



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I – CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
CURSO DE BACHARELADO EM FARMÁCIA**

ADRIAN LIMA ROBERTO

**OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA DE NANOPARTÍCULAS DE
PRATA ESTABILIZADAS COM MEL DE *Croton* sp.**

**CAMPINA GRANDE - PB
2024**

ADRIAN LIMA ROBERTO

OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA ESTABILIZADAS COM MEL DE *Croton sp.*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Área de concentração: Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. João Augusto Oshiro Junior.

**CAMPINA GRANDE - PB
2024**

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto em versão impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que, na reprodução, figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

R642o Roberto, Adrian Lima.

Obtenção e avaliação antimicrobiana de nanopartículas de prata estabilizadas com mel de *Croton sp.* [manuscrito] / Adrian Lima Roberto. - 2024.

39 f. : il. color.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2024.

"Orientação : Prof. Dr. João Augusto Oshiro Junior, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas".

1. Síntese verde. 2. Atóxico. 3. Nanopartículas inorgânicas.
I. Título

21. ed. CDD 615

ADRIAN LIMA ROBERTO

OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA ESTABILIZADAS COM MEL DE CROTON SP.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação do Curso de Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de BACHAREL EM FARMÁCIA

Aprovada em: 22/11/2024.

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado eletronicamente por:

- **Mariana Rillo Sato** (***.514.248-**), em **04/12/2024 12:44:00** com chave **94b7bc48b25611ef9c242618257239a1**.
- **Paulo César Dantas da Silva** (***.194.894-**), em **04/12/2024 12:38:06** com chave **c18c115cb25511efb1662618257239a1**.
- **João Augusto Oshiro Junior** (***.616.238-**), em **04/12/2024 12:10:48** com chave **f1b0e550b25111ef822c06adb0a3afce**.

Documento emitido pelo SUAP. Para comprovar sua autenticidade, faça a leitura do QrCode ao lado ou acesse https://suap.uepb.edu.br/comum/autenticar_documento/ e informe os dados a seguir.

Tipo de Documento: Folha de Aprovação do Projeto Final

Data da Emissão: 16/12/2024

Código de Autenticação: 5b314c



RESUMO

A crescente resistência dos patógenos aos antibióticos tem levado a indústria farmacêutica a buscar métodos alternativos, como a utilização de nanopartículas. As nanopartículas de prata (AgNPs), em particular, têm se destacado como uma solução promissora devido às suas propriedades antimicrobianas. No entanto, os métodos convencionais de síntese dessas nanopartículas frequentemente envolvem solventes químicos, que geram resíduos tóxicos, impactando negativamente o meio ambiente e a saúde humana. Nesse contexto, a síntese verde surge como uma alternativa, sendo ecológica, econômica e atóxica. Uma das estratégias promissoras é o uso do mel, que devido sua composição pode atuar como um agente redutor e estabilizante na síntese de nanopartículas inorgânicas, oferecendo uma maneira mais sustentável e segura para a produção de nanopartículas. Assim, o objetivo deste trabalho foi utilizar a síntese verde por meio do mel para obter AgNPs, e avaliar sua estabilidade e atividade antimicrobiana. A estabilidade das AgNPs foi monitorada por espectrometria UV-Vis, revelando uma estabilidade de 90 dias, caracterizada pela ausência de precipitação e um leve escurecimento ao longo do tempo. O tamanho e a concentração foram determinados por Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA), com valor médio de $141.6 \text{ nm} \pm 4.4 \text{ nm}$ e concentração de $2,82 \times 10^8 \pm 3,75 \times 10^6$ partículas/mL. A análise por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) apresentou um diâmetro hidrodinâmico médio de $126,49 \text{ nm}$, índice de polidispersão de $3,465$ e potencial zeta de $-13,77 \text{ mV}$. A análise dos componentes e metabólitos secundários do mel revelou uma concentração de flavonoides de $55,88 \text{ EQ/Kg}$ e de polifenóis de $347,4 \text{ mg/Kg}$, taninos de $251,25 \text{ mg/Kg}$ e uma de porcentagem de $87,9\%$ de açúcares redutores. A CIM (concentração inibitória mínima) e CFM (concentração fungistática mínima) para *Candida albicans* demonstrou atividade fungicida em concentração de $\geq 1,41 \times 10^7$ partículas/mL e fungistática em $\geq 7,05 \times 10^6$ partículas/mL. Para *Escherichia coli*, a CIM e CBM (Concentração bacteriostática mínima) foi de $\geq 2,82 \times 10^7$ partículas/mL. Os resultados do *Staphylococcus aureus* da CIM e CBM mostraram atividade em concentrações de $\geq 7,05 \times 10^6$ e $\geq 3,52 \times 10^6$, respectivamente. Os resultados demonstram que as AgNPs sintetizadas apresentaram estabilidade e atividade antimicrobiana contra o fungo, a bactéria Gram-negativa e a bactéria Gram-positiva testados, sugerindo que podem ser uma abordagem promissora contra esses microrganismos como no revestimento de materiais médico-hospitalares.

Palavras-chave: síntese verde; atóxico; nanopartículas inorgânicas.

ABSTRACT

The growing resistance of pathogens to antibiotics has led the pharmaceutical industry to seek alternative methods, such as the use of nanoparticles. Silver nanoparticles (AgNPs), in particular, have emerged as a promising solution due to their antimicrobial properties. However, conventional methods for synthesizing these nanoparticles often involve chemical solvents, which generate toxic waste, negatively impacting the environment and human health. In this context, green synthesis emerges as an alternative, being ecological, economical, and non-toxic. One promising strategy is the use of honey, which, due to its composition, can act as a reducing and stabilizing agent in the synthesis of inorganic nanoparticles, offering a more sustainable and safer method for nanoparticle production. Thus, the aim of this study was to use green synthesis through honey to obtain AgNPs and evaluate their stability and antimicrobial activity. The stability of the AgNPs was monitored by UV-Vis spectrometry, revealing a stability of 90 days, characterized by the absence of precipitation and a slight darkening over time. The size and concentration were determined by Nanoparticle Tracking Analysis (NTA), with an average value of $141.6 \text{ nm} \pm 4.4 \text{ nm}$ and a concentration of $2.82 \times 10^8 \pm 3.75 \times 10^6$ particles/mL. Dynamic Light Scattering (DLS) analysis showed an average hydrodynamic diameter of 126.49 nm, a polydispersity index of 3.465, and a zeta potential of -13.77 mV. Analysis of the components and secondary metabolites of honey revealed a flavonoid concentration of 55.88 EQ/Kg, polyphenols of 347.4 mg/Kg, tannins of 251.25 mg/Kg, and 87.9% of reducing sugars. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungistatic concentration (MFC) for *Candida albicans* showed fungicidal activity at a concentration of $\geq 1.41 \times 10^7$ particles/mL and fungistatic activity at $\geq 7.05 \times 10^6$ particles/mL. For *Escherichia coli*, the MIC and minimum bacteriostatic concentration (MBC) were $\geq 2.82 \times 10^7$ particles/mL. The results for *Staphylococcus aureus* showed MIC and MBC activity at concentrations of $\geq 7.05 \times 10^6$ and $\geq 3.52 \times 10^6$, respectively. The results demonstrate that the synthesized AgNPs exhibited stability and antimicrobial activity against the fungus, Gram-negative bacteria, and Gram-positive bacteria tested, suggesting they may be a promising approach for combating these microorganisms, such as in the coating of medical and hospital materials.

