

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC (UFABC)**

Dissertação de Mestrado

Diógenes Gaudencio da Silva Fernandes

Orientador: Prof. Dr. Wanius José Garcia da Silva

**Caracterização e estudos da atividade antimicrobiana de nanopartículas de cloreto de prata sintetizadas utilizando extrato vegetal de *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville (barbatimão)**

Santo André – SP

2021

Curso de pós-graduação em Nanociências e Materiais Avançados

## **Dissertação de Mestrado**

Diógenes Gaudencio da Silva Fernandes

Orientador: Prof. Dr. Wanius José Garcia da Silva

Caracterização e estudos da atividade antimicrobiana de nanopartículas de cloreto de prata sintetizadas utilizando extrato vegetal de *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville (barbatimão)

Trabalho apresentado como requisito para obtenção do título de Mestre em Nanociências e Materiais Avançados, sob orientação do Professor Doutor Wanius José Garcia da Silva.

Santo André – SP

2021

## Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do ABC

Elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFABC  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Gaudencio da Silva Fernandes, Diógenes

Caracterização e estudos da atividade antimicrobiana de nanopartículas de cloreto de prata sintetizadas utilizando extrato vegetal de *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville (barbatimão) / Diógenes Gaudencio da Silva Fernandes. — 2021.

79 fls. : il.

Orientador: Wanius José Garcia da Silva

Dissertação (Mestrado) — Universidade Federal do ABC, Programa de Pós-Graduação em Nanociências e Materiais Avançados, Santo André, 2021.

1. Nanociências. 2. *Stryphnodendron adstringens*. 3. Nanopartículas. 4. Cloreto de prata. 5. Atividade antimicrobiana. I. José Garcia da Silva, Wanius. II. Programa de Pós-Graduação em Nanociências e Materiais Avançados, 2021. III. Título.

**Este exemplar foi revisado e alterado em relação à versão original, de acordo com as observações levantadas pela banca examinadora no dia da defesa, sob responsabilidade única do(a) autor(a) e com a anuência do(a) (co)orientador(a).**

**Santo André**      ☐, 14 de      junho      de 2021 .

Diógenes gaudencio da Silva Fernandes *Diógenes Gaudencio da Silva Fernandes*  
**Nome completo e Assinatura do(a) autor(a)**

Wanius José Garcia da Silva *Wanius José Garcia da Silva*  
**Nome completo e Assinatura do(a) (co)orientador(a)**



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**

**Fundação Universidade Federal do ABC**

Avenida dos Estados, 5001 – Bairro Santa Terezinha – Santo André – SP  
CEP 09210-580 · Fone: (11) 4996-0017

**FOLHA DE ASSINATURAS**

Assinaturas dos membros da Banca Examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato, DIÓGENES GAUDENCIO DA SILVA FERNANDES realizada em 08 de Junho de 2021:

*Wanús José Garcia da Silva*

Prof.(a) JULIANA MARCHI  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC

*Wanús José Garcia da Silva*

Prof.(a) LIVIA SENO FERREIRA CAMARGO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC

Prof.(a) JEAN JACQUES BONVENT  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC

*Wanús José Garcia da Silva*

Prof.(a) WANUS JOSE GARCIA DA SILVA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC - Presidente

\* Por ausência do membro titular, foi substituído pelo membro suplente descrito acima: nome completo, instituição e assinatura



Universidade Federal do ABC

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

## **Agradecimentos**

À UFABC, central multiusuário (CEM), que foram fundamentais para que fosse possível realizar as mais diversas análises na própria instituição poupando tempo e permitindo elevado padrão de qualidade.

Ao professor doutor Wanius José Garcia da Silva pela orientação, paciência, comprometimento, ensinamentos e por ter acreditado no meu potencial.

À professora Ana Fortuna da Unesp/Campus Botucatu que contribuiu com a identificação da espécie vegetal utilizada no trabalho.

Ao professor Bruno Lemos Batista e seu orientando André Luiz Marques de Souza por suas fundamentais contribuições às análises tão importantes para este presente trabalho.

Aos colegas de laboratório que tanto me apoiaram, Dnane Vieira Almeida, Juscemácia N. Araujo, Viviane Brito Andrade, Geomar Feitosa da Cruz, Gustavo Pinheiro.

Ao Felipe Nogueira Ambrosio, Letícia Neves de Lucena, professora Fernanda Dias da Silva do núcleo de pesquisas biológicas do CCNH de São Bernardo-SP.

Aos meus Pais que são minha sustentação, e quem sempre me apoiou nos momentos mais difíceis.

Ao vizinho de laboratório Wallace Rosado Rolim, que contribuiu muito com sua amizade e conversas que ajudaram a me portar de forma eficiente sobre esse trabalho.

Aos amigos que me proporcionaram um porto seguro para encontrar forças para perserverar em meu objetivo.

## RESUMO

*Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville é uma planta medicinal que possui importantes propriedades farmacológicas como, por exemplo, atividades anti-inflamatórias, cicatrizante, antioxidantes, antivirais, antiprotzoárias e antimicrobianas. Nessa dissertação de Mestrado, relatou-se a fotossíntese e caracterização de nanopartículas de cloreto de prata usando extrato vegetal de *S. adstringens* (denominado aqui NPsAgClSa). NPsAgClSa foram fotossintetizadas, utilizando um processo simples, rápido e verde, com morfologia predominantemente esférica, com pequena polidispersividade (diâmetro médio de 22 nm), elevada cristalinidade, contendo pequena quantidade de prata metálica, e recobertas por uma camada de material orgânico responsável pela estabilidade coloidal. As NPsAgClSa não demonstraram citotoxicidade contra células VERO de mamíferos permitindo viabilidade em concentrações  $< 20,48 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . As NPsAgClSa apresentaram notável atividade antifúngica contra o fungo *Cryptococcus neoformans* ( $\text{MIC}_{80} \geq 0,32 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Também observou-se que a atividade antibacteriana foi notável contra as bactérias Gram-negativas *Pseudomonas aeruginosa* ( $\text{MIC}_{80} \geq 2,56 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e *Serratia marcescens* ( $\text{MIC}_{80} \geq 20,48 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Em contraste, as bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* foram menos suscetíveis as NPsAgClSa ambas com  $\text{MIC}_{80} \geq 40,93 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . As NPsAgClSa produzidas representam um novo nanomaterial híbrido orgânico-inorgânico de fácil síntese e com potencial para aplicações biomédicas futuras.

## PALAVRAS-CHAVE

Nanopartículas; *Stryphnodendron adstringens*; Química verde; atividade antimicrobiana, Ag/AgCl, Barbatimão, *Cryptococcus neoformans*



## ABSTRACT

*Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville is a medicinal plant described as having important pharmacological properties such as, for example, anti-inflammatory, healing, antioxidant, antiviral, antiprotozoal and antimicrobial activities. In this study, we report photosynthesis and characterization of silver chloride nanoparticles using *S. adstringens* plant extract (referred to here as SaAgCINPs). The photosynthesized SaAgCINPs, using a simple, fast, and green process, were approximately spherical with a small polydispersity (average diameter of 22 nm), with crystalline nature containing a small amount of metallic silver and covered by a layer of organic material responsible for colloidal stability. SaAgCINPs were not cytotoxic against mammalian VERO cells allowing total viability at concentrations  $< 20.48 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . However, SaAgCINPs showed remarkable antifungal activity against the fungus *Cryptococcus neoformans* ( $\text{MIC}_{80} \geq 0.32 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). We also observed remarkable antibacterial activity against Gram-negative bacteria *Pseudomonas aeruginosa* ( $\text{MIC}_{80} \geq 2.56 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) and *Serratia marcescens* ( $\text{MIC}_{80} \geq 20.48 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). In contrast, Gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* were less susceptible to SaAgCINPs both with  $\text{MIC}_{80} \geq 40.93 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . SaAgCINPs represents a new hybrid organic-inorganic nanomaterial with potential for biomedical applications.

## KEYWORDS

Nanoparticles; *Stryphnodendron adstringens*; Green chemistry; antimicrobial activity, Ag/AgCl, Barbatimão, *Cryptococcus neoformans*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Taça de Licurgo que data da época Romana, onde aparenta verde quando a luz é refletida em sua superfície e vermelha quando a luz é transmitida do interior do recipiente..	18
Figura 2: Diferentes estágios de agregação das nanopartículas de prata, com aumento de agregação da esquerda para a direita ( $a > b > c > d$ ).	22
Figura 3: Oxidação do citrato de sódio em meio aquoso com liberação de hidrônio e gás carbônico, reação exotérmica.	23
Figura 4: Representação esquemática das etapas inerentes ao processo de síntese de nanopartículas de prata por co-redução usando borohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ) e Citrato trissódico ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ )	24
Figura 5: Esquema representativo das etapas que controlam a formação das nanopartículas de prata	25
Figura 6: Representação dos mecanismos de estabilização que atuam comumente na estabilização de nanopartículas de prata.	27
Figura 7: Esquema representativo da dupla camada eletrônica (EDL) a partir dos modelos de Helmholtz (a) e Stern (b)	28
Figura 8: Espectro de absorção UV-Vis das nanopartículas coloidais de prata sintetizada usando glicose em diferentes períodos de reação	32
Figura 9: Reação de redução química de $\text{AgNO}_3$ por catequina	33
Figura 10: Imagem da estrutura molecular da Isoquercetina (glicosídeo monomérico) (a); glicosídeo dimérico (b).	35
Figura 11: Fórmula molecular de um Senosídeo-(Glicosídeo de <i>Senna</i> ), presente na <i>Cassia angustifolia</i> (Gênero <i>Senna</i> )	35
Figura 12: Ocorrência de espécies do gênero <i>Stryphnodendron</i> em território brasileiro, onde: (1.) <i>S. occhionianum</i> ; (2.) <i>S. paniculatum</i> ; (3.) <i>S. polystachyum</i> ; (4.) <i>S. racemiferum</i> ; (5.) <i>S. humile</i> ; (6.) <i>S. rotundifolium</i> ; (7.) <i>S. piptadenioides</i> ; (8.) <i>S. consimile</i> ; (9.) <i>S. obovatum</i> ; (10.) <i>S. microstachyum</i> ; (11.) <i>S. levelii</i> ; (12.) <i>S. adstringens</i> ; (13.) <i>S. fissuratum</i> ; (14.) <i>S. foreroi</i> ; (15.) <i>S. goyazense</i> ; (16.) <i>S. polyphyllum</i> var. <i>polyphyllum</i> ; (17.) <i>S. polyphyllum</i> var. <i>villosum</i> ; (18.) <i>S. coriaceum</i> ; (19.) <i>S. rizzinianum</i> ; (20.) <i>S. pulcherrimum</i> ; (21.) <i>S. guianense</i> subsp. <i>guianense</i>	

*var. guianense*; (22.) *S. guianense subsp. guianense varo roseiflorum*; (23.) *S. guianense subsp. glandulosum*; (24.) *S. duckeatum*; (25.) *S. confertum*; (26.) *S. plastyspicum*; (27.) *S. gracile*; (28.) *S. cristalinae*; (29.) *S. heringeri*; (30.) *S. porc tum*; (31.) *S. barbatulum*; (32.) *S. sallesianum*. ..... 37

Figura 13: . Árvore de barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*) (A). Tronco rugoso em detalhe (B). ..... 38

Figura 14: Exemplar da folha contendo de 6-16 folíolos (A), folíolo dispostos em pares contendo pares de 3 a 5 pinas (B), vagem e sementes (C) do barbatimão. .... 39

Figura 15: Galocatequina (A), Epigalocatequina (B) e Galato-3-epigalocatequina (C). ..... 45

Figura 16: Estrutura molecular de cada prodelphinidina (taninos condensados) já encontrada no extrato cru da casca do caule de *Stryphnodendron adstringens* ..... 47

Figura 17: (A) esquema preparo das soluções estoques das NPsAgClSa e colônia microbiana (B) Subdivisão de microtitulação em placa de múltiplos poços, sendo [C<sup>-</sup>] controle negativo, [C<sup>+</sup>] controle positivo, [NPs] NPsAgClSa, [E.P.] extrato puro. .... 54

Figura 18: (A) preparo do extrato vegetal de *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville. (B) uso de extrato de *S. adstringens* na síntese fotoquímica de nanopartículas de cloreto de prata. .... 56

Figura 19: Curva de espectroscopia de UV-vis do controle (A) (controle) sem a presença do extrato bruto de *S. adstringens* e (B) dispersão coloidal de prata após síntese verde absorvância em 414 nm de banda de ressonância plasmônica de superfície (RPS)..... 57

Figura 20: (A) Histograma mostrando a distribuição de tamanho das nanopartículas, com um perfil monomodal e (B) Distribuição de potencial zeta (mV) mostrando um pico predominante de -37 mV e outra -22,5 mV, o valor médio do ( $\zeta$ ) é de aproximadamente -30 mV, com SD 0,265. .... 58

Figura 21: Espectros de FT-IR de extrato cru da casca do caule de *S. adstringens* (Vermelho) e suspensão coloidal contendo as nanopartículas sintetizadas (Preto) ..... 60

Figura 22: Padrões de DRX das nanopartículas de cloreto de prata (azul), e nanopartículas de prata metálica (preto), usando uma fonte  $\text{CuK}\alpha^1$  (1,5418 Å). Índices de Miller para todas as reflexões de Bragg indicadas na figura..... 61

Figura 23: Imagens MET (A), histograma de 500 nanopartículas (B), imagens MEV (C) e espectro de análise EDX para análise composicional (D) das nanopartículas de cloreto de prata de <i>Stryphnodendron adstringens</i> obtidas (NPsAgClSa). .....	62-63
Figura 24: Viabilidade celular das células Vero após 24 horas de contato com nanopartículas de prata (NPsAgClSa) em diferentes concentrações. A linha a 70% representa o limite abaixo do qual o resultado é considerado uma resposta citotóxica das células. [*] representa as amostras estatisticamente equivalentes ao controle positivo (C <sup>+</sup> ) e [**] representa as equivalentes ao controle negativo (C <sup>-</sup> ), com P < 5%. A análise estatística foi realizada por ANOVA One-way, seguida pelo método de comparações múltiplas de Tuckey.....	64
Figura 25: Viabilidade celular de células Vero após 24 horas de contato com nanopartículas de prata em diferentes concentrações. A linha a 70% representa o limite abaixo do qual o resultado é considerado uma resposta citotóxica das células.....	64
Figura 26. Micrografias da morfologia celular após 24 horas em contato com NPsAgClSa em concentrações de 163,8 µg.mL <sup>-1</sup> (A); 81,9 µg.mL <sup>-1</sup> (B); 40,95 µg.mL <sup>-1</sup> (C); 20,47 µg.mL <sup>-1</sup> (D) e com nada além de meio de cultura (C <sup>-</sup> )(E), também com 50% DMSO (C <sup>+</sup> )(F). A escala visível na micrografia de C <sup>+</sup> representa 20 µm e se aplica a todas micrografias.....	65
Figura 27: Histograma das NPsAgClSa com inibição de crescimento dos microrganismo (A) <i>Cryptococcus neoformans</i> , (B) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , (C) <i>Serratia marcescens</i> , (D) <i>Staphylococcus aureus</i> , (E) <i>Staphylococcus epidermidis</i> .....	67

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Alguns procedimentos físicos, químicos e fotoquímicos para síntese de nanopartículas de prata. ....	26
Tabela 2: Síntese verde de nanopartículas de prata utilizando extrato vegetal. ....	30
Tabela 3: Apanhado do custo em dólar dos principais compostos que foram identificados em predominância no extrato cru da casca de <i>Stryphnodendron adstringens</i> .....	47
Tabela 4: Valores encontrados para alguns elementos em análise instrumental de nêutrons (INAA) do extrato de casca do <i>Stryphnodendron adstringens</i> . Valores correspondem a concentração em $\text{mgg}^{-1}$ e sua medida de incerteza por propagação de erro.....	48

## SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

NP .....	Nanopartículas
NPsAgClSa ....	Nanopartículas de Cloreto de prata a partir de <i>Stryphnodendron adstringens</i>
SaAgCINPs .....	<i>Stryphnodendron adstringens</i> Silver Chloride Nanoparticles
NPs-AgCl .....	Nanopartículas de cloreto de prata
NPsAg .....	Nanopartículas de prata
nm .....	nanômetros
Ag .....	Prata
Ag <sup>0</sup> .....	Prata metálica
Ag <sup>+</sup> .....	Prata catiônica
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> ou (CTS) –	citrato trissódico
NaBH <sub>4</sub> .....	Borohidreto de sódio
Tris HCl .....	Tris abreviação para tris(hidroximetil)aminometano, (HOCH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CNH <sub>2</sub> , e HCl ácido clorídrico, trata-se de um tampão muito utilizado atualmente
pH .....	Potencial hidrogeniônico
VERO. ....	Células <i>verda reno</i> , significa “rim verde”
MIC <sub>80</sub> .....	“Minimal Inhibition Concentration”, em livre tradução “Concentração Mínima Inibitória” que inibe o crescimento de até 80% dos microrganismos
µg.mL <sup>-1</sup> .....	Concentração em microgramas por mililitros
NaBH <sub>4</sub> .....	Borohidreto de sódio
Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> ....	Citrato de trissódico
EDL .....	Dupla camada eletrônica
UV-Vis .....	Espectroscopia no Ultravioleta e Visível
AgNO <sub>3</sub> .....	Nitrato de prata
RPS .....	Ressonância plasmônica de superfície
mV .....	milivolts
(ζ) .....	(Zeta) significa ensaio de potencial zeta
SD .....	Desvio padrão
FT-IR .....	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
DRX .....	Difração de Raios-X
CuKα <sup>1</sup> .....	Radiação alfa de fonte de cobre em camada k

MET .....Microscopia Eletrônica de Transmissão  
 MEV .....Microscopia Eletrônica de Varredura  
 EDX .....Espectroscopia de raios X por dispersão em energia  
 DLS .....Espalhamento dinâmico de luz  
 DMSO .....Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo  
 C<sup>+</sup> .....Controle positivo  
 C<sup>-</sup> .....Controle negativo  
 µg.mL<sup>-1</sup> .....microgramas por mililitros  
 R.Q. ....Redução química  
 ADD .....ácido dodecanóico  
 PVP .....polivinil pirrolidona  
 EES .....(2-etilexil) sulfosuccinato  
 Qc .....Quitosana carboximetilada  
 piH .....Plano interno de Helmholtz  
 peH .....Plano externo de Helmholtz  
 Ag(OH)<sub>x</sub> .....Intermediário hidróxido de prata  
 XTT .....Ensaio de viabilidade celular  
 CBM .....Concentração bactericida mínima  
 DL<sub>50</sub> .....Dose letal para 50% dos espécimes em estudo  
 mgg<sup>-1</sup> .....miligramas por grama  
 CCC .....Cromatografia líquida contracorrente  
 INAA .....Análise instrumental de neurônios  
 ICP-MS .....Espectrometria de massa de plasma indutivamente acoplado  
 LAT. ....Latitude  
 Long. ....Longitude  
 g/m<sup>2</sup> .....gramas por metro quadrado  
 mW/cm<sup>2</sup> .....miliwatt por centímetro quadrado (unidade de potência)  
 kV .....kilovolts  
 MEV-FEG ...Microscopia eletrônica de varredura - Feixe eletrônico por emissão de campo  
 FBS .....Soro fetal bovino

ISO .....International Organization for Standardization (Organização Internacional de Normalização)

MTT .....Ensaio de viabilidade celular (brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio)

P.....Probabilidade estatística de teste de hipóteses simples,  $P < 5\%$  indica elevado grau de confiança

UFC/mL ...Unidade Formadora de Colónias por mililitros

PDB .....Caldo de dextrose de batata

PdI .....Índice de polidispersividade

BBT .....Barbatimão (*S. adstringens*)

HPLC .....Cromatografia líquida de alta eficiência

JCPDS ....Joint Committee on Powder Diffraction Standards, em livre tradução Comitê conjunto em padrões de difração em pó

LPS .....Lipopolissacarídeos

HIV ..... "Human Immunodeficiency Virus" (vírus da imunodeficiência humana)



## SUMÁRIO

1. Introdução.....	18
2. Revisão Bibliográfica.....	20
2.1. Nanopartículas de cloreto de prata (NPs-AgCl).....	20
2.2. Síntese de nanopartículas de prata por redução química.....	21
2.3. Síntese verde de nanopartículas de prata utilizando extratos vegetais .....	29
2.4. <i>Stryphnodendron adstringens</i> .....	36
2.4.1. Ocorrência e características gerais .....	36
2.4.2. Botânica do <i>S. adstringens</i> .....	37
2.4.3. Exploração econômica. ....	39
2.4.4. Aplicação como fármaco.....	39
2.4.5. Atividade antimicrobiana e antisséptica.....	40
2.4.6. Efeito anti-inflamatório e antinociceptivo. ....	42
2.4.7. Efeito antiulcerativo e cicatrizante.....	43
2.4.8. Efeitos tóxicos .....	44
2.4.9. Composição Bioquímica .....	45
3. Objetivos.....	49
4. Metodologia.....	50
4.1. Extrato bruto de <i>Stryphnodendron adstringens</i> .....	50
4.2. Síntese de nanopartículas de prata assistidas por extrato cru da casca do caule de <i>S. adstringens</i> (Martius) Coville por fotossíntese. ....	50
4.3. Caracterização das nanopartículas obtidas por síntese biogênica com extrato cru de <i>S. adstringens</i> .....	51
4.4. Ensaio de citotoxicidade das nanopartículas de AgCl de <i>Stryphnodendron adstringens</i> (NPsAgClSa) .....	53
4.4.1. Cultura de células.....	53
4.4.2. Citotoxicidade <i>in vitro</i> .....	53
4.5. Ensaio de atividade antimicrobiana das nanopartículas de cloreto de prata (NPsAgClSa).....	54
5. Resultados e Discussão.....	55
5.1. Síntese verde de nanopartículas de prata assistida por <i>S. adstringens</i> .....	55
5.2. Espectroscopia UV-Vis das nanopartículas obtidas pela síntese verde ....	56

5.3.Espalhamento dinâmico de luz (DLS) e potencial zeta ( $\zeta$ ) .....	57
5.4.Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)..	58
5.5.Análise de difratometria de raios-X (DRX) das nanopartículas.....	60
5.6.Análise de imagens das nanopartículas microscopia eletrônica de transmissão, microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de raios- X por energia dispersiva (MET, MEV e EDX).....	61
5.3 Citotoxicidade.....	63
5.4 Atividade antimicrobiana (antifúngica e antibacteriana).....	66
6. Conclusão .....	69
7. Bibliografia.....	70

## 1. Introdução

Materiais em escala nanométrica são utilizados pela humanidade desde a pré-história, como por exemplo, o uso de diferentes tipos de pigmentos em pinturas e materiais cerâmicos, a exemplo da taça de Licurgo (Figura 1) que foi um dos primeiros artefatos de que se tem notícias que apresentam duas cores que se alternam de acordo com o clima e a incidência de luz sobre o mesmo, esse efeito dicróico deve-se a diferença entre a proporção de nanopartículas de ouro e prata dispersa no pigmento coloidal do material vítreo [1]. Porém, apenas com avanços científicos e tecnológicos ocorridos em meados do século XX, técnicas ópticas de análises como microscopia eletrônica de varredura (MEV) (1928) [2], a técnica de difração de cristais por difratometria de raios-X (1912) [3] e técnicas espectroscópicas como a espectroscopia no UV-Vis, responsáveis por permitir análises mais acuradas e conclusivas sobre os materiais em escalas nanométricas.

Desde que o ser humano foi capaz de identificar materiais em escalas nanométricas (1-100 nm) de tamanho os estudos acerca dos métodos variados de fabricação, bem como de tipos de materiais obtidos têm tido maior destaque na comunidade científica, esse fato se torna bastante relevante pois, em engenharia dos materiais sempre se buscam o desenvolvimento de materiais que desempenhem diferentes funções e com diferentes propriedades. Em se tratando de tamanhos de partículas, nanomateriais de diferentes substâncias apresentam diferentes formas, propriedades mecânicas, ópticas, físicas e químicas em relação ao seu correlato de tamanhos maiores, ou seja materiais em escala “bulk” [4,5].



**Figura 1.** Taça de Licurgo que data da época Romana, onde aparenta verde quando a luz é refletida em sua superfície e vermelha quando a luz é transmitida do interior do recipiente. Fonte: <https://coeurdelhistoire.tumblr.com/post/83493488573/peashooter85-ancient-roman-nanotechnology>

No campo dos nanomateriais destacam-se principalmente as nanopartículas sintetizadas a partir de metais de transição como prata (Ag), ouro (Au), esse fato pode ser explicado devido ao comportamento peculiar desses materiais em face ao processo de síntese, há materiais em escala nanométricas e em nanocompósitos que resultam em semicondutores, que podem atuar na catalise de reações de degradação, no campo biomédico atuando como um poderoso agente bactericida como é o caso das nanopartículas de Ag. Essas nanopartículas de Ag apresentam baixa citotoxicidade contra células de mamíferos e eficiente efeito antimicrobiano sendo capaz de atuar matando inúmeras doenças causadas por microrganismos [6].

