aproximadamente 430 a 480 nm. No espectro nota-se a formação e estabilização das nanopartículas de prata em pico máximo de absorção de 438 nm (Figura 15). Conforme Viana *et al.*, (2021) as AgNPs apresentam ressonância plasmônica de superfície característica com pico de absorção máxima em torno de 400 nm.

Esse resultado está de acordo com as excitações do plásmom de superfície e bandas de comprimento de onda máximo presente nos trabalhos de Rani *et al.* (2020). Tal resultado também corrobora com o trabalho De Brito *et al.* (2019) para AgNPs com formato esféricos e diâmetro entre 10 e 20 nm com banda típica no espectro de absorção em torno de 400 nm e com solução amarelada.

Figura 17- Espectro de absorção Ultravioleta Visível das soluções: Extrato Bauhinia forficata AgNPs + citrato de sódio e extrato Bauhinia forficata + AgNPs + citrato de sódio



Fonte: Autor (2023).

Segundo Ali *et al.* (2016) a adição de extrato de *Camellia sinensis* assim como o extrato de *Bauhinia forficata* contribuiu para a estabilização e formação de AgNPs. Nota-se na Figura 17 que o surgimento da banda ocorre apenas após 72 horas com intensidade baixa e uma banda larga. Esse resultado está compatível com os estudos de (Sena, 2019; Mittal; Chisti; Banerjee, 2013). A visualização de mudança de cor

posterior a 72 horas para essa condição favoreceu a partir de 24 horas a visualização de banda na região de 400 a 450 nm. Os picos em 260-280 nm correspondem aos compostos flavonoides (Anouar *et al.*, 2012) e compostos aromáticos, carboxílicos e carbonilas presente no extrato (Weibel, 2021)

Na Figura 17 pode-se observar que as nanopartículas de prata estabilizadas em extrato aquoso de *Bauhinia forficata*, se mantiveram estáveis após 1 dia e 7 dias de sua síntese, tendo em vista que não houve deslocamento significativo das bandas de absorção. A análise do espectro permite afirmar que não foi observado diferença de intensidade entre os picos de absorção e que o extrato aquoso de *Bauhinia forficata* contribui para uma boa atividade como estabilizador das nanopartículas de prata. Essa evidencia concerne com os dados de Riaz *et al.* (2021) obtidas via biossíntese.

As nanopartículas são capazes de apresentar tamanhos e formas diferentes de acordo com a síntese utilizada e no que se refere a ação bactericida e fúngica das nanopartículas depende da sua dimensão e forma geométrica. Conforme o espectro Figura 15 o comprimento de onda de máxima absorção está localizado em aproximadamente 438 nm e isso evidencia a formação de nanopartículas de prata polimórficas (Noguez, 2007). De acordo com Anouar *et al.* (2012) o espectro de absorção óptica das nanopartículas metálicas desloca para comprimentos de onda maiores quando elas aumentam de tamanho.

No espectro UV-VIS (Figura 15) o extrato aquoso de *Bauhinia Forficata* contribuiu para a síntese verde das nanopartículas de prata esféricas. As nanopartículas de prata obtidas a partir da síntese verde mostram-se estáveis com o tempo devido o deslocamento da banda para regiões de maior energia e diminuição da intensidade da banda atribuído ao crescimento das nanopartículas de pratas e formação de modos vibracionais de plásmom associados às mudanças de forma e tamanho das nanopartículas (Gomes *et al.*, 2020).

De acordo com a teoria de Mie, para nanopartículas esféricas tem-se apenas uma banda de ressonância plasmônica de superfície, enquanto partículas anisotrópicas tem-se duas ou mais bandas, dependendo do formato das partículas. As nanopartículas esféricas, discos e triangulares irão fornecer um, dois ou mais picos respectivamente (Sandhu; Shukla; Shukla, 2017).

Segundo os estudos de Song, Kwon e Kim (2019), o deslocamento da banda plasmônica para as regiões com maior comprimento de onda está relacionado com o aumento do tamanho das nanopartículas. No que se refere ao potencial

antimicrobiano das nanopartículas de prata estabilizada em extrato vegetal, o tamanho das nanopartículas está diretamente relacionado com a execução da biossíntese consequentemente isso influencia na sua área de contato contra os microrganismos, isto é quanto menor as partículas maiores são as superfícies de contato e consequente elevada aderência e a possibilidade de ação antimicrobiana.

Esse resultado 438 nm ($\lambda_{\max}$) concorda com as análises espectrofotométrica de Lemos *et al.*, (2021) que apresenta espectros com picos de 412 nm a 422 nm, para nanopartículas de prata estabilizada em extrato de girassol *Helianthus annuus* e picos de 410 nm a 430 nm em extrato de cajueiro *Anacardium occidentale* (Viana *et al.* 2021), 450 nm em extrato de *Acalypha wilkesiana* (Dada *et al.* 2019) e intensidade da absorção ocorreu em 438 nm, a planta utilizada para obtenção do extrato foi a *Psidium Guajava*.

A síntese verde das nanopartículas de prata utilizando extrato vegetal é possível devido a planta apresentar compostos fotoquímicos capazes de contribuir com a estabilização das nanopartículas de prata, No entanto essa estabilidade no processo de síntese pode ser afetada por diferentes fatores tais como, pela espécie do solvente ou pela quantidade de agentes redutores (Houllou *et al.*, 2019). O método de síntese verde além de ser um processo rápido e econômico não requer produtos tóxicos e ainda é compatível com produtos biomédicos de aplicação farmacêutica e biotecnológica (Osuntokun; Onwudiwe; Ebenso, 2019).

4.2 ANÁLISE ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

A caracterização estrutural do extrato da planta *Bauhinia forficata* e sua interação com AgNPs foi realizada por FTIR espectroscopia na região do infravermelho. A análise revela padrões característicos de volatilidade dos materiais isolados e dos materiais presentes na dispersão.

O extrato aquoso das folhas de *Bauhinia forficata* apresenta biomoléculas, como alcaloides, flavonoides, terpenoides, esteroides, polissacarídeos, compostos fenólicos, ácidos orgânicos, e proteínas relatado na literatura (Lourenço, 2021; Jacomassi; Moscheta; Machado, 2017). As análises de infravermelho foram realizadas para as seguintes amostras: AM1, AM2 e AM3, a fim de verificar a interação

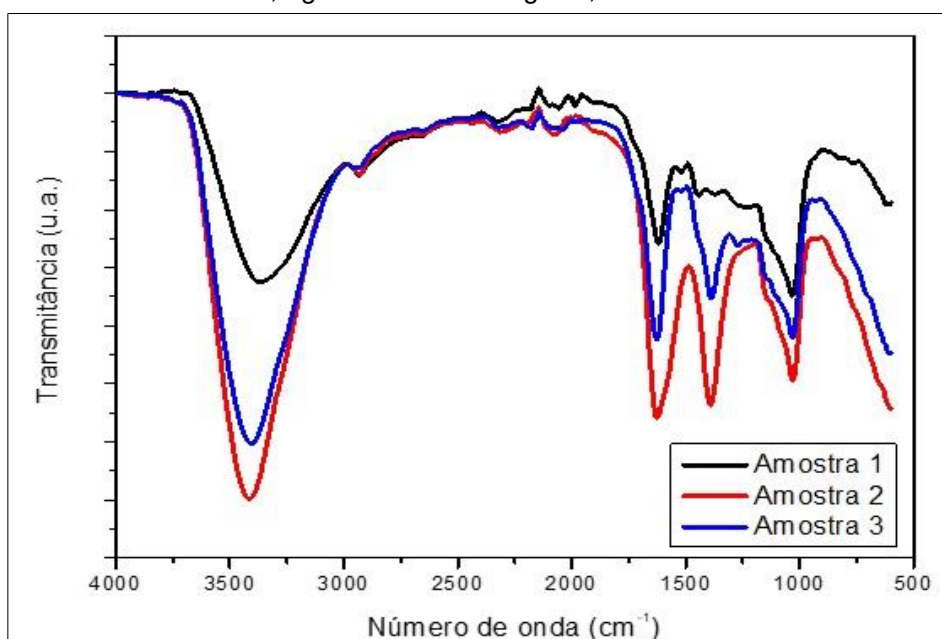
das nanopartículas de prata com o extrato aquoso vegetal. Os resultados dessa análise estão ilustrados na Figura 18.

A interpretação dos espectros foi realizada de modo a compreender a interação química do material com as biomoléculas presente no extrato vegetal. Ao comparar os espectros obtidos para as amostras é possível notar picos característicos, os quais se devem à presença e ausência de grupos funcionais de compostos orgânicos de álcoois, proteínas, lipídios, carbonilas e compostos aromáticos.

Para AM 1 percebe-se picos significativos: 3367 cm^{-1} 1619 cm^{-1} 1033 cm^{-1} para AM2: 3414 cm^{-1} 1626 cm^{-1} 1393 cm^{-1} 1031 cm^{-1} para AM3: 3408 cm^{-1} 1628 cm^{-1} 1389 cm^{-1} 1031 cm^{-1} representados na Figura 16 O extrato aquoso AM1 apresenta bandas de absorção nesta faixa de região devido à presença do grupo funcion -OH associado representado por uma banda forte e larga 3367 cm^{-1} . A banda 3414 cm^{-1} AM2 e a banda 3408 cm^{-1} AM3 também é atribuída ao grupo funcional -OH sua intensidade depende da concentração.

Segundo Osuntokun, Onwudiwe e Ebenso (2019) essa banda é característica do grupo funcional hidróxi presente em água, álcoois e compostos fenólicos. As bandas na faixa 1619 cm^{-1} AM1 1626 cm^{-1} AM2 e 1628 cm^{-1} AM3 se refere a grupamentos carbonila de polifenóis e essas bandas referem-se as vibrações de núcleos aromáticos.

Figura 18- Espectrofotometria na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) do extrato; AgNPs e extrato e AgNPs, extrato e citrato



Fonte: Autor (2023).

Conforme Osuntokun, Onwudiwe e Ebenso (2019) a presença de uma ou duas bandas adicionais de 1.650 cm^{-1} e 1.600 cm^{-1} ocorre quando o grupo fenila é conjugado com insaturações ou mesmo ligado a átomos com pares de elétrons livres comprovando a presença de compostos fenólicos no extrato. As vibrações de núcleos aromáticos são atribuídas para essas bandas. A banda de 1.580 cm^{-1} é intensa quando o grupo fenila é conjugado com insaturações ou mesmo ligado a átomos com pares de elétrons livres. A banda de 1.450 cm^{-1} geralmente é obscurecida e a banda de 1.500 cm^{-1} é normalmente mais forte. As bandas estão ausentes em alcenos simétricos.

A presença de uma ou duas bandas adicionais de 1.650 cm^{-1} e 1.600 cm^{-1} ocorre em alcenos conjugados (Chayavanich; Thiraphibundet; Imyim, 2020). A banda 1393 cm^{-1} e 1389 cm^{-1} referem-se à ligação C-O de ácidos carboxílicos e aparecem duas bandas de deformação axial, devido ao acoplamento da deformação angular no plano da ligação O-H e a deformação axial de C-O (Viana *et al.*, 2021). Já os picos na faixa 1033 cm^{-1} e 1031 cm^{-1} referem-se à ligação de ésteres insaturados e aromáticos e duas bandas na faixa 1.300 cm^{-1} entre 1.250 cm^{-1} e 1.200 cm^{-1} entre 1.050 cm^{-1} e éteres aromáticos e vinílicos duas bandas na faixa 1.200 cm^{-1} entre 1.275 cm^{-1} 1.020 cm^{-1} entre 1.075 cm^{-1} (Chayavanich; Thiraphibundet; Imyim, 2020).