Keywords: green synthesis; non-toxic; inorganic nanoparticle.

LISTA DE ABREVIATURAS

AlCl ₃	Cloreto de alumínio
Ag ⁺	Íons de prata
AgNO ₃	Nitrato de prata
AgNPs	Nanopartícula de prata
Ag ₂ O	Óxido de prata
AgCl	Cloreto de prata
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
CBM	Concentração bactericida mínima
CFM	Concentração fungicida mínima
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	<i>Clinical Laboratory and Standards Institute</i>
d.nm	Diâmetro hidrodinâmico médio
DLS	Espalhamento dinâmico de luz
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FC	Folin-Ciocalteau
HCl	Ácido clorídrico
NTA	Análise de rastreamento de nanopartículas
part./mL	Partículas/mililitro
PZ	Potencial zeta
ROS	Espécies reativas de oxigênio
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
UV-Vis	Ultravioleta-visível

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Metodologia de execução da microdiluição em caldo na microplaca de 96 poços..	25
Figura 2- (a) Espectro de absorção UV-Vis. (b) AgNPs.....	26
Figura 3- Espectro UV-vis das AgNPs.....	27
Figura 4- Avaliação visual da estabilidade das AgNPs.....	28
Figura 5- Análise quantitativa da relação entre distribuição de tamanho de partículas e concentração, medida por Análise de Rastreamento de Nanopartículas - NTA no dia 1 (a) e no dia 30 (b).....	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Compostos e metabólitos secundários presente no mel.....	30
Tabela 2 - Determinação do CIM e CBM/CFM da AgNPs, em part./mL.....	31

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	11
2.1 Nanotecnologia.....	11
2.1.1 Nanopartículas.....	11
2.2 Síntese de nanopartículas.....	13
2.2.1 Síntese verde.....	14
2.3 Estabilidade.....	15
2.4 Atividade antimicrobiana das AgNPS.....	16
3. OBJETIVOS.....	18
3.1 Objetivo geral.....	18
3.2 Objetivos específicos.....	18
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1 Material.....	19
4.2 Métodos.....	19
4.2.1 Síntese das nanopartículas de Prata.....	19
4.2.2 Caracterização das nanopartículas de Prata.....	20
4.2.2.1 Espectroscopia de absorção no UV-Vis.....	20
4.2.2.2 Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA).....	20
4.2.2.3 Diâmetro hidrodinâmico médio (d.nm), índice de polidispersão (IPD) e potencial zeta (PZ).....	20
4.2.3 Quantificação dos compostos e metabólitos secundários presente no mel.....	21
4.2.3.1 Determinação de flavonóides.....	21
4.2.3.2 Determinação de polifenóis.....	21
4.2.3.3 Determinação de taninos.....	22
4.2.3.4 Determinação de açúcar redutor.....	22
4.2.4 Avaliação <i>in vitro</i> da atividade antimicrobiana das AgNPs.....	23
4.2.4.1 Preparo do inóculo.....	23
4.2.4.2 Determinação da Concentração Inibitória e Bactericida/Fungicida Mínima.....	23
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
5.1 Obtenção das nanopartículas de prata.....	26
5.2 Espectroscopia com absorção no UV-vis.....	26
5.3 Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA).....	28
5.4 Diâmetro hidrodinâmico médio (d.nm), índice de polidispersão (IPD) e potencial zeta (PZ)....	29
5.5 Quantificação dos compostos do mel.....	30
5.6 Avaliação <i>in vitro</i> da atividade antimicrobiana.....	30
5.6.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima e Concentração Fungicida/Bactericida Mínima.....	30
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	33
REFERÊNCIAS.....	34

1 INTRODUÇÃO

A resistência bacteriana representa um desafio significativo para a saúde pública global, constituindo uma ameaça crescente à eficácia dos tratamentos antimicrobianos. Essa resistência origina-se, principalmente, do uso inadequado e excessivo de antimicrobianos, bem como da administração irracional de medicamentos. Ao longo do tempo, essas práticas permitem que bactérias adquiram mecanismos de defesa contra os antibióticos tradicionais, dificultando assim o tratamento (Furtado *et al.*, 2019).

Devido à crescente resistência bacteriana, estudos alertam que, até 2050, as infecções causadas por microrganismos resistentes poderão resultar em até 10 milhões de mortes, tornando-se um dos maiores desafios para a saúde pública global. Não irá afetar apenas a saúde, mas também terá um impacto na economia global (Fernandes; Pereira; Cláudia, 2020). Em resposta a esse problema crescente, nos últimos 30 anos, a indústria farmacêutica tem intensificado seus esforços na pesquisa e desenvolvimento de novos antibióticos para combater a resistência bacteriana (Crisan *et al.*, 2021).

As nanopartículas de prata (AgNPs) têm atraído crescente atenção na pesquisa científica devido às suas potentes propriedades antibióticas, especialmente no combate a microrganismos resistentes a antibióticos convencionais. Estudos demonstram que as AgNPs são eficazes contra uma ampla gama de bactérias, incluindo Gram-positivas e Gram-negativas, além de anaeróbios, fungos e vírus. Dependendo do agente redutor utilizado para sua síntese, estas podem agir sinergicamente, potencializando a ação antimicrobiana, tornando-se ainda mais efetivo (Kang *et al.*, 2019; El-Gebaly *et al.*, 2024).

Os métodos convencionais empregados na síntese de nanopartículas incluem uma variedade de abordagens, cada uma com características e vantagens específicas para a produção de nanopartículas com diferentes propriedades morfológicas e funcionais. Dentre esses métodos, destacam-se o método de Turkevich-Frens, que utiliza citrato trissódico como agente redutor; o método de Brust-Schiffrin, que emprega brometo de tetrabutilamônio e 1-dodecanethiol; e o método de Martin, que faz uso de borohidreto de sódio e 1-dodecanethiol (Coura *et al.*, 2018; Hammami *et al.*, 2021; Thiye *et al.*, 2022).

Os métodos convencionais de síntese de nanopartículas geralmente envolvem processos físicos, químicos e biológicos, que utilizam solventes e frequentemente geram resíduos tóxicos. Esses resíduos podem representar riscos significativos tanto para o meio ambiente quanto para a saúde humana. Como alternativa, a síntese verde se apresenta como

uma abordagem mais sustentável, ecológica e econômica. Esse método, geralmente, exige baixa energia e não é tóxico, utilizando reagentes naturais e renováveis, como extratos vegetais, frutas, fungos, enzimas e resíduos agrícolas. Essa abordagem não só reduz o impacto ambiental, mas também oferece uma maneira mais segura e eficiente de produzir nanopartículas (Gupta *et al.*, 2023; Papolu; Bhogi, 2023).