A síntese de nanopartículas em geral têm duas origens metodológicas principais, os métodos de síntese baseados no modelo “top-down” onde as nanopartículas são obtidas por decomposição de materiais maiores até o nível nanométrico, por processos químicos como degradação por reagentes ácidos ou outros solventes, físicos como moínhos de bolas, cisalhamento por placas, sucessivas deformações plásticas, litografia e fotolitografia [7,8].

A segunda o método "bottom up", em que o material precursor parte do nível atômico até atingir o material nanoestruturado, nesse processo as forças atômicas e elétricas atuam modelando o nanocompósito, nesse ponto exemplos comuns de síntese “bottom-up” são a formação de "quantum-dot", a formação de nanopartículas a partir de dispersões coloidais, utilização de agentes de origem orgânica para ajudar o processo de síntese, vapor químico [7,8].

As rotas sintéticas de nanopartículas pelos métodos físicos e químicos convencionais apresentam uma série de inconvenientes ambientais e econômicos que podem tornar algumas inviáveis, como, técnicas trabalhosas, muitos passos que podem comprometer a reprodutibilidade do processo, custo da matéria prima, riscos à saúde decorrentes do uso de solventes orgânicos tóxicos [9].

Desse modo, métodos biogênicos de síntese de NPsAg estão cada vez mais em evidência, considerando que são em geral de baixo custo, envolvem técnicas mais simples e principalmente utilizam matéria prima de fonte renovável como extratos vegetais, proteínas, microrganismos de origem fungica ou bacteriana. Nesse contexto, os métodos químicos de síntese de NPsAg envolvendo redução de íons prata por ação química, eletroquímica, radiação e métodos fotoquímicos, os quais são implementados aos processos de biossíntese aumentando sua eficiência e qualidade dos materiais nanométricos obtidos [9].

Entre as biológicas de síntese de nanopartículas que mais se destacam estão, o uso da bactéria *Pseudomonas stutzeri* - AG259 no processo sintético, *Pediococcus pentosaceus* fungo utilizado para síntese de NPsAg por bioadsorção (processo em que alguns microrganismos absorvem ou adsorvem determinados elementos metálicos, geralmente empregado na remoção de metais pesados) e redução extracelular [7], extratos de partes de algumas plantas também desempenham fator importante na síntese de NPsAg atualmente como a Aloe-vera (conhecida comumente por “Babosa”) apresenta eficiente síntese de nanopartículas de Ag e Au [10].

Neste contexto, atualmente tem-se empregado o uso de extratos vegetais das mais variadas espécies de plantas na síntese verde de nanopartículas metálicas, das mais variadas origens e partes dos vegetais como extratos vegetais de folhas, sementes, casca e até tubérculos, sendo dessa forma uma rota sintética amigável ao meio ambiente, de baixo custo e de fonte renovável [11,12].

O presente trabalho de dissertação de Mestrado descreve a síntese verde de nanopartículas de cloreto de prata (NPsAgCl) monodispersas através de redução fotoquímica de solução de nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) em tampão Tris-HCl pH 8,0, utilizando como agente redutor e estabilizante extrato vegetal da casca do caule da planta *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville, conhecida como "Barba-timão".

O método de síntese baseou-se em procedimentos de excitação fotoquímica para reduzir íons  $\text{Ag}^+$  a  $\text{Ag}^0$  em solução à medida que o extrato vegetal atua estabilizando os íons metálicos durante a formação dos nanocompositos. As nanopartículas obtidas foram então caracterizadas quanto a composição química e morfologia, para então atestar sua eficiência antimicrobiana contra o microrganismo *Cryptococcus neoformans* (fungo em forma de levedura que mede em torno de 4-8  $\mu\text{m}$  de diâmetro, revestido por uma cápsula de polissacarídeos, e as bactérias Gram-positiva *S. aureus*, *S. epidermidis* e Gram-negativas *P. aeruginosa*, *S. marcescens*, bem como análise de toxicidade das nanopartículas em relação à células de mamíferos saudáveis.

## 2. Revisão Bibliográfica

### 2.1 Nanopartículas de cloreto de prata (NPs-AgCl)

Nanopartículas de AgCl podem ser sintetizadas pelos métodos mais variados [13,14], radiação gama [15], micro emulsão[16], ablação a laser [17], redução fotoquímica [18], micro-

ondas [19], métodos biológicos [20], etc. Porém, sintetizar nanopartículas de prata por métodos físico-químicos apresenta alto custo, técnicas laboratoriais complexas e risco ambiental, por outro lado, a aplicação de métodos biológicos geralmente envolve bactérias ou fungos, que têm desvantagens como métodos complexos de cultivo de culturas bacterianas ou fungos e a difícil síntese devido ao desempenho tóxico de nanopartículas de prata ao microrganismo limitando o rendimento do processo [21].

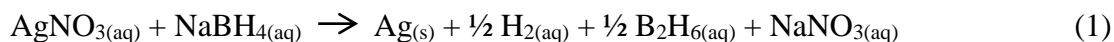
Contra tantas dificuldades para sintetizar nanopartículas de AgCl reprodutíveis e com propriedades físico-químicas variáveis, aplicar a metodologia de síntese verde [21] se torna um grande desafio. Muitos estudos relatam boa eficiência na síntese verde de nanopartículas de prata usando extratos vegetais de diferentes partes dessas plantas, como casca [22], folha [23], tubérculo [11], frutas [24] e tantas outras, mas, em comum, essa rotasintética depende de algumas moléculas presentes nos extratos para proporcionar estabilização da solução, redução de  $\text{Ag}^+$  a  $\text{Ag}^0$  e revestimento de nanopartículas sintetizadas dessa maneira o crescimento, nucleação e formação de nanopartículas pode ser alcançado [12].

## 2.2 Síntese de nanopartículas de prata por redução química

Como já mencionado, um dos métodos de síntese de nanopartículas metálicas mais amplamente difundidos na atualidade é o da redução química, um método que faz parte da síntese de nanopartículas denominado “*bottom up*”, onde ocorrem interações eletrônicas entre os átomos ou moléculas precursoras das nanopartículas individualizadas e formam a nanoestrutura, que permite entre outras coisas controlar de forma mais eficiente o tamanho das nanopartículas, suas formas, e também estados de agregação (fator determinante para algumas aplicações das nanopartículas que é afetado pelo tamanho das nanopartículas, estabilidade química do meio reacional, que leva a alterações na dissolução, mobilidade e toxicidade da nanopartícula)

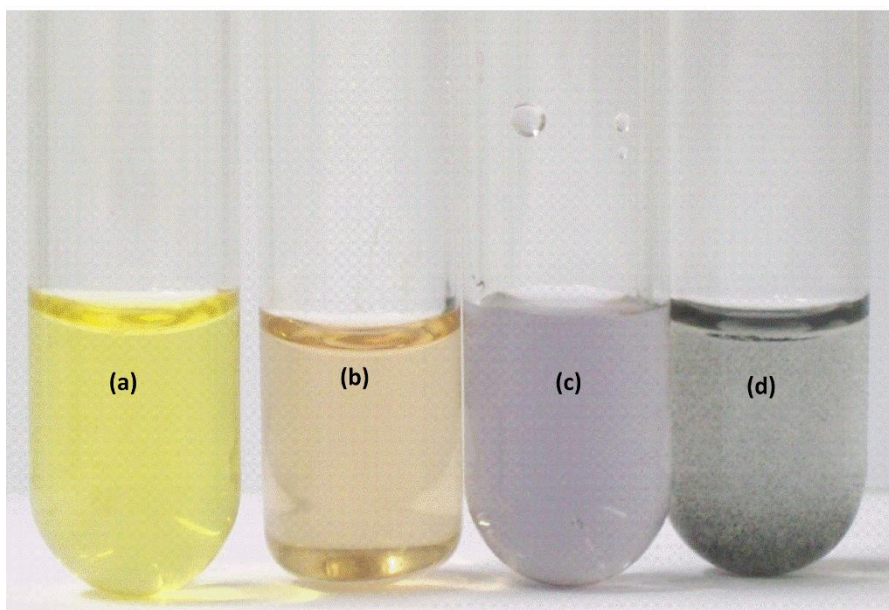
O mecanismo de redução química de um sal precursor como o  $\text{AgNO}_3$  em meio aquoso com um agente redutor que pode ser o citrato de sódio ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$ ) [27], borohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ) que reduz a prata iônica e estabiliza o meio em simultâneo para a formação das nanopartículas, esse procedimento forma uma dispersão de cor amarela-alaranjada Fig.2a [25].

A equação química que descreve a redução química do sal de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) (eq.1).



Por ser muito reativa na presença de íons prata a solução deve ser resfriada e a adição do sal de prata deve ser controlada para que não haja problemas, geralmente a adição se dá por gotejamento, esse controle da temperatura é importante também pois atua como um controle do tamanho das nanopartículas de prata, haja vista que a entalpia favorável da reação favorece o crescimento das partículas, logo seu resfriamento mantém as NPsAg em tamanhos adequados para a escala manométrica, nesse caso tamanhos em torno de 12 nm. O procedimento de síntese deve ser conduzido sob agitação constante e as quantidades entre ambos reagentes devem ser rigorosamente controladas, a fim de, não comprometer a qualidade das nanopartículas obtidas.

Através desse método de síntese é possível obter partículas monodispersas e homogêneas de prata, porém ainda há um problema que persiste nas nanopartículas de prata que é a agregação das mesmas. A agregação das nanopartículas torna a cor da dispersão escura e leva à deposição de partículas de prata metálica maiores de coloração cinza Figura 2d.

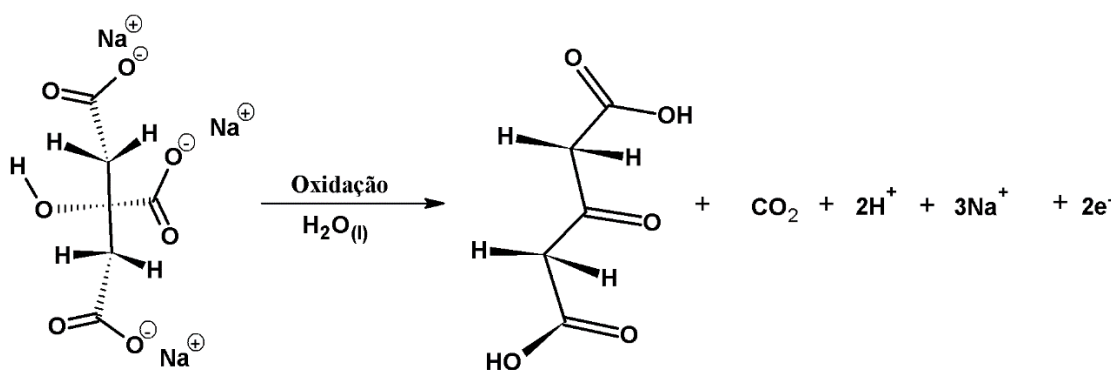


**Figura 2.** Diferentes estágios de agregação das nanopartículas de prata, com aumento de agregação da esquerda para a direita ( $a > b > c > d$ ). Fonte: adaptado de [26].

O método de Turkevich (Turkevich, 1951) para síntese de nanopartículas de ouro e posteriormente adaptado por Lee e colaboradores (1982) [27] para síntese de nanopartículas de prata, que consiste basicamente em obter nanopartículas de prata a partir de solução aquosa de nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) com adição de citrato de sódio ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ) na proporção molar de 1:3, respectivamente, numa reação de óxido-redução em que íons  $\text{Ag}^+$  são reduzidos a  $\text{Ag}^0$ ,

sendo que em algumas situações pode-se empregar borohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ) com resultados similares, porém o método utilizando citrato é mais amplamente empregada na síntese de nanopartículas de prata uniformes e com distribuição de tamanhos muito pequenas (1-100 nm).

A reação de Turkevich envolve aquecimento até o ponto de ebulição da dispersão coloidal de prata, o que leva a formação de íons  $\text{H}^+$ , que de acordo com a quantidade de reagentes necessários e a quantidade de nanopartículas que se deseja produzir pode configurar risco de acidentes como explosão, intoxicação além da reação causar alterações ao pH da solução o que pode comprometer o crescimento das nanopartículas, além de ser explosivo em contato com o oxigênio presente no ar Figura 3.



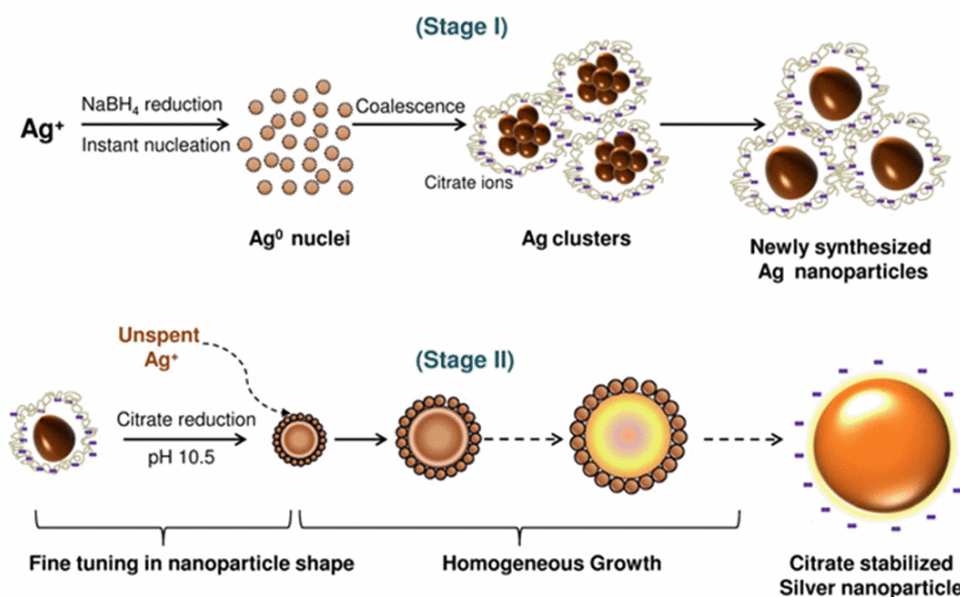
**Figura 3.** Oxidação do citrato de sódio em meio aquoso com liberação de hidrônio e gás carbônico, reação exotérmica. Fonte: adaptado de [27]

Como descrito por Agnihotri e colaboradores em 2013 o procedimento de co-redução utilizando borohidreto de sódio e citrato trissódico ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ) como agente redutor e estabilizante, foi possível sintetizar nanopartículas de prata de tamanhos variáveis, esse controle dos tamanhos das nanopartículas foi possível devido ao controle dos estágios do tratamento térmico, sendo que no primeiro estágio houve um aquecimento em torno de  $60\text{ }^\circ\text{C}$ , que por sua vez favoreceu bastante a produção de nanopartículas de prata, na etapa denominada de nucleação [28].

As nanopartículas produzidas no primeiro estágio passaram para a etapa de crescimento mediada pela ação de redução proporcionada pelo citrato trissódico (CTS) e aquecimento a  $90\text{ }^\circ\text{C}$ , as moléculas de CTS proporcionaram um meio propício ao crescimento das nanopartículas dificultando sua aglomeração, porém essa é uma etapa crítica onde o controle da proporção de CTS e  $\text{NaBH}_4$  é fundamental para a nucleação e crescimento (Figura 4). O método de síntese



com borohidreto e citrato de sódio com aquecimento leva a formação em geral de nanopartículas com diâmetros entre 60 e 80 nm [28].

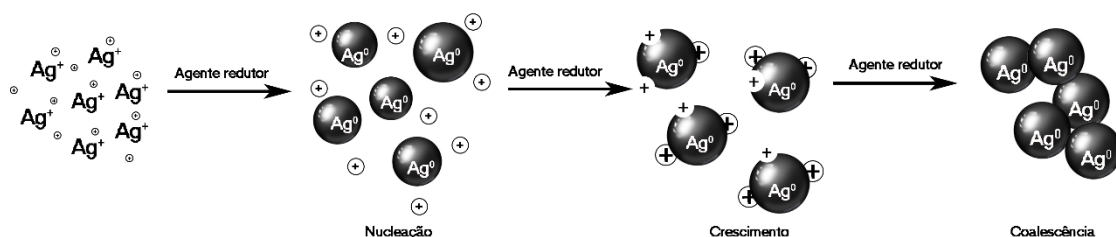


**Figura 4.** Representação esquemática das etapas inerentes ao processo de síntese de nanopartículas de prata por co-redução usando borohidreto de sódio ( $NaBH_4$ ) e Citrato trissódico ( $Na_3C_6H_5O_7$ ). Fonte: adaptado de [28].

Como pode ser visto na Figura 4 o processo de síntese ocorre em dois estágios a nucleação (estágio 1) e o crescimento (estágio 2), observando-se que essas etapas ainda não são plenamente compreendidas devido à dificuldade de estudar esses fenômenos a partir de partículas isoladas. Esses processos são determinantes para o tamanho e distribuição das nanopartículas. Logo que os cristalitos são formados na etapa de nucleação inicia-se a precipitação dessas nanopartículas, por conseguinte inicia-se também os processos de aglomeração desses núcleos denominados por sementes algumas vezes, isso deve-se principalmente a presença do agente redutor em solução que induz a redução dos íons  $Ag^+$  a  $Ag^0$  [29].

A nucleação tem relação direta com o poder de redução do agente redutor e as condições da reação, haja vista que, o agente redutor forte como o borohidreto de sódio induz a formação de centros de nucleação com muita facilidade. Agentes redutores fracos como o citrato de sódio apresentam processos de redução de íons prata mais lentos, o que favorece uma nucleação mais estável e nanopartículas menores e menos aglomeradas.

Na etapa seguinte onde ocorre o crescimento das nanopartículas é necessário a presença de um agente estabilizador e que iniba essa interação entre os núcleos formados impedindo sua aglomeração. Neste ponto o citrato trissódico ou outro agente que realize a mesma função reveste essas nanopartículas possibilitando um crescimento homogêneo e monodisperso de cada nanopartícula metálica de forma independente. É pertinente ressaltar que esses estágios podem acontecer em simultâneo, porém a etapa de crescimento só ocorre depois da formação dos núcleos (Figura 5). Esse fenômeno de estabilização das nanopartículas formadas na etapa de nucleação já é bastante dependente da carga elétrica superficial adsorvida às nanopartículas nos clusters formados como pode ser visto na figura 5, dessa forma devido as forças de repulsão que atuam entre os clusters dificultam sua aglomeração.



**Figura 5.** Esquema representativo das etapas que controlam a formação das nanopartículas de prata. Fonte: adaptado de [29].

É importante destacar que em dispersão em fase líquida as nanopartículas sofrem colisões devido a um fenômeno físico denominado movimento Browniano das partículas, que pode levar a um ordenamento momentâneo das mesmas, esses grupamentos são denominados de “clusters”, que por sua vez pode vir a se redissolver, ou ainda formar partículas maiores, a depender de fatores termodinâmicos, energia de Gibbs ou temperatura de fusão. Os “clusters” aumentam de tamanho dependendo do incremento de novas nanopartículas aos núcleos e a diminuição desse incremento leva a dissolução dos mesmos.

Além das substâncias anteriormente citadas que atuam como redutores e estabilizantes do processo de síntese das nanopartículas de prata, ainda pode ser usada para tal função outras substâncias, métodos químicos e físicos destacados na tabela 1.

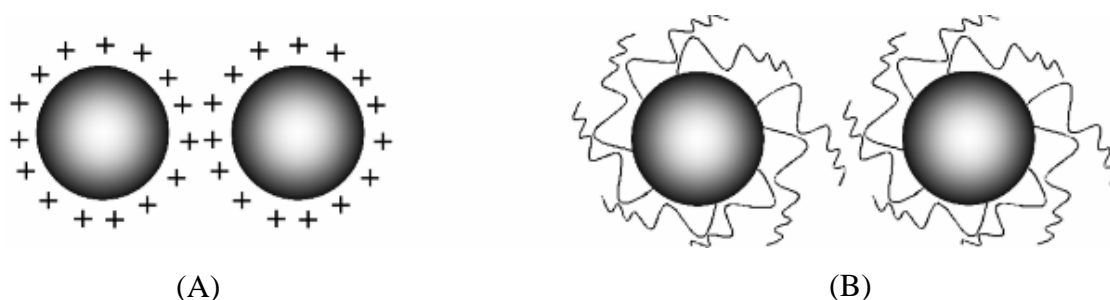
**Tabela 1.** Alguns procedimentos físicos, químicos e fotoquímicos para síntese de nanopartículas de prata.

Precursor de prata	Agente redutor	Agente estabilizante	Método
AgNO <sub>3</sub>	DMF	-	R.Q.
AgNO <sub>3</sub>	NaHB <sub>4</sub>	Surfactina (biossurfactante lipopeptídeo)	R.Q.
AgNO <sub>3</sub>	Citrato trissódico (inicial) + SFS (secundário) Trissódico	Citrato trissódico	R.Q.
AgNO <sub>3</sub>	Citrato trissódico	Citrato trissódico	R.Q.
AgNO <sub>3</sub>	Ácido ascórbico	-	R.Q.
AgNO <sub>3</sub>	NaBH <sub>4</sub>	ADD	R.Q.
AgNO <sub>3</sub>	Parafina	Oleilamina	R.Q.
AgNO <sub>3</sub>	Dextrose	PVP	R.Q. (Térmica)
AgNO <sub>3</sub>	Hidrazina	-	R.Q. (Térmica)
AgNO <sub>3</sub>	Glicose	Ácido glucônico	R.Q. (Oxidação da glicose)
AgNO <sub>3</sub>	Etileno glicol	PVP	R.Q. (Processo do poliol)
AgNO <sub>3</sub>	Etileno glicol	PVP	R.Q. (Processo do poliol)
AgNO <sub>3</sub>	Eletrólise catódica: ânodo de titânio/Pt	PVP	R.Q. (Processo do poliol)
AgNO <sub>3</sub>	m-hidroxibenzaldeído	DSS	R.Q. (Tollen)
Fios de Ag	Descarga de arco elétrico em água	-	Síntese física
AgNO <sub>3</sub>	Descarga de arco elétrico	Citrato de sódio	Síntese física
AgNO <sub>3</sub>	Hidrato de hidrazina	EES	R.Q. (microemulsão)
AgNO <sub>3</sub>	Etileno glicol	-	R.F-Q. (Radiólise)
AgNO <sub>3</sub>	Etileno glicol	PVP	R.F-Q. (Microndas)
AgNO <sub>3</sub>	Luz UV	-	R.F-Q. (fotoredução)
AgNO <sub>3</sub>	Raios-X	-	R.F-Q. (radiólise de raios-X)
AgNO <sub>3</sub>	QC,UV	QC	R.F-Q. (radiólise de raios-X)

R.Q (Redução Química); R.F(Redução Física); DMF(n,n-dimetilformamida); NaBH<sub>4</sub>(Borohidreto de sódio); DSS (Dodecil sulfaço de sódio); ADD (ácido dodecanóico); PVP (Polivinil pirrolidona); EES ((2-etilexil) sulfosuccinato); QC (Quitosana carboximetilada). Fonte: adaptado de [30].

Como destacado anteriormente o método de síntese de nanopartículas de prata por redução química já é bastante difundido em pesquisas e até escala comercial, além de proporcionar nanopartículas de boa qualidade, porém os problemas provenientes da

aglomeração na etapa da formação dos clusters, deve ser considerado, dessa forma a utilização do estabilizante torna-se fundamental. Os estabilizantes necessários para permitir a síntese de NPsAg por redução química atuam basicamente de duas maneiras principais, ilustrados de forma simples na Figura 6.



**Figura 6.** Representação dos mecanismos de estabilização que atuam comumente na estabilização de nanopartículas de prata. Fonte: adaptado de [116].

A figura 6 (A) demonstra a estabilização por dispersão por repulsão eletrostática devido a interação entre a dupla camada eletrônica (electrical double layer-EDL) que recobre as nanopartículas do tipo core-shell, haja vista que a carga superficial das nanopartículas mantém-se desigual em relação às cargas presentes na solução coloidal. Em termos de interações eletrostáticas a repulsão ocorre quando estas são superiores em módulo as forças de atração de Van der Waals entre as partículas.

A EDL é uma estrutura superficial que surge quando dois líquidos entram em contato, e divide-se basicamente em duas camadas, uma denominada “carga de superfície” (pode ser positiva ou negativa), e uma segunda presente na superfície do líquido e oposta à carga da primeira camada, esta carga é do tipo difusa, ou seja, está presente no solvente em decorrência dos íons livres em solução.