O extrato, citrato e AgNPs apresentam banda fina, mas forte quando medida em solução diluída bastante semelhantes apresentando os mesmos picos e bandas de absorção com pequenas diferenças entre as intensidades. Essa banda é atribuída para as AgNPs obtidas, as quais assemelharam bastante entre si sob o ponto de vista dos espectros obtidos. O pico característico mais intenso resulta da presença de compostos orgânicos como: álcoois, carbonilas e compostos aromáticos. Para amostra 1: 3367 cm^{-1} 1619 cm^{-1} 1033 cm^{-1} Para a amostra 2 os picos: 3414 cm^{-1} 1626 cm^{-1} 1393 cm^{-1} 1031 cm^{-1} . E para a amostra 3 os picos: 3408 cm^{-1} 1628 cm^{-1} $1,389\text{ cm}^{-1}$ 1031 cm^{-1} (Sena, 2019; Viana *et al.*, 2021).

É possível detectar o desaparecimento da banda em 1723 cm^{-1} v (C = O) e o desaparecimento da banda em 1663 cm^{-1} (na proporção δ (OH) água v (C = O) proteína v (CN) anel aromático 8). O mesmo desaparecimento em 1723 cm^{-1} foi observado para dispersão de AgNPs em pH 11,4. Além disso, a banda do álcool associada ao δ (CO) deslocou-se ligeiramente de 1025 nm para 1032 nm após irradiação em pH 11,4 e na amostra sem alteração de pH (Chayavanich; Thiraphibundet; Imyim, 2020).

Sem alteração do pH no extrato, o pico em 1723 cm^{-1} (ν (C = O)) é destacado na (Figura 18) e a forma em 1978 cm^{-1} (proteína amida δ (NH) δ (CN)) desaparece após a irradiação. E quando AgNO_3 é adicionado à forma AgNP, então este desaparecimento final não ocorre). Devido a alterações pós-irradiação na formação e dissolução de ligações, como resultado de diferentes estabilizações de agentes redutores e/ou AgNPs contidos nestes extratos podem ocorrer oscilações (Osuntokun; Onwudiwe; Ebenso, 2019).

Vários parâmetros podem interferir nas reações de síntese de AgNP verdes, como a composição e concentração dos extratos, a temperatura o tempo de síntese e o pH do meio reacional. É provável que os perfis ácidos exibidos pelos extratos sejam derivados da quantidade de compostos ácidos extraíveis, como ácido elágico, ácido mandélico e ácido p-cumárico, nesta espécie (Brito *et al.*, 2019; Sena, 2019). As biomoléculas flavonóides, saponinas e taninos foram encontrados condensados em ambos os extratos. Isso confirmou estudo de Toledo *et al.* (2020), no qual beneficiar esses três tipos de compostos em álcool e extratos aquosos das folhas de *Eugenia involucrata*.

Conforme observado, os extratos introduzem faixas de alta, média e baixa intensidade entre 3200 e 1050 cm^{-1} . Como a faixa de maior intensidade na faixa entre 3.233 e 3.240 cm^{-1} pode ser imputada ao estiramento do grupo hidroxila (-OH), e a faixa de média intensidade na faixa entre 1.500 e 1.625 cm^{-1} pode ser imputada à água que é um solvente utilizado para redispersar os extratos, mas é importante ressaltar que bandas nesta área podem estar associadas a compostos fenólicos. Estas características corroboraram com os trabalhos de Da Costa e Silva Júnior, (2017) e Sena (2019) ao observar a interação das AgNPs com o extrato vegetal.

Na região entre 2.977 a 2.983 cm^{-1} é visualizada uma banda de baixa intensidade, imputada ao grupo alquil (-CH) (Song; Kwon; Kim, 2010). Áreas entre 1400 e 1300 cm^{-1} estão associadas a grupos aromáticos. Ainda, observa-se banda de baixa intensidade em ambos os extratos na região de 1200 cm^{-1} , associada a ácidos carboxílicos (-C=O) (Sena, 2019). Ademais também se observa que há diferença na intensidade da banda na região de 1050 a 1070 cm^{-1} entre os extratos, banda nessa região é atribuída a estiramento de álcoois secundários (-C-OH) (Viana *et al.*, 2022).

Esses resultados revelam biomoléculas contendo grupamentos alquilas, carbonila, hidroxilas e compostos aromáticos, caracterizando estruturalmente compostos fenólicos. Os espectros de ambos os extratos se assemelham ao

apresentado por Pereira (2014), no extrato aquoso da infusão das folhas da espécie, onde atribuiu as bandas a compostos fenólicos.

Os compostos e grupos funcionais presentes nos extratos como: flavonóides, alcaloides, taninos e saponinas atuam como agentes redutores e agentes estabilizadores na reação de síntese contribuindo para a redução de Ag^+ a Ag^0 , e simultaneamente, atuam como agentes estabilizadores na reação (Xu *et al.*, 2020).

4.3 ANÁLISE DO ESPALHAMENTO DINÂMICO DE LUZ (DLS)

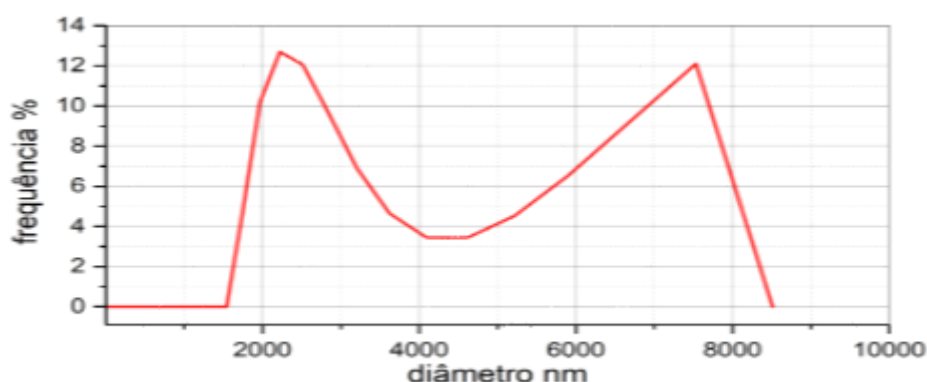
Os resultados obtidos através da análise por espalhamento dinâmico de luz (DLS) permitem compreender e estimar o diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas presente na dispersão coloidal em decorrência de seu movimento browniano. As partículas menores se propagam em uma velocidade média maior em relação as partículas maiores. Segundo o espectro de DLS as nanopartículas de prata formadas apresentam tamanho médio bimodal, isto é, as populações de nanopartículas apresentam dois picos característicos o de maior intensidade e o de menor intensidade dado em unidades de diâmetro hidrodinâmico proporcional a frequência apresentada na Figura 19 e 20 (Machado *et al.*, 2021).

O raio hidrodinâmico calculado por (DLS) conforme Sandhu, Shukla e Shukla (2017) geralmente é maior que o raio das nanopartículas mensurado através de outras técnicas de caracterização. Isso ocorre devido ao efeito de solvatação presente na superfície das nanopartículas. Essa solvatação é formada pela presença de íons em solução que interagem eletrostaticamente com a nanopartícula resultando em uma dupla camada elétrica envolta da nanomaterial (Meva *et al.*, 2019).

As amostras de nanopartículas de prata estudadas por experimento de DLS relevam três medidas distintas com diâmetros que variam do maior pico para o menor pico de acordo com essas amostras. O ângulo de medição utilizado pelo equipamento foi 90° isso favorece a medição em sistemas polidispersos, pois as partículas com tamanhos entre 50 nm a 100 nm se encontram em equilíbrio nessa condição. A concentração da suspensão também é outro fator que pode influenciar nessa medida, visto que uma concentração elevada ocasiona espalhamento dinâmico múltiplo e isso interfere diretamente nos resultados de DLS, isto é quanto maior a concentração maior o diâmetro calculado (Subedi; Vijay; Willcox, 2018).

Através dos gráficos observa-se que o tamanho médio das AgNPs obtido através da análise DLS para as amostras: extrato (AM1), AgNPs com extrato (AM2) e AgNPs com citrato de sódio (AM3) estão em concordância com os resultados encontrados nos estudos de Sandhu, Shukla e Shukla (2017) em que tal caracterização apontou AgNPs de tamanhos menores de acordo com aumento de temperatura de síntese. As medidas do DLS para o extrato vegetal são apresentadas na Figura 19.

Figura 19- Espectro de distribuição de tamanho em intensidade do extrato aquoso obtida por DLS



Fonte: Autor (2023).

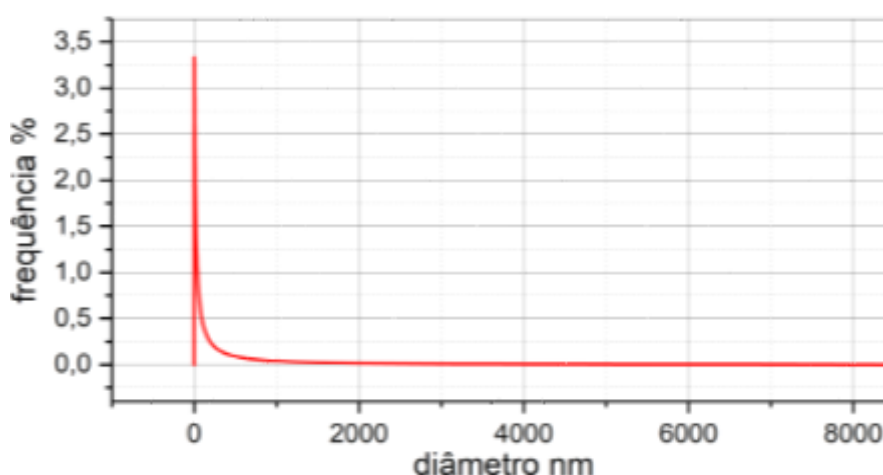
Conforme Santos *et al.* (2016) essa diferença na frequência da luz incidente sob a amostra também possibilita a construção e análise do espectro de distribuição de tamanhos das nanopartículas presente na amostra como também a avaliação do comportamento dessas nanopartículas quanto ao solvente e no que se refere a dissolução e aglomeração. Na Figura 19 observa-se uma maior mudança na frequência das partículas menores em relação as partículas maiores o tamanho variou entre 0,34 nm e 8.510,56 nm.

Ao comparar com estudos de Meva *et al.* (2019) evidencia-se a modificação superficial das nanopartículas. Segundo Viana *et al.* (2021) a presença de uma camada de cobertura na síntese de AgNPs mediada por plantas, onde o extrato da planta molda a nanopartícula durante seu crescimento tem um efeito na distribuição de tamanho dessas nanopartículas.