Em sua composição predominante, o mel é formado por açúcares como glicose, sacarose e frutose, que, junto com vitamina C, proteínas e enzimas, têm a capacidade de atuar como agentes redutores na síntese de nanopartículas. Além disso, o mel contém uma série de compostos antioxidantes, como aminoácidos, ácidos orgânicos, compostos fenólicos e proteínas, que podem conferir propriedades benéficas, tanto na redução de nanopartículas quanto no aumento da estabilidade e atividade biológica dessas partículas (Keskin *et al.*, 2023).

Portanto, este estudo busca sintetizar nanopartículas de prata através de uma síntese verde, utilizando o mel de *croton* sp., e avaliar sua estabilidade, caracterização e determinar sua eficácia antimicrobiana.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Nanotecnologia

A nanotecnologia, inicialmente idealizada por Richard Feynman em 1959, tem mostrado um crescente interesse mundial nas últimas décadas, principalmente devido às propriedades únicas que os materiais em escala nanométrica apresentam. Esses materiais possuem comportamentos e características físicas, químicas e biológicas diferentes daquelas em escalas macroscópicas, o que desperta grande atenção para seu uso em diversas áreas. Considerada uma das tecnologias mais promissoras do século XXI, a nanotecnologia está cada vez mais presente no cotidiano, sendo aplicada desde produtos de uso diário até dispositivos médicos avançados. Tal abrangência e potencial de impacto fazem com que essa área receba investimentos consideráveis, devido ao retorno financeiro esperado no setor industrial e nos mercados de alta tecnologia (Hulla; Sahu; Hayes, 2015; Haleem *et al.*, 2023).

De forma ampla, a nanotecnologia é uma ciência multidisciplinar, que envolve observações, manipulação, controle e fabricação de materiais em escala nanométrica (Bayda, 2019). A capacidade de desenvolver novos produtos ou melhorar os já existentes é possível por meio de métodos inovadores, que permitem reestruturar materiais, aprimorando suas características, como resistência, durabilidade e eficiência. Além disso, ela também promove a criação de dispositivos e soluções em áreas como eletrônica, medicina e meio ambiente, sempre promovendo um maior desempenho (Nasrollahzadeh *et al.*, 2019).

Para ser classificado como um nanomaterial é necessário que pelo menos uma de suas dimensões esteja na faixa nanométrica, geralmente entre 1 e 100 nanômetros. Entre os exemplos de nanomateriais, destacam-se as nanopartículas, as nanofibras e os nanotubos, cada um com propriedades e metodologias específicas (Khan *et al.*, 2022). Devido ao seu tamanho nanométrico, esses compostos permitem uma interação mais eficiente com materiais biológicos, tanto em seres humanos quanto em animais, podendo atuar em células, tecidos, órgãos e até mesmo em microrganismos (Chang *et al.*, 2015).

Na área da saúde, a nanotecnologia tem sido explorada, destacando-se os benefícios que pode trazer para a prevenção, diagnóstico, tratamento e monitoramento de doenças. Suas aplicações variam desde a entrega controlada de medicamentos, que podem aumentar a eficácia e reduzir os efeitos colaterais, até o desenvolvimento de dispositivos de detecção de alta precisão, próteses e implantes avançados que se integram melhor ao organismo e oferecem maior durabilidade e eficiência funcional. Esses avanços resultam em novas

possibilidades terapêuticas e em melhorias na qualidade de vida dos pacientes (Ramos *et al.*, 2017).

2.1.1 Nanopartículas

Nanopartículas são partículas com dimensões na escala nanométrica, variando entre 1 e 100 nm. No entanto, o termo nanomaterial é utilizado para descrever materiais que ultrapassam esse limite superior da nanoescala, variando entre 100 nm e 1000 nm, desde que exibam propriedades ou fenômenos que dependem do tamanho, ou seja, comportamentos distintos dos mesmos materiais quando observados em escalas maiores, como na macroescala (ANVISA, 2022). Essa diferenciação ocorre devido às suas características únicas, que surgem das interações na escala nanométrica. As nanopartículas possuem propriedades magnéticas, químicas, ópticas, elétricas, físicas e biológicas significativamente diferentes das de materiais com tamanhos maiores, o que as torna objetos de grande interesse em diversas áreas da ciência e da tecnologia, como na área biomédica (Dhaka *et al.*, 2023).

Além das nanopartículas, existem subgrupos de materiais que se comportam de forma semelhante às nanopartículas, com características próprias da escala nanométrica. Dentre esses, destacam-se os lipossomas, micelas, dendrímeros e pontos quânticos. Esses nanomateriais têm se destacado especialmente na área da saúde, sendo utilizados como carreadores de medicamentos, agentes de diagnóstico, marcadores moleculares, biossensores e até como revestimentos de materiais hospitalares, oferecendo vantagens como maior eficácia e menor toxicidade em relação aos tratamentos convencionais (Dhand *et al.*, 2015).

As propriedades das nanopartículas se devem, em grande parte, à sua maior área superficial, o que aumenta a interação com o meio e proporciona características como maior permeabilidade e solubilidade. Além disso, a presença de maior área de contato também possibilita a alteração de pontos de fusão e ebulição dos materiais (Dhaka *et al.*, 2023). Podendo ser constituídas de diversos materiais, como metais, polímeros, cerâmicas e óxido metálicos, as nanopartículas possuem, devido ao seu tamanho, morfologia e constituição, a capacidade de interagir com biomoléculas tanto no interior quanto no exterior das células, permitindo-lhes realizar atividades biológicas que afetam microorganismo (El-Gebaly *et al.*, 2023; Gupta *et al.*, 2023).

Entre os tipos mais estudados de nanopartículas, as metálicas se destacam pela sua versatilidade e propriedades únicas. As nanopartículas de prata (Ag) e de ouro (Au), em particular, apresentam propriedades ópticas notáveis, incluindo a ressonância plasmônica de

superfície (SPR), que ocorre na região do UV-visível-IR próximo. Essa propriedade possibilita a utilização dessas nanopartículas em diversas aplicações, como em imagens médicas, como agentes de contraste em ressonância magnética, além de permitir terapias fototérmicas. Em virtude dessas características, as nanopartículas metálicas se mostram como ferramentas poderosas para detecção, diagnóstico e tratamentos terapêuticos, especialmente na medicina (Ramos *et al.*, 2017).

O efeito SPR é um fenômeno de grande relevância para a caracterização e aplicação das nanopartículas metálicas. De maneira geral, refere-se à excitação dos elétrons livres na superfície das nanopartículas quando expostas à radiação eletromagnética incidente, o que resulta em uma absorção e dispersão da luz com diferentes intensidades e padrões, dependendo da composição, do tamanho e da forma das nanopartículas. Essa capacidade de modulação óptica permite o monitoramento da estabilidade físico-química das nanopartículas ao longo do tempo, além de fornecer informações sobre sua funcionalidade, o que é essencial para o desenvolvimento de novos dispositivos e terapias (Truong *et al.*, 2024).

Entre as nanopartículas metálicas, as de prata (AgNPs) têm se destacado, principalmente na biomedicina, devido às suas diversas propriedades, como atividades antibacterianas, antivirais, antifúngicas, antiparasitárias, anti-inflamatórias e antitumorais. Essas propriedades tornam as AgNPs uma escolha promissora para o desenvolvimento de métodos alternativos para o tratamento de doenças, como o câncer, e para a detecção e diagnóstico de enfermidades. Além disso, as nanopartículas de prata são utilizadas na fabricação de materiais médicos e hospitalares, como cateteres, dispositivos cardiovasculares, malhas cirúrgicas, membranas para regeneração cutânea, e materiais neurocirúrgicos e ortopédicos (Ramos, *et al.*, 2017; Gherasim *et al.*, 2020; Sakthi *et al.*, 2022).