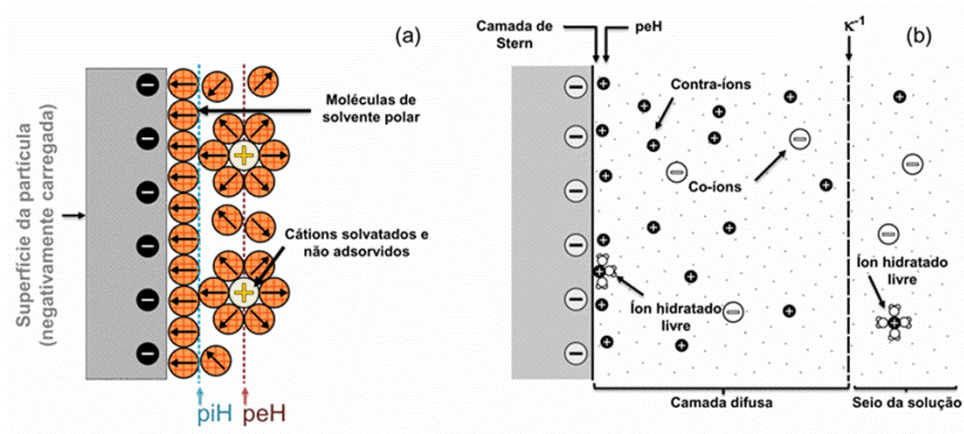
A segunda forma de estabilização consiste na repulsão estérica, em que ocorre uma repulsão entre partículas sólidas decorrentes do volume que reveste cada uma, decorrentes da grande proporção de material elástico, que impede ou dificulta a aproximação entre elas, substâncias como tensoativos (componente formado por cadeias longas hidrofóbicas e extremidade hidrofílica adsorvida na superfície das partículas), um polímero funcionalizado, cadeias proteicas (figura 6.b) atuam como surfactantes no meio líquido reacional. A natureza do surfactante é um importante parâmetro para a estabilidade coloidal das nanopartículas.

Na teoria dos sólidos, a adsorção de tensoativos à superfície dos mesmos é regida por interações do tipo ácido-base entre o sólido e as moléculas superficiais, onde um tensoativo aniônico adsorvido na superfície da molécula atua como uma base de Lewis, enquanto a superfície da partículas tem comportamento de ácido de Lewis [31].

Dessa forma o fenômeno da adsorção é um fenômeno eletrostático, mas a estabilização no meio reacional é um fenômeno decorrente da hidrofobicidade do tensoativo em relação ao solvente, e esta por sua vez é estérica. Como tal a estabilização estérica e eletrostática ocorrem em simultâneo nesse sistema [32].

No que concerne ao tamanho da molécula do tensoativo o que determina sua eficiência em estabilizar o crescimento das nanopartículas em um meio coloidal é o comprimento de sua cadeia hidrofóbica, de acordo com [33] a estabilidade estérica contribui significativamente para a estabilidade coloidal, bem como em se tratando de estruturas de revestimento de origem polimérica constituem verdadeiras barreiras que impedem a aglomeração.

O modelo que descreve o fenômeno da dupla camada eletrônica (EDL), anteriormente destacado, denominado de modelo de Helmholtz e de Stern, onde é possível constatar que para que seja mantida a eletro neutralidade do sistema as cargas adsorvidas à superfície das partículas e os contra-íons presentes na solução devem ser equivalentes, isso acaba por formar camadas diferentes entre si, a Figura 7 descreve bem esse fenômeno [34].



**Figura 7.** Esquema representativo da dupla camada eletrônica (EDL) a partir dos modelos de Helmholtz (a) e Stern (b). Fonte: adaptado de [35].

A camada de Helmholtz demonstrada pela Figura 7. (a) localiza-se entre a superfícies carregada e dois planos um interno (piH) e outro externo (peH), que são formados pela primeira

camada de solvente adsorvido e pelos cátions solvatados. A outra representação da distribuição das cargas e variação do potencial elétrico é definido pelo modelo de Stern destacado na Figura 7.(b), Nesse modelo é visível a presença de alguns íons fortemente atraídos e organizados próximo à superfície carregada formando uma camada compacta ou camada de Stern, enquanto outros mantêm-se mais afastados da superfície, dispostos numa espécie de atmosfera iônica denominada camada difusa de Gouy-Chapman. A concentração dos eletrólitos em solução é fator determinante para a estabilidade do sistema, posto que seu excesso pode acabar por destruir a ED resultando na agregação das nanopartículas [35].

### 2.3. Síntese verde de nanopartículas de prata utilizando extratos vegetais

Devido a biodisponibilidade, ausência de efeitos tóxicos e deletérios ao meio ambiente, baixo custo, e segurança de manipulação a síntese de nanopartículas de prata utilizando como matéria-prima extratos vegetais já é uma realidade [36]. Devido a sua composição química ser rica em flavonóides, catequinas, polifenóis, alcaloides, vitaminas e sais minerais, substâncias químicas que assim como o citrato de sódio ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ), pode ser uma alternativa viável para induzir e controlar o processo de redução química e formação das nanopartículas metálicas como as de prata [26].

A biossíntese verde de nanopartículas de prata nos últimos anos vêm sendo implementada de várias formas como biomoléculas, bactérias, algas, fungos, e por plantas. A síntese por plantas se concentra em implementar a técnica de síntese por redução química com a utilização de biomoléculas presentes no extrato vegetal para contribuir com o processo de redução da prata em solução ( $\text{Ag}^+$ ) para prata metálica ( $\text{Ag}^0$ ) e estabilização da dispersão coloidal por meio de recobrimentos da superfície das partículas, impedindo a aglomeração destas.

De acordo com a composição bioquímica de cada planta o processo pode ser favorecido, vários metabólitos secundários utilizados por algumas plantas contribuem para proporcionar essa síntese como, (flavonóides, terpenóides, taninos, saponinas, polifenóis, ácidos orgânicos) e polímeros proteicos. Alguns estudos apontam que algumas moléculas presentes em extratos vegetais atuam na redução de íons metálicos como aminoácidos, flavonóides, ácido gálico, ácido cítrico, compostos fenólicos, compostos heterocíclicos, enzimas, terpenos, peptídeos, polissacarídeos, saponinas, entre outros [37].

Vários tipos de plantas são utilizadas no processo de síntese, bem como várias partes, desde suas raízes, casca do caule, frutos, folhas e sementes, dependendo da sua composição bioquímica. As plantas encontradas na literatura com boa aplicação em síntese de nanopartículas pertencem a uma vasta gama de espécies, a destacar pteridófitas *Pteris tripartita* SW[38], *Rhizoctonia* pertencente a espécie briófitas [39], gimnosperma – *Pinus desiflora* [40], angiosperma *Pistacia atlântica* [41], entre outras (Tabela 2.).

**Tabela 2.** Síntese verde de nanopartículas de prata utilizando extrato vegetal.

ORGANISMO	DIÂMETRO	FORMA	REFERÊNCIAS
<i>Aloe vera</i> (babosa)	15,2 nm	Esférica	[42]
<i>Azadirachta indica</i>	–	Esférica	[43]
<i>Anacardium occidentale</i> L. (caju)	4 nm	Esférica	[44]
<i>Callicarpa maingayi</i>	12,4 nm	–	[45]
<i>Capsicum annuum</i> L. (pimentão)	10 nm a 40 nm	Esférica	[46]
<i>Carica papaya</i>	40 nm a 105 nm	Esférica	[47]
<i>Cassia fistula</i>	50-60 nm	Nanofios	[48]
<i>Cinnamomum camphora</i>	64,8 nm	–	[49]
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> (canela)	25 nm	Esférica, prismática	[50]
<i>Eclipta prostrata</i>	35 nm a 60 nm	Esférica	[51]
<i>Medicago sativa</i> (alfafa)	5 nm a 51 nm	Esférica	[52]
<i>Mentha piperita</i> (hortelã)	90 nm	Esférica	[53]
<i>Ocimum tenuiflorum</i> (manjerição-pequeno)	25 nm a 40 nm	Esférica	[54]
<i>Ocimum sanctum</i> (manjerição-sagrado)	5 nm e 10 nm	Esférica	[55]
<i>Papaver somniferum</i>	3,2 µm a 7,6 µm	Esférica	[56]
<i>Parthenium hysterophorus</i>	187.87 ± 4.89 nm	Esférica	[57]
<i>Prosopis juliflora</i>	70 nm – 105 nm	Cúbica	[58]
<i>Rhododendron dauricum</i>	25 nm a 40 nm	Esférica	[59]
<i>Sebania grandiflora</i>	10 nm a 25nm	Esférica	[60]
<i>Sorbus aucuparia</i>	16 nm	Esférica	[61]
<i>Tephrosia purpurea</i> (índigo-selvagem)	20 nm	Esférica	[62]
<i>Trachyspermum ammi</i>	87 nm a 998 nm	Triangular	[56]

Fonte: elaborado pelo autor.

Em estudos recentes S. IRAVANI, B. ZOLFAGHARI, 2013, constatou-se uma série de parâmetros que interferem nos resultados obtidos da síntese de nanopartículas de prata durante a reação de síntese, além da composição bioquímica da variedade da planta utilizada no processo, estes parâmetros interferem na morfologia, propriedades químicas, mecânicas e taxa de síntese dos nanomateriais, entre eles destaca-se a temperatura, onde em temperaturas mais baixas (20 °C) predomina da forma triangular com variação de tamanho entre 5 a 500 nm, em

temperaturas entre 50 e 60 °C já é predominante a forma esférica e as nanopartículas são mais estáveis [63].

Além das variação nos tamanhos e morfologias das nanopartículas a temperatura também influencia na taxa de nucleação que é ampliada de acordo com o incremento da temperatura, permitindo assim uma reação mais rápida e consequentemente a formação de mais centros de nucleação [64]. Quanto ao pH sua interferência assim como a temperatura está relacionada ao processo de nucleação do metal precursor, em suma com o incremento do pH há formação de mais centros de nucleação, proporcionando assim a formação de mais nanopartículas metálicas.

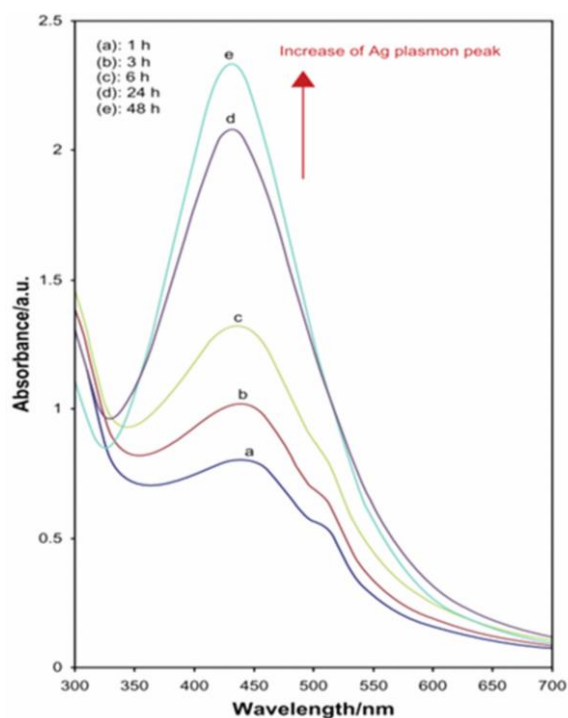
Em estudos realizados por Zhao e colaboradores em 2019 foi possível constatar que as nanopartículas de prata esféricas obtidas apresentaram um incremento na taxa de formação em pH 10, enquanto que em pH em torno de 9,2 sua estabilidade coloidal foi superior, isso possivelmente ocorreu porque a substância utilizada como estabilizante a Iturina apresenta em sua composição química grupos funcionais como, carboxil, fenólicos, e hidroxílicos, e dessa forma possibilita a sua maior interação com sítios metálicos, em pH elevado, estes grupos funcionais desprotonam, e facilmente combina o sítio negativamente carregado da Iturina com a partículas positivamente carregada ( $\text{Ag}^+$ ), resultando num complexo organometálico bastante estável. Além disso elevados pH resultam numa taxa de redução de íons  $\text{Ag}^+$  e consequentemente aumento da taxa de formação das nanopartículas [65].

Assim como os fatores anteriormente citados o tempo de reação também constitui fator determinante para influenciar a morfologia das nanopartículas. Darroudi e colaboradores em 2011 estudaram através da síntese de nanopartículas de prata em solução aquosa através da adaptação do método de Turkevich, os efeitos da variação do tempo de reação nas propriedades das nanopartículas de prata em meio coloidal, a variação de tempo reacional foi entre 1,0 a 48 horas, sendo que a principal forma de estabelecer um paralelo foi a análise por espectroscopia no UV-Vis em diferentes tempos com temperatura constante e a 60°C (Figura 8). Através dessa observação pode-se constatar que, visualmente houve uma variação de cor perceptível da dispersão, de levemente marrom para marrom, e depois marrom escuro, indicando a formação das nanopartículas [66].

Em suma a mudança de cor percebida com uma hora de reação Figura 8(A) apresentou uma absorvidade de 400 nm, após 3 horas de reação Figura 8(B), esse pico foi deslocado para 438 nm em 6 horas de reação Figura 8(C), essa mudança indica um aumento do tamanho das

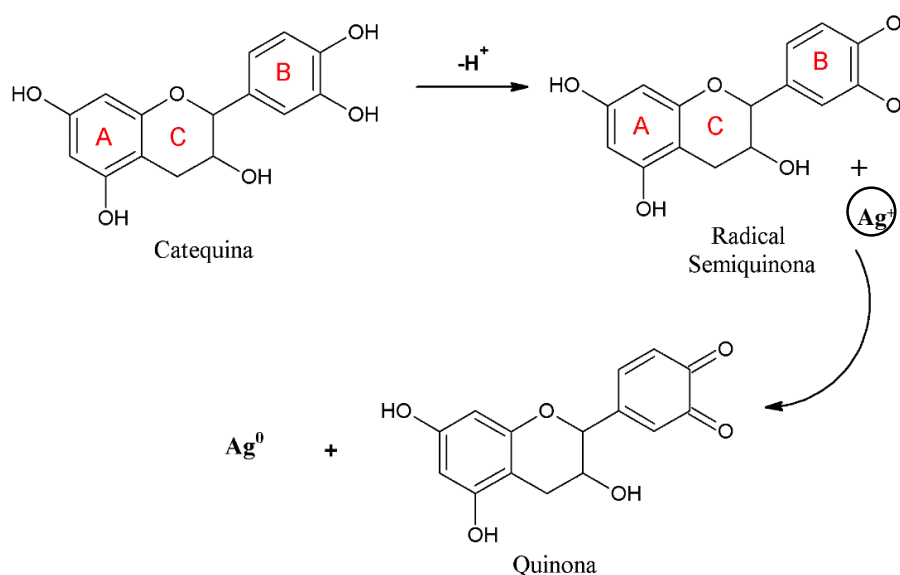


partículas, após 24 horas de reação Figura 8(D) diminuiu para 431 nm, o que indica a diminuição do tamanho dessas partículas, no fim da reação em 48 horas Figura 8(E), a absorção foi consideravelmente acrescida, porém não somente o tempo de reação atuou nessa diminuição de tamanho das nanopartículas, o aquecimento contínuo (60 °C) provocou uma dissociação desses núcleos de NP a partículas menores, porém foi evidente que o tempo de reação foi fundamental para proporcionar uma variação considerável nos tamanhos das nanopartículas [66].



**Figura 8.** Espectro de absorção UV-Vis das nanopartículas coloidais de prata sintetizadas usando glicose em diferentes períodos de reação. Fonte: adaptado de [66].

Todos estes fatores estão presentes também em sínteses biogênicas de nanopartículas de prata utilizando extratos vegetais, e contribuem para o processo sintético, permitindo tanto a redução dos íons  $\text{Ag}^+$  a  $\text{Ag}^0$ , quanto os estabilizando eletrostaticamente e estericamente, como pode ser visto no estudo realizado por S. OLIVER, *et al.* (2018) [67], onde o grupo sintetizou a partir de catequina (extraídas de extratos vegetais e purificada) nanopartículas de prata com tamanho médio de 20 nm, a técnica implementada consistia em utilizar o polifenol sob a forma de um polímero e usado como agente redutor para a prata ( $\text{Ag}^+ - \text{Ag}^0$ ) e recobrimento, isso foi possível devido ao fenômeno de oxidação bastante comum, que ocorre com o grupo catecol presente na moléculas de catequina, Figura 9.



**Figura 9.** Reação de redução química de  $\text{AgNO}_3$  por catequina. Fonte: adaptado de [67].

O processo de redução é muito influenciado pelo pH da solução, haja vista que em pHs mais baixos a taxa de redução de íons  $\text{Ag}^+$  também é diminuída, dessa forma a formação de centros de nucleação decresce, o que possibilita a formação de partículas maiores. Já em pH mais elevado pode ocorrer além da redução de íons  $\text{Ag}^+$  pela catequina, a formação de um intermediário  $\text{Ag}(\text{OH})_x$  que por sua vez reduz a  $\text{Ag}^0$ , aumentando a taxa de nucleação.

Oliver *et al* em 2018 também observou que após a oxidação dos grupos catecol à quinona forma um subproduto consideravelmente menos solúvel que seus precursores, o que acaba influenciando na instabilidade da dispersão, além disso foi avaliada também uma variação nos pHs das sínteses de nanopartículas, através destes testes o grupo constatou que em pHs mais elevados proporcionou a formação de nanopartículas maiores [67].

Nos estudos de S. OLIVER, *et al.* (2018) também observou-se o potencial redutor e de recobrimento do tetraborato de sódio (borax), por se tratar de um íon tetrafuncional com quatro ligações de hidrogênio em quatro grupamentos hidroxil formando uma rede reticulada 3D, teorizou-se que se a catequina possui cinco grupamentos hidroxila o bórax poderia ser utilizado como reticulador, e dessa forma potencializar o efeito estérico de estabilização das partículas, e através da otimização do sistema por micro-ondas foi possível produzir nanopartículas menores que as obtidas apenas pela redução com catequina [67]. Como descrito anteriormente

com o aumento da solubilidade há um favorecimento do processo de recobrimento e consequentemente uma melhor estabilização das nanopartículas, desta forma.

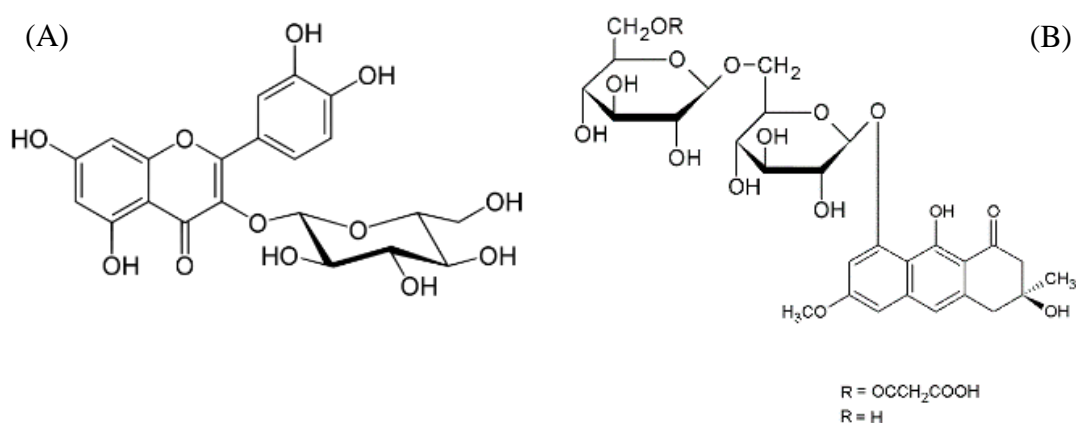
S. OLIVER, *et al.* (2018) desenvolveu um polímero a partir da catequina em meio ácido, e fez as seguintes constatações, as nanopartículas obtidas pelo polímero foram consideravelmente menores, em pHs mais elevados notou-se uma certa aglomeração das nanopartículas, apontando que o processo se desenvolve melhor em pH baixo (pH 8 e temperatura ambiente), após seis meses as nanopartículas obtidas pelo polímero (catequina) ainda estava estável, em comparação a estabilidade das NPsAg preparadas por catequina pura e catequina-borax permaneceram estáveis por dois dias e duas semanas, respectivamente [67].

Um outro estudo conduzido por Biao L. em 2018 reportou a síntese de nanopartículas de prata através da redução química com proantocianidinas (um flavonóide oligomérico que tem como estrutura base a catequina, um potente antioxidante polihidroxilado, pode ser encontrado em uma vasta gama de vegetais, desde frutos, caule, sementes), que atuou como agente redutor dos íons  $\text{Ag}^+$  a  $\text{Ag}^0$  e estabilizante por um método hidrotérmico de síntese [68].

Os pesquisadores utilizaram proantocianidina (padrão analítico) em pó que foi dissolvido em água e adicionado  $\text{AgNO}_3$ , a solução teve seu pH ajustado para 6 e foi aquecida por 4 horas a  $140^\circ\text{C}$  durante o processo de síntese, houve a constatação da formação das nanopartículas de prata pela alteração da cor da solução precursora, e através de espectroscopia no UV-Vis [68].

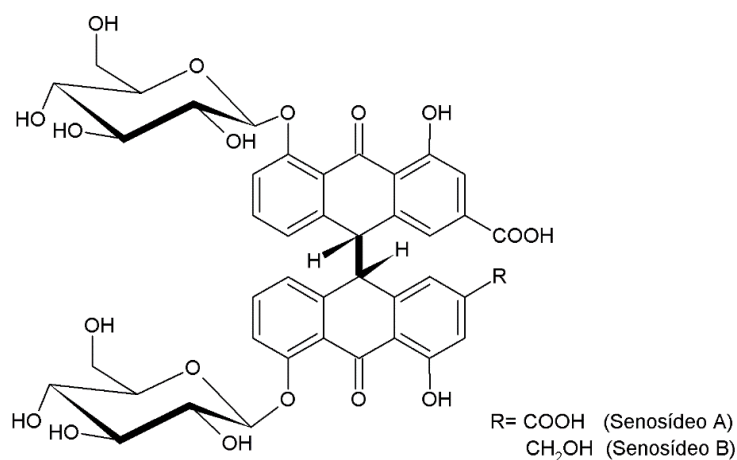
As nanopartículas obtidas eram esféricas, com tamanho médio de 55 nm, não houve formação de grande quantidade de aglomerados, supõe-se que houve a adsorção da proantocianidina a superfície carregada das nanopartículas de prata o que contribuiu para sua estabilização e dificultou sua aglomeração, a dispersão se mostrou estável mesmo após um mês de armazenamento, as nanopartículas de prata funcionalizadas por proantocianidinas apresentou bom efeito antimicrobiano contra *E. coli*, *C. albicans*, e *S. aureus* [68].

Amaladhas *et al* (2012) também realizou sínteses biogênicas utilizando plantas ricas em substâncias químicas que podem atuar tanto na redução da prata quanto na sua estabilização, em suma seu extrato é composto majoritariamente de glicosídeos diméricos e em menor quantidade glicosídeos monoméricos (Figura 10.) além de outras estruturas derivadas da antraquinona [69].



**Figura 10.** Imagem da estrutura molecular da Isoquercetina (glicosídeo monomérico) (a); glicosídeo dimérico (b). Fonte: adaptado de [69].

Amaladhas *et al* (2012) buscou sintetizar nanopartículas de prata a temperatura ambiente, de forma rápida e pautada nos princípios da química verde, utilizando como agente redutor e estabilizante extrato vegetal de *Cassia angustifolia*, isso decorre de acordo com suas constatações dos componentes hidrossolúveis presentes no extrato que proporcionaram um efeito altamente redutor (proveniente de substâncias derivadas de antraquinonas, como os senosídeos, ou glicosídeos de senna (Figura 11) [115]. Como resultado o grupo obteve nanopartículas de prata polidispersas, de tamanho em torno de 21,6 nm em pH 11, sua eficiência contra os microrganismos *E coli* e *S. aureus* foi boa. Como o observado em outros estudos as propriedades das nanopartículas, seu tamanho, forma, taxa de redução, estabilidade, se mostraram dependentes de fatores como pH, tempo de reação, e temperatura.



**Figura 11.** Fórmula molecular de um Senosídeo-(Glicosídeo de *senna*), presente na *Cassia angustifolia* (Gênero *Senna*). Fonte: adaptado de [111].

Várias pesquisas recentemente ganharam destaque no que se refere à síntese por metodologias menos impactantes, de baixo custo e que respeite os princípios da química verde, e nesse ponto a síntese de nanopartículas por extratos vegetais tornou-se cada vez mais importante, quer seja como agente redutor e estabilizante, quer seja como revestimento voltado para a funcionalização dessas nanopartículas, mostra-se bastante versátil e aplicável de acordo com a literatura de sínteses de nanopartículas recentes.