Estudos como de Sena (2019), Freire *et al.* (2018) os autores constataram que a geometria das partículas influencia nas medidas de DLS. As partículas não esféricas

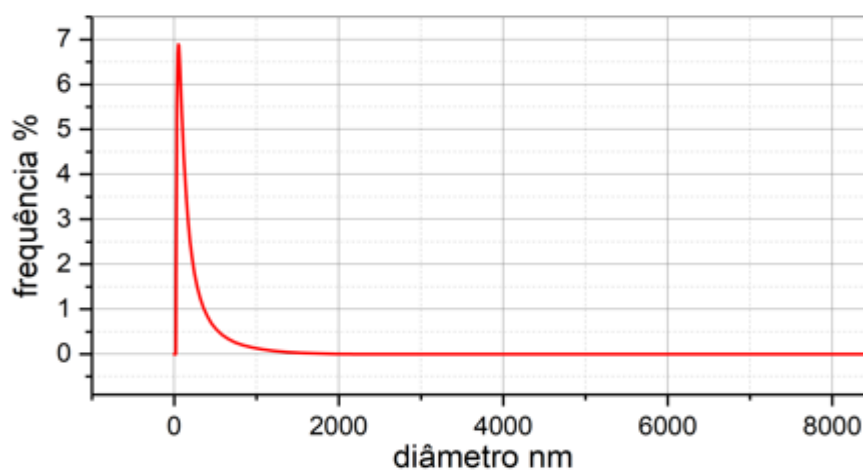
com diâmetros maiores que 30 e 40 nm resulta em interpretações equivocadas e incompatibilidade com resultados de DLS e análise microscópica pois a largura dos picos de DLS não corresponde aos dados obtidos pela análise microscópica. Ao discutir os resultados de análise das nanopartículas de prata usando DLS é importante considerar os seguintes pontos: o tamanho médio das partículas para que esteja dentro da faixa esperada conforme as propriedades desejadas em função da aplicação específica. No que se refere a ação antimicrobiana os dados estão de acordo com o (Meva *et al.*, 2019). As medidas do DLS para as nanopartículas de prata em extrato vegetal pH > 10 são apresentadas nas Figura 20 e as medidas do DLS para as nanopartículas de prata com adição de citrato são apresentadas na Figura 21.

Figura 20- Espectro de distribuição de tamanho em intensidade de AgNPs e extrato obtida por DLS



Fonte: Autor (2023).

Figura 21- Espectro de distribuição de tamanho em intensidade de AgNPs e citrato obtida por DLS



Fonte: Autor (2023).

A análise a partir das flutuações de intensidade da luz espalhada em um determinado ângulo e volume fixo iluminado revela o tamanho a partir da velocidade do movimento browniano das nanopartículas. Nesse caso a relação matemática de *Stokes-Einstein* considerando as partículas esféricas foi utilizada pelo equipamento como modelo matemático para determinar o diâmetro das partículas ao relacionar o Dh que representa o diâmetro hidrodinâmico da nanopartícula, o Dt representa o coeficiente de difusão encontrado pela espectroscopia de correlação dos fótons, o Kb é a constante de Boltzmann, T a temperatura e o n a viscosidade dinâmica expresso na equação 1 abaixo (Solomon *et al.*, 2017).

$$Dh = \frac{Kb.T}{3\pi nDt} \quad \text{Eq. (1)}$$

O método de síntese é outro parâmetro que pode ser considerado ao analisar os resultados. No que se refere ao processo de preparação de nanopartículas, a síntese verde é um método efetivo ao evitar o processo de aglomeração e reatividade da prata (Houllou *et al.*, 2019). Segundo Sandhu, Shukla e Shukla (2017) o método de síntese verde contribui para minimizar de maneira simultânea o crescimento e a distorção de tamanho e morfologia das nanopartículas.

O diâmetro das AgNPs obtidos por rotas de síntese verde utilizando extratos vegetais descrito por DLS fornece dados também referente aos extratos. No presente trabalho, optou-se pela metodologia DLS para analisar as AgNPs suspensas. Os dados obtidos pela técnica mostrado na Figura 21, inclui uma avaliação do tamanho das partículas na dispersão aquosa, bem como o diâmetro hidrodinâmico, o qual apresentou distribuição bimodal de acordo com o número de classes, com máximos de 35,03 nm e 50 nm, indicativo da presença de duas populações de partículas (Sandhu; Shukla; Shukla, 2017). A (Tabela 1) abaixo representa o raio hidrodinâmico das nanopartículas.

Tabela 1- Tamanhos hidrodinâmicos partículas.

AMOSTRAS	SIZE HIDRODINÂMICO	Z-AVERAGE	TAXA COUNT
AM1	2493 nm	3587 nm	300 Kcps
AM2	21,4 nm	47,0 nm	400 Kcps

AM3

107,7 nm

62,3 nm

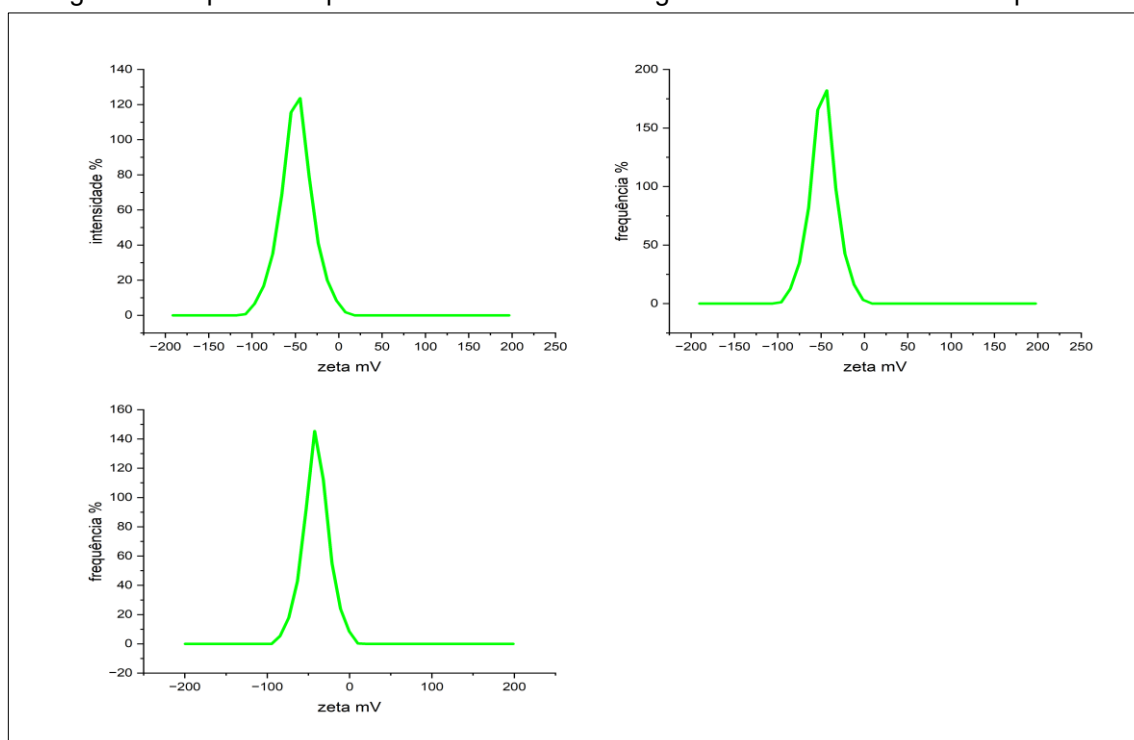
753 Kcps

Fonte: Autor (2023).

4.4 ANÁLISE DO POTENCIAL ZETA (PZ)

Ao analisar os resultados de medidas das cargas superficiais do extrato vegetal e é possível compreender a estabilidade coloidal do sistema. Alguns pontos importantes são considerados como por exemplo: a estabilidade e o comportamento das partículas. Quanto maior o valor absoluto do potencial Zeta, mais estáveis as nanopartículas. Os valores elevados de potencial Zeta costumam criar forte repulsão eletrostática entre as partículas, impedindo a aglomeração decorrente da falta de forças repulsivas (Lunardi *et al.*, 2021). Neste sentido os valores obtidos para potencial Zeta do extrato vegetal *Bauhinia forficata* são mostrados nos gráficos abaixo. As medidas do potencial zeta para o extrato aquoso de *Bauhinia forficata* estão representados na Figura 22.

Figura 22- Espectro de potencial Zeta do extrato vegetal *Bauhinia forficata* obtida por DLS

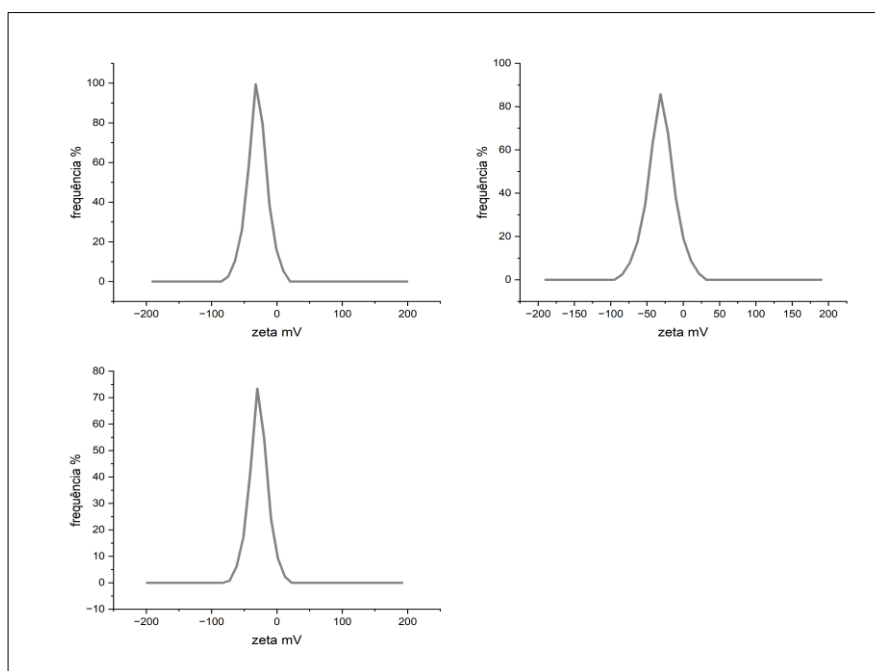


Fonte: Autor (2023).

O potencial Zeta é uma medida que considera as distribuições de volume e intensidade. De acordo com a gráfico acima os valores de potenciais maiores que +30 mV e menores que -30 mV são associados a obtenção de AgNPs mais estáveis (Rodrigues, 2018). Segundo o gráfico o ponto isoelétrico do nanocompósito não varia em relação à concentração do extrato vegetal, presente nas amostras. Ao considerar a estabilidade das amostras com relação ao potencial Zeta maior que 30 mV nota-se forte influência do pH nas amostras. Observa-se que o pH adequado quanto à estabilidade são aqueles maiores que 10. As soluções com o pH levemente ácido em torno de 6,0 a 6,8 apresentam boa estabilidade, faixa de pH ideal para a maioria dos sistemas biológicos.

Em outras palavras o potencial Zeta correlaciona-se com a repulsão eletrostática entre partículas e estabilidade do sistema. A taxa de formação de agregados aumenta à medida que Zeta se aproxima de zero. Quando o valor do potencial Zeta for inferior a -30 mV ou superior a +30 mV, a partícula estará estável (Rodrigues, 2018). O gráfico abaixo representa o potencial Zeta para as nanopartículas em pH maior que 10.