No entanto, apesar dos benefícios terapêuticos das AgNPs, elas têm demonstrado ser citotóxica em células de mamíferos. O acúmulo de AgNPs nas células pode levar a danos no DNA, alteração na expressão de genes responsáveis pelo ciclo celular, formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), radicais livres e danos à membrana celular, induzindo a apoptose. Devido a esses efeitos citotóxicos, as AgNPs não são recomendadas para aplicação sistêmica (Tortella *et al.*, 2020; Gherasim *et al.*, 2020).

2.2 Síntese de nanopartículas

A síntese de nanopartículas baseia-se em dois princípios, de cima para baixo (top-down) e de baixo para cima (bottom-up). O top-down consiste na redução do material até

a nanoescala, para isso pode ser utilizado métodos físicos ou químicos, como a moagem que por meio da pressão exercida sobre o material, haverá a sua fragmentação em partículas menores. O bottom-up é a construção de partículas maiores a partir de partículas menores como átomos e moléculas (Abdi *et al.*, 2022).

Os métodos convencionais utilizados para síntese de nanopartículas, podem ser empregados em técnicas físicas ou químicas. Entre os físicos, podem ser empregados por exemplo, condensação/evaporação, síntese solvotérmica, técnica de sol gel e ablação a laser. Já em métodos químicos são utilizados, por exemplo, redução química, micela reversa, eletroquímica e deposição química de vapor (Keskin *et al.*, 2023; Magdy *et al.*, 2024).

As AgNPs são obtidas a partir de um precursor, convencionalmente, sais de prata que são submetidos a agentes redutores que reduzem o sais de prata em íons de prata (Ag^+). Para estabilizar, geralmente são utilizados surfactantes, permitindo assim a dispersão entre nanopartículas impedindo sua agregação. Além disso, o tamanho e forma são influenciadas pelo agente redutor, estabilizante, pH, temperatura e tempo de reação (Dawadi *et al.*, 2021).

Em geral, são utilizados reagentes químicos como borohidreto de sódio, citrato de sódio, carbonato e hidrogênio elementar que atuam reduzindo os íons metálicos favorecendo a formação de aglomerados ou agregados, além de atuarem como estabilizantes. Dessa forma, os métodos químicos permitem uma reprodutividade e controle do tamanho de nanopartículas, entretanto, os reagentes utilizados para a síntese podem gerar subprodutos tóxicos, não sendo assim uma alternativa ecologicamente viável (Keskin *et al.*, 2023; Magdy *et al.*, 2024).

2.2.1 Síntese verde

Nas últimas duas décadas, visando obter nanopartículas de uma forma ecologicamente sustentáveis, a síntese verde tem surgido como uma alternativa viável devido seu caráter atóxico, sustentável e econômico, geralmente exigindo baixa energia. Não utilizando reagentes que geram produtos ou subprodutos que comprometam o meio ambiente ou a saúde humana. Assim, produtos de origem natural, como extratos de plantas, bactérias, fungos e enzimas, podem atuar como agentes redutores e estabilizantes de nanopartículas. Outra vantagem em relação aos métodos convencionais é que, devido sua composição, a síntese verde permite a produção de nanopartículas com variados tamanhos, formas e propriedades físicas, químicas e biológicas (Rónavári *et al.*, 2021; Gupta *et al.*, 2023).

A síntese das nanopartículas geralmente envolve três etapas principais, a redução, nucleação e o crescimento. Na síntese verde, compostos como saponinas, alcaloides, flavonoides e terpenoides atuam como agente redutor dos íons metálicos. Após a redução dos íons metálicos, a supersaturação da solução leva ao processo de nucleação, no qual pequenas partículas começam a se formar, essas partículas irão se aglomerar até obter uma estabilidade. Além disso, esses compostos garantem uma estabilidade na superfície das nanopartículas formadas, impedindo assim que se agreguem, mantendo a dispersão das partículas (Thoms *et al.*, 2024).

O mel é um composto natural obtido através de abelhas constituído de diversos compostos, como glicose (35%), frutose (40%), sacarose (5%), água (15-17%) e proteínas (0,1-0,4%). Ademais, o mel apresenta outros constituintes como enzimas, compostos fenólicos, vitaminas e flavonóides (Keskin *et al.*, 2023; Bahari *et al.*, 2023). Devido a essa rica variedade de compostos, apresenta atividade cicatrizante, antibacteriana, antiinflamatória e antioxidante, podendo ser utilizado para o tratamento de feridas (Scepankova *et al.*, 2021).

Devido aos componentes presentes no mel, esse vem sendo utilizado para a realização de síntese de nanopartículas. A exemplo, a glicose, frutose, proteínas, enzimas, vitaminas e ácido fenólico possuem ação oxidante, atuando como agente redutor. As proteínas presentes no mel podem atuar como agente de revestimento, contribuindo para a estabilidade, impedindo a aglomeração e oxidação das nanopartículas (Bahari *et al.*, 2023).

2.3 Estabilidade

A estabilidade das nanopartículas, em especial as AgNPs, refere-se a capacidade das nanopartículas manterem as suas características, impedindo a formação de agregados ou se dissolvendo (Bahari *et al.*, 2023). Para isso, vários fatores são levados em consideração, na síntese química, por exemplo, em altas temperaturas, a reação de formação de nanopartículas ocorre mais rápidas, entretanto, pode haver a formação de nanopartículas maiores e com formatos irregulares e em temperaturas baixas, a síntese pode ocorrer de uma forma lenta (Nguyen *et al.*, 2023).

O pH é um fator crucial na obtenção das AgNPs, pois exerce influência direta sobre o processo de formação e estabilidade dessas partículas. Em ambientes altamente ácidos, o pH baixo pode favorecer a liberação excessiva de íons de prata (Ag^+), o que pode resultar na formação de precipitados indesejáveis, como o cloreto de prata (AgCl) (Fernando; Zhou,

2019). Além disso, em condições aquosas, o óxido de prata pode liberar íons Ag^+ por meio do processo de dissolução (Phan; Haes; 2019).

Outro fator importante a ser considerado na estabilidade das AgNPs é a presença de oxigênio no ambiente. As AgNPs são particularmente sensíveis ao oxigênio, o que pode levar à oxidação da prata. A oxidação ocorre quando a prata metálica reage com o oxigênio presente no ar ou no meio aquoso, formando compostos como o óxido de prata (Ag_2O). Esse processo também pode amortecer as características de ressonância plasmônica, resultando na diminuição da intensidade da resposta óptica das nanopartículas, o que pode levar à agregação (Phan; Haes; 2019; Slepíčka *et al.*, 2019).

2.4 Atividade antimicrobiana das AgNPs

A prata tem sido utilizada há séculos devido à sua ação antimicrobiana, sendo empregada tanto de forma isolada quanto em associação com outras tecnologias. Seu uso abrange diversas áreas, desde o desenvolvimento de formas farmacêuticas para o tratamento de feridas e queimaduras, até a formulação de cosméticos. Além disso, é aplicada no revestimento de materiais médico-hospitalares e, na indústria, no preparo de embalagens de alimentos e eletrodomésticos (Bruna *et al.*, 2021).