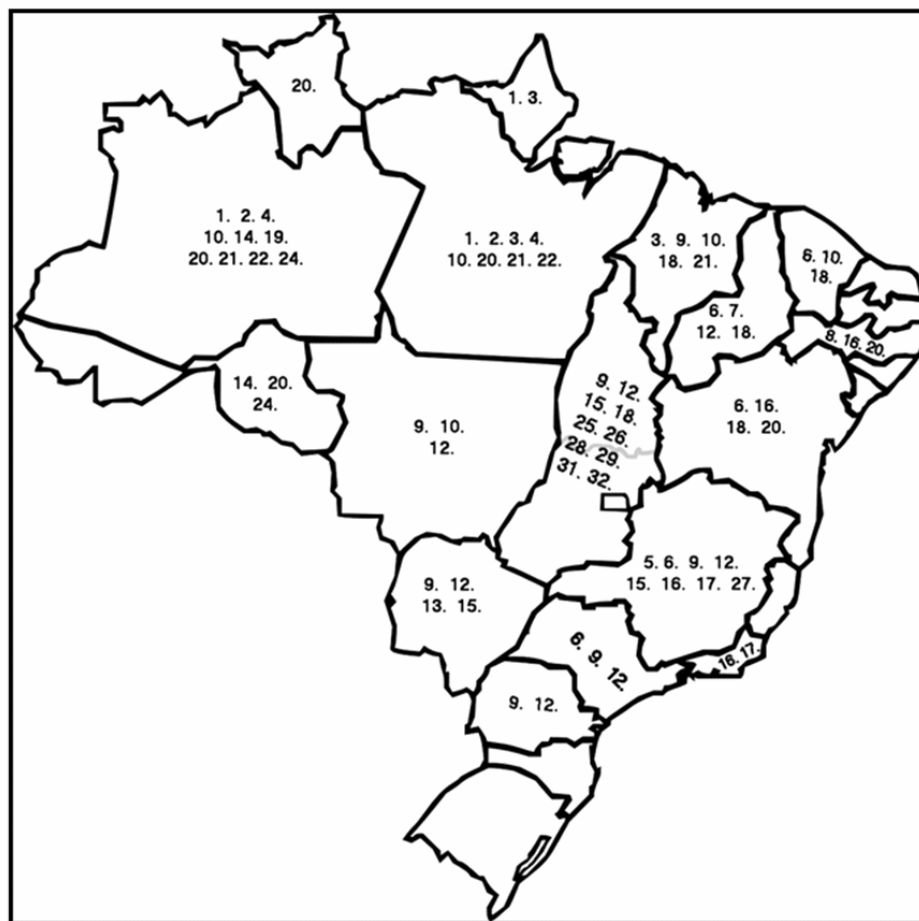
## 2.4. *Stryphnodendron adstringens*

### 2.4.1. Ocorrência e características gerais

O *Stryphnodendron* como gênero foi identificado e catalogado pela primeira vez em 1837 por Martius sendo este pertencente à família *Leguminosae* do grupo das angiospermas, presentes nas cinco grandes regiões do Brasil. Em estudos posteriores Occhioni-Martins (1990) apresentou que o gênero *Stryphnodendron* é composta por 25 espécies, duas subespécies e três variedades [117].

A espécie *Stryphnodendron adstringens* pertencente à família *Leguminosae*, pode ser denominada por *Acacia adstringens* (Martius) Coville, *Mimosa barbadetimam* Vell., *Mimosa virginalis* Arruda, e *Stryphnodendron barbatimam* Mart. Baseados em suas características químicas, biológicas e citogênicas, os autores decidiram enquadrá-la em três famílias distintas a *Caesalpiniaceae*, *Fabaceae* e *Mimosaceae*, porém recentemente adicionaram a família *Faboidae* [70].

A variedade *S. adstringens* tem como características ocorre basicamente nos estados do Acre, Amazonas, Amapá, Roraima e Pará, mas como já mencionado se espalhou facilmente para os demais estados do Brasil, haja vista que é uma planta perfeitamente adaptada à regiões de clima tropical e subtropical, dessa forma encontra ambiente perfeito para propagação na região da Amazônia onde constitui a variedade com maior número de indivíduos. Por apresentar 94% das espécies encontradas e catalogadas no planeta em território brasileiro (Figura 12.) é conhecida como uma planta tipicamente brasileira, os únicos espécimes encontrados fora do Brasil são o *S. levelli* e *S. porcatum*, e apenas o *S. adstringens* é dito “barbatimão verdadeiro”, mesmo que os demais apresentem, composição química e até aplicações farmacológicas bastante similares.



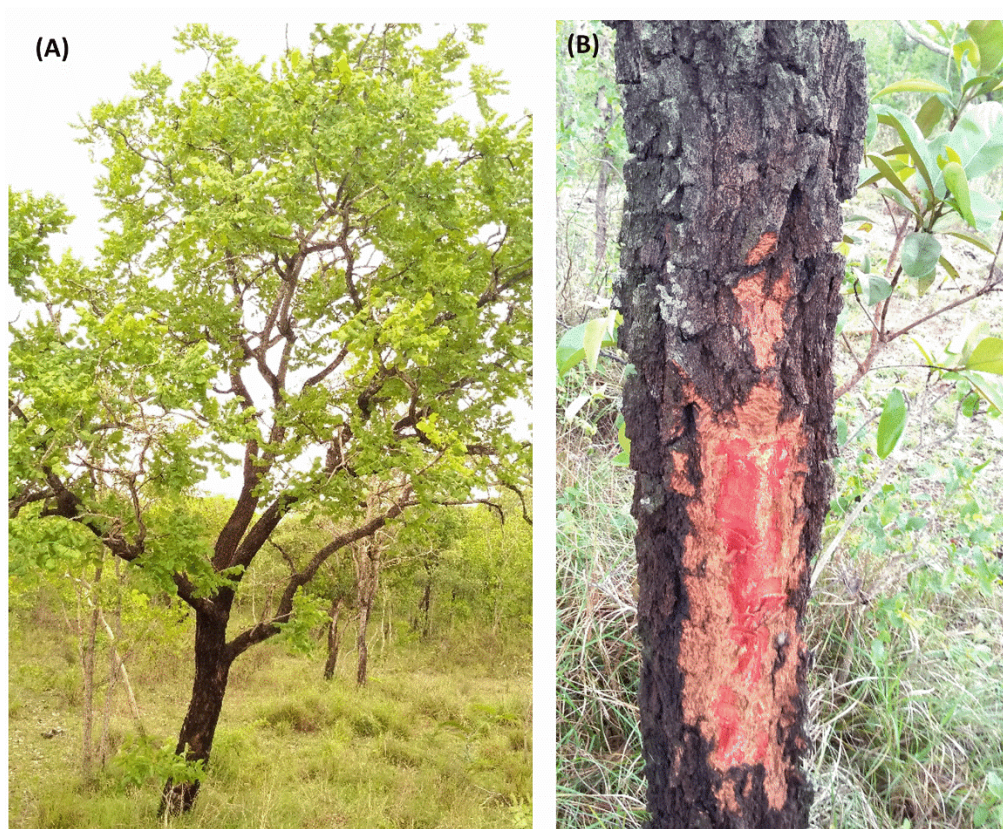
**Figura 12.** Ocorrência de espécies do gênero *Stryphnodendron* em território brasileiro, onde: (1.) *S. occhionianum*; (2.) *S. paniculatum*; (3.) *S. polystachyum*; (4.) *S. racemiferum*; (5.) *S. humile*; (6.) *S. rotundifolium*; (7.) *S. piptadenioides*; (8.) *S. consimile*; (9.) *S. obovatum*; (10.) *S. microstachyum*; (11.) *S. levelii*; (12.) *S. adstringens*; (13.) *S. fissuratum*; (14.) *S. foreroi*; (15.) *S. goyazense*; (16.) *S. polyphyllum* var. *polyphyllum*; (17.) *S. polyphyllum* var. *villosum*; (18.) *S. coriaceum*; (19.) *S. rizzinianum*; (20.) *S. pulcherrimum*; (21.) *S. guianense* subsp. *guianense* var. *guianense*; (22.) *S. guianense* subsp. *guianense* var. *roseiflorum*; (23.) *S. guianense* subsp. *glandulosum*; (24.) *S. duckeanum*; (25.) *S. confertum*; (26.) *S. plastyspicum*; (27.) *S. gracile*; (28.) *S. cristalinae*; (29.) *S. heringeri*; (30.) *S. porc tum*; (31.) *S. barbatulum*; (32.) *S. sallesianum*. [71]

#### 2.4.2. Botânica do *S. adstringens*

O barbatimão *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Colville típica do cerrado apresenta quando adulta uma altura em torno de 4-6 m, tronco com diâmetro variável de 0,2 a 0,3 m Figura 13(A) e é revestido por uma casca espessa e rugosa que a protege da ação fungos



e outros microrganismos Figura 13 (B), bem como de queimadas que são muito frequentes na região. O barbatimão é uma planta que cresce retilínea até determinada altura, com ramas um pouco curvilíneas. Sua casca apresenta arranjo fibroso e coloração avermelhada no seu interior [72]. A planta é decídua, ou seja, necessita de intensa exposição à luz solar para se desenvolver.



**Figura 13.** Árvore de barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*) (A). Tronco rugoso em detalhe (B). Fonte: Elaborada pelo Autor.

As folhas apresentam estrutura alternada formada por pares de folíolos dispostos em pares num total que pode variar de 6 – 16 folíolos, apresenta forma arredondada ou ovalada, com tamanho entre 30 e 60 mm, não possuem tricomas, dessa forma são muito suscetíveis a desidratação por transpiração folicular, as folhas são bipinadas com 5 a 8 pares de pinas, com 3 a 8 pares de folíolos em cada pina [72] (Figura 14.).

O *S. adstringens* é uma planta perene e hermafrodita, tem sua florada entre outubro e fevereiro (varia de acordo com o período chuvoso da região), durante a floração brotam pequenas flores creme-esverdeadas, e se dispõem no formato de espiga. Os frutos são do tipo de vagens secas e lenhosas de tamanho variável (6-9 cm) de comprimento Figura 14 (C), e ocorrem entre os meses de junho e novembro, os frutos imaturos apresentam sementes de

coloração verde e os maduros são pardos, o tempo de maturação em geral ocorre durante a estação seca favorecendo assim o processo de germinação e crescimento das plântulas [70].



**Figura 14.** Exemplar da folha contendo de 6-16 folíolos (A), folíolo dispostos em pares contendo pares de 3 a 5 pinas (B), vagem e sementes (C) do barbatimão. Fonte: Elaborada pelo Autor.

#### 2.4.3 Exploração econômica

Por ser uma planta de pequeno porte é muito empregada na ornamentação de jardins e paisagismo, principalmente em ruas estreitas, muito recomendada também em plantios de áreas degradadas de preservação permanente. Sua madeira por ser bastante fibrosa apresenta boa estabilidade mecânica e durabilidade, dessa forma é bastante usada na construção civil, obras expostas, marcenaria e torno [72]. No meio rural também é bastante comum utilizar a cinza dessa madeira como a dicoada, que é um líquido escuro e de caráter alcalino rico em sais que substitui a soda caustica na fabricação de sabão artesanal. A casca rica em taninos é utilizada na indústria de curtume de couro, a decocção da casca produz um pigmento vermelho muito utilizado como corante em algodão tingido artesanalmente, bem como em tinta para escrever.

#### 2.4.4 Aplicação como fármaco

Não se tem conhecimento desde quando se tem utilizado partes da planta como folhas e caule como fármaco fitoterápico, mas sabe-se que o *S. adstringens* já é popularmente utilizado por tribos indígenas da antiguidade sendo denominado pelos nativos por *ybá timbó* “planta que aperta” devido seu sabor adstringente que causa sensação de constrição no tecido bucal e língua,



o que lhe rendeu uma denominação peculiar de casca da virgindade devido sua aplicação por mulheres no tecido vaginal por provocar constrição no local concebendo tônus aos músculos, alguns géis e pomadas já em uso no mercado utilizam o extrato da planta em sua formulação para medicamentos com a finalidade de melhorar o desempenho sexual [73].

A principal forma de extração se dá por extrativismo, sendo que devido ausência ou ineficácia de fiscalização das leis ambientais ou instruções normativas que regulamentem a forma de extração desse material (até o memento da elaboração do presente trabalho), se torna uma prática extremamente nociva à planta, posto que a retirada indiscriminada da casca da planta em grande quantidade de modo anelar, ou seja remoção de um anel completo do caule, compromete vasos condutores de seiva são comprometidos [74], além de permitir que o caule fique exposto à ação de parasitas, microrganismos e intemperes que pode levar à morte da planta [75].

A aplicação de infusões, extratos, decocção, uso direto das raspas e pó de várias partes da planta em questão, predominando o uso das folhas e principalmente da casca do caule na medicina popular já é bastante difundida no Brasil, e sua ação farmacológica deve-se principalmente à sua composição total em taninos e polifenóis [73], sendo que sua casca apresenta abundância desses metabólitos secundários. Entre as atividades medicinais as quais o *S. adstringens* popularmente é empregada destacam-se: ação antimicrobiana [76,77], tratamento de leucorréia e afecções como gonorreia [78], diarreia, anti-inflamatória [79], cicatrizante, antisséptica [80], gastrites e efeitos antiulcerogênicos [81], a casca é, também, usada no combate de afecções escorbúticas, hérnias, diarréias, hemorragias, impigem e oftalmias [82]. Atualmente os efeitos com maior aceitação científica são: ação antimicrobiana, anti-inflamatória, antinociceptiva, antiulcerativa e cicatrizante[81,86].

#### 2.4.5. Atividade antimicrobiana e antisséptica

A atividade antimicrobiana nos estudos de Freitas e colaboradores (2018) estudaram o efeito dos taninos poliméricos de proantocianidina obtida da decocção de casca de *S. adstringens* contra fungos *Candida albicans in vitro*, relatando que o mesmo composto tem ação antifúngica contra células planctônicas e de bio-filme de *Candida não-albicans* incluindo as resistentes ao antibiótico fluconazol, sendo que essa substância pode ser empregada no controle da Vaginite *in vivo*[76].

Os ensaios foram conduzidos *in vitro* por microdiluições em caldo (leveduras planctônicas e células dispersos em biofilme) ou por ensaio XTT (para células sásseis do biofilme), os ensaios *in vivo* foram realizados em camundongos com infecção vaginal causada pelo fungo *C. albicans* e *C. glabrata*, por aplicação de gel contendo a formulação tânica ou taninos combinados com fluconazol), e como resultados os pesquisadores relataram que os taninos poliméricos de proantocianidina obtido do extrato de *S. adstringens* demonstraram ação antifúngica contra *C. albicans* e *C. glabrata* (mesmo as resistentes ao fluconazol), apontando assim sua potencial utilização no tratamento da candidíase vaginal *in vivo* [76].

R. TROLEZI, *et al* (2017) estudou também a ação antifúngica do extrato bruto da casca de *S. adstringens* e tanino puro em estudos comparativos *in vitro* e *in vivo*, contra a cepa de fungos *Pythium insidiosum* (agente patogênico da pitiose, doença infecciosa que pode levar o indivíduo a morte em regiões tropicais e subtropicais)[83].

Foi avaliada no estudo tanto o efeito fungicida como a toxicidade do extrato bruto da casca de *Stryphnodendron adstringens* e do tanino disponível comercialmente em *Pythium insidiosum*, como resultado percebeu-se que as duas substâncias em concentrações variáveis demonstraram atividade fungicida e por microscopia eletrônica de varredura notou-se alterações na superfície da parede celular do patógeno, nos espécimes inoculados com o patógeno houve a formação de lesões e abscessos nodulosos que não foram capaz de ser tratados apenas com o tanino puro ou extrato do *S. adstringens*, sendo necessário então maiores estudos acerca dos efeitos cicatrizantes de ambos diante de um quadro de Pitiose [83].

Pesquisa realizada por AUDI *et al.* (2004) avaliou a atividade biológica e controle de qualidade do extrato do caule de *Stryphnodendron adstringens*. Foram avaliadas as atividades antibacteriana e hipotensora da composição acetona/extrato aquoso e de extratos semi-purificados do caule de *Stryphnodendron adstringens*. O extrato bruto e os extratos semi-purificados apresentaram atividade contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. No entanto, não foi possível confirmar a atividade hipotensiva dos extratos de *Stryphnodendron adstringens*[84].

O controle de qualidade foi realizado com o fármaco vegetal coletado há dois anos, por meio de testes farmacopéicos e envolvendo técnicas cromatográficas. As frações de ambas formulações apresentaram ação antibacteriana bastante similares, entretanto os resultados são promissores para estudos futuros. Porém os dados colhidos no estudo sugerem que o uso

comum do extrato de *S. adstringens* é inadequado para tratamento de hipotensão, bem como redução na pressão arterial em cães, induzidas por diferentes frações das amostras [84].

A ação antisséptica foi estudada por Souza e colaboradores em estudo realizado em 2007, onde os pesquisadores avaliaram a concentração bactericida mínima (CBM) do extrato seco das cascas de *Stryphnodendron adstringens* frente a duas bactérias Gram-positivas e uma bactéria Gram-negativa através da técnica de microdiluição em tubos. A atividade antimicrobiana do extrato seco e a atividade anti-séptica do sabonete líquido contendo o extrato seco foram avaliadas pelo método de difusão em ágar. O extrato apresentou valores de CBM de 50 mgmL<sup>-1</sup> frente a *Staphylococcus aureus* e 75 mgmL<sup>-1</sup> contra *Staphylococcus epidermidis* e *Escherichia coli* e no teste de difusão em ágar, *S. aureus* apresentou maior sensibilidade ao extrato seco que as outras bactérias. O sabonete líquido mostrou maior eficiência na atividade anti-séptica contra as bactérias testadas na concentração de 100 mg de extrato.mL<sup>-1</sup> do sabonete [85].

#### 2.4.6. Efeito anti-inflamatório e antinociceptivo

Em pesquisa realizada por Lima em 1998 avaliou-se a fração solúvel em solvente apolar acetona do extrato cru da casca do caule de *Stryphnodendron adstringens* frente a quadros de inflamação aguda e crônica em camundongos. Os dados obtidos apontaram entre outros efeitos uma inibição significativa do edema da pata do camundongo, houve também um maior volume de exsudato e leucócitos no local da lesão do animal o que levou a um aumento na taxa de recuperação do mesmo e diminuição do inchaço na pata ferida, sendo que o efeito antiinflamatório do extrato cru solúvel em acetona de *S. adstringens* foi comparável ao do fármaco fenilbutazona (uma droga de ação antiinflamatória, antipirética e analgésica. É conhecida também pelo nome "Butacifona" em alguns países) [86].

O efeito antinociceptivo (capacidade que o indivíduo possui de ser sensível à dor) foi avaliado em estudo conduzido por Melo e colaboradores em 2007 demonstra de forma clara a ação antinociceptivo do extrato bruto e frações de *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville "barbatimão". Três modelos experimentais de indução de dor foram usados: contorções abdominais, formalina e placa aquecida. Os resultados demonstraram um efeito antinociceptivo do barbatimão nos modelos experimentais de contorção induzida por ácido acético e dor induzida por formalina. No entanto, os extratos não alteraram significativamente o tempo de latência na placa quente em ratos. Esses resultados sugerem que o extrato de barbatimão tem efeito antinociceptivo periférico [87].

#### 2.4.7. Efeito antiulcerativo e cicatrizante

A atividade antiúlcera do extrato total e das frações de *Stryphnodendron adstringens* foi estudada por Audi e colaboradores (1999) em ratos e comparada com a da cimetidina (utilizada no tratamento de úlcera duodenal, úlcera gástrica benigna, esofagite péptica e outros distúrbios gástricos, devido às atividades de antiácido gástrico e redutor da produção de pepsina). Úlceras foram induzidas em ratos por meio de três modelos experimentais: estresse agudo, etanol acidificado e indometacina. O extrato total e as frações mostraram ter atividade antiúlcera significativa no caso dos modelos de estresse agudo e etanol acidificado. Esses achados apóiam o uso de extratos de *S. adstringens* no tratamento de lesões gástricas [81].

No campo da ação cicatrizante é onde o extrato de *S. adstringens* se destaca, nos estudos realizados por Coelho e colaboradores (2010) avaliou-se a ação cicatrizante de ferimentos cutâneos causados em camundongos, de diferentes substâncias a sulfadiazina de prata (S), extrato de ipê roxo (IR), extrato de *S. adstringens* (B), e solução salina (C), após 30 dias com o ferimento já confeccionado, houve a inoculação das amostras durante o período de 7, 14 e 30 dias, por meio de análise histológica avaliou-se: proliferação vascular, neutrófilo, linfócito, fibroblasto, fibras colágenas e epitelização (evidenciando processo de cicatrização). Como resultados macroscópicos após 14 dias houve epitelização completa nos grupos submetidos aos agentes S, IR e B, A análise dos resultados morfológicos permite inferir que o grupo S, IR e B foram favorecidos no processo de cicatrização das feridas cutâneas, quando comparados com o controle [88].

Hernandes *et al.* (2010) também avaliaram os efeitos cicatrizantes do *S. adstringens* através de aplicação de pomada contendo uma fração acetato de etila 1% obtida de cascas de “barbatimão” em feridas excisionais na pele de ratos após 4, 7 e 10 dias de tratamento. As feridas controle foram tratadas com pomada base, sem extrato. A proliferação dos queratinócitos na área reepitelizada foi avaliada através da contagem do número de queratinócitos bloqueados em metáfase, pelo sulfato de vincristina. O comprimento da margem reepitelizada e a contração das feridas foram mensurados [80].

As feridas tratadas com barbatimão apresentaram um maior número de mitoses do que aquelas tratadas com a pomada base, em todos os tempos avaliados. A aplicação tópica da pomada de “barbatimão” estimulou a proliferação epitelial contudo não teve efeito sobre a migração dos queratinócitos ou sobre a contração das feridas [80].

#### 2.4.8. Efeitos tóxicos

Os estudos de N. C. de SOUSA, *et al.* (2003) visou avaliar os efeitos genotóxicos do extrato da casca do caule de *Stryphnodendron adstringens*, um extrato fitoterápico da casca foi avaliado para efeitos mutagênicos e recombinagênicos usando o teste de mancha de asa de *Drosophila melanogaster* (teste de mutação e recombinação somática, SMART), e para danos cromossômicos em células germinativas usando o Teste de perda do cromossomo sexual de *Dro-Sophila* (perda do anel X)[115]. Para SMART, os cruzamentos da mosca padrão, bem como os de alta bioativação foram usados; o último cruzamento é caracterizado por uma alta sensibilidade a promutágenos e procarcinogênicos[115]. As larvas de terceiro ínstar desses dois cruzamentos foram tratadas por 48 horas com diferentes concentrações (66%, 75% e 100%) do extrato fitoterápico[89].

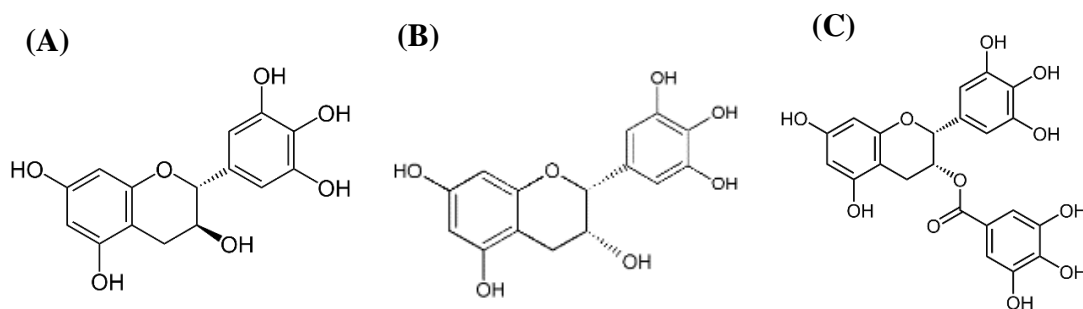
As asas dos adultos emergentes foram analisadas para a ocorrência de diferentes tipos de manchas mutantes. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nas frequências de pontos entre os controles e as séries tratadas. Para o teste de perda do anel-X, os machos adultos foram alimentados com as mesmas concentrações do extrato que no teste da mancha da asa[89]. Não foram observados aumentos estatisticamente significativos nas perdas do anel-X. Os resultados de nossos experimentos sugerem que o extrato fitoterápico da casca do caule de *S. adstringens* não é genotóxico em células somáticas e germinativas de *D. melanogaster* [89].