Figura 23- Espectro de potencial Zeta de AgNPs pH<10 obtida por DLS

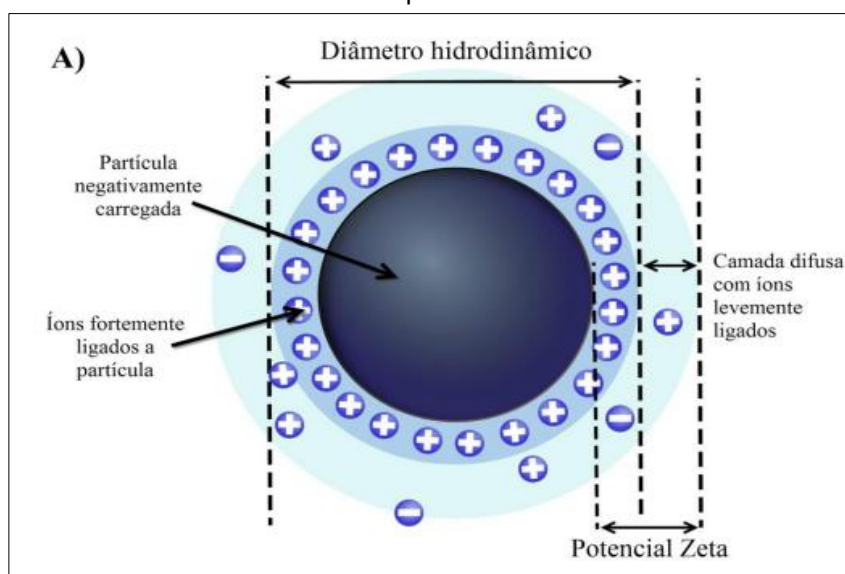


Fonte: Autor (2023).

O efeito do pH no meio exerce interferência na medida do potencial Zeta das nanopartículas de prata ao afetar a carga superficial das partículas, visto que, a magnitude da repulsão ou atração eletrostática mede a estabilidade das nanopartículas. Tal estabilidade do sistema decorre do fato das nanopartículas formadas permanecerem em suspensão e não se agregarem em partículas maiores, além disso, ao entrarem em contato com o solvente, levam cargas elétricas em sua superfície, criando um potencial elétrico. Em geral, os valores do potencial Zeta podem mudar drasticamente com mudanças no pH, o que pode ser relevante para determinadas aplicações.

O potencial Zeta pode ser analisado em vários solventes isso é importante, pois a estabilidade coloidal das nanopartículas pode variar dependendo do meio e reflete na estabilidade do solvente. Em concordância com esta pesquisa e com os estudos de Salazar-Bryam *et al.* (2021) ao aumentar o pH da solução, aumenta-se o potencial Zeta. O potencial elétrico entre as nanopartículas e a camada aquosa é apresentado na Figura 24.

Figura 24- Esquema representativo do raio hidrodinâmico e potencial Zeta para partículas esféricas por DLS



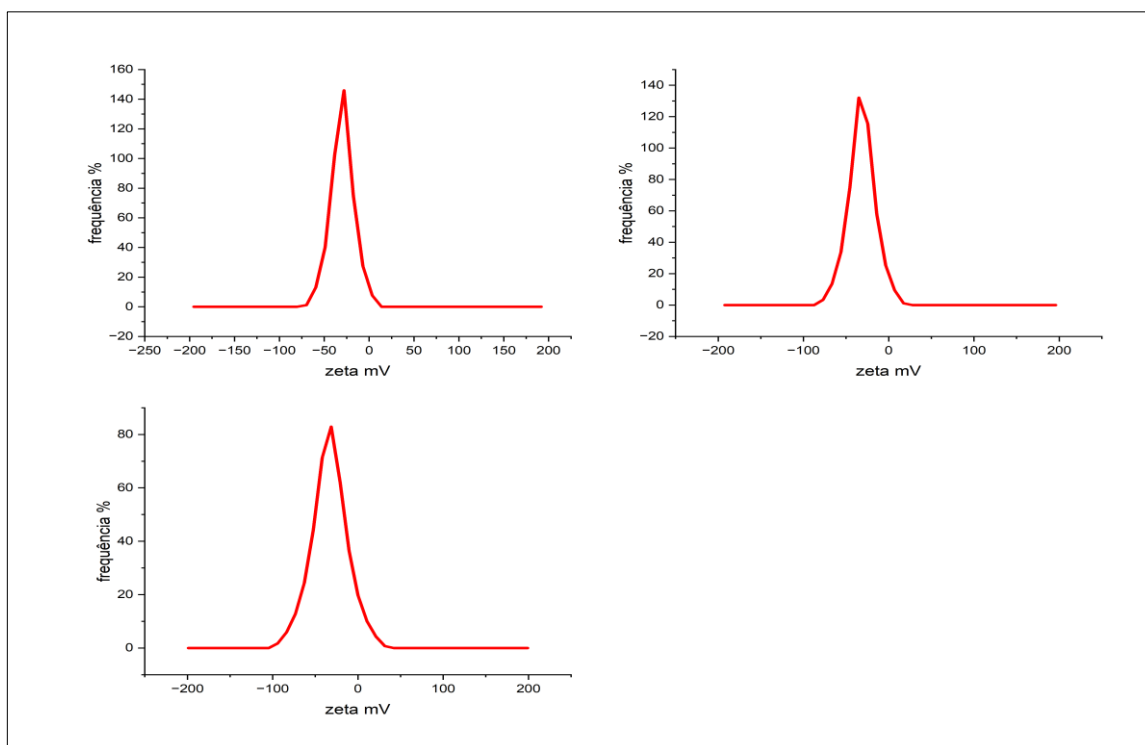
Fonte: Sousa (2018).

Além dos aspectos de estabilidade coloidal, o potencial Zeta também fornece informações sobre a potencial toxicidade das nanopartículas de prata. Os valores elevados de potencial Zeta podem indicar um baixo potencial de envenenamento celular tóxico, o que é importante em aplicações médicas e ambientais. A

interpretação dos resultados deve ser considerada em função de aplicações específicas das nanopartículas de prata (Yusuf *et al.*, 2020). Ao realizar uma análise do potencial Zeta, é importante considerar o tamanho médio das nanopartículas de prata, pois as partículas pequenas podem se comportar de maneira diferente das partículas grandes. O teste de potencial Zeta conseguiu demonstrar a estabilidade das partículas obtidas durante o processo com valor de -39,75 mV, o que confirma sua funcionalidade conforme os estudos de (Toledo *et al.*, 2020).

Segundo Yusuf *et al.* (2020), os valores negativos obtidos para o potencial Zeta podem ser decorrentes da adsorção de compostos bioativos como compostos carboxílicos e fenólicos revestindo AgNPs na síntese com o extrato vegetal *Bauhinia forficata*, além disso, a temperatura é um importante fator de estabilidade. O valor do potencial Zeta das nanopartículas aumenta com o aumento da temperatura. O gráfico abaixo mostra o potencial Zeta para as nanopartículas com adição de citrato de sódio. As medidas do potencial zeta para nanopartículas de prata com adição de citrato de sódio (Figura 25).

Figura 25- Espectro de potencial Zeta de AgNPs com adição de citrato obtida por DLS



Fonte: Autor (2023).

O alto valor do módulo do potencial Zeta das AgNPs obtido juntamente com a polidispersidade baixa a moderada nas análises DLS é uma evidência satisfatória de que essas partículas têm baixa tendência a agregar-se. A análise DLS com Potencial Zeta também fornece informações sobre a distribuição de tamanho das nanopartículas.

As amostras de nanopartículas geralmente podem conter partículas subatômicas de vários tamanhos. Compreendendo este parâmetro, a homogeneidade da amostra pode ser estimada. A polidispersidade (PDI) é um parâmetro utilizado para avaliar a distribuição de tamanho de AgNPs, esse valor varia de 0 a 1, e quanto menor for, mais monodispersas e, portanto, mais homogêneas são as nanopartículas (Toledo 2020 *et. al.*).

A distribuição de tamanho das nanopartículas é determinada a partir da relação entre a diferença de frequência da luz incidente decorrente do espalhamento da luz em diferentes intensidades e do PDI. Para Mendes (2015) a diminuição na polidispersividade significa uma alta distribuição de tamanho de partícula. Os valores de $PDI > 0,7$ significa uma alta distribuição de tamanho de partícula. De acordo com os resultados as amostras analisadas estão dentro de um PDI que é a média para a distribuição de AgNPs.

A polidispersidade é uma medida da uniformidade ou heterogeneidade das partículas em relação ao seu tamanho. Quanto menor o valor da polidispersidade, mais fechada é a amostra. Isto reflete a estabilidade coloidal das nanopartículas em suspensão e a sua capacidade de permanecerem uniformemente dispersas em solução ao longo do tempo. Esta estabilidade coloidal é importante para a compreensão do comportamento das partículas aglomeradas e da perda de suas propriedades específicas. Ao analisar distribuições de tamanho de amostra, é necessário gerar e ou identificar diferentes subpopulações dessas partículas (Garcia et al., 2021).

Ao avaliar os valores de polidispersidade para determinar o quão uniforme é o tamanho das partículas, é necessário relacionar a estabilidade coloidal em função da idade das partículas (Mendes, 2015). A Tabela 2 apresenta a análise de PDI os resultados indicam amostras de acordo com os resultados as amostras analisadas estão dentro de um PDI que é a média para a distribuição de AgNPs.

Tabela 2 – Tamanho hidrodinâmico e potencial Zeta das partículas.

	AM1	AM2	AM3
Tamanho médio	2493 nm	21,2 nm	107,7 nm
Potencial Zeta	-45,6 mV	-32,1 mV	-31,5 mV
PDI	3,0	1,5	0,5
Viscosidade	0,807 mPa.s	0,898 mPa.s	0,896 mPa.s

Fonte: Autor (2023).

As AgNPs apresentaram índice de polidispersidade (PDI) de 0,202, valor que indica monodispersidade moderada. AgNPs formadas por síntese verde normalmente apresentam um PDI moderado entre 0,3 e 0,5 (Mendes, 2015). O processo de obtenção de AgNPs homogeneamente dispersos pode ser explicado pela homogeneidade de suas propriedades físico-químicas dispersões coloidais. Isto permite que as propriedades do sistema resultante estejam diretamente relacionadas às propriedades dos AgNPs individuais (Garcia *et al.*, 2021).

Em termos de morfologia pode-se prever que as AgNPs formadas têm formato esférico segundo suas características e os valores UV-VIS obtidos. Conforme Durán *et al.* (2018) mostram que AgNPs de até 100 nm de tamanho são de preferência uma forma esférica. O tamanho do AgNPs pode estar relacionado à aplicação pretendida. O tamanho das nanopartículas é proporcional a sua toxicidade, nanopartículas menores são mais tóxicas devido à elevada área superficial.

Os valores do potencial Zeta, tamanho e índice de polidispersidade do AgNPS mostrados na tabela abaixo. Conforme Dada *et al.* 2019 descreve o método de biossíntese como promissor para a síntese de nanopartículas de prata a partir de extratos vegetais como por exemplo *Bauhinia forficata*. Com base nos resultados obtidos, percebe-se variações mínimas em relação as propriedades e características das AgNPs. Os valores de DLS, potencial Zeta e índice de polidispersidade se mostraram estáveis e complementar na análise do tamanho das AgNPs. Na tabela 3 está representado as inferências dos valores de PDI.