As propriedades antimicrobianas das AgNPs estão diretamente relacionadas a diversos fatores físico-químicos, como o método de obtenção, o tamanho, a forma e a carga superficial. Dentre esses fatores, o tamanho das nanopartículas, em particular, desempenha um papel crucial, pois possibilita a penetração nas paredes celulares e o desregulamento das funções celulares, levando à morte celular. (Chugh; Viswamalya; Das, 2021).

O principal mecanismo de ação das AgNPs sobre as bactérias está relacionado ao estresse oxidativo. Em resposta, às AgNPs promovem a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e radicais livres, cuja quantidade está associada à concentração e ao tamanho das nanopartículas. As ROS, como ânions superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxila, oxigênio singlete e ácido hipocloroso, causam danos ao DNA, a enzimas e à membrana celular, ativando a via de apoptose, levando à morte celular (Bruna *et al.*, 2021; Crisan *et al.*, 2021).

A formação de poros na membrana celular, que resulta da interação dos íons de prata com as células carregadas negativamente, é um dos principais mecanismos pelos quais as AgNPs exercem sua ação antimicrobiana. Esses poros comprometem a integridade da

membrana celular, levando à perda de componentes essenciais. A prata coloidal pode interagir com grupos sulfidrilas presentes nas proteínas da parede celular. Essa interação pode levar à formação de pontes dissulfeto, que modificam a estrutura das proteínas e comprometem sua função. Como resultado, a respiração celular pode ser bloqueada levando a morte celular (Crisan *et al.*, 2021).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Desenvolver e avaliar nanopartículas de prata por meio de uma síntese verde, utilizando mel a 3% como agente estabilizador, e avaliar sua atividade antimicrobiana.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar a síntese das nanopartículas de prata utilizando mel 3%;
- Caracterizar físico-quimicamente as AgNPs através das técnicas de NTA e DLS;
- Avaliar a estabilidade das AgNPs através da espectroscopia UV-Vis;
- Quantificar os compostos presente no mel;
- Avaliar a ação antimicrobiana das AgNPs contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

Na síntese das AgNPs, foi utilizado nitrato de prata (AgNO_3) proveniente da indústria cennabras, lote 1569-07A, e hidróxido de sódio (NaOH) da indústria LABSYNTH[®], lote 113612, juntamente com mel de marmeleiro (*Croton* sp.) da abelha *Apis mellifera*, obtido de um produtor local na cidade de Campina Grande-PB em janeiro de 2024.

4.2 Métodos

4.2.1 Síntese das nanopartículas de Prata

Para a realizar a síntese, foi adaptado a metodologia empregada por González *et al.* (2016). Inicialmente, 100 mL de uma solução de mel a 3% foi feita considerando o ajuste da massa pesada com a respectiva densidade do mel. Em sequência foi preparado 20 mL uma solução 5,88 mM de nitrato de prata (AgNO_3), onde foram pesados 19,7 mg de AgNO_3 e adicionado em um balão volumétrico de 20 mL, sendo então completado o volume com água destilada. Em seguida, foi preparado uma solução de 0,1M de hidróxido de sódio (NaOH). Para isso, foram pesados 40 mg de NaOH e adicionados a um balão volumétrico de 10 mL e completado o volume com água destilada.

O pH da solução de mel foi ajustado para 9,5 utilizando a solução de NaOH . Posteriormente, sob agitação a 600 rpm e temperatura de 70 °C, foram adicionados 13,5 mL da solução de AgNO_3 , equivalente a 13,5 % do volume total da solução de mel. Durante a reação, foi possível observar a mudança de cor indicativa da formação das nanopartículas, e a mistura foi deixada em agitação por 2 horas. As AgNPs foram então submetidas à centrifugação a 5.000 rpm por 15 minutos para que os compostos sólidos se precipitassem. Em seguida, o sobrenadante foi retirado e utilizado para as análises subseqüentes.

4.2.2 Caracterização das nanopartículas de Prata

4.2.2.1 Espectroscopia de absorção no UV-Vis

Para avaliar a estabilidade, foram examinadas as soluções de AgNPs em diferentes intervalos de tempos (nos dias: 0, 1, 3, 7, 10, 15, 20, 30, 60 e 90) utilizando o espectrofotômetro UV-visível, modelo UV-mini-1240, da marca Shimadzu[®]. A análise foi realizada na faixa de comprimento de onda de 190 – 1100 nm. A absorbância na faixa de 320 a 440 nm foi priorizada, empregando uma cubeta de quartzo. Além disso, a análise dos aspectos visuais da amostra foi acompanhada pelo registro de imagens com o auxílio da câmera de um iPhone 8 Plus.

4.2.2.2 Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA)

Foi realizado a análise de rastreamento de nanopartículas (NTA - *nanoparticle tracking analysis*) das sínteses do dia 1 e dia 30 para determinação do tamanho e da concentração das AgNPs, por meio do equipamento NanoSight NS300, da marca Malvern Instruments[®]. Com auxílio de uma seringa, foi introduzido 1 mL da amostra diluída em 100 vezes. A amostra foi submetida a um laser verde a 532 nm, possibilitando a identificação do tamanho médio das partículas, moda, desvio padrão e concentração de partículas por mL com base na dispersão da luz.

4.2.2.3 Diâmetro hidrodinâmico médio (d.nm), índice de polidispersão (IPD) e potencial zeta (PZ)

A determinação do diâmetro hidrodinâmico médio (d.nm) e do índice de polidispersão (IPD) das nanopartículas de prata (NP-Ag) foi realizada após 60 dias da síntese por meio da técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS – *dynamic light scattering*). O potencial zeta (ζ) (PZ) das nanopartículas também foi avaliado utilizando o mesmo equipamento. As medições foram feitas em réplicas, a uma temperatura de 25 °C. Para a análise, não foi necessário diluir a amostra, que foi mantida em frascos fechados, transferida para uma cubeta e colocada na célula eletroforética, com dispersão em um ângulo de 90°.

4.2.3 Quantificação dos compostos e metabólitos secundários presente no mel

4.2.3.1 Determinação de flavonóides

A quantificação de flavonoides foi realizada conforme a metodologia descrita por Meda et al. (2005). Primeiramente, foi pesado 200 mg de cloreto de alumínio (AlCl_3), que foram dissolvidos em metanol até completar o volume de 10 mL em um balão volumétrico. A solução foi colocada em um banho de ultrassom para garantir a completa dissolução do AlCl_3 . Em seguida, preparou-se uma solução de mel a 10%, dissolvendo 1,4027 g de mel em 9 mL de metanol. Em ambiente escuro, realizou-se a reação diluindo 1,5 mL da solução de AlCl_3 em 1,5 mL da solução de mel 10%, deixando reagir por 10 minutos. Para o branco, foi feita uma diluição de 1,5 mL de metanol com 1,5 mL da solução de AlCl_3 . A leitura da absorbância da amostra foi realizada em um espectrofotômetro UV-Vis a 415 nm.