Almeita em 2010 estudou os efeitos toxicológicos pré-clínico inicial para várias plantas entre elas as folhas de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.), Aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.) e barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville) e do farelo da casca de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.), por meio da determinação da dose letal 50% (DL<sub>50</sub>). Na investigação da DL<sub>50</sub>, foram utilizados grupos de camundongos Swiss de mesmo sexo (n=150, sendo 30 animais por tratamento) inoculados, por via intraperitoneal, com diluições seriadas do extrato hidroalcoólico das folhas de alecrim, aroeira, barbatimão e do farelo da casca de pequi. Após a inoculação, os animais foram observados por um período de 14 dias, para determinar a quantidade de mortos, doentes e sobreviventes. O estudo toxicológico pré-clínico agudo, em camundongos por via intraperitoneal, demonstrou toxicidade igual a 0,31mg mL<sup>-1</sup>DL<sub>50</sub>mL<sup>-1</sup> para todas as plantas, exceto para o barbatimão, que apresenta toxicidade igual a 0,25 mg mL<sup>-1</sup>[90].

#### 2.4.9. Composição bioquímica

O *Stryphnodendron adstringens* é composto por importantes substâncias que proporcionam os efeitos farmacológicos pesquisados, entre eles: taninos, alcaloides, terpenos, estilbenos, esteroides, inibidores de protease (tripsina), flavonóides, polifenóis, proantocianidinas, ácido gálico e galocatequina. Para a farmacopeia brasileira define que para efeitos farmacológicos a quantidade mínima de taninos totais na casca do *Stryphnodendron adstringens* deve ser de 8% ou mais, dos quais 0,2 mgg<sup>-1</sup>, devem ser composta por ácido gálico e 0,3 mgg<sup>-1</sup> de galocatequina (monômero dos taninos condensados) [91].

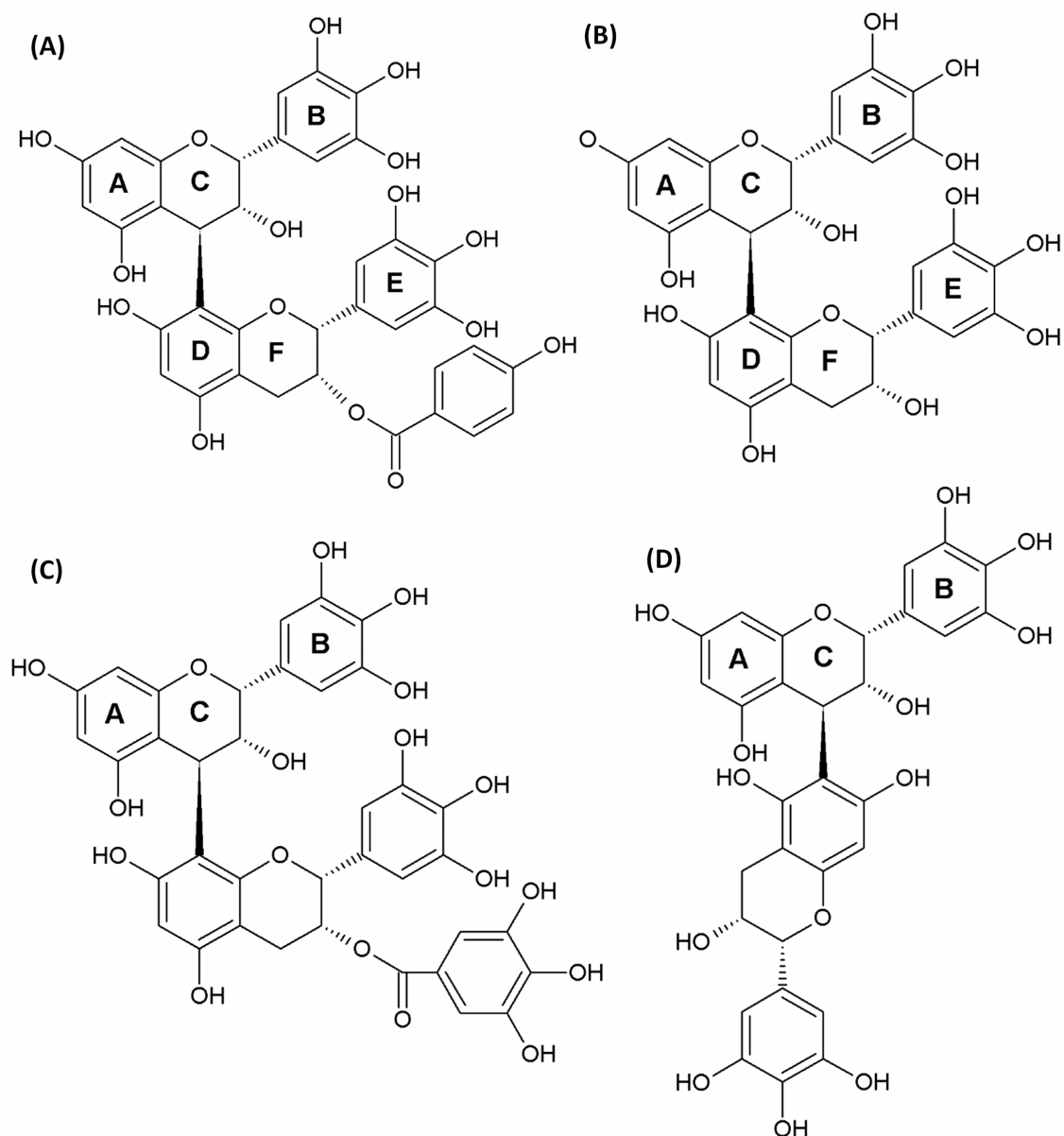
Em estudo de MELLO *et al.* (1996), a composição química do extrato da casca do caule de *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville, foi apresentada, desta forma foi possível identificar e isolar seis Flavan-3-ols e oito Proantocianidinas, ambos compostos fazem parte do grupo de substâncias denominadas taninos condensados, essas moléculas são o que garante atividade farmacológica ao extrato, este grupo fenólico pode conter de duas a 50 unidades flavonóides e possuem estruturação complexa, com resistência a hidrólise, porém podem ser solúveis em solventes orgânicos aquosos, de acordo com sua estrutura. Cromatografia múltipla em Sephadex e cromatografia líquida contracorrente (CCC) da fração de acetato de etila originada de um extrato acetona-H<sub>2</sub>O da casca do caule seca ao ar de *S. adstringens* produziu os compostos 1-14. Três flavonóides base para os demais foram identificados como Galocatequina (Fig.15(A)), Epigalocatequina (Fig.15(B)) e Galato-3-epigalocatequina (Fig.15(C))[92].

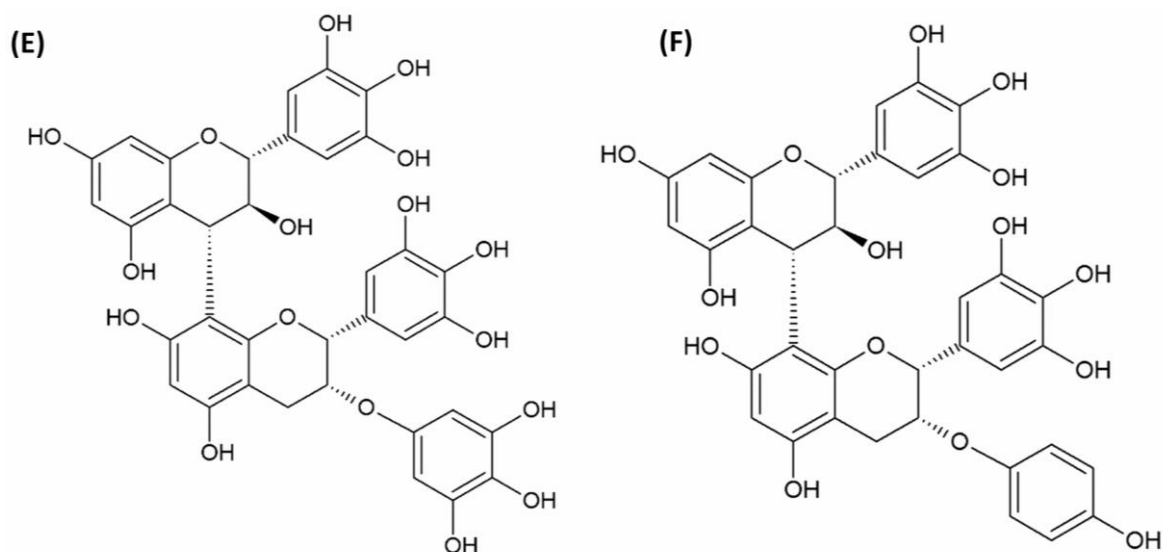


**Figura 15.** Galocatequina (A), Epigalocatequina (B) e Galato-3-epigalocatequina (C). Fonte:  
Elaborada pelo autor.

Outras substâncias pertencentes ao grupo dos taninos condensados, as seguintes prodelfinidinas (também flavonóides) foram isoladas, a Epigalocatequina-(4 $\beta$ →8)-

epigallocatequina-3-O-(4-hidroxi)benzoato Figura 16(A), epigallocatequina-(4 $\beta$ →8)-epigallocatequina Figura 15(B) e epigallocatequina-(4 $\beta$ →8)-epigallocatequina-3-O-galato Figura 16(C). Prodelphinidinas diméricas também foram isoladas com sucesso, entre elas destacam-se três, a epigallocatequina-(4 $\beta$ →6)-epigallocatequina Figura 16(D), Galocatequina-(4 $\alpha$ →8)-epigallocatequina-3-O-galato Figura 16(E), e Galocatequina-(4 $\alpha$ →8)- epigallocatequina-3-O-4-hidroxibenzoato Figura 16(F)[92,36].





**Figura 16.** Estrutura molecular de cada prodelfinidina (taninos condensados) já encontrada no extrato cru da casca do caule de *Stryphnodendron adstringens*, Fonte: adaptado de [93].

Diante da quantidade de flavonóides pertencentes ao grupo dos taninos condensados fica evidente a viabilidade da planta *Stryphnodendron adstringens* como fonte renovável desses metabólitos, que são de extrema valia para a indústria farmacêutica, como pode ser visto na Tabela 3.

**Tabela 3.** Apanhado do custo em dólar dos principais compostos que foram identificados em predominância no extrato cru da casca de *Stryphnodendron adstringens*.

Custo por cada molécula no mercado mundial (\$USD)	Quant.(mg)	Preço (USD)	Vendedor
Galocatequina	100,0	500,00	© PI Chemicals Ltd.
Epigalocatequina	50,0	100,00	© BiosynthCarbosynth
Epigallocatechin gallate hydrate	50,0	50,00	© AK Scientific Inc.
Epigallocatechin-3-(3''-O-methyl) gallate	1,0	476,00	© MedChemExpress
Epigallocatechin-3-O-gallate	50,0	749,00	© Sigma-Aldrich
Epigallocatechin-2,3,4- <sup>13</sup> C <sub>3</sub> *	1,0	783,00	© Sigma-Aldrich

Fonte: elaborada pelo autor.

Além das substâncias orgânicas comumente encontradas na casca de *S. adstringens*, também encontram-se elementos inorgânicos advindos da absorção de nutrientes do solo e pela reação de fotossíntese da planta, bem como pela genética e bioma ao qual a planta está sujeita.



A análise da concentração desses elementos implica em identificar os componentes por análise elementar do extrato seco após etapas de secagem, trituração, maceração em solvente orgânico, permanência por 7 dias a temperatura ambiente, e para finalizar o extrato bruto foi filtrado e separado do solvente e seco em estufa até peso constante [94]. Os valores obtidos nem sempre apresentavam massas representativas, posto que, alguns elementos estavam presentes em quantidades traços. Para contextualização as análises focaram nos elementos ditos essenciais à manutenção da saúde dos seres vivos como Ca, Fe, K, Mg, Mn,

Rb e Zn, a quantidade desses elementos e outros não tão relevantes na dieta alimentar dos animais, mas pode ser de interesse farmacológico presentes no extrato de *S. adstringens*, pode ser verificado na Tabela 4.

**Tabela 4.** Valores encontrados para alguns elementos em análise instrumental de nêutrons (INAA) do extrato de casca do *Stryphnodendron adstringens*. Valores correspondem a concentração em  $\text{mg.g}^{-1}$  e sua medida de incerteza por propagação de erro [94].

Elemento químico	Concentração ( $\text{mg.g}^{-1}$ )	Incerteza $\pm 1\sigma$	Elemento químico	Concentração ( $\text{mg.g}^{-1}$ )	Incerteza $\pm 1\sigma$
As	0,0110	0,002	Se	0,0180	0,0030
Ba	3,0000	0,200	Ta	0,0007	0,0001
Br	0,2890	0,004	Th	0,0170	0,0010
Ca	302,00	47,00	U	0,0057	0,0006
Co	0,0108	0,0009	Zn	6,3000	0,2000
Cr	0,4500	0,4500	Zr	4,7000	0,4000
Cs	0,0160	0,0010			
Fe	39,400	0,4000			
Hf	0,0028	0,0002			
K	-	-			
Na	455,00	11,000			
Rb	9,3000	0,3000			
Sb	0,1140	0,0040			
Sc	0,0040	0,0001			

Fonte: elaborada pelo autor.

Diante do atual panorama industrial e ambiental que requer métodos cada vez mais simples, de baixo custo, com elevada reprodutibilidade, baixo potencial danoso ao meio ambiente e alinhado com os princípios da química verde, neste ponto a fotossíntese verde de nanopartículas de cloreto de prata utilizando extrato de *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville se torna uma alternativa viável, assim sendo o presente estudo visa produzir, caracterizar e aplicar a contra alguns microrganismos patogênicos essas nanopartículas.

### 3 Objetivos

- Sintetizar por método fotoquímico nanopartículas de AgCl utilizando extrato vegetal da Casca do caule da leguminosea *Stryphnodendron adstringens*;
- Caracterizar fisicoquimicamente as nanopartículas obtidas por métodos de difração de raios-X (DRX), espectroscopia Uv-vis, espectroscopia no infravermelho com transformata de Fourir (FT-IR), espectroscopia de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), potencial zeta e espalhamento dinâmico de luz (DLS), microscopia eletrônica de transmissão (MET), microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de raios X por dispersão em energia (EDX);
- Identificar o grau de toxicidade das nanopartículas nas concentrações de trabalho, através de testes de citotoxicidade *in vitro*.
- Atestar a atividade antifúngica contra a cepa *Cryptococcus neoformans*, utilizando a técnica de concentração mínima inibitória (MIC);
- Atestar a atividade antibacteriana contra as cepas Gram-negativas *P. aeruginosa* e *S. marcescens*, e Gram-positivas *S. aureus* e *S. epidermidis*, utilizando a técnica de concentração mínima inibitória (MIC);

## 4 Metodologia

### 4.1. Extrato bruto de *Stryphnodendron adstringens*

Pedaços da casca do caule de *Stryphnodendron adstringens* foram coletados em Teresina, estado do Piauí, Brasil (LAT. 04 ° 38'38.19 " / LONG. 42 ° 30'30.47"), a coleta (raspas da parte fibrosa interna da casca Figura 13(B)) ocorreu em maio de 2019. Na estação chuvosa da região, a planta foi identificada pelos habitantes da região, coletada e posteriormente confirmada por investigação no site do banco de dados “plantlist.org”, bem como via fotografias pela especialista Profa. Dra. Ana Paula Fortuna-Perez da UNESP/Campus Botucatu. O material foi lavado e preservado à temperatura ambiente por quatro semanas ao abrigo de luz, o material foi então triturado até que adquirisse uma característica de um fino pó e armazenado para uso posterior.

A metodologia de fabricação do extrato bruto da casca do caule de *S. adstringens* consistiu em pesar 20 g do pó da casca previamente seca à temperatura ambiente, adicionando 200 mL de água destilada e aquecendo a 70°C por 40 minutos com agitação moderada (utilizando um agitador magnético), após resfriar a decocção, procedeu-se com a filtração em papel de filtro de 80 g/m<sup>2</sup>, e depois armazenou-se o filtrado a 8 °C para uso posterior [95].

### 4.2. Síntese de nanopartículas de prata assistidas por extrato cru da casca do caule de *S. adstringens* (Martius) Coville por fotossíntese.

Todos os reagentes de padrão analítico utilizados neste estudo têm alto grau de pureza, sem nenhum tratamento prévio para a biossíntese das nanopartículas de prata, solução AgNO<sub>3</sub> de nitrato de prata 1,0 mM (Sigma-Aldrich) em quantidade equimolar de tampão Tris HCl, um volume total de 25 mL contendo 1 mM de Tris-HCl pH 8, solução 1 mM de AgNO<sub>3</sub> e 1,0 mg de extrato vegetal de *S. adstringens*, foi irradiado por 40 minutos por luz azul (comprimento de onda máximo de 464 nm e intensidade de 0,32 mW/cm<sup>2</sup> em 7 cm) à temperatura ambiente, sem agitação. O controle da síntese das nanopartículas foi realizado na ausência do extrato da planta.

Espectrofotômetro (Biochrom Libra) foi usado para medir a absorbância na faixa de comprimento de onda de 200 a 800 nm. Após a síntese, as nanopartículas foram lavadas 4 vezes por centrifugação em rotação de 5000 rpm, com cada rotação durando 4 minutos, para remover partículas menores e torná-las uniformes, bem como para remover frações orgânicas do extrato que permaneceu em solução, por fim o material sólido separado foi solubilizado em 5,0 ml de

água ultrapura, a fim de manter concentração constante para futuras caracterizações e aplicações.

#### 4.3. Caracterização das nanopartículas obtidas por síntese biogênica com extrato cru de *S. adstringens*.

A formação bem como composição das nanopartículas foi acompanhada por espectroscopia UV-Vis usando um espectrofotômetro de feixe duplo (Biochrom Libra), na faixa de varredura de 200-800 nm, com resolução de 1,0 nm. O espectro de absorção depende das propriedades da molécula em questão. O pico de ressonância plasmônica de superfície (RPS) é um parâmetro natural e único de muitos nanomateriais, portanto, a presença desse pico, entre outras coisas, pode confirmar a presença de nanopartículas de prata, seu tamanho médio e sua estabilidade em dispersões coloidais [112]. O tamanho hidrodinâmico médio e a distribuição do tamanho de partícula foram identificados pela técnica de espalhamento dinâmico de luz usando um Zetasizer Nano-ZS (Malvern), a temperatura da amostra foi de 25 °C em um ângulo de detecção de 173°, a análise foi realizada em triplicata com diluições 300 µL usando água ultrapura.

O ensaio de potencial zeta ( $\zeta$ ) foi realizado em equipamento (Zetasizer Nano-ZS (Malvern)), e os resultados foram expressos com a identificação da média e desvio padrão das análises. A análise total de  $\text{Ag}^+$  foi identificada em ensaio de ICP-MS Agilent 7900 (Hachioji, Japão), controlado pelo MassHunter™ Software (versão C.01.03, 2017). O ICP-MS foi operado com argônio de alta pureza (99,999%, White Martins, Brasil), todos os reagentes utilizados no ensaio foram de grau analítico, exceto ácido nítrico a 65% (Synth, Brasil) que foi purificado por Savillex™ DST-1000 (Minnetonka, EUA).

A calibração do equipamento foi realizada usando a Solução Agilent Tuning para ICP-MS contendo Li, Mg, Y, Ce, Ti e Co em 1 µg L<sup>-1</sup> em HNO<sub>3</sub> a 2% v v<sup>-1</sup>. Uma solução padrão de  $\text{Ag}^+$  1000 mgL<sup>-1</sup> (Merck, Alemanha) foi usada para calibrações. Tubos de plástico isentos de metal (Falcon®, Corning, Tamaulipas, México) foram utilizados para a preparação da amostra.

As amostras de nanopartículas metálicas foram digeridas usando 100 µL da amostra em concentração previamente desconhecida com 1 mL de HNO<sub>3</sub> purificado. Esta solução foi mantida a 96 °C durante 4 horas e diluída até 50 mL. O processo de diluição foi realizado mais duas vezes, considerando a concentração desconhecida da amostra e a sensibilidade do sistema ICP-MS.

Para identificar a cristalinidade do material e o tamanho do cristalito, foi realizada análise de difração de raios-X (DRX), as amostras foram preparadas em um suporte de amostra de silicone e analisadas em uma faixa de 20° a 90° (ângulo 2θ, etapas de 0,015) usando um STADI-P (Stoe ®, Darmstadt, Alemanha), foi usado para registrar a difração de raios X em pó, detector Vantec-1, com uma fonte de radiação Cu Kα<sup>1</sup> (λ = 1.54056 Å), tensão de 40 kV e corrente de 40 mA, 200 s de tempo de integração a cada 1,05°. O tamanho do cristalito das nanopartículas de cloreto de prata assistidas por *S. adstringens* foi calculado pela equação de Debye-Scherrer (eq-2) [96].

$$D = (k\lambda) / (\beta \cos \theta) \quad (2)$$

onde "D" é o tamanho do diâmetro do cristalito, "λ" é o comprimento de onda da radiação CuKα, "β" é o pico máximo à meia altura (FWHM), "θ" é o ângulo de difração de Bragg e K é uma constante geralmente 0,94 é usado como uma representação de um cristalito esférico com simetria cúbica.

As imagens das nanopartículas foram obtidas por Microscopia eletrônica de transmissão (MET) utilizando microscópio Eletrônico de Transmissão (modelo Libra 120, Carl Zeiss, Alemanha) com tensão de aceleração de 120 kV e emissão termiônica em filamento LaB<sub>6</sub> (hexaboreto de lantânio).

As amostras foram depositadas em telas formvar/carbono em uma grade de cobre de 400 mesh. Imagens de Microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) em microscópio eletrônico com efeito de campo (MEV-FEG) JEOL JSM-6701F, operando entre 5 e 10 kV, 1nm(30kV)–2.2nm(1.2kV), Magnificação: 25x a 650.000x, para obtenção de imagens da superfície, morfologia e tamanho das nanopartículas. A Espectroscopia de raios-X por energia dispersiva (EDX) foi utilizada para identificar a composição elementar das nanopartículas obtidas utilizando o sistema de EDX acoplado ao microscópio Jeol JSM-6010LA.

#### 4.4 Ensaio de citotoxicidade das nanopartículas de AgCl de *Stryphnodendron adstringens* (NPsAgClSa)

##### 4.4.1 Cultura de células

Para os experimentos *in vitro*, em que culturas de células foram necessárias, foi utilizada a linhagem de células Vero [97]. A cultura foi mantida com meio de cultura HAM-F10 suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) em incubadora a 37° C, 5% de CO<sup>2</sup> e ambiente umidificado.

##### 4.4.2. Citotoxicidade *in vitro*

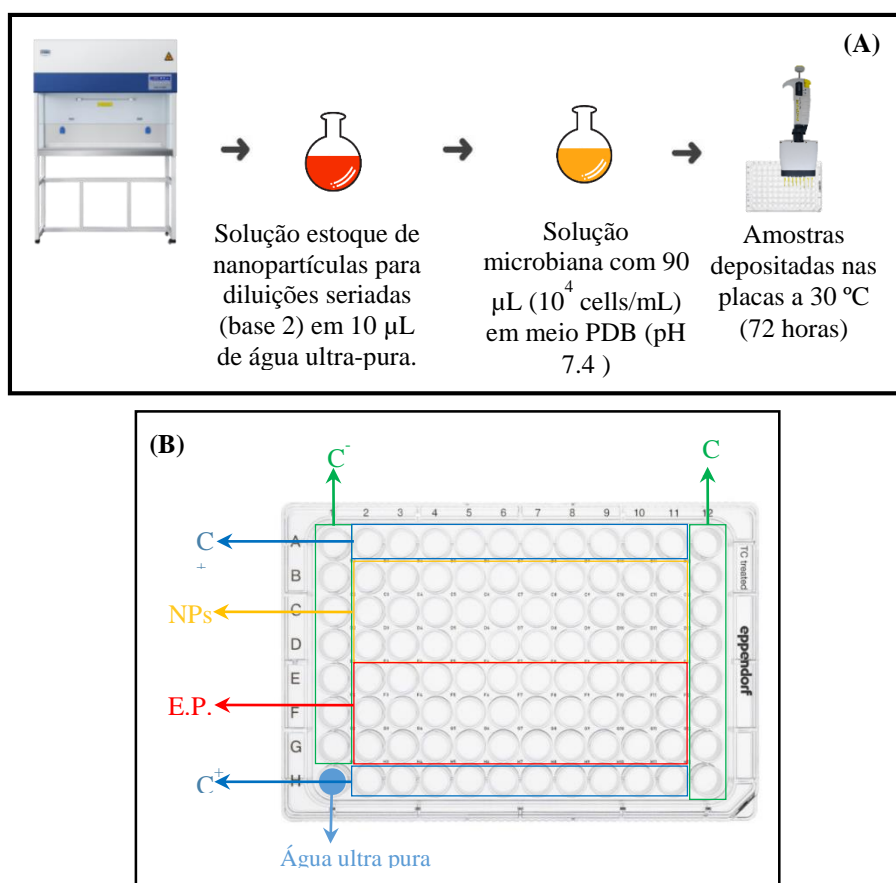
O ensaio de citotoxicidade foi realizado seguindo os parâmetros estabelecidos no conjunto internacional de normas ISO 10993 [99]. Em uma placa de múltiplos poços, foram semeadas aproximadamente 1,5 x 10<sup>4</sup> células por poço e, quando uma monocamada quase confluyente foi estabelecida, o meio de cultura foi substituído por soluções das nanopartículas de prata diluídas em um meio de cultura, com concentrações iniciais de 163,8 µg.mL<sup>-1</sup> (aferidas pelo ensaio de ICP-MS) a 0,0199 µg.mL<sup>-1</sup> (diluições seriadas). Para controle positivo (C<sup>+</sup>) da citotoxicidade, foi utilizado dimetilsulfóxido (DMSO) (Synth) diluído em meio de cultura até a concentração de 50% e, para controle negativo (C<sup>-</sup>), foi utilizado meio de cultura sem nanopartículas.