Tabela 3 – PDI valores e características

PDI	Características
0,00 a 0,05	Partículas produzidas como monodispersas
0,05 a 0,08	Amostra quase monodispersa
0,08 a 0,70	Polidispersividade média
> 0,70	Alto grau de polidispersividade

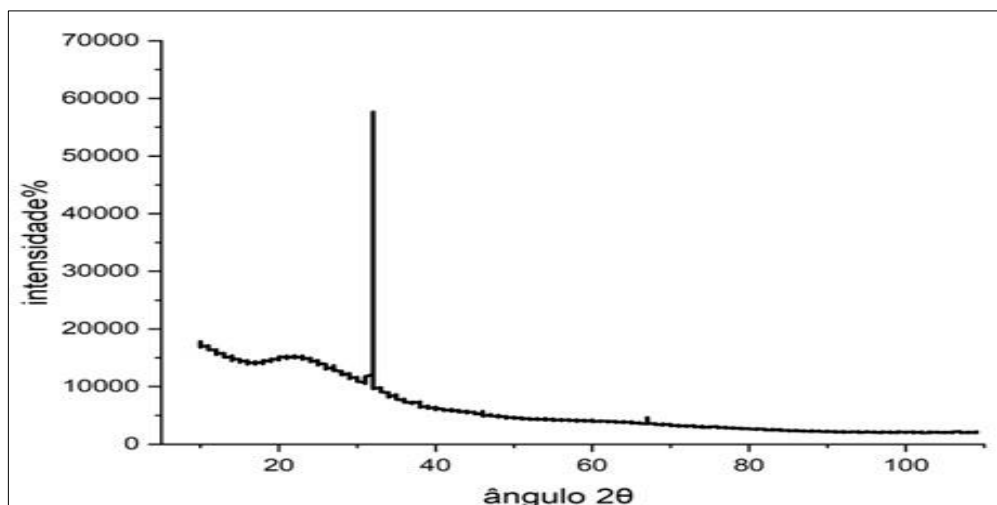
Fonte: Solomon et al. (2017).

4.5 ANÁLISE DA DIFRAÇÃO DE RAIOS-X

A difração de raios X é o resultado da interferência construtiva entre os raios X e a amostra. O comprimento de onda dos raios X utilizados é da mesma ordem de grandeza que a distância entre os átomos ou arranjo da estrutura analisada. Quando um feixe de raios X incide sobre um material sólido, os elétrons associados a cada átomo ou íon no feixe espalham parte desse feixe em todas as direções e permite investigações sobre a simetria cristalina, distâncias interplanares e defeitos estruturais.

A possível estrutura cristalina e a presença de nanopartículas de prata produzidas, foi avaliada a partir da análise de difração de raios X na Figura 26. A amostra foi sintetizada a partir do extrato aquoso de *Bauhinia forficata*.

Figura 26- Difratoograma de raios-X das AgNPs preparadas por síntese verde



Fonte: Autor (2023).

O padrão de difração de raios X do precipitado obtido durante a eletrodeposição de uma solução de nitrato de prata 1mmol/L mostrado na Figura 26 evidencia que o precipitado tem picos de difração em cerca de 38° , 44° e 68° , consistentes com o perfil cristalográfico de prata resultante da formação de AgNPs.

Os picos de intensidade em valores de 2θ de 38° , 44° e 68° corresponde aos níveis de prata 111, 200, 220 e 311. Tal confirmação é possível por comparação com o registro cristalográfico da prata (JCPDS nº 00-004-0783).

Conforme Durán *et al.* (2018) o grande pico em $2\theta = 38^\circ$ é caracterizado como um pico indicando uma composição fitoquímica que pode coexistir com AgNPs, isto é interação do material com o extrato, porém, este pico e outros valores de $2\theta = 38^\circ$, 44° e 68° também foram identificados como a presença de cloreto durante a síntese ou fase (AgCl). Segundo Xu *et al.*, (2021), esses picos resultam da reação entre íons prata e cloreto como etapa de síntese de nanopartículas a partir da síntese verde utilizando extratos aquoso de plantas identificados na literatura.

A partir da análise das propriedades físico-químicas, pode-se observar que algumas das propriedades mais importantes das AgNPs podem ser moduladas pela biossíntese simplesmente alterando a origem do material vegetal e agente redutor. A síntese a partir de outros agentes redutores que utiliza extrato aquoso de partes da planta produz AgNPs com menor diâmetro hidrodinâmico, menor PDI com propriedades mais homogêneas e maior módulo de potencial Zeta que implica em maior estabilidade em relação as AgNPs sintetizadas com outros agentes redutores.

Isso reflete na difusão de rotas sintética mais adequada para a biossíntese de AgNPs com tamanho nanométrico uniforme e estáveis (Magarelli; Pupe; Silva, 2021).

No padrão de difração mostrado na Figura 23 é possível observar picos em um ângulo de 38°; 44°; 68° correspondentes aos planos cristalinos (1 1 1), (2 0 0), (2 2 0). De acordo com a norma JCPDS 89-3722 os picos referem-se à superfície do sistema cristalino prata centrada. Devido à pequena espessura formada na fina película decorrente do pequeno volume de material a interação com a radiação de raios X é bastante reduzida em comparação com materiais em pó resultando num sinal espalhado e de baixa intensidade. Além disso, devido à mesma característica o feixe de raios X incidente pode passar pelo filme e interagir com o substrato causando uma forte interferência no padrão de difração (Xu *et al.*, 2021)

4.6 ENSAIO TOXICOLÓGICO DO EXTRATO AQUOSO DA PLANTA

O ensaio de toxicidade frente as espécies *Artemia salina* demonstra a sensibilidade da espécie aquática em relação as substâncias tóxicas ou atóxicas. A avaliação da atividade tóxica do extrato aquoso de *Bauhinia forficata* frente a *Artemia salina* foi realizada em quintuplicata em concentrações diferentes conforme o Quadro abaixo.

Figura 27- Quadro 1 - DL50 concentração 1000 µg/mL e taxa de mortalidade

Amostras	Concentrações (g/ML)							Controles	
	1000 µg/ML	750 µg/mL	500 µg/mL	250 µg/mL	200 µg/mL	100 µg/mL	50 µg/mL	CN	CP
T1	5	7	10	10	10	10	10	10	0
T2	10	10	9	10	10	10	10	10	0
T3	5	9	10	10	9	10	10	10	0
T4	5	8	9	9	10	10	10	10	0
T5	10	9	9	9	10	10	10	10	0
N	35	43	47	48	49	50	50	50	0
n ₋	15	7	3	2	1	0	0	0	50
$\bar{x}(n)$	7	8,6	9,4	9,6	9,8	10	10	10	0
$\bar{x}(n_-)$	3	1,4	0,6	0,4	0	0	0	0	10

n_+ (%)	30	14	6	4	2	0	0	0	100
-----------	----	----	---	---	---	---	---	---	-----

Fonte: Autor (2023).

Onde: n : vivos; n_- : mortos; $\bar{x}$: vivos $\bar{x}_-$:mortos; $\%n_-$: taxa mortos.

O controle positivo $K_2Cr_2O_4$ dicromato de potássio apresentou uma DL_{50} menor que 1000 $\mu\text{g/mL}$, e o controle negativo contendo apenas solução salina exibiu DL_{50} maior que 1000 $\mu\text{g/mL}$. Em relação à taxa de mortalidade na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ 30% das *Artemias salinas* morreram e na concentração de 750 $\mu\text{g/mL}$ 14%, já na concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$ a taxa de mortalidade foi de 6%. Esse fato evidencia a concordância ao limite de 1000 $\mu\text{g/mL}$ com no mínimo 50% das espécies mortas, visto que a toxicidade do material em relação à taxa de mortalidade considera o extrato atóxico nessa concentração máxima de 1000 $\mu\text{g/mL}$. Para todas as frações obtidas do extrato aquoso da planta *Bauhinia Forficata* a DL_{50} foi superior a 1000 $\mu\text{g/mL}$ e em nenhuma das concentrações testadas foi verificada a mortalidade das *Artemias salinas*.

Observa-se que tanto o extrato aquoso quanto as frações apresentaram $DL_{50} > 1000 \mu\text{g mL}^{-1}$. Segundo a OMS são classificados como materiais tóxicos, os que apresentam $DL_{50} < 1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ e atóxicos os que apresentam $DL_{50} > 1000 \mu\text{g mL}^{-1}$. De acordo com Meyer *et al.* (1982) esse parâmetro aplica-se à espécie *Artemia salina*. Os testes de toxicidade são elaborados com objetivo de avaliar ou prever os efeitos tóxicos em sistemas biológicos e dimensionar a toxicidade relativa das substâncias (Mendes, 2015). O fluxograma (Figura 27) abaixo representa a dose letal para uma determinada população conforme a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

Figura 27- Fluxograma DL_{50}

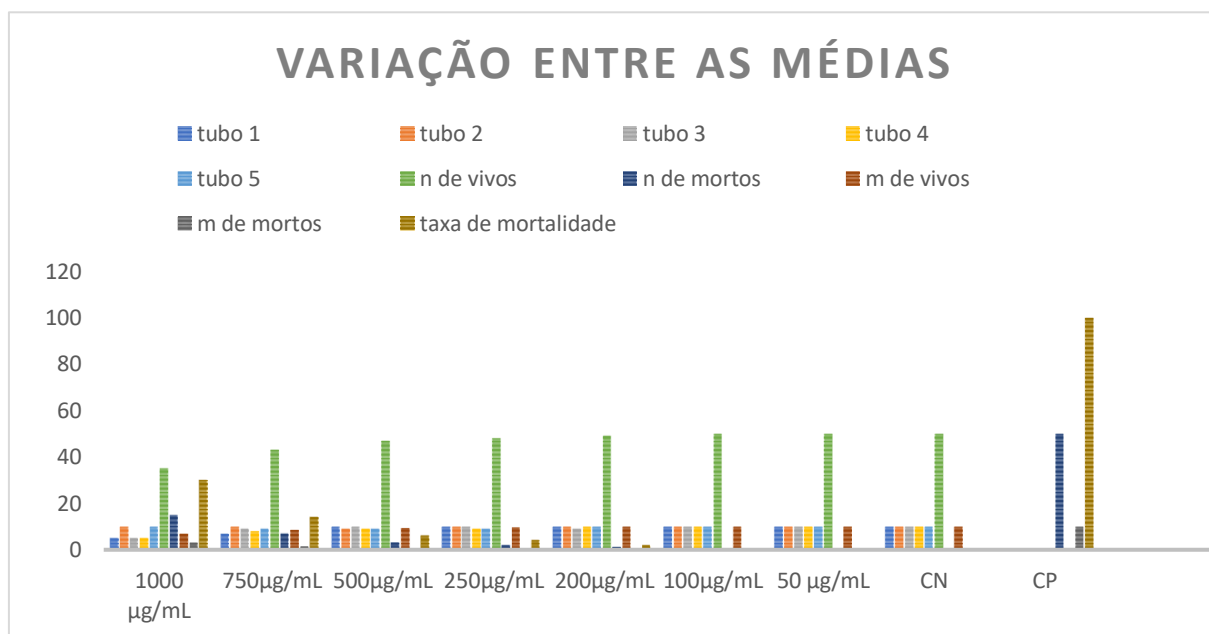


Fonte: Autor (2023).

Os ensaios realizados frente *Artemia salina* revelam que as frações obtidas do extrato aquoso e solução salina, apresentaram baixa taxa de mortalidade nas

concentrações estudadas, indicando atoxicidade das frações; representado na Figura 28 abaixo.