4.2.3.2 Determinação de polifenóis

A determinação da quantidade de polifenóis foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Chandra (2004). Inicialmente, preparou-se uma solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3) 20%, dissolvendo 5 g de Na_2CO_3 em água destilada, completando o volume para 25 mL em um balão volumétrico. Em seguida, preparou-se uma solução de Folin-Ciocalteu (FC) 50%, para a qual foram adicionados 5 mL de solução de FC em 5 mL de água destilada, homogeneizando a mistura em um béquer de 10 mL. Além disso, foi preparada uma solução de mel a 10%, dissolvendo 1,4027 g de mel em 9 mL de água destilada.

A quantificação foi realizada a 25 °C. Em um tubo de ensaio, adicionou-se 0,5 mL da solução de FC 50% e 0,5 mL da solução de mel 10%, permitindo a reação por 2 minutos. Após esse tempo, adicionou-se 1 mL da solução de Na_2CO_3 20%, deixando a mistura repousar por 10 minutos. Para o branco, preparou-se uma solução de 0,5 mL de FC 50%, 0,5 mL de água e 1 mL de Na_2CO_3 20%. A absorbância foi medida em um espectrofotômetro UV-vis a 747 nm.

4.2.3.3 Determinação de taninos

A quantificação de taninos condensados foi realizada de acordo com a metodologia de Makkar (1995). Primeiramente, preparou-se uma solução de vanilina a 4%, pesando 4 g de vanilina P.A. e dissolvendo-a em 80 mL de metanol em um balão volumétrico de 100 mL, homogeneizando a mistura e completando o volume com metanol. Em seguida, preparou-se uma solução de mel a 10%, dissolvendo 1,4027 g de mel em 9 mL de metanol.

Para a análise, em um tubo de ensaio, adicionou-se 1,5 mL da solução de vanilina 4%, 0,25 mL da solução de mel e 0,75 mL de ácido clorídrico (HCl). Essa mistura foi deixada em repouso por 20 minutos à temperatura de 22 °C. O procedimento foi realizado em triplicata. O branco foi preparado com 1,5 mL da solução de vanilina 4%, 0,25 mL de metanol e 0,75 mL de HCl. Após o período de repouso, as amostras foram analisadas em um espectrofotômetro UV-Vis, utilizando o comprimento de onda de 500 nm.

4.2.3.4 Determinação de açúcar redutor

A quantificação de açúcar redutor foi realizada por meio da adaptação da metodologia de Maldonade (2013). Inicialmente, preparou-se uma solução padrão de glicose a 1,0 g/L, pesando 0,1 g de glicose, a qual foi dissolvida em 20 mL de água destilada, homogeneizada e transferida para um balão volumétrico de 100 mL, completando o volume com água destilada. A solução de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) foi preparada pesando 10,6 g de DNS e 19,8 g de NaOH, os quais foram dissolvidos em 1,416 L de água destilada. A isso, adicionou-se 7,6 mL de fenol e 8,3 g de metabissulfito de sódio. Em seguida, preparou-se uma solução de tartarato duplo de sódio e potássio, pesando 15,1 g do composto e adicionando 1 mL de água destilada. Para a solução de hidróxido de sódio (NaOH) 2N, pesaram-se 40 g de NaOH, que foram diluídos em 500 mL de água destilada. Por fim, foi preparada uma solução de HCl 2N em capela de fluxo, pesando 85 mL de HCl, que foi transferido para um balão volumétrico de 500 mL e completado com água destilada até o volume final.

A análise foi realizada adicionando 1 g de mel em um balão volumétrico de 50 mL, que foi completado com água destilada. A amostra foi então submetida à centrifugação a 5.000 rpm por 15 minutos. Após a centrifugação, retirou-se 2 mL do sobrenadante e adicionou-se 2 mL da solução de HCl 2N. A mistura foi aquecida em banho-maria por 10 minutos e, em seguida, resfriada em banho de gelo. Posteriormente, adicionou-se 2 mL de NaOH 2N e homogeneizou-se bem. Retirou-se 1 mL do sobrenadante e transferiu-se para um

tubo de ensaio, ao qual foi acrescentado 1 mL da solução de DNS. A mistura foi então submetida à ebulição por 5 minutos e resfriada em banho de gelo por 5 minutos. Após o resfriamento, adicionaram-se 16 mL da solução de tartarato duplo de potássio e a leitura foi realizada em um espectrofotômetro UV-VIS, utilizando um comprimento de onda de 540 nm. O branco foi realizado substituindo a amostra por água destilada.

4.2.4 Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana das AgNPs

4.2.4.1 Preparo do inóculo

Para avaliação da atividade antimicrobiana foi utilizada como linhagem a *Candida albicans* (ATCC 10231) como fungo, *Staphylococcus aureus* (ATCC 25223) e *Escherichia coli* (ATCC 25922) como bactéria. *Candida albicans* foi cultivada em Ágar Sabouraud Dextrose, enquanto o *Staphylococcus aureus* e a *Escherichia coli* foram cultivados no Ágar Mueller-Hinton, todos por 24 horas. Em seguida, o inóculo foi padronizado. Para isso, adicionaram-se 10 mL de caldo Sabouraud Dextrose (para o fungo) e 10 mL de Mueller-Hinton (para bactérias) em tubos de ensaio, seguido da adição de 1 a 5 colônias de cada microrganismo. Essa mistura foi agitada por 15 minutos e a absorbância foi medida no espectrofotômetro a 530 nm para o fungo e 625 para as bactérias, sendo realizado o branco em seus respectivos caldos. A leitura foi ajustada de acordo com a escala 0,5 de McFarland, correspondendo a uma absorbância entre 0,08 a 0,1 de absorbância, indicando a presença de aproximadamente 1 a 2 x 10⁸ Unidades Formadoras de Colônia (UFC/mL) para bactérias e 1 a 5 x 10⁶ UFC/mL para fungo.

4.2.4.2 Determinação da Concentração Inibitória e Bactericida/Fungicida Mínima

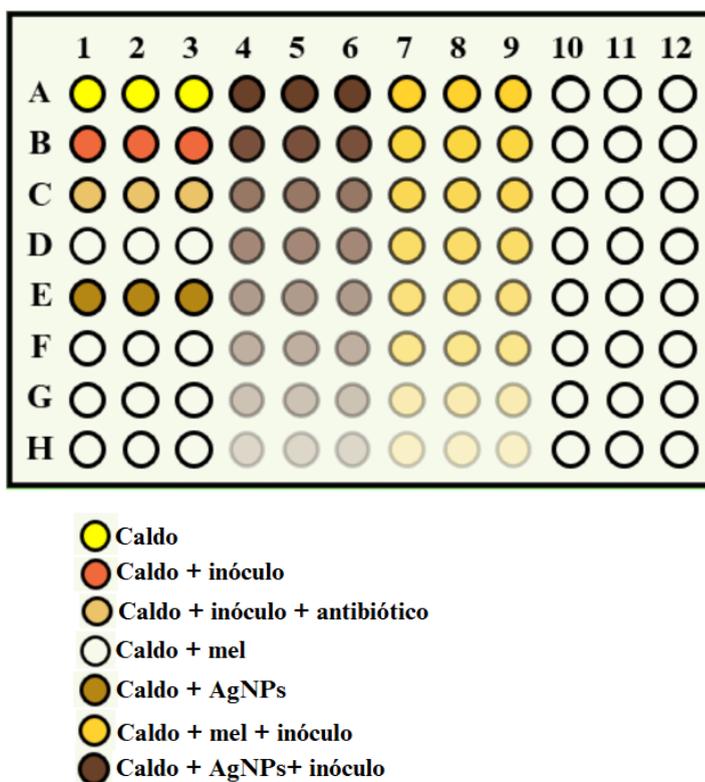
A determinação do CIM foi realizada utilizando uma adaptação da metodologia descrita pelas normas M07 e M27 do manual *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Essa metodologia utiliza diluições seriadas (Figura 1), nas quais, em todos os poços testados, adicionou-se 100 µL do caldo. Nas colunas A5, A6 e A7 foram adicionados 100 µL das AgNPs. Os poços foram homogeneizados e diluídos, retirando-se 100 µL de cada poço e