As culturas celulares foram deixadas em contato com as amostras por um tempo de 24 horas. Após este período, o meio de cultura foi removido e todos os poços foram lavados com solução tampão de fosfato 1M (pH 7,4). Em seguida, foram adicionados em cada poço 100 µL de uma solução de tetrazólio (MTT) de 0,5 mg.mL<sup>-1</sup> em meio de cultura sem SBF [98,100].

A cultura foi incubada por 2 h com a solução MTT, que foi, então removida e foi utilizada uma solução de DMSO puro para solubilizar os cristais de formazan formados a partir da metabolização do MTT dentro das mitocôndrias das células vivas. Em seguida, os resultados foram obtidos por uma análise colorimétrica em um leitor de microplacas, quantificando a absorbância a 570 nm. A viabilidade celular de cada amostra foi obtida como proporcional diretamente em relação à absorbância e calculada em porcentagens, sendo o controle negativo de 100%. Uma amostra foi classificada como citotóxica se resultasse em viabilidade celular de 70% ou menos [98,100].

#### 4.5. Ensaio de atividade antimicrobiana das nanopartículas de cloreto de prata (NPsAgClSa)

As atividades antimicrobianas das nanopartículas de cloreto de prata foram avaliadas pelo teste de concentração mínima inibitória 80% (MIC<sub>80</sub>) contra a levedura *Cryptococcus neoformans* (ATCC 56990). O caldo de dextrose de batata (Invitrogen®) foi utilizado para antifúngicos. A levedura ( $1 \times 10^4$  UFC/mL) foi incubada com diluições em série fracionada por base 2 das NPsAgClSa em microplaca de 96 poços a 30 °C, sob agitação branda. Após 18-24 h, o crescimento microbiano foi avaliado medindo a absorbância a 595 nm em um leitor de microplacas Multiskan Go (Thermo Scientific®, EUA). A concentração inibitória mínima (MIC<sub>80</sub>) das nanopartículas foi definida como a menor concentração que inibe pelo menos 80% do crescimento microbiano quando comparada ao controle positivo (leveduras não tratadas). Os ensaios foram repetidos pelo menos duas vezes em triplicata e os valores médios tratados estatisticamente, Figura 17 (A) e (B).



**Figura 17.** (A) esquema preparo das soluções estoques das NPsAgClSa e colônia microbiana (B) Subdivisão de microtitulação em placa de múltiplos poços, sendo [C<sup>-</sup>] controle negativo, [C<sup>+</sup>] controle positivo, [NPs] NPsAgClSa, [E.P.] extrato puro. Fonte: elaborado pelo autor (2019)

A figura 17 (B) apresenta em detalhes a forma de microtitulação de cada poço na placa de múltiplos poços, sendo então  $C^- = 100 \mu\text{L}$  de meio PDB controle negativo,  $C^+ = 90 \mu\text{L}$  do microrganismo +  $10 \mu\text{L}$  de água controle positivo, NPs =  $90 \mu\text{L}$  do microrganismo +  $10 \mu\text{L}$  das NPsAgClSa (diluídas em série), E.P. =  $90 \mu\text{L}$  de PDB +  $10 \mu\text{L}$  de extrato puro de *S. adstringens* para constatar efeitos antimicrobianos intrínsecos ao extrato puro.

## 5. Resultados e discussão

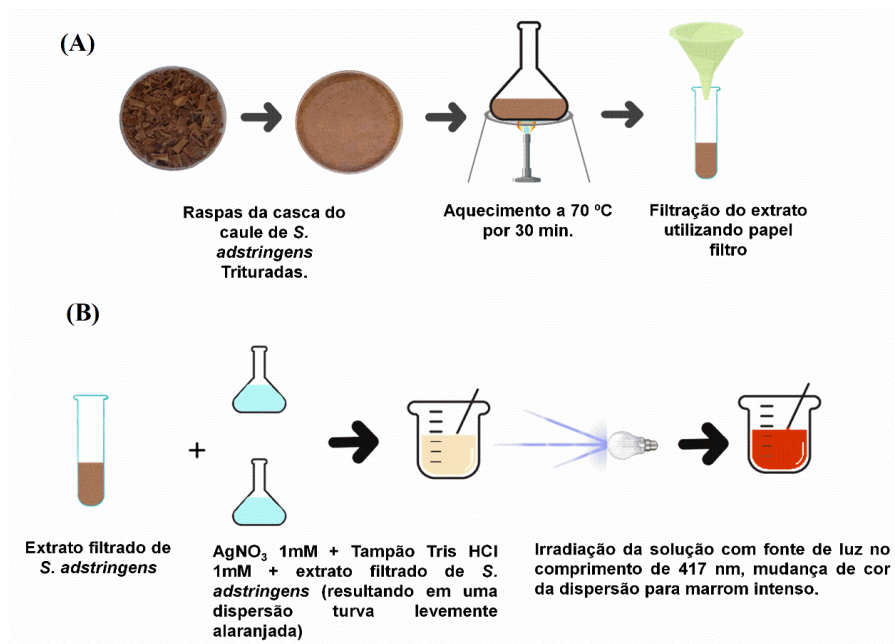
### 5.1 Síntese verde de nanopartículas de prata assistida por *S. adstringens*

A dispersão foi preparada em meio aquoso após um processo de redução química na presença de extrato bruto da casca do caule de *Stryphnodendron adstringens* (1,5 mL) como agente redutor e estabilizante, misturado com solução de  $\text{AgNO}_3$  em uma concentração de 1,0 mM (0,83 mL) e tampão Tris-HCl ajustado a pH 8,0 na mesma concentração (2,5 mL). Antes da síntese, a dispersão sem o extrato de *S. adstringens* apresentou uma cor turva esbranquiçada, porém após a adição do extrato bruto, mudou para uma coloração levemente alaranjada devido à cor característica do extrato, e após 30 min com exposição à radiação no comprimento de 464 nm (luz azul) e uma potência de  $0,32 \text{ mW/cm}^2$  adquiriu uma cor marrom intensa, evidenciando a formação das nanopartículas (Figura 18).

A concentração de prata total na amostra, obtida por ICP-MS após a síntese e lavagem, foi de aproximadamente  $163,8 \mu\text{g/mL}$ , sendo que essa concentração é o que possivelmente condiciona o efeito antimicrobiano das nanopartículas em relação às cepas em estudo.

A figura 18 (A) ilustra a preparação do extrato bruto de *Stryphnodendron adstringens*. (Extrato de casca de barbatimão) - cortamos o *Stryphnodendro adstringens* (limpo e seco) em pequenas hastes e triuramos em pó e depois aquecemos a solução por 30 min a  $70^\circ\text{C}$ . Em seguida esperamos esfriar e filtramos em papel de filtro, uma alíquota foi separada e armazenada a  $8^\circ\text{C}$  para a síntese em sequência. A Figura 18 (B) mostra a síntese fotoquímica verde das nanopartículas assistidas pelo extrato da casca de *S. Adstringens*. O extrato filtrado e misturado à solução salina de  $\text{AgNO}_3$  resultou numa solução levemente alaranjada em decorrência do pigmento natural do estrato de “barbatimão” após a irradiação a solução apresentou uma forte mudança de cor para marrom, evidenciando a formação das nanopartículas de cloreto de prata).

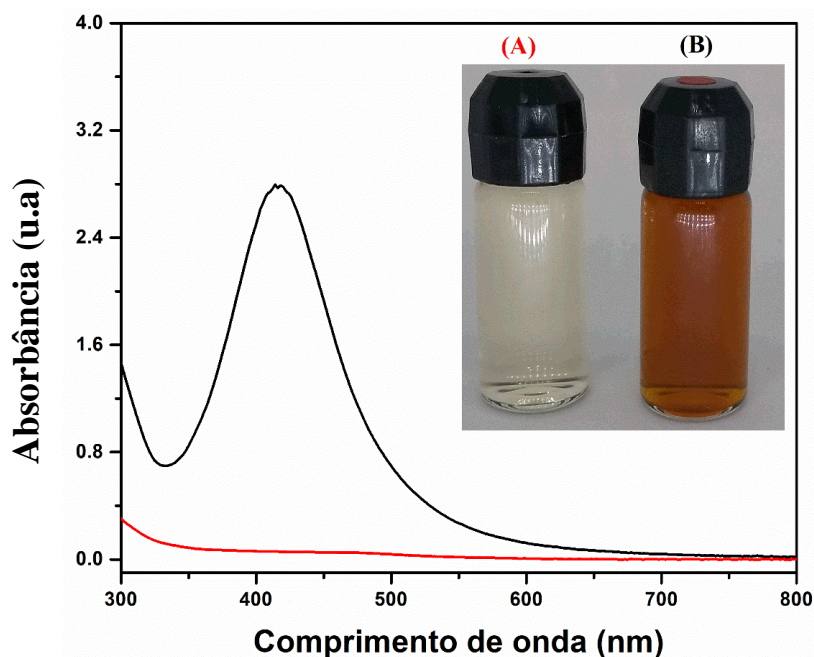




**Figura 18.** (A) preparo do extrato vegetal de *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville. (B) uso de extrato de *S. adstringens* na síntese fotoquímica de nanopartículas de cloreto de prata. Fonte: Elaborada pelo autor.

## 5.2 Espectroscopia UV-Vis das nanopartículas obtidas pela síntese verde

A análise de espectroscopia no UV-Vis foi utilizada para identificar a formação de nanopartículas. Essa análise foi realizada na faixa de 200 à 800 nm e a curva de absorção obtida mostrou um pico único muito proeminente (Figura 19) com o máximo de absorbância em 414 nm (chamado pico de ressonância plasmônica de superfície (RPS), característica das nanopartículas e aparece em dispersões coloidais de prata na faixa entre 390 e 530 nm) [67], enquanto que a amostra controle sem a presença do extrato de *S. adstringens* não apresentou a mesma absorção Figura 19 (A), por tanto pode-se inferir que as nanopartículas se apresentam heterogêneas em relação à distribuição de tamanho e que seu pico de absorbância é compatível com a literatura [67].



**Figura 19.** Curva de espectroscopia de UV-vis do controle (A) (controle) sem a presença do extrato bruto de *S. adstringens* e (B) dispersão coloidal de prata após síntese verde absorvância em 414 nm de banda de ressonância plasmônica de superfície (RPS). Fonte: Elaborado pelo autor.

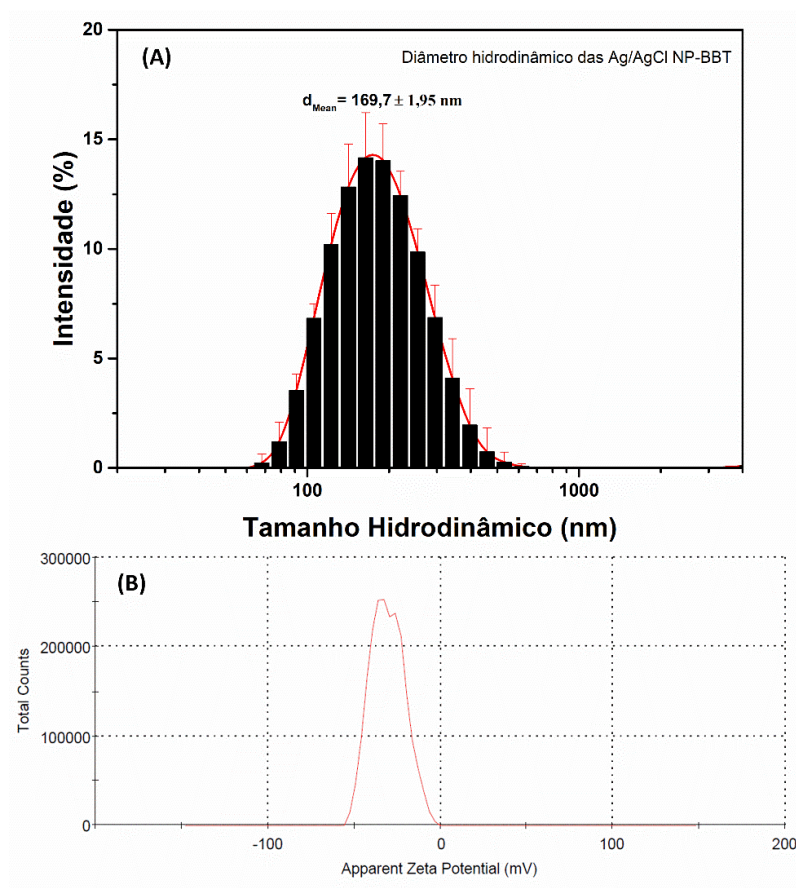
### 5.3 Espalhamento dinâmico de luz (DLS) e potencial zeta ( $\zeta$ )

A análise de espalhamento dinâmico de luz (DLS) apresenta um perfil da distribuição média dos tamanhos das nanopartículas, na qual é uma análise óptica que também é muito afetada pelos diferentes tamanhos das nanopartículas, principalmente em consequência das variações de tamanhos (partículas maiores) que acabam por ocultar as variações de partículas menores [113], portanto, podem fornecer informações de que existem em maior quantidade partículas grandes que partículas pequenas, mas quando analisadas em conjunto com outras técnicas, como imagens de microscopia (MET) e difratogramas (DRX), pode ser uma análise complementar a seus resultados, sendo que as nanopartículas de cloreto de prata demonstraram um perfil de distribuição de tamanho hidrodinâmico monomodal cujo valor é  $169,7 \pm 1,95$  nm Figura 20 (A), seu valor de índice de polidispersividade (PdI) de 0,15 com desvio padrão (SD) de 0,024.

Os valores comprovaram a predominância de um tamanho suficientemente uniforme de NPs ao aplicar o processo de fotossíntese verde com extrato da casca do caule de *S. adstringens*, vale ressaltar também que estes valores de PdI são dificilmente alcançados, mas são buscados pela maioria dos processos de síntese de nanopartículas, seja por via química, física ou

biológica, lembrando que o valor de PDI varia de 0 a 1, sendo que, quanto menor o valor, mais monodispersa, e consequentemente menor será a variabilidade populacional de tamanhos distintos do nanomaterial.

O valor médio do potencial zeta das nanopartículas foi de -30,3 mV, SD 0,265 Figura 20(B). O elevado valor negativo das nanopartículas se deve principalmente ao revestimento das nanopartículas, o material orgânico provavelmente originado dos polifenóis e proteínas que recobrem a NP, conferindo às mesmas grande estabilidade eletroforética e impedimento estérico [28].



**Figura 20.** (A) Histograma mostrando a distribuição de tamanho das nanopartículas, com um perfil monomodal e (B) Distribuição de potencial zeta (mV) mostrando um pico predominante de -37 mV e outra -22,5 mV, o valor médio do ( $\zeta$ ), através da média aritmética, é de aproximadamente -30 mV, com SD 0,265. Fonte: Elaborado pelo autor.

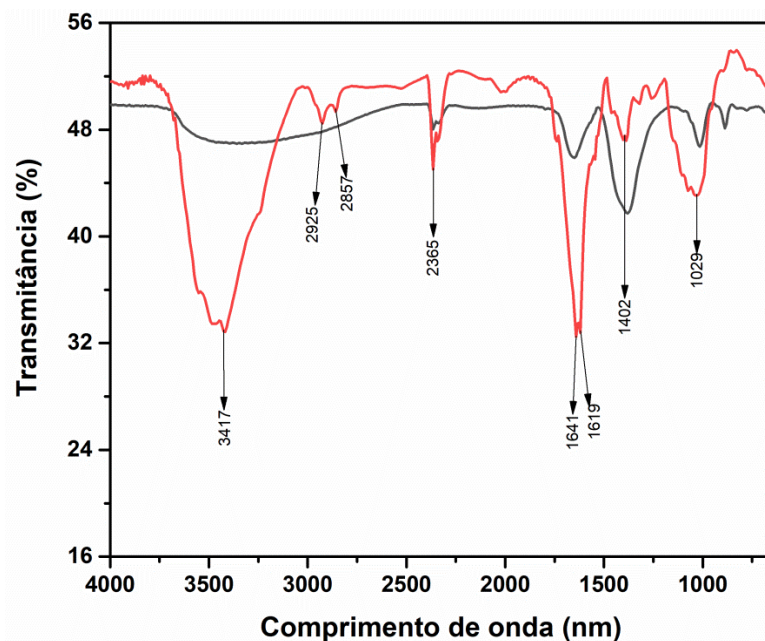
#### 5.4 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

As análises por FT-IR são importantes para confirmar a presença de agentes fotoquímicos (substâncias químicas reativas à luz) que revestem a superfície das nanopartículas

de prata e verificar a presença desse material na matriz do extrato vegetal, que pode atuar na estabilização e revestimento das nanopartículas, bem como a sua total remoção após o processo de lavagem das mesmas. Já se sabe que as moléculas presentes nos extratos de plantas e alguns fungos atuam como agentes redutores de  $\text{Ag}^+$  a  $\text{Ag}^0$  e sua estabilização, a fim de obter nanopartículas de Ag [101].

A Figura 21 mostra análises de FT-IR para o extrato bruto e das nanopartículas obtidas após lavagem e secagem, onde a Figura 21 (vermelho), mostra o espectro do extrato bruto da casca do caule de *S. adstringens*, é possível observar um pico intenso e largo em torno de  $3.417\text{ cm}^{-1}$  relacionado à vibração de estiramento do grupo hidroxila (O–H), essa banda é característica dos compostos polifenólicos, em  $2.925\text{ cm}^{-1}$  e  $2.857\text{ cm}^{-1}$  existem dois picos fracos que são característicos dos compostos alcoólicos, não foi possível identificar os dupletos em  $2.365\text{ cm}^{-1}$ , em  $1.641\text{ cm}^{-1}$  e  $1.619\text{ cm}^{-1}$  temos uma vibração de estiramento do grupo carboxila (C = O), possivelmente atribuída a deformações do anel aromático dos polifenóis, entre  $1.402\text{ cm}^{-1}$  e  $1.261\text{ cm}^{-1}$ , existem quatro picos pouco intensos, mas visíveis, chamados "oscilação harmônica" decorrente da vibração C = C dos anéis aromáticos dos componentes fenólicos do extrato, o pico médio e largo em  $1.029\text{ cm}^{-1}$  pode ser atribuído à vibração de estiramento do C-O-C [102].

Como o extrato obtido não passou por nenhum processo de purificação prévio, como cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) ou colunas de separação cromatográficas, as frações de ácido gálico, prodelphinidinas, catequinas e outros flavonóides que possuem grupos funcionais com coeficientes de absorção muito semelhantes [92], dificilmente são distinguíveis no espectro FT-IR, no entanto, como o objetivo da técnica é identificar a participação desses polifenóis na estabilização e redução de  $\text{Ag}^+$  para  $\text{Ag}^0$ , formando as nanopartículas, pode-se inferir que a Figura 21 (preto) correspondente as nanopartículas após a lavagem apresentou diferenças visíveis quando comparado ao extrato bruto, como o pico correspondente ao grupo -OH que diminuiu consideravelmente, pois esse grupo sofre oxidação no processo de síntese em meio aquoso, sendo possivelmente a sua deshidrogenação um indicativo da pureza final das nanopartículas após a sua lavagem por centrifugação, além dessa deshidrogenação em meio aquoso pode contribuir com a redução dos íons  $\text{Ag}^+$  a  $\text{Ag}^0$  [114].



**Figura 21.** Espectros de FT-IR de extrato cru da casca do caule de *S. adstringens* (Vermelho) e suspensão coloidal contendo as nanopartículas sintetizadas (Preto). Fonte: Elaborada pelo autor.

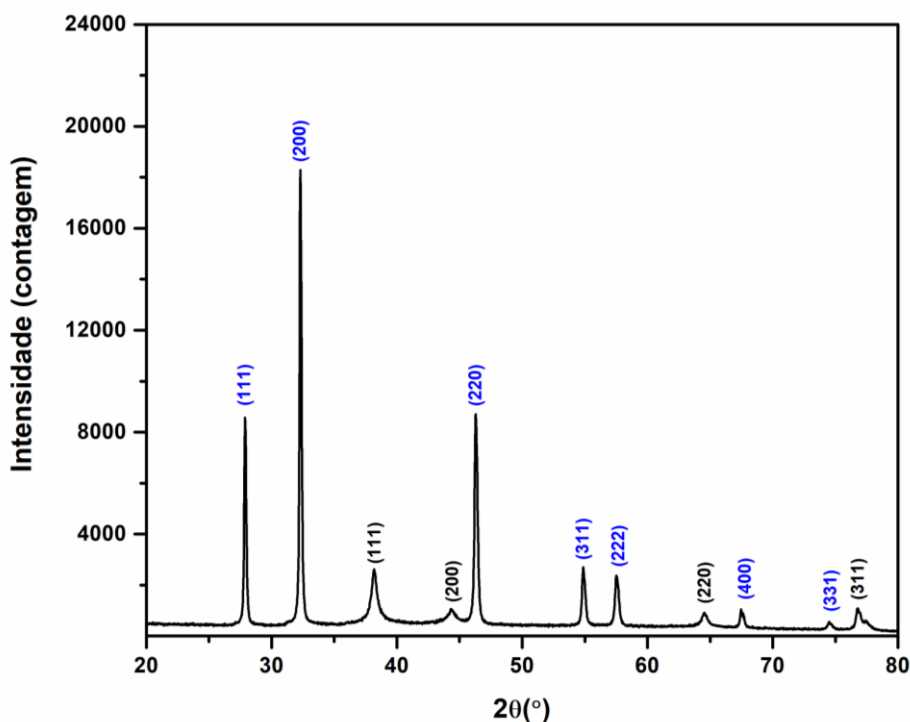
### 5.5 Análise de difratometria de raios-X (DRX) das nanopartículas

Utilizando a análise de difração de raios-X (DRX), foi possível identificar a predominância da natureza cristalina do nanocompósito obtido. A análise desta nanopartícula pode ser vista na Figura 22 (preto) e apresenta os valores dos seguintes picos  $2\theta$  em 38,22 °, 44,30 °, 64,50 ° e 76,76 °, que estão associados aos planos [111], [200], [220] e [311], apresentando a estrutura CFC (Cúbica de face centrada) de prata em acordo com o padrão (JCPDS - arquivo 04-0783) [103,67].

Outro padrão de DRX apresentou outros sete picos nos valores de  $2\theta$  em 27,88°, 32,29°, 46,29°, 54,88°, 57,57°, 67,48° e 74,55° correspondentes aos planos [111], [200], [220], [311], [222], [400] e [331] Figura 22 (azul), respectivamente, sendo esse padrão identificado como a estrutura CFC das nanopartículas de acordo com (arquivo JCPDS 85-1355)[104,9], confirmando a coexistência de ambas as estruturas cristalinas com o perfil cristalográfico CFC [8].

O tamanho médio do cristalito foi calculado usando a equação de Debye-Scherrer (eq. 1) e o tamanho médio de 29,21 nm foi encontrado, sendo este valor inferior ao encontrado através das análises de DLS, que resultaram em um valor de 169,7, este valor corresponde ao seu diâmetro hidrodinâmico, em que as nanopartículas se encontram solvatadas pelo solvente (água), desse modo espera-se realmente uma diferença de tamanhos entre ambas análises.

Apesar da heterogeneidade das nanopartículas essa faixa de tamanhos predominante aponta para um tamanho controlado e aproximado entre as nanopartículas [8].



**Figura 22.** Padrões de DRX das nanopartículas de cloreto de prata (azul), e nanopartículas de prata metálica (preto), usando uma fonte  $\text{CuK}\alpha^1$  (1,5418 Å). Índices de Miller para todas as reflexões de Bragg indicadas na figura. Fonte: elaborada pelo autor.