Figura 28- Gráfico da variação entre as médias de vivos e mortos



Fonte: Autor (2023).

A Figura 28 confere uma ideia de não toxicidade pois as frações do material são considerados não tóxicos em DL_{50} acima de $1000 \mu\text{L.mL}^{-1}$ frente as espécies aquáticas *Artemia salina* (Nguta *et al.*, 2011).

Os compostos orgânicos de origem vegetal geralmente são tóxicos frente a *Artemia salina*, dessa forma a sua taxa de mortalidade pode ser utilizada como um teste prático e versátil capaz de estabelecer um parâmetro de toxicidade do material analisado, a fim de estabelecer uma correlação entre a atividade toxica do material analisado a essa espécie aquática, confirmando assim a sua sensibilidade e versatilidade em estudos de toxicidade bem como atividade antimicrobiana, além de ser considerado um bioensaio simples e de baixo custo (Lima *et al.*, 2011).

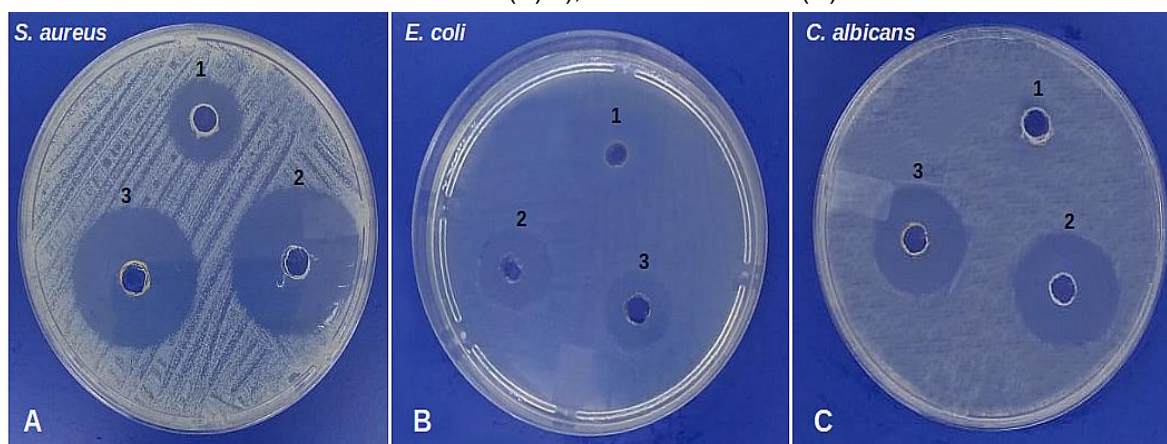
O ensaio de toxicidade frente as espécies de *Artemia salina* revela um método alternativo para a determinação da toxicidade, pois demonstra a sensibilidade da *Artemia salina* a diversas substâncias tóxicas (Nguta *et al.*, 2011). Este ensaio toxicológico comumente utilizado para detectar o potencial biológico a partir da análise de toxicidade de extratos vegetais e compostos químicos (Lima *et al.*, 2011).

Segundo Ali *et al.* (2016) relataram os mecanismos de toxicidade de nanopartículas, ligação membrana celular cujas propriedades mudam, danos ao material genético do patógeno e, finalmente, interação iônica prata e proteínas contendo tiol da parede celular que causam disfunção. Entretanto, Lima *et al.* (2011) descrevem que um dos principais mecanismos de toxicidade é a produção de espécies reativas de oxigênio, o que leva estresse oxidativo e diversas formas de inibição celular.

4.7 TESTE DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA AgNPs

Na pesquisa foram analisados a ação antibiótica do nanomaterial formado por nanopartículas de prata estabilizadas em extrato aquoso de *Bauhinia forficata* contra as cepas testadas *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*. Os halos de inibição foram analisados em placa de Petri pelo método de difusão do poço conforme a Figura 29 e a Tabela 4 a seguir.

Figura 29- Teste de difusão em poços contendo soluções testes contra *Staphylococcus aureus* (A), *Escherichia coli* (B) e, *Candida albicans* (C)



Fonte: Autor (2023).

Tabela 4- Amostra do material frente as culturas testadas

Solução teste	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida albicans</i>
Extrato (AM1)	20 mm	0mm	0 mm

Nanopartícula (AM2)	38 mm	22 mm	28 mm
Extrato/nanopartícula (AM3)	36 mm	21 mm	28 mm

Fonte: Autor (2023).

AgNPs apresentaram atividade microbica contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Estes resultados confirmam a informação disponível na literatura de que a atividade antibacteriana foi eficaz contra estes dois microrganismos. Embora vários estudos indiquem que a categoria gram-positiva não é tão sensível aos efeitos das AgNPs quanto as bactérias gram-negativas, devido a diferenças na interação com a parede celular bacteriana (Sukri *et al.*, 2019).

A susceptibilidade bacteriana consiste em testes e análises capazes de medir a sensibilidade antimicrobiana, isto é a sensibilidade de bactérias aos antibióticos, bem como nanopartículas de prata (Rani *et al.*, 2020).

Esse procedimento possibilita não só a identificação do antibiótico adequado como também novas possibilidades de tratamento do paciente através de nanopartículas por exemplo. Dessa forma pode-se analisar e classificar os organismos patogênicos que causam infecções e assim impedir o seu desenvolvimento. Diante disso é possível medir o grau de resistência com precisão e exatidão para que se possa intervir na proliferação dos patógenos antimicrobianos.

A amostra 1 contendo o extrato puro apresentou-se eficaz na inibição do crescimento da *Staphylococcus aureus*, formando um halo de inibição de 20mm (médias das 3 repetições), entretanto AM1 não houve formação de halo para as espécies *Escherichia coli* e *Candida albicans*. Na amostra 2 contendo nanopartícula mostrou-se eficaz na inibição do crescimento de todos os microrganismos testados, sendo que as médias das três repetições dos halos formados é de 38 mm para *Staphylococcus aureus*, 22 mm para *Escherichia coli* e 28 mm para *Candida albicans*.

Na amostra 3 contendo extrato e nanopartícula também foi eficiente na inibição do crescimento dos três microrganismos, apresentando as seguintes médias: 36 mm para *Staphylococcus aureus*, 21 mm para *Escherichia coli* e 28 mm para *Candida albicans* na (Tabela 5)

Tabela 5 - Média do halo teste triplicata: Cepas dos microrganismos e halos de inibição de crescimento microbiano frente AgNPs

Solução teste	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	<i>Candida albicans</i> ATCC10231
Extrato (AM1)	20 mm	0mm	0 mm
Nanopartícula (AM2)	38 mm	22 mm	28 mm
Extrato/nanopartícula (AM3)	36 mm	21 mm	28 mm

Fonte: Autor (2023).

A atividade antimicrobiana das AgNPs foi evidenciada pelo aparecimento dos halos de inibição em placas de Petri com cultivo de 36 mm para *Staphylococcus aureus*, 21 mm para *Escherichia coli* e 28 mm para *Candida albicans*. Foram testados volumes da solução contendo as AgNPs. O tratamento controle consistiu em água destilada ilustra o resultado do teste de inibição antimicrobiana das nanopartículas sintetizadas pelo método de síntese verde a partir da alíquota que apresentou.

As bactérias podem ser classificadas como gram-positivas qualificadas por apresentar coloração azul após aplicação de substâncias químicas e submissão á solventes específicos, tal processo denominado coloração de gram. As bactérias classificadas como gram-negativa adquire coloração vermelha. Esse processo depende da constituição química da parede celular da bactéria. Esta coloração permite distinguir a variedade e tipos de bactérias e principalmente sua parede celular em termos de complexidade e ou quantidade de peptideoglicanos principal componente da parede celular bacteriana. Essa diferenciação causa tipos diferentes de infecções e tipos diferentes de antibióticos são eficazes contra elas (Rani *et al.*, 2020).

As nanopartículas de prata apontaram boa atividade antimicrobiana contra duas espécies de bactérias testadas e uma espécie fúngica. A maior atividade bactericida se deu frente a bactéria gram-positiva na cepa *Staphylococcus aureus*. As bactérias gram-positivas se mostram bastante resistentes aos antibióticos. A bactéria *Staphylococcus aureus* é resistente à meticilina um tipo de penicilina, além disso é resistente à maioria dos antibióticos relacionados à penicilina. As cepas de bactérias gram-positivas geralmente estão envolvidas em infecções adquiridas em

estabelecimentos de saúde e podem causar infecções adquiridas na comunidade (Gomes *et al*, 2020).

A menor ação antimicrobiana das AgNPs contra a *Escherichia coli* em relação à *Staphylococcus aureus* pode ser atribuída a sua estrutura química da parede celular formada por diferentes camadas de polipeptideoglicanos, enquanto as bactérias gram-negativas apresentam uma membrana extrema denominada de periplasma contendo camadas de lipopolissacarídeos, os quais lhes dá maior proteção contra ações externas (Oliveira; Paula, 2021).

É importante destacar que a disposição estrutural da parede celular da bactéria tem influência sobre o mecanismo bioquímico responsável pela interação e adsorção das nanopartículas de prata em suas células, isto é, o mecanismo de ação é influenciado pela composição da membrana celular dos microrganismos (De Brito; Viana; Viana, 2022). Este fato sugere que a maior concentração de nanopartículas de prata reverte os mecanismos de defesa bacteriana, ao passo que oferece melhor resposta antimicrobiana.

A concentração mínima inibitória (CMI) é definida como a menor concentração em $\mu\text{g/mL}^{-1}$ do agente antimicrobiano, no qual foi observada a inibição de crescimento do microrganismo em condições padronizadas (Magarelli; Pupe; Silva, 2021). Os ensaios foram realizados em triplicata. As nanopartículas de prata apresentaram atividade antimicrobiana pelo método de difusão em poço contra *Candida albicans*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, com halos de inibição variando de 28 a 36 mm conforme a tabela 4.

A atividade antimicrobiana das nanopartículas provavelmente ocorre através do mecanismo de ancoragem na parede celular bacteriana em seguida tem-se a interação com a membrana celular do microrganismo causando lise celular ou produção de radicais livres e liberação de íons de prata que interagem com o grupo tiol de enzimas vitais inativando-as (Mittal; Chisti; Banerjee, 2022).

As ações antibacterianas das AgNPs sugerem também estarem associadas as substâncias bioativas, como os flavonoides e polifenóis presentes no extrato vegetal contendo compostos bioativos capazes de inibir vários microrganismos. Considerando os elementos que compõem o extrato de *Bauhinia forficata*, citrato de sódio e nanopartículas de prata, permite levantar a hipótese de que a atividade antimicrobiana observada na pesquisa seja potencializada pelo sinergismo das substâncias bioativas que compõem a solução (Freire *et al.*, 2018).

Dessa forma, além do efeito antimicrobiano do extrato de *Bauhinia forficata* frente a bactéria *Staphylococcus aureus* subte-se a hipótese que o seu uso conjuntamente com as nanopartículas de prata possa apresentar também efeito modulador positivo sobre elas, melhorando sua performance na atividade antimicrobiana. Bezerra *et al.*, (2019) por sua vez relacionaram a atividade bactericida significativa contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*. No estudo de Pereira *et al.* 2014, foi demonstrado também efeito modulador significativo de antibióticos no combate à *Escherichia coli*. Devendo realizar novos testes com novas concentrações ampliando a possibilidade de ação das AgNPs.