adicionando-os ao poço seguinte da respectiva coluna. Nas colunas A9, A10 e A11, o mesmo procedimento foi realizado com a solução de mel.

Os controles foram realizados na coluna A1, A2 e A3, onde foi adicionado apenas 100 μL de caldo. Nos poços B1, B2 e B3, foram adicionados 100 μL do caldo e 10 μL do inóculo quando se tratava de bactérias, ou 5 μL do inóculo quando se tratava de fungos. Nos poços C1, C2 e C3, foram adicionados 100 μL do caldo e 100 μL do antibiótico (nistatina para fungo ou cefalosporina para bactérias, ambos na concentração de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$). No poço D1, D2 e D3, foram adicionados 100 μL das AgNPs e 100 μL do caldo. Já nos poços E1, E2 e E3, foi adicionada apenas 100 μL da solução de mel e 100 μL do caldo.

Por fim, com exceção dos poços D1, D2, D3, E1, E2 e E3, serão adicionados 5 μL do inóculo (fungo) ou 20 μL do inóculo (bactérias) em todos os poços, os quais foram incubados a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas para bactérias e a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 horas para fungos. A revelação realizada após 24 horas, quando em cada poço foi adicionado 40 μL de resazurina a 0,01% (Sigma Aldrich®), previamente filtrada em membrana 0,22 μm , e a leitura foi feita após 2 horas. O roseamento do poço indica a presença de fungo ou bactéria. A determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM) foi avaliada em ágar Sabouraud Dextrose e a Concentração Bactericida Mínima (CBM) em ágar Mueller-Hinton. Foi realizado o repique do último poço que apresentou atividade. Esse material foi incubado a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas para bactérias e a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 horas para fungos, conforme a metodologia descrita pelas normas do CLSI M27-A3 e M07.

Figura 1 - Metodologia de execução da microdiluição em caldo na microplaca de 96 poços



Legenda: AgNPs: Nanopartículas de prata

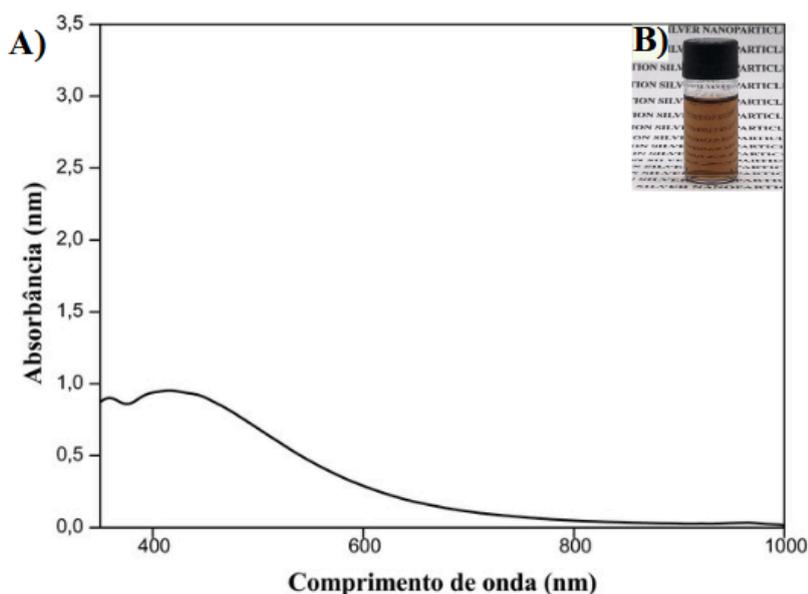
Fonte: Autoria própria (2024)

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção das nanopartículas de prata

O processo de síntese foi visualmente confirmado pela mudança de cor da solução, que ao final da reação, passou de uma solução clara para uma tonalidade escura (Figura 2b). Essa alteração de cor está relacionada à excitação da ressonância plasmônica da superfície das AgNPs. Além disso, a confirmação da síntese das AgNPs foi obtida por meio da análise espectrofotométrica UV-Vis, onde foi observado um pico de absorção na faixa de comprimento de 407 nm (Figura 2a), característico das AgNPs, conforme descrito por Anju (2021). Picos na faixa de próximo a 405 nm, está relacionado a AgNPs com tamanho esférico (Rehal *et al.*, 2023).

Figura 2- (a) Espectro de absorção UV-Vis. (b) AgNPs



Fonte: Dados da pesquisa (2024).

5.2 Espectroscopia com absorção no UV-vis

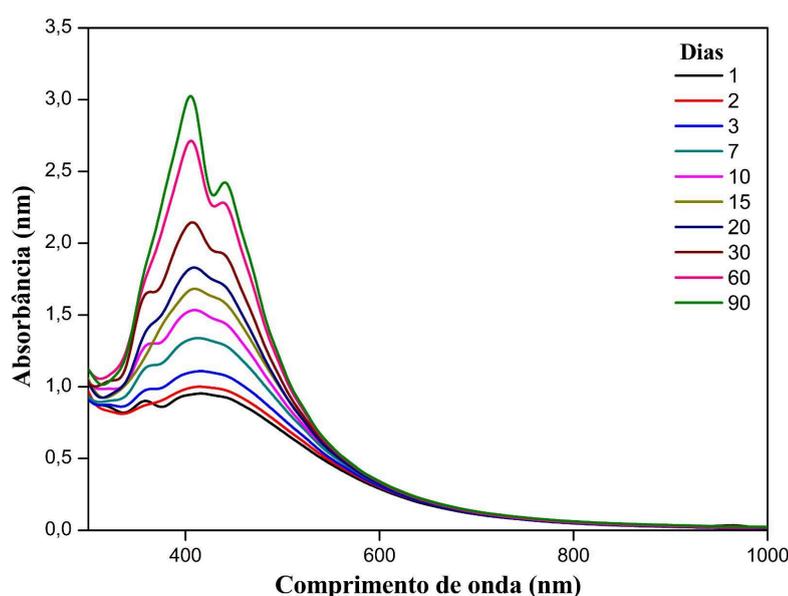
A análise espectroscópica realizada para monitorar a estabilidade das nanopartículas ao longo do tempo indicou uma estabilidade de 90 dias. Durante esse período, foi observado que, ao longo dos dias, houve um aumento na uniformidade da distribuição dos tamanhos das partículas. A presença de ombros nos espectros pode estar relacionada à distribuição de grupos de nanopartículas de tamanhos distintos. Além disso, foi observada uma diminuição

no alargamento dos picos e um aumento na intensidade da absorbância. Esse fenômeno pode estar relacionado a um aumento na concentração e tamanho das nanopartículas, sugerindo que o processo de oxidação, ou seja, partículas menores estão se dispersando, aumentando a concentração na solução e se ligando em partículas maiores.