#### 5.6 Análise de imagens das nanopartículas microscopia eletrônica de transmissão, microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de raios-X por energia dispersiva (MET, MEV e EDX)

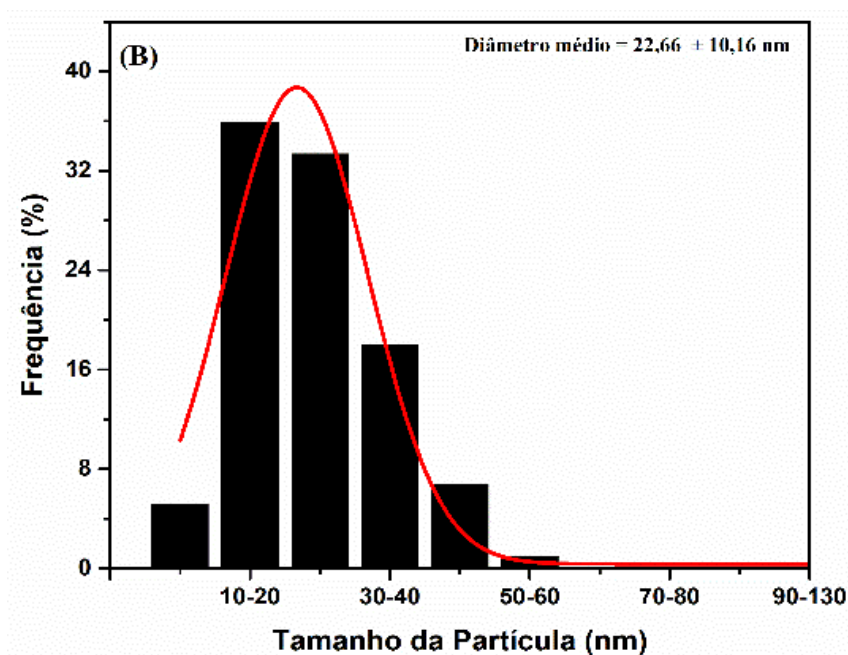
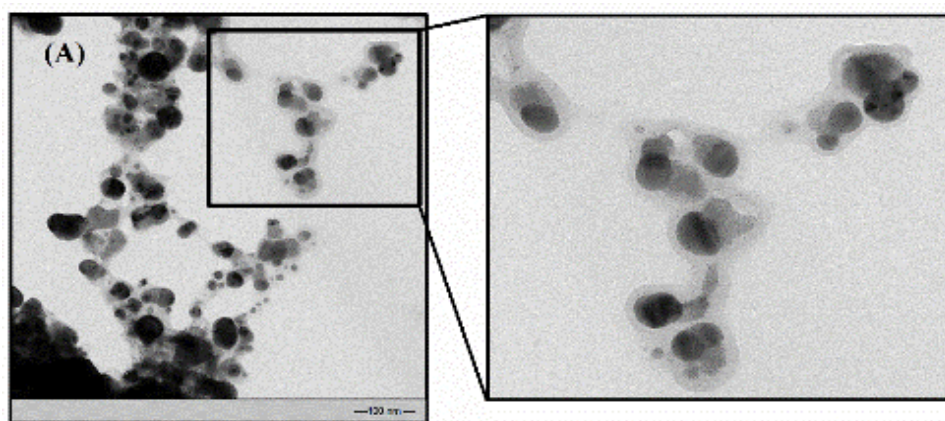
A Figura 23 mostra as imagens representativas das nanopartículas obtidas a partir da síntese verde com *S. adstringens*, e sua morfologia predominante é esférica, apesar da visível aglomeração das nanopartículas, característica deste tipo de nanomaterial, a distribuição de tamanho médio das nanopartículas assistidas por *S. adstringens* é  $22,66 \pm 10,16$  nm, conforme mostrado no histograma Figura 23 (B) obtido pela contagem usando o programa Imagej 1.46®.

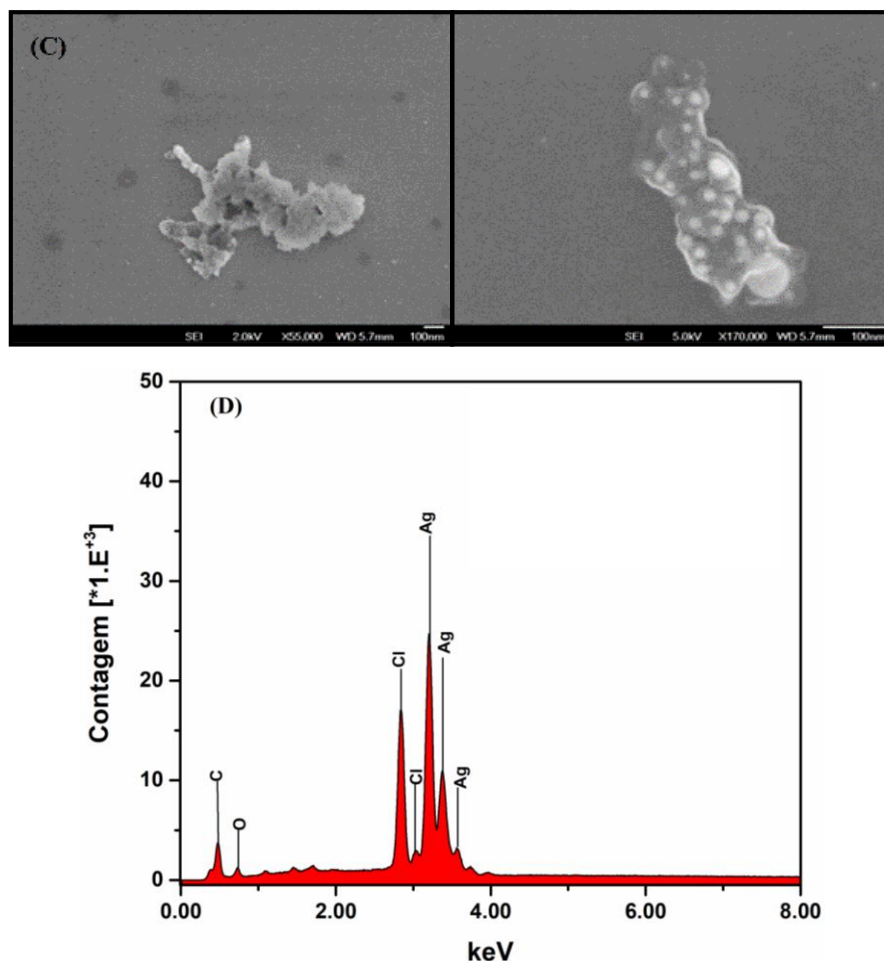
Apesar da característica de aglomeração das nanopartículas, sua de distribuição de tamanhos abaixo de 30 nm ainda é predominante, como pode ser observado nas análises de DRX, e uma população de tamanhos monomodais através dos ensaios de DLS apresentadas anteriormente. Através de imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) Figura 23 (C), é possível visualizar a superfície recoberta por material orgânico ao redor das



nanopartículas, esse material não impede a passagem do feixe de elétrons incidente e também é possível distinguir as nanopartículas em pontos brancos no interior do envólucro possivelmente originado da fração orgânica do extrato de “barbatimão”.

A análise de EDX Figura 23 (D) foi realizada na amostra para identificar sua composição elementar e, como resultado, os elementos presentes foram: carbono (C), oxigênio (O), prata (Ag) e cloro (Cl), carbono e oxigênio possivelmente originárias do revestimento orgânico das nanopartículas, prata e cloro são o que compõem as nanopartículas halometálicas e também estão em maior quantidade, como pode ser visto pelos picos intensos em 3,21 keV para Ag e 2,84 keV para Cl.



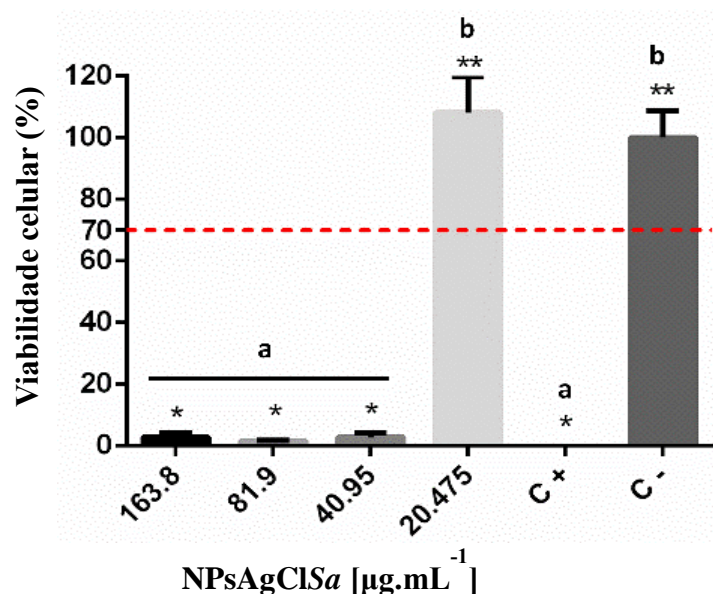


**Figura 23.** Imagens MET (A), histograma de 500 nanopartículas (B), imagens MEV (C) e espectro de análise EDX para análise composicional (D) das nanopartículas de cloreto de prata de *Stryphnodendron adstringens* obtidas (NPsAgClSa). Fonte: elaborada pelo autor.

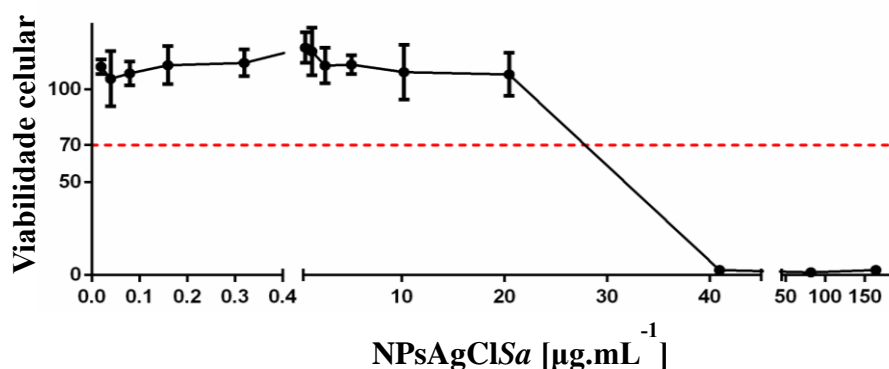
### 5.5 Citotoxicidade

Os resultados da análise *in vitro* de citotoxicidade das nanopartículas de prata obtidas por síntese verde com extrato de *Stryphnodendron adstringens* “Barbatimão” revelaram que elas apresentam potencial citotóxico em concentrações iguais ou superiores a  $40,95 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , mas todas as amostras em concentrações de  $20,475 \mu\text{g.mL}^{-1}$  ou menos resultam em viabilidades celulares em torno de 100%, como pode ser visto nas Figura 24 e Figura 25.



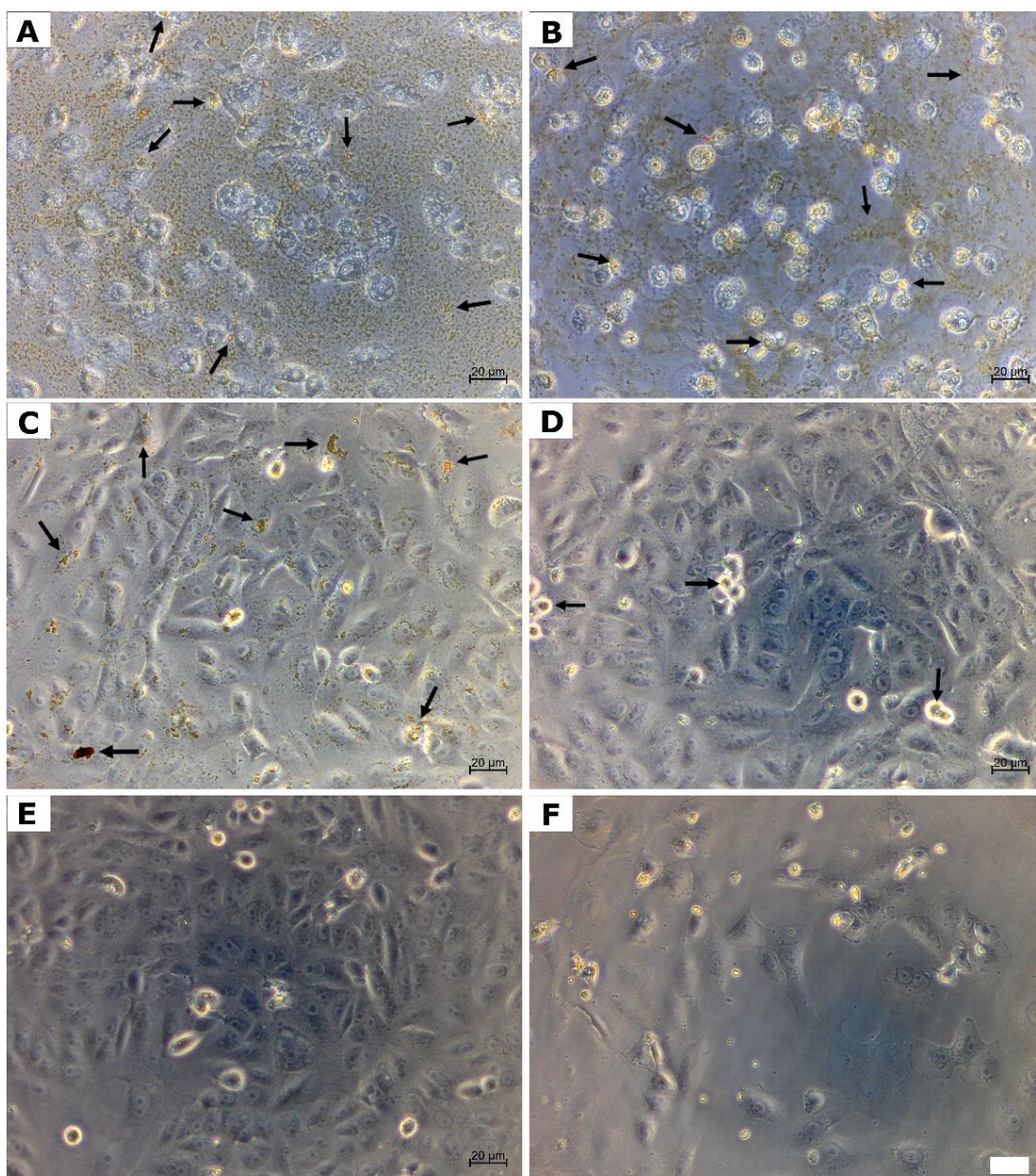


**Figura 24.** Viabilidade celular das células Vero após 24 horas de contato com nanopartículas de prata (NPsAgClSa) em diferentes concentrações. A linha a 70% representa o limite abaixo do qual o resultado é considerado uma resposta citotóxica das células. [\*] representa as amostras estatisticamente equivalentes ao controle positivo (C<sup>+</sup>) e [\*\*] representa as equivalentes ao controle negativo (C<sup>-</sup>), com P < 5%. A análise estatística foi realizada por ANOVA One-way, seguida pelo método de comparações múltiplas de Tuckey. Fonte: elaborada pelo autor.



**Figura 25.** Viabilidade celular de células Vero após 24 horas de contato com nanopartículas de prata em diferentes concentrações. A linha a 70% representa o limite abaixo do qual o resultado é considerado uma resposta citotóxica das células. Fonte: elaborada pelo autor.

De acordo com o ensaio quantitativo, a morfologia celular também mostrou sinais de que as amostras com concentração de 163,8 µg.mL<sup>-1</sup> (Figura 26-A) e 81,9 µg.mL<sup>-1</sup> (Figura 26-B) provocaram uma resposta citotóxica das culturas celulares. Nesses ensaios ficou clara a citotoxicidade das NPsAgClSa em células VERO nas concentrações supracitadas, o que acarretou rompimento da membrana celular e extravazamento do material citozoico no meio de cultura, de acordo com as ISO 10993-1:2009 e 10993-5:2009.



**Figura 26.** Micrografias da morfologia celular após 24 horas em contato com NPsAgClSa em concentrações de  $163,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (A);  $81,9 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (B);  $40,95 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (C);  $20,47 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (D) e com nada além de meio de cultura (C⁻)(E), também com 50% DMSO (C⁺)(F). A escala visível na micrografia de C⁺ representa  $20 \mu\text{m}$  e se aplica a todas micrografias. Fonte: elaborada pelo autor.

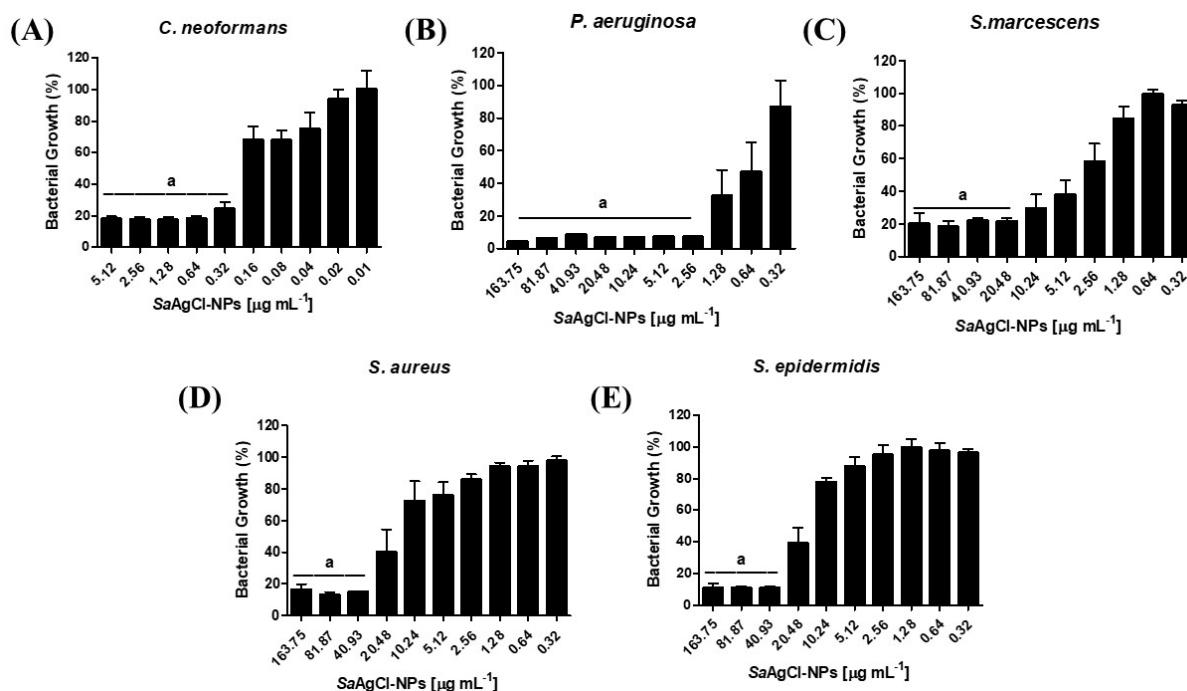
Baseando-se na literatura não foram observados efeitos citotóxicos para o extrato puro de *Stryphnodendron adstringens* [89,90]. Sendo então creditada a efeitos decorrentes do contato direto da célula com as referidas nanopartículas em concentrações variáveis as prováveis causas para lise celular ou qualquer forma de dano às mesmas.

A morfologia celular da concentração de 40,95  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  Figura 26 (C) não mostrou diferença significativa em relação ao C<sup>-</sup> Figura 26 (F), embora ainda seja possível observar partículas de prata entre e dentro das células, como é sinalizado pelas setas na Figura 26. Esta concentração de NPsAgClSa aponta para elevada citotoxicidade, de acordo com o ensaio de citotoxicidade demonstrado na Figura 25, sendo então necessário um estudo mais detalhado a cerca de como se comportam as nanopartículas em relação às lesões à estrutura celular interna e membranas das células VERO, porém para as concentrações de 20,47  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  Figura 26 (D), a morfologia celular não apresentou diferença significativa em relação ao controle negativo (C<sup>-</sup>) Figura 26 (F), em consonância com o ensaio de citotoxicidade *in vitro* demonstrado na Figura 25.

#### 5.6 Atividade antimicrobiana (antifúngica e antibacteriana)

Entre as bactérias em estudo, é possível notar que houve maior suscetibilidade às bactérias Gram-negativas (*P. aeruginosa* e *S. marcescens*) quando comparadas às bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *S. epidermidis*). Estes resultados podem possivelmente estar correlacionados com as diferenças na composição da parede celular bacteriana. Um fator que pode justificar essa maior suscetibilidade é que a parede celular bacteriana Gram-negativa possui uma membrana externa exclusiva composta por lipopolissacarídeos (LPS) ricos em cargas negativas que podem se ligar às cargas positivas dos íons prata das NPsAgClSa, gerando orifícios na parede celular que permitem a penetração de nanopartículas [105,64].

Além disso, as bactérias Gram-positivas têm uma camada mais rígida de peptidoglicano [106,107] o que pode dificultar a interação das nanopartículas com a superfície celular bacteriana [64]. Acredita-se que o tamanho das nanopartículas também possa interferir na atividade antimicrobiana, uma vez que nanopartículas menores permitem maior interação com a parede celular [108].



**Figura 27.** Histograma das NPsAgClSa com inibição de crescimento dos microrganismo (A) *Cryptococcus neoformans*, (B) *Pseudomonas aeruginosa*, (C) *Serratia marcescens*, (D) *Staphylococcus aureus*, (E) *Staphylococcus epidermidis*. Fonte: elaborada pelo autor.

As nanopartículas de cloreto de prata de *S. adstringens* (NPsAgClSa) têm um tamanho médio de  $22,7 \pm 10,0$  nm, o que poderia explicar sua melhor ação contra as cepas bacterianas Gram-negativas em estudo. O potencial zeta para as nanopartículas de NPsAgClSa de aproximadamente -30 mV poderiam atuar de forma a predominar interações repulsivas entre as cargas negativas das NPsAgClSa e LPS de bactérias Gram-negativas, porém foi observada maior ação antimicrobiana em cepas Gram-negativas, indicando que estudos adicionais são necessários para melhor compreender a interação das NPsAgClSa com superfícies celulares microbianas e seu modo de ação antimicrobiano.

É importante destacar que as nanopartículas têm uma atividade notável contra patógenos de grande importância médica, como a levedura *C. neoformans* Figura 27(A) ( $\text{MIC}_{80} \leq 0,32 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e as bactérias Gram-negativas *P. aeruginosa* (Fig. 27(B)) ( $\text{MIC}_{80} \leq 2,56 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). *C. neoformans* infectou em 2014 aproximadamente 223.100 pessoas/ano, causando mais de 181.100 mortes anualmente por meningite criptocócica no mundo, com 15% desses pacientes continham HIV [109]. A presença de uma cápsula de polissacarídeo é uma das razões da grande virulência de *C. neoformans*, aumentando sua patogenicidade, invasividade e fornecendo resistência aos organismos hospedeiros [110]. Em relação à *P. aeruginosa*, esse patógeno

oportunista tem sido uma das principais causas de infecção em hospitais e em pacientes imunocomprometidos, mais comumente causando pneumonia e infecções do trato urinário.

Além disso, em 2017, cepas resistentes de *P. aeruginosa* causaram aproximadamente 32.600 infecções em pacientes hospitalizados e 2.700 mortes nos Estados Unidos, representando um risco maior para pacientes que foram submetidos a cirurgia ou que precisam usar cateteres e respiradores. Assim, a busca por moléculas alternativas para combater microorganismos resistentes aos medicamentos disponíveis tornou-se de grande importância nos dias de hoje. As nanopartículas de cloreto de prata (NPsAgClSa) mostraram um potencial antimicrobiano interessante, com atividade antimicrobiana em pequenas concentrações e sem toxicidade para células de mamíferos.

## 6. Conclusão

Por fim, o extrato da casca do caule de *S. adstringens* demonstrou ser um excelente agente redutor e estabilizador para fotossíntese verde de nanopartículas monodispersas de AgCl. As nanopartículas obtidas apresentaram alta estabilidade, formato predominante esférico, distribuição de tamanho entre 22,66 nm a 29,21 nm, elevada cristalinidade e grau de organização, apesar da presença de uma pequena quantidade de prata metálica formada durante o processo de fotossíntese as nanopartículas de AgCl foram predominantes, e o método utilizado mostrou-se bastante reprodutível sem a necessidade de purificações prévias ou posteriores, visto que a simples lavagem e centrifugação da amostra foi suficiente para eliminar resíduos de matéria orgânica não consumidos ou sobras de soluções precursoras que ainda estavam em solução.

Com uma estratégia simples e relativamente rápida, foi possível obter nanopartículas muito uniformes e de alta qualidade para aplicar em testes de concentração inibitória mínima (MIC) contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungo (*Cryptococcus neoformans*), sendo esta última a que apresentou o melhor resultado de inibição de crescimento microbiano, com MIC de aproximadamente  $0,32 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Os ensaios de citotoxicidade demonstraram que a concentração inibitória de trabalho não foi citotóxica para células saudáveis de mamíferos.