Conforme estudos Balasooriya *et al.* (2017) encontrou significativa atividade antimicrobiana contra uma ampla gama de linhagens bacterianas e fúngicas, sendo muito eficiente para inibição de *Staphylococcus aureus*. Já Hosny *et al.* (2017) observou que as AgNPs sintetizadas foram mais ativas contra as bactérias gram-negativas testadas do que as gram-positivas em relação aos fungos. A espécie de fungo *Candida albicans* causa infecções invasivas associadas geralmente a internação de longa duração e apresenta alta taxa de mortalidade, além do aumento no custo hospitalar. A aplicação das AgNPs sobre o fungo *Candida albicans* também apresentou inibição positiva da levedura (Bezerra *et al.*, 2019).

Esses resultados estão em concordância com registros na literatura. No estudo de Mittal, Chisti e Banerjee (2013), foi demonstrado que as AgNPs sintetizadas por (*Aspergillus flavus* Link 1809) inibiram o crescimento contra *Candida albicans*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Além disso, a investigação de Rani *et al.*, (2017) também evidenciou que as AgNPs obtidas por rota de síntese verde apresentaram efeito antimicrobiano e inibiram a ação desses microrganismos (Venu *et al.*, 2011; Oskuee *et al.*, 2016).

A síntese verde de AgNPs a partir de extratos naturais realizada via rota sintética verde é uma técnica que possui muitas vantagens sobre outros métodos de síntese, além de serem considerados potenciais agentes antifúngicos e antibactericidas biocompatíveis, baixa toxicidade e econômicos utilizando nanopartículas de prata sintetizadas a partir de materiais naturais e por apresentarem excelentes ações antimicrobianas (Balasooriya *et al.*, 2017; Hosny *et al.*, 2017).

5. CONCLUSÃO

Em vista dos resultados apresentados compreende-se que as nanopartículas de prata preparadas pelo método de síntese verde apresentaram características significativas. O material sintetizado exibe coloração amarelada, pico de absorção máxima de 438 nm, pico de difração máximo em 38° além disso, diâmetro hidrodinâmico de 21,2 nm e potencial zeta 32,1 mV dados característicos de nanopartículas de prata eletronicamente estáveis. O material apresentou baixa toxicidade e ação antimicrobiana efetiva frente aos microrganismos resistentes testados: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans* com halos de inibição que representam o efeito do material aos patógenos.

Portanto, as nanopartículas de prata podem ser utilizadas como materiais inovadores e acessíveis no tratamento alternativo ou integrante de infecções não tratáveis pelos antibióticos convencionais, a fim de combater a resistência antimicrobiana. As nanopartículas de prata estabilizadas em extrato aquoso vegetal conferem um melhoramento ao nanomaterial em termos de baixa toxicidade, menos danos ao meio ambiente e funções terapêuticas da planta. É pertinente a comunidade científica desenvolver mais pesquisas sobre a função desse material, bem como sua utilização na composição de biomateriais.

REFERÊNCIAS

ALEXANDRINO, Ú. S. **Correlação entre estado de dispersão, propriedades eletrocinéticas e flotabilidade de hematita**. 2013. 126 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2013.

ALI, M. *et al.* Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Artemisia absinthium* aqueous extract — A comprehensive study. **Materials Science And Engineering: C**, [S.L.], v. 58, p. 359-365, jan. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2015.08.045>.

ÁLVAREZ, A. *et al.* Microwave pretreatment to improve extraction efficiency and polyphenol extract richness from grape pomace. Effect on antioxidant bioactivity. **Food And Bioproducts Processing**, [S.L.], v. 106, p. 162-170, nov. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2017.09.007>.

ANDRADE, L. N.; DARINI, A. L. C. Resistencia bacteriana –Parte 1: Mecanismos de Resistencia aos antibioticos - Resistencia bacteriana – Parte 2: Conceitos e Definicoes. **Journal of Infection Control**, v. 7, n. 3, 2018.

ANOUAR, E. H. *et al.* UV/Visible spectra of natural polyphenols: a time-dependent density functional theory study. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 131, n. 1, p. 79-89, mar. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.08.034>.

BALASOORIYA, E. R. *et al.* Honey Mediated Green Synthesis of Nanoparticles: new era of safe nanotechnology. **Journal Of Nanomaterials**, [S.L.], v. 2017, p. 1-10, 2017. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2017/5919836>.

BEZERRA, J. W. A. *et al.* Chemical composition, antimicrobial, modulator and antioxidant activity of essential oil of *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants. **Comparative Immunology, Microbiology And Infectious Diseases**, [S.L.], v. 65, n. 5, p. 58-64, ago. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2019.04.010>.

BRITO, S. C. *et al.* Filmes poliméricos com nanopartículas de prata fornecem atividade antimicrobiana para embalagens alimentícias. In: Simpósio Nacional de Instrumentação Agropecuária, 4, 2019, São Carlos. **Anais [...]** São Paulo: Siagro, 2019. p. 680-684.

BRITO, V. P. *et al.* A fitoterapia como uma alternativa terapêutica complementar para pacientes com Diabetes Mellitus no Brasil: uma revisão sistemática. **Saúde e meio ambiente: revista interdisciplinar**. [S.L.] v.9, p.189-204, 2020.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies Arbóreas Brasileiras**: pata de vaca. 3. ed. São Paulo: Embrapa, 2003. 10 p.

CHAYAVANICH, K.; THIRAPHIBUNDET, P.; IMYIM, A. Biocompatible film sensors containing red radish extract for meat spoilage observation. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 226, p. 117-601, 2020.

CLSI-Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved standard. New Jersey: Clinical And Laboratory Standards Institute, v. 32, n. 11, jan. 2012.

CUSSOLIM, P. A. *et al.* Mecanismos de resistência do staphylococcus aureus a antibióticos mechanisms of resistance of staphylococcus aureus to antibiotics. **Mecanismos de resistência do Staphylococcus aureus a antibióticos**, v.6 n.12, 2021.

DA COSTA, A. L. P.; SILVA JUNIOR, A. C. S. Resistencia bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve literatura. **Estação Científica (UNIFAP)**, v. 7, n. 2, p.23-45, 2017.

DADA, A. O. *et al.* Synthesis of silver nanoparticles by Acalypha wilkesiana extract: phytochemical screening, characterization, influence of operational parameters and preliminary antibacterial test. **Heliyon**, v. 5, n. 10, p. 502-517, 2019.

DE BRITO, J. E.; VIANA, D. Dos S. F.; VIANA, V. G. F. V. Síntese verde e caracterização de nanopartículas de prata AgNp estabilizadas em extrato de jurema preta (Mimosa Tenuiflora). **Research Society and Development**, [S.L.], v.11, n. 6, p.1-8, 25 abr. 2022.

DE SOUZA, E. *et al.* Hypoglycemic effect and antioxidant potential of kaempferol-3,7-O-(alpha)-dirhamnoside from forficata leaves. **Journal of Natural Products**, v. 67, p.829-832, 2006.

DUARTE, J. M. **Uso indiscriminado de antibióticos por pacientes atendidos em uma unidade básica de saúde da família.** 2013. 22 f. Monografia (Especialização) - Curso de Atenção Básica em Saúde da Família, Universidade Federal de Minas Gerais, Alagoas, 2013.

DURÁN, N. *et al.* Nanotoxicologia de nanopartículas de prata: toxicidade em animais e humanos. **Química Nova**, Campinas, v. 42, n. 2, p. 206-213, fev. 2018. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170318>.

FREIRE, N. B. *et al.* Atividade antimicrobiana e antibiofilme de nanopartículas de prata sobre isolados de Aeromonas spp. Obtidos de organismos aquáticos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 2 p.244-249, 2018.

GARCIA, D. G. *et al.* Síntese de nanopartículas de prata pela técnica de eletrodeposição para desenvolvimento de biossensores / synthesis of silver nanoparticles by electrodeposition technique for biosensor development. **Brazilian Journal Of Development**, [S.L.], v. 7, n. 3, p. 31130-31145, 2021.

GOMES, D. M. D. *et al.* Síntese verde de nanopartículas de prata intermediada por fungo anamórfico e eficácia antibacteriana e antifúngica. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi—Ciências Naturais*, v. 15, n. 2, p.433–443, 2020.

GUIÃO, M. **Pata de vaca**. 2021. Disponível em: <http://revistaecologico.com.br/revista/edicoes-anteriores/edicao-137/pata-de-vaca-1/>. Acesso em: 10 ago. 2013.

HUQ, Md. A. *et al.* Green Synthesis and Potential Antibacterial Applications of Bioactive Silver Nanoparticles: a review. **Polymers**, [S.L.], v. 14, n. 4, p. 742, 15 fev. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/polym14040742>.

HILTUNEN, T.; VIRTÄ, M.; LAINE, A.-L. Antibiotic resistance in the wild: an eco-evolutionary perspective. **Philosophical Transactions Of The Royal Society B: Biological Sciences**, [S.L.], v. 372, n. 1712, p. 20160039, 19 jan. 2017. The Royal Society. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2016.0039>.

HOSNY, A M s *et al.* Antimicrobial activity of silver nanoparticles synthesized using honey and gamma radiation against silver-resistant bacteria from wounds and burns. **Advances In Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology**, [S.L.], v. 8, n. 4, p. 045009, 29 set. 2017. IOP Publishing. <http://dx.doi.org/10.1088/2043-6254/aa8b44>.

HOULLOU, L. M. *et al.* Green synthesis of silver nanoparticles using leaf extract from *Tabebuia roseoalba* and *T. pentaphylla*. **Journal of Environmental Analysis and Progress**, [S.L.], v. 4, n. 3, p. 216–222, 18 set. 2019.

IRAVANI, S. *et al.* Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods. **Research In Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 9, n. 6, p. 385-406, dez. 2014.

JACOMASSI, E.; MOSCHETA, I. S.; MACHADO, S. R. Morfoanatomia e histoquímica de *Brosimum gaudichaudii* Trécul (Moraceae). **Acta Botanica Brasilica**, [S.L.], v. 21, n. 3, p. 575-597, 2017.

JENSEN, P. A.; ZHU, Z.; VAN OPIJNEN, T. Antibiotics Disrupt Coordination between Transcriptional and Phenotypic Stress Responses in Pathogenic Bacteria. **Cell Reports**, [S.L.], v. 20, n. 7, p. 1705-1716, ago. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2017.07.062>.

LEMOS, T. A. B. *et al.* Preparação, caracterização e aplicação antimicrobiana de nanopartículas de prata estabilizadas em extrato de girassol (*Helianthus Annus*). **Research, Society And Development**, [S.L.], v. 10, n. 6, p. 1-11, 30 maio 2021. Research, Society and Development. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i6.15533>.

LIMA, C. P. *et al.* Efeito alelopático e toxicidade frente à *Artemia salina* Leach dos extratos do fruto de *Euterpe edulis* Martius. **Acta Botanica Brasilica**, [S.L.], v. 25, n. 2, p. 331-336, jun. 2011. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-33062011000200009>.

LÓPEZ, P. *et al.* Vapor-phase activities of cinnamon, thyme, and oregano essential oils and key constituents against foodborne microorganisms. **Journal of agricultural and food chemistry**, [S.L.], v. 55, n. 11, p. 4348-4356, 2017.