De acordo com Granbohm (2018), além do processo de nucleação e crescimento, pode ocorrer o processo de amadurecimento de Ostwald, que consiste na dissolução de partículas menores para formar partículas maiores, como indicado pelo aumento dos picos de absorção no UV-Vis e confirmado pela técnica de NTA. Essa dissolução de partículas pode estar relacionada ao processo de oxidação das AgNPs, o qual pode ser ocasionado pela exposição ao oxigênio e à luz.

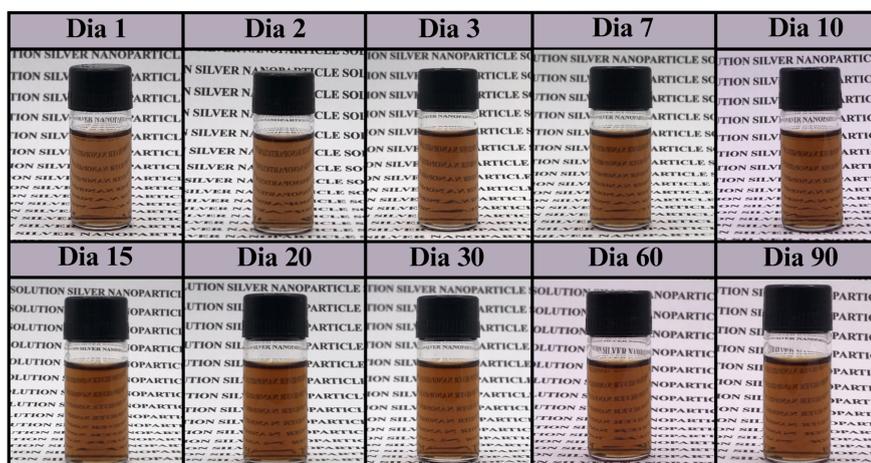
A confirmação da estabilidade também foi observada por análises visuais (Figura 4), nas quais foi demonstrado que, ao longo dos dias, as AgNPs não apresentaram mudanças significativas em sua cor, nem a presença de precipitados, os quais são característicos de perda de estabilidade. Segundo Rehal *et al.* (2023), é possível visualizar as AgNPs devido às propriedades de ressonância plasmônica de superfície, que, dependendo da forma, tamanho e concentração das partículas, podem apresentar cores variando desde amarelo claro, vermelho escuro a verde.

Figura 3- Espectro UV-vis das AgNPs



Fonte: Dados da pesquisa (2024).

Figura 4 - Avaliação visual da estabilidade das AgNPs

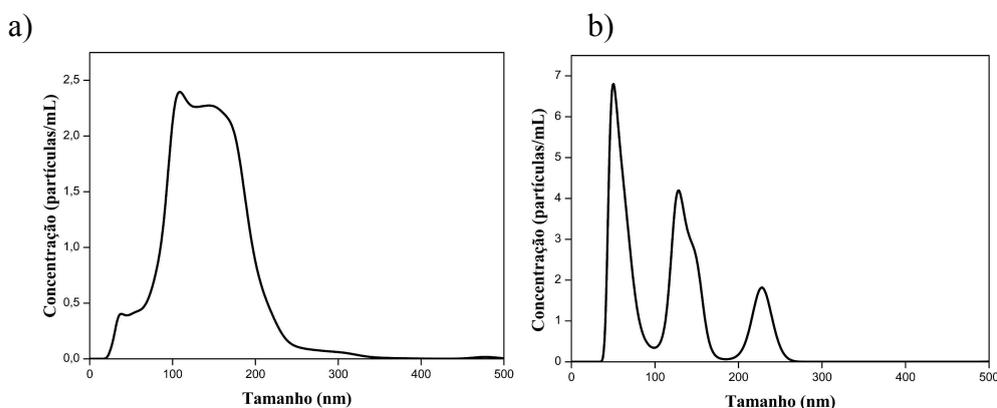


Fonte: Dados da pesquisa (2024).

5.3 Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA)

O NTA obtido das AgNPs analisada no dia 1 apresentou um tamanho médio de $141,6 \pm 4,4$ nm, com uma moda de $140,3 \pm 12,1$ nm e uma concentração de $2,82 \times 10^8 \pm 3,75 \times 10^6$ partículas/mL. A mesma amostra analisada após 30 dias de sua síntese possuía um tamanho médio de $127,8 \pm 5,2$ nm, ocasionando uma moda de $60,9 \pm 3,8$ nm e uma concentração de $4,65 \times 10^8 \pm 4,94 \times 10^7$ part./mL. conforme apresentado na Figura 5.

Figura 5- Análise quantitativa da relação entre distribuição de tamanho de partículas e concentração, medida por Análise de Rastreamento de Nanopartículas - NTA no dia 1 (a) e no dia 30 (b)



Fonte: Dados da pesquisa (2024).

A diminuição do tamanho médio das AgNPs pode ser resultado da oxidação das partículas, o que pode ocasionar dois processos: a liberação dos íons de prata presente na

superfície das partículas e a continuação do processo de nucleação, que aumenta o número de partículas presentes na solução. Esse aumento na quantidade de partículas pequenas favorece a agregação em partículas maiores, resultando no amadurecimento de Ostwald, como evidenciado pela estabilidade observada no UV-Vis.

Esse comportamento explica o aumento da concentração das partículas de $2,82 \times 10^8 \pm 3,75 \times 10^6$ no dia 1, para $4,65 \times 10^8 \pm 4,94 \times 10^7$ part./mL no dia 30, pois a desagregação de partículas, em partículas menores resultará em uma maior concentração dessas partículas presente na solução.

5.4 Diâmetro hidrodinâmico médio (d.nm), índice de polidispersão (IPD) e potencial zeta (PZ)

O diâmetro hidrodinâmico médio das AgNPs, medido no 60º dia após a síntese, foi de 126,49 nm, valor que está dentro da faixa de tamanhos indicada pelo NTA. O índice de polidispersão (IPD) foi de 3,465, o que sugere uma distribuição de tamanhos das partículas. Quando o IPD é superior a 0,400, como no caso da amostra, isso indica que o sistema é polidisperso (Leersnyder *et al.*, 2019). Além disso, o valor elevado do IPD também pode estar relacionado à presença de impurezas na solução de mel, que contribuem para o aumento desse índice. Portanto, o IPD elevado observado indica a presença de um sistema polidisperso, o que pode ser confirmado pelos picos mais largos observados no UV-Vis (Figura 3), sugerindo partículas de tamanhos diferentes e refletindo uma menor uniformidade, além de caracterizar-se por uma ampla distribuição de tamanhos das nanopartículas, como evidenciado pelo NTA (Figura 4b).

O potencial zeta (