Este processo de fotossíntese de nanopartículas de AgCl por meio de procedimentos simples e de baixo custo, a partir de matéria-prima de fonte renovável abre a possibilidade de futuras implementações em outros nanomateriais semicondutores, voltados para as mais diversas aplicações na área de engenharia de materiais, farmacêutica, além de proporcionar uma diretriz que pode auxiliar em estudos futuros, em que esta síntese verde de nanopartículas de cloreto de prata seja referência

## BIBLIOGRAFIA

- [1] F. E. WAGNER, *et al.* Before striking gold in gold-ruby glass. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 691–692 (2000).
- [2] O. C. WELLS, D. C. JOY. The early history and future of the SEM. **Surf. Interface Anal.** 38: 1738–1742 (2006).
- [3] C. ABRAHAM, R. JOSEPH, B. NATTAMAI. Principles and Applications of Powder Diffraction. 1<sup>st</sup>ed. Iowa-USA. **Wiley-Blackwell**, 2008.
- [4] S. MOURDIKOU DIS, R. M. PALLARES, N. T. K. THANH. Characterization techniques for nanoparticles: Comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties. **Nanoscale**, v. 10, n. 27, p. 12871–12934 (2018).
- [5] T. PREMKUMAR, K. E. GECKELER. Facile synthesis of silver nanoparticles using unmodified cyclodextrin and their surface-enhanced Raman scattering activity. **New Journal of Chemistry**, v. 38, n. 7, p. 2847–2855 (2014).
- [6] S. H. JEONG, S. Y. YEO, S. C. YI. The effect of filler particle size on the antibacterial properties of compounded polymer/silver fibers. **Journal of Materials Science**, v. 40, n. 20, p. 5407–5411 (2005).
- [7] V. GOPINATH, *et al.* Biosynthesis of silver nanoparticles from *Tribulus terrestris* and its antimicrobial activity: A novel biological approach. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 96, p. 69–74 (2012).
- [8] Z. LIU, *et al.* Synthesis and characterization of L-histidine capped silver nanoparticles. **Materials Science and Engineering C**, v. 32, n. 4, p. 811–816 (2012).
- [9] Y. CHENG, F. WANG, C. FANG, J. SU, L. YANG. Preparation and characterization of size and morphology controllable silver nanoparticles by citrate and tannic acid combined reduction at a low temperature. **Journal of Alloys and Compounds**, 658, P. 684–688 (2016).
- [10] S. P. CHANDRAN, *et al.* Synthesis of gold nanotriangles and silver nanoparticles using Aloe vera plant extract. **Biotechnol Prog.** v. 22(2) p. 577–583 (2006).
- [11] S. SATPATHY, *et al.* Antioxidant and anticancer activities of green synthesized silver nanoparticles using aqueous extract of tubers of *Pueraria tuberosa*. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, v. 46, p. S71–S85 (2018).
- [12] J. S. VALLI, B. VASEEHARAN. Biosynthesis of silver nanoparticles by *Cissus quadrangularis* extracts. **Materials Letters**, v. 82, p. 171–173 (2012).
- [13] A. HENGLEIN, M. GIERSIG. Formation of Colloidal Silver Nanoparticles: Capping Action of Citrate Arnim Henglein. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 103, n. 44, p. 9533–9539 (1999).
- [14] D. MALINA, *et al.* Silver nanoparticles synthesis with different concentrations of



- Polyvinylpyrrolidone. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**, v. 7, n. 4, p. 1527–1534 (2012).
- [15] A. EL-BATAL. Synthesis of Silver Nanoparticles and Incorporation with Certain Antibiotic Using Gamma Irradiation. **British Journal of Pharmaceutical Research**, v. 4, n. 11, p. 1341–1363 (2014).
- [16] L. LU, X. AN. Silver nanoparticles synthesis using H<sub>2</sub> as reducing agent in toluene-supercritical CO<sub>2</sub> microemulsion. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 99, p. 29–37 (2015).
- [17] H. IMAM, *et al.* Fabrication of silver nanoparticles by laser ablation in liquid solution. **Life Science Journal**, v. 10, n. 4, p. 401–404 (2013).
- [18] P. KSHIRSAGAR, *et al.* Synthesis of fluorescent metal nanoparticles in aqueous solution by photochemical reduction. **Nanotechnology**, v. 25, n. 4 (2014).
- [19] S. JOSEPH, B. MATHEW. Microwave-assisted green synthesis of silver nanoparticles and the study on catalytic activity in the degradation of dyes. **Journal of Molecular Liquids**, v. 204, p. 184–191 (2015).
- [20] N. PANTIDOS. Biological Synthesis of Metallic Nanoparticles by Bacteria, Fungi and Plants. **Journal of Nanomedicine & Nanotechnology**, v. 05, n. 05 (2014).
- [21] S. P. VINAY, N. CHANDRASEKHAR. Facile Green Chemistry Synthesis of Ag Nanoparticles Using Areca Catechu Extracts for the Antimicrobial Activity and Photocatalytic Degradation of Methylene Blue Dye. **Materials Today: Proceedings**, v. 9, n. April 2018, p. 499–505 (2019).
- [22] M. DAS, S. S. SMITA Biosynthesis of silver nanoparticles using bark extracts of *Butea monosperma* (Lam.) Taub. and study of their antimicrobial activity. **Applied Nanoscience (Switzerland)**, v. 8, n. 5, p. 1059–1067 (2018).
- [23] C. PANNEERSELVAM, K. MURUGAN, M. RONI, *et al.* Fern-synthesized nanoparticles in the fight against malaria: LC/MS analysis of *Pteridium aquilinum* leaf extract and biosynthesis of silver nanoparticles with high mosquitocidal and antiplasmodial activity. **Parasitology Research**, v.115, p. 997-1013 (2016).
- [24] H. M. M. IBRAHIM. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using banana peel extract and their antimicrobial activity against representative microorganisms. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 8, n. 3, p. 265–275 (2015).
- [25] D. L. VAN HYNING, & C. F. ZUKOSKI. Formation Mechanisms and Aggregation Behavior of Borohydride Reduced Silver Particles. **Langmuir**, 14(24), 7034–7046 (1998).
- [26] M. A. MELO JR, L. S. S. SANTOS, M. DO C. GONÇALVES, A.F. NOGUEIRA.



- Preparação de nanopartículas de prata e ouro: um método simples para a introdução da nanociência em laboratório de ensino. **Quim. Nova**, v. 35, n. 9, p. 1872–1878 (2012).
- [27] P. C. LEE, D. MEISEL. Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols. **Journal of Physical Chemistry**, v. 86, n. 17, p. 3391–3395 (1982).
- [28] S. AGNIHOTRI, S. MUKHERJI, S. MUKHERJI. Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5-100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. **RSC Advances**, v. 4, n. 8, p. 3974–3983 (2014).
- [29] R. PATAKFALVI, I. DÉKÁNY. Nucleation and growth of silver nanoparticles monitored by titration microcalorimetry. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 79, n. 3, p. 587–594 (2005).
- [30] S. IRAVANI *et al.* Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods. **Research in pharmaceutical sciences**, v. 9, n. 6, p. 385–406 (2014).
- [31] A. MAJEE, A. WÜRGER. Collective thermoelectrophoresis of charged colloids. **Physical Review E - Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics**, v. 83, n. 6, p. 1–6 (2011).
- [32] A. MEZULIS, M. MAIOROV, E. BLUMS. Transport properties of an ionic magnetic colloid: Experimental study of increasing the ionic strength. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 252, n. 1- 3 SPEC. ISS., p. 221–223 (2002).
- [33] T. L. MOORE, *et al.* Nanoparticle colloidal stability in cell culture media and impact on cellular interactions. **Chemical Society Reviews**, v. 44, n. 17, p. 6287–6305 (2015).
- [34] M. V. D. GARCIA. Síntese , caracterização e estabilização de nanopartículas de prata para aplicações bactericidas em têxteis. **Universidade Estadual de Campinas, Campinas**, p. 77 (2011).
- [35] C. L. FILOMENO. Dispersões de Nanopartículas Magnéticas do tipo Core-Shell  $\text{MFe}_2\text{O}_4 @ \gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  em solventes polares: Reatividade eletroquímica e o papel da interface Óxido/Solução nas propriedades coloidais. Tese (Doutorado em Química Universidade de Brasília e Doutorado em química Universidade Pierre et Marie Curie) (2015).
- [36] W. SCHMITZ, *et al.* O chá verde e suas ações como quimioprotetor. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 26, n. 2, p. 119 (2005).
- [37] M. S. AKHTAR, J. PANWAR, Y. S. YUN. Biogenic synthesis of metallic nanoparticles by plant extracts. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 1, p. 591–602 (2013).
- [38] X. BASKARAN, *et al.* Biosynthesis, characterization, and evaluation of bioactivities of leaf extract-mediated biocompatible silver nanoparticles from an early tracheophyte, *Pteris tripartita* Sw. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 5789–5805 (2016).

- [39] D. B. RAUDABAUGH, *et al.* Synthesis of silver nanoparticles by a bryophilous *Rhizoctonia* species. **Nanomaterials and Nanotechnology**, v. 3, n. 1 (2013).
- [40] P. VELMURUGAN, *et al.* Synthesis and characterization of nanosilver with antibacterial properties using *Pinus densiflora* young cone extract. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 147, p. 63–68 (2015).
- [41] M. HAMELIAN, *et al.* Green synthesis, antibacterial, antioxidant and cytotoxic effect of gold nanoparticles using *Pistacia Atlantica* extract. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 93, p. 21–30 (2018).
- [42] Y. YAMAMOTO, *et al.* A case of mucocele of the appendix; diffusion weighted MRI appearance. **Japanese Journal of Clinical Radiology**, v. 52, n. 10, p. 1265–1269 (2007).
- [43] S. S. SHANKAR, *et al.* Rapid synthesis of Au, Ag, and bimetallic Au core-Ag shell nanoparticles using *Neem* (*Azadirachta indica*) leaf broth. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 275, n. 2, p. 496–502 (2004).
- [44] K. S. MUKUNTHAN, S. BALAJI. Cashew apple juice (*Anacardium occidentale* L.) speeds up the synthesis of silver nanoparticles. **International Journal of Green Nanotechnology: Biomedicine**, v. 4, n. 2, p. 71–79 (2012).
- [45] K. SHAMELI, *et al.* Green biosynthesis of silver nanoparticles using *callicarpa maingayi* stem bark extraction. **Molecules**, v. 17, n. 7, p. 8506–8517 (2012).
- [46] S. LI, *et al.* Green synthesis of silver nanoparticles using *Capsicum annuum* L. Extract. **Green Chemistry**, v. 9, n. 8, p. 852–85 (2007).
- [47] A. M. N. JASSIM, *et al.* Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using *Carica Papaya* Juice and Study of their biochemical application. **J. Pharm. Sci. & Res.** 11(3), p. 1025–1034 (2019).
- [48] L. LIN, *et al.* Nature factory of silver nanowires: Plant-mediated synthesis using broth of *Cassia fistula* leaf. **Chemical Engineering Journal**, v. 162, n. 2, p. 852–858 (2010).
- [49] J. HUANG, *et al.* Biosynthesis of silver and gold nanoparticles by novel sundried *Cinnamomum camphora* leaf. **Nanotechnology**, v. 18, n. 10 (2007).
- [50] M. SATHISHKUMAR, *et al.* *Cinnamon zeylanicum* bark extract and powder mediated green synthesis of nano-crystalline silver particles and its bactericidal activity. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 73, n. 2, p. 332–338 (2009).
- [51] G. RAJAKUMAR, A. A. RAHUMAN. Larvicidal activity of synthesized silver nanoparticles using *Eclipta prostrata* leaf extract against filariasis and malaria vectors. **Acta Tropica**, v. 118, n. 3, p. 196–203 (2011).

- [52] A. I. LUKMAN, *et al.* Facile synthesis, stabilization, and anti-bacterial performance of discrete Ag nanoparticles using *Medicago sativa* seed exudates. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 353, n. 2, p. 433–444 (2011).
- [53] D. MUBARAKALI, *et al.* Plant extract mediated synthesis of silver and gold nanoparticles and its antibacterial activity against clinically isolated pathogens. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 85, n. 2, p. 360–365 (2011).
- [54] R. S. PATIL, M. R. KOKATE, S. S. KOLEKAR. Bioinspired synthesis of highly stabilized silver nanoparticles using *Ocimum tenuiflorum* leaf extract and their antibacterial activity. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 91, p. 234–238, (2012).
- [55] N. AHMAD, *et al.* Rapid synthesis of silver nanoparticles using dried medicinal plant of Brasil. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 81, n. 1, p. 81–86 (2010).
- [56] K. VIJAYARAGHAVAN, *et al.* One step green synthesis of silver nano/microparticles using extracts of *Trachyspermum ammi* and *Papaver somniferum*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 94, p. 114–117 (2012).
- [57] A. AHSAN, *et al.* Green synthesis of silver nanoparticles using *Parthenium hysterophorus*: Optimization, characterization and in vitro therapeutic evaluation. **Molecules**, v. 25, n. 15 (2020).
- [58] Y. ANWAR, *et al.* Synthesis of silver nanoparticles using *Prosopis juliflora* extract: Potential oantimicrobial and pollutants degradation performance. **Desalination and Water Treatment**, v. 167, p. 105–112 (2019).
- [59] P. W. WANG. Formation of silver colloids in silver ion-exchanged soda-lime glasses during annealing. **Applied Surface Science**, v. 120, n. 3–4, p. 291–298 (1997).
- [60] J. DAS, M. P. DAS, P. VELUSAMY. *Sesbania grandiflora* leaf extract mediated green synthesis of antibacterial silver nanoparticles against selected human pathogens. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 104, p. 265–270 (2013).
- [61] S. P. DUBEY, *et al.* Bioprospective of *Sorbus aucuparia* leaf extract in development of silver and gold nanocolloids. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 80, n. 1, p. 26–33 (2010).
- [62] B. AJITHA, Y. A. K. REDDY, P. S. REDDY. Biogenic nano-scale silver particles by *Tephrosia purpurea* leaf extract and their inborn antimicrobial activity. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 121, p. 164–172 (2014).

- [63] S. IRAVANI, B. ZOLFAGHARI. Green synthesis of silver nanoparticles using *Pinus eldarica* bark extract. **BioMed Research International**, v. 2013 (2013).
- [64] A. SINGH, *et al.* Green synthesis of metallic nanoparticles as effective alternatives to treat antibiotics resistant bacterial infections: A review. **Biotechnology Reports**, v. 25, p. e00427 (2020).
- [65] X. ZHAO, *et al.* Synthesis of silver nanoparticles and its contribution to the capability of *Bacillus subtilis* to deal with polluted waters. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 15, p. 6319–6332 (2019).
- [66] M. DARROUDI, *et al.* Time-dependent effect in green synthesis of silver nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v. 6, n. 1, p. 677–681 (2011).
- [67] S. OLIVER, *et al.* Enhancing the antimicrobial and antibiofilm effectiveness of silver nanoparticles prepared by green synthesis. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 6, n. 24, p. 4124–4138 (2018).
- [68] L. BIAO, *et al.* Synthesis and characterization of proanthocyanidins-functionalized Ag nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 169, n. May, p. 438–443 (2018).
- [69] T. P. AMALADHAS, *et al.* Biogenic synthesis of silver nanoparticles by leaf extract of *Cassia angustifolia*. **Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology**, v. 3, n. 4 (2012).
- [70] T. C. D. de LIMA, *et al.* Breve revisão etnobotânica, fitoquímica e farmacologia de *Stryphnodendron adstringens* utilizada na Amazônia . **Revista Fitos**, v. 10, n. 3, p. 329–338 (2016).
- [71] E. M. de L. OCCHIONI. Considerações taxonômicas no gênero *Stryphnodendron* Mart. (*Leguminosae-Mimosoideae*) e distribuição geográfica das espécies. **Acta Botanica Brasilica**, v. 4, n. 2 suppl 1, p. 153–158 (1990).
- [72] S. L. GOULART. Características Anatômicas , Químicas E Densidade Do Barbatimão. Tese: Doutorado em Ciência e tecnologia da madeira, Universidade Federal de Lavras-MG, 2010.
- [73] S. C. SANTOS, *et al.* Tannin composition of barbatimão species. **Fitoterapia**, v. 73, n. 4, p. 292–299 (2002).
- [74] W. E. RIEDELL, T. E. SCHUMACHER. Transport of water and nutrients in plants. **Agricultural Sciences ©Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS)**, v.1, p. 1-16.
- [75] H. C. B. FILHO, J. M. FELFILI. Avaliação dos níveis de extrativismo da casca de barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville] no Distrito Federal, Brasil.

**Revista Árvore**, v. 27, n. 5, p. 735–745 (2003).

- [76] A. L. D. de FREITAS, *et al.* Proanthocyanidin polymeric tannins from *Stryphnodendron adstringens* are effective against *Candida spp.* isolates and for vaginal candidiasis treatment. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 216, p. 184–190 (2018).
- [77] A. R. - GARCIA, *et al.* *In Vitro* Antimicrobial and Antiproliferative Activity of *Amphipterygium adstringens*. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015 (2015).
- [78] A. C. MARCO, *et al.* Pharmaceutical topical gel containing proanthocyanidin polymers-rich fraction from *Stryphnodendron adstringens*. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 12, n. 10, p. 116–123 (2018).
- [79] B. O. HENRIQUES, *et al.* *In vitro* TNF-alpha inhibitory activity of Brazilian plants. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, (2016).
- [80] L. HERNANDES, *et al.* Wound-healing evaluation of ointment from *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) in rat skin. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 3, p. 431–436 (2010).
- [81] E. A. AUDI, *et al.* Gastric antiulcerogenic effects of *Stryphnodendron adstringens* in rats. **Phytotherapy Research**, v. 13, n. 3, p. 264–266 (1999).
- [82] J. S. GLASENAPP. Estrutura genética e fenôis de populações naturais de Barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*). Dissertação: Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, Universidade Federal de Viçosa-MG, (2007).
- [83] R. TROLEZI, *et al.* *Stryphnodendron adstringens* and purified tannin on *Pythium insidiosum*: *In vitro* and *in vivo* studies. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 16, n. 1, p. 1–7 (2017).
- [84] E. A. AUDI, *et al.* Biological activity and quality control of extract and stem bark from *Stryphnodendron adstringens*. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 23, n. 3, p. 328–333 (2004).
- [85] T. M. SOUZA, *et al.* Avaliação da atividade anti-séptica de extrato seco de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville e de preparação cosmética contendo este extrato. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 1, p. 71–75 (2007).
- [86] J. C. S. LIMA, D. T. O. MARTINS, P. T. de SOUZA. Experimental evaluation of stem bark of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville for antiinflammatory activity. **Phytotherapy Research**, v. 12, n. 3, p. 218–220 (1998).
- [87] J. O. de MELO, *et al.* Effect of *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) bark on animal

- models of nociception. **Revista Brasileira de Ciencias Farmaceuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n. 3, p. 465–469 (2007).
- [88] J. M. COELHO, *et al.* O efeito da sulfadiazina de prata, extrato de ipê-roxo e extrato de barbatimão na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. **Revista do Colegio Brasileiro de Cirurgioes**, v. 37, n. 1, p. 45–51 (2010).
- [89] N. C. de SOUSA, *et al.* Absence of genotoxicity of a phytotherapeutic extract from *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville in somatic and germ cells of *Drosophila melanogaster*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 41, n. 4, p. 293–299 (2003).
- [90] A. C. ALMEIDA, *et al.* Toxicidade aguda dos extratos hidroalcoólicos das folhas de alecrim-pimenta, aroeira e barbatimão e do farelo da casca de pequi administrados por via intraperitoneal. **Ciencia Rural**, v. 40, n. 1 (2010).
- [91] L. S. de ANDRADE, D. B. de CASTRO, L. C. CHEN. Efeito Modulador do Extrato de *Stryphnodendron adstringens* Mart. Barbatimão contra danos induzidos pela Mitomicina C em Camundongos. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 1, n. 2, p. 127–130 (2006).
- [92] P. D. E. MELLO, F. PETEREIT, A. NAHRSTEDT. Flavan-3-Ols and Prodelphinidins from *Stryphnodendron adstringens*. **Phytochemistry**, v. 41, n. 3, p. 807–813 (1996).
- [93] D. FERREIRA, X. C. LI. Oligomeric proanthocyanidins: Naturally occurring O-heterocycles. **Natural Product Reports**, v. 17, n. 2, p. 193–212 (2000).
- [94] L. FRANCISCONI, R. GONÇALVES, P. da SILVA. Determination of essential elements in herbal extracts by neutron activation analysis. **International Nuclear Atlantic Conference**, p. 12 (2013).
- [95] D. F. RODRIGUES. *et al.* O extrato da casca de barbatimão, *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville, na cicatrização de feridas em animais. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.9, N.16; p. 1583 (2013).
- [96] L. ALEXANDER, H. P. KLUG, Determination of crystallite size with the x-ray spectrometer. **Journal of Applied Physics**, v. 21, n. 2, p. 137–142 (1950).
- [97] Norma ATCC. Vero (ATCC® CCL-81™). Acessado em: <https://www.atcc.org/products/all/CCL-81.5.aspx> 15 ago. 2019.
- [98] ISO. **ISO 10993-1:2009 - Biological evaluation of medical devices -- Part 1: Evaluation and testing within a risk management process**, 2009a.
- [99] ISO. **ISO 10993-5:2009 - Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in**

**vitro cytotoxicity**, 2009b.

- [100] A. O. MASSON, **Estudo comparativo de ensaios de citotoxicidade aplicados à biomateriais : metodologias e condições de ensaio**. [s.l.] Universidade Federal do ABC, (2016).
- [101] B. R. BERGMANN, *et al.* Therapeutic potential of biogenic silver nanoparticles in murine cutaneous leishmaniasis. **Journal of Nano Research**, v. 20, p. 89–97 (2012).
- [102] T. RAJAN, S. MUTHUKRISHNANA. Characterization of phenolic compounds in *Pseudarthria viscida* root extract by HPLC and FT-IR analysis. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 6, n. SUPPL. 2, p. 271–273 (2013).
- [103] S. S. D. KUMAR, *et al.* Cellular imaging and bactericidal mechanism of green-synthesized silver nanoparticles against human pathogenic bacteria. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 178, p. 259–269 (2018).
- [104] R. BIGDELI, *et al.* Cytotoxic and apoptotic properties of silver chloride nanoparticles synthesized using *Escherichia coli* cell-free supernatant on human breast cancer MCF 7 cell line. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, v. 47, n. 1, p. 1603–1609 (2019).
- [105] A. AHMAD, *et al.* The effects of bacteria-nanoparticles interface on the antibacterial activity of green synthesized silver nanoparticles. **Microbial Pathogenesis**, v. 102, n. 2017, p. 133–142 (2017).
- [106] J. S. KIM, *et al.* Antimicrobial effects of silver nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 3, n. 1, p. 95–101 (2007).
- [107] T. J. SILHAVY, D. KAHNE, S. WALKER. The bacterial cell envelope. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 2, n. 5 (2010).
- [108] M. GUZMAN, J. DILLE, S. GODET. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 8, n. 1, p. 37–45 (2012).
- [109] R. RAJASINGHAM, *et al.* Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 8, p. 873–881 (2017).
- [110] F. P. GULLO, *et al.* Cryptococcosis: Epidemiology, fungal resistance, and new alternatives for treatment. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 32, n. 11, p. 1377–1391 (2013).
- [111] E. M. S. MACEDO, J. G. A. e SILVA, M. G. V. SILVA. Quimiodiversidade e

Propriedades Biofarmacológicas de Espécies de Senna Nativas do Nordeste do Brasil Macedo. **Revista virtual de Química**, v.8, n.1, p. 169-195 (2016)

- [112] KIM, J. H. *et al.* Phosphate sorption to quintinite in aqueous solutions: Kinetic, thermodynamic and equilibrium analyses. **Environmental Engineering Research**, v. 20, n. 1, p. 73–78 (2015)
- [113] FILIPE, V.; HAWES, A.; JISKOOT, W. Critical evaluation of nanoparticle tracking analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates. **Pharmaceutical Research**, v. 27, n. 5, p. 796–810, (2010)
- [114] VENKATESHAM, M. *et al.* A novel green one-step synthesis of silver nanoparticles using chitosan: catalytic activity and antimicrobial studies. **Applied Nanoscience (Switzerland)**, v. 4, n. 1, p. 113–119 (2014)
- [115] GRAF, U. *et al.* Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Environmental Mutagenesis**, v. 6, n. 2, p. 153–188, (1984)
- [116] Physical Stability of Disperse Systems. **Particle Sciences**. Technical Brief: 2009. Vol. 1. Disponível em [www.particlesciences.com](http://www.particlesciences.com)
- [117] OCCHIONI, E. M. De L. Considerações taxonômicas no gênero *Stryphnodendron* Mart. (Leguminosae-Mimosoideae) e distribuição geográfica das espécies. **Acta Botanica Brasilica**, v. 4, n. 2 suppl 1, p. 153–158. (1990)