LOURENÇO, M. V. **Estudo comparativo dos constituintes químicos de Brosimum gaudichaudii Trécul e do medicamento V**. 2001. 121 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Química, Unesp, Araraquara, 2001.

LUNARDI, C. e N. *et al.* Experimental methods in chemical engineering: Zeta potential. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, [S.L.], v. 99, n. 3, p. 627-639, 2021.

MACHADO, B. A. S. *et al.* Potencial nanoantimicrobiano das nanopartículas metálicas / Nanoantimicrobial potential of metallic nanoparticles. **Brazilian Journal Of Development**, São José dos Pinhais, v. 7, n. 6, p. 63038-63044, 25 jun. 2021. South Florida Publishing LLC. <http://dx.doi.org/10.34117/bjdv7n6-604>.

MAGARELLI, G.; PUPE, J. M.; SILVA, L. P. da. **Detecção de nanopartículas de prata (AgNPs) e determinação de íons prata (Ag⁺) por técnicas voltamétricas**. 108. ed. Brasília: Embrapa, 2021. 11 p.

MASOUMIAN, M.; ZANDI, M. Antimicrobial Activity of Some Medicinal Plant Extracts against Multidrug Resistant Bacteria. **Zahedan Journal Of Research In Medical Sciences**, [S.L.], v. 19, n. 11, p. 10-80, 30 nov. 2017. Briefland. <http://dx.doi.org/10.5812/zjrms.10080>.

MEIRA, R. R. Nanopartículas metálicas: antimicrobianos promissores. **Revista Multidisciplinar de Educação e Meio Ambiente**, [S. l.], v. 2, n. 1, p. 5, 2021.

MENDES, J. E. **Estudo in vitro da atividade antifúngica de nanopartículas de prata em fungos de armazenamento de soja (Glycine max)**. 2015. 157 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biotecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2015.

MEVA, F.E. *et al.* Silver and palladium nanoparticles produced using a plant extract as reducing agent, stabilized with an ionic liquid: sizing by X-ray powder diffraction and dynamic light scattering. **Journal of Materials Research and Technology**, [S.L.], v. 8, n. 2, p. 1991-2000, 2019.

MEYER, B.N. *et al.* Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Médica**, v. 45, n. 5, p.31-34, 1982.

MITTAL, A. K.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. **Biotechnology Advances**, [S.L.], v. 31, n. 2, p. 346-356, mar. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.01.003>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0734975013000050>. Acesso em: 19 ago. 2022.

MURARO, P. *et al.* Atividade antimicrobiana do nanocatalisador de óxido de ferro. **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**. Vacaria, p. 1-10. 28 ago. 2020.

NAIKOO, G. A. *et al.* Bioinspired and green synthesis of nanoparticles from plant extracts with antiviral and antimicrobial properties: a critical review. **Journal Of Saudi Chemical Society**, [S.L.], v. 25, n. 9, p. 101304, set. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jscs.2021.101304>.

NOGUEZ, C. Surface Plasmons on Metal Nanoparticles: The influence of shape and physical environment. **The Journal Of Physical Chemistry C**, [S.L.], v. 111, n. 10, p. 3806-3819, 9 fev. 2007. American Chemical Society (ACS). Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jp066539m>. Acesso em: 25 fev. 2023.

OLIVEIRA, C. Z. *et al.* Anticoagulant and antifibrinolytic properties of the aqueous extract from *Bauhinia forficata* against snake venoms. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 98, p. 213-216, 2005.

OLIVEIRA, J. W. A. de; PAULA, C. C. Bactérias gram-negativas multirresistentes: revisão sobre os desafios e demais discussões. **Caderno de Publicações Univag**, [S. l.], n. 11, 2021. DOI: 10.18312/cadernounivag.v0i11.1651. Disponível em: <https://www.periodicos.univag.com.br/index.php/caderno/article/view/1651>. Acesso em: 7 mar. 2023.

OLIVEIRA, L. J. D. G. *et al.* Rotas de síntese do biobiotico Linezolida e antibiótica entre sua estrutura química e bioatividade. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, [S.L.], v. Sup., n. 13, pag.1557–1566, 2018.

OPAS- Organização Pan-americana da Saúde (Brasil). **Trabalhando juntos para combater a resistência aos antimicrobianos**. 2022. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/juntos-combater-resistencia-antimicrobianos>. Acesso em 09 ago. 2023.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (Washington). **Resistência antimicrobiana**. 2022. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/topicos/resistencia-antimicrobiana>. Acesso em: 20 jun. 2023.

OSUNTOKUN, J.; ONWUDIWE, D. C.; EBENSO, E. E. Green synthesis of ZnO nanoparticles using aqueous *Brassica oleracea* L. var. *italica* and the photocatalytic activity. **Green Chemistry Letters and Reviews**, v. 12, n. 4, p. 444–457, 2019.

PANG, Z. *et al.* Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. **Biotechnology Advances**, [S.L.], v. 37, n. 1, p. 177-192, jan. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.013>.

PEREIRA, A. C. S. *et al.* Biologic activity of the hydroalcoholic extract of *Bauhinia forficata* Link on *Herpetomonas Samuel* pessoai. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, [S.L.], v. 16, p. 585-592, 2014.

RANI, P. *et al.* Highly stable AgNPs prepared via a novel green approach for catalytic and photocatalytic removal of biological and non-biological pollutants. **Environment International**, [S.L.], v. 143, p. 105-135, out. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2020.105924>.

RIAZ, M. *et al.* Exceptional antibacterial and cytotoxic potency of monodisperse greener AgNPs prepared under optimized pH and temperature. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 11, n. 1, 2021.

RIBEIRO, L. H. L. Análise dos programas de plantas medicinais e fitoterápicos no Sistema Único de Saúde (SUS) sob a perspectiva territorial. **Ciência & Saúde Coletiva**, [S.L.], v. 24, n. 5, p. 1733-1742, maio 2019. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1413-81232018245.15842017>.

ROCA, I. *et al.* The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention. **New Microbes And New Infections**, [S.L.], v. 6, p. 22-29, jul. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nmni.2015.02.007>.

RODRIGUES, A. M. T. **Estudo da correlação entre curvas de fluxo em defloculação e condutividade elétrica do meio dispersante**. 2018. 92 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2018.

SALAZAR-BRYAM, A. M. *et al.* Silver nanoparticles stabilized by ramnolipids: effect of ph. **Colloids And Surfaces B: Biointerfaces**, [S.L.], v. 205, p. 111883, set. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.111883>.

SALLEH, A. *et al.* The Potential of Silver Nanoparticles for Antiviral and Antibacterial Applications: a mechanism of action. **Nanomaterials**, [S.L.], v. 10, n. 8, p. 1566, 9 ago. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/nano10081566>.

SANDHU, S. S.; SHUKLA, H.; SHUKLA, S. Biosynthesis of silver nanoparticles by endophytic fungi: Its mechanism, characterization techniques and antimicrobial potential. **African Journal of Biotechnology**, [S.L.], v. 16, n. 14, p. 683-698, 2017.

SANTOS, J. *et al.* Ressonância de plasmon de superfície localizado e aplicação em biossensores e células solares. **Química Nova**, [S.L.], v. 39, n. 9, p. 1098–1111, 2016.

SENA, A. E. C. *et al.* Avaliação da síntese de nanopartículas de prata sob diferentes concentrações do extrato de Copaíba multijuga (Heine). **Scientia Naturalis**, Rio Branco, v. 60, n. 1, p. 10-16, 12 fev. 2019.

SILVA, L. P. **Nanopartículas verdes**: plantas do cerrado são usadas na produção de nanossistemas para controle de patógenos e pragas da agricultura, entre outras aplicações. 2014. Disponível em: <https://revistapesquisa.fapesp.br/nanopartículas-verdes/>. Acesso em: 09 jun. 2023.

SOLOMON, S. *et al.* Synthesis and study of silver nanoparticles. **Journal of Chemical Education**, [S.L.], v. 84, n. 2, p. 322, 2017.

SONG, J. Y.; KWON, E. Y.; KIM, B. S. Biological synthesis of platinum nanoparticles using *Diopyros kaki* leaf extract. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, [S.L.], v. 33, n. 1, p. 159-64, 2010.

SOUSA, J. N. *et al.* Modulation of the resistance to norfloxacin in *Staphylococcus aureus* by *Bauhinia forficata* link. **Natural Product Research**, [S.L.], v. 35, n. 4, p. 681-685, 2 abr. 2019. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2019.1590714>.

SOUZA, M. M. F. *et al.* Avaliação in vitro das atividades antimicrobianas de extratos etanólicos de *Arnica montana* L., *Bauhinia forficata* e *Plantago major* sobre *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sanguis*. **Journal of Applied Pharmaceutical Sciences**, [S.L.], v. 21, p.18-28, 2014.

SUBEDI, D.; VIJAY, A. K.; WILLCOX, Mark. Overview of mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: an ocular perspective. **Clinical And Experimental Optometry**, [S.L.], v. 101, n. 2, p. 162-171, 1 mar. 2018. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1111/cxo.12621>.

SUKRI, Siti Nur Amalina Mohamad *et al.* Cytotoxicity and antibacterial activities of plant-mediated synthesized zinc oxide (ZnO) nanoparticles using *Punica granatum* (pomegranate) fruit peels extract. **Journal Of Molecular Structure**, [S.L.], v. 1189, p. 57-65, ago. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molstruc.2019.04.026>.

TEIXEIRA, P. J. P. *et al.* Beyond pathogens: microbiota interactions with the plant immune system. **Current Opinion In Microbiology**, [S.L.], v. 49, p. 7-17, jun. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2019.08.003>.

TOLEDO, A. G. *et al.* Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil of leaves of *Eugenia involucrata* DC. **Bioscience Journal**, [S.L.], v. 36, n. 2, p. 568–577, 2020.

VASCONCELOS, F. *et al.* Insulin-like effects of *Bauhinia forficata* aqueous extract upon *Tityus serrulatus* scorpion envenoming. **Journal Of Ethnopharmacology**, [S.L.], v. 95, n. 2-3, p. 385-392, dez. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2004.08.006>.

VIANA, A. V. *et al.* Potencial antimicrobiano das nanopartículas de prata estabilizadas em curcumina e extrato de folhas de cajueiro (*Anacardium occidentale* L.). **Research, Society And Development**, [S.L.], v. 10, n. 9, p. 1-10, 31 jul. 2021. Research, Society and Development. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i9.18364>.

XU, L. *et al.* Silver nanoparticles: synthesis, medical applications and biosafety. **Theranostics**, [S.L.], v. 10, n. 20, p. 8996-9031, nov. 2020. Ivyspring International Publisher. <http://dx.doi.org/10.7150/thno.45413>.

WEIBEL, D. E. Polymer Assisted Surface Modification by Photons. **Nova Science Publishers**, Nova York, v. 1, n. 1, p.119, 2021.

YUSUF, S. N. A. M. et al. Optimization of biogenic synthesis of silver nanoparticles from flavonoid-rich *Clinacanthus nutans* leaf and stem aqueous extracts. **Royal Society Open Science**, [S.L.], v. 7, n. 7, p. 20-65, jul. 2020. The Royal Society. <http://dx.doi.org/10.1098/rsos.200065>.

ZHANG, K. et al. Delayed application of silver nanoparticles reveals the role of early inflammation in burn wound healing. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 30-55, 14 abr. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-020-63464-z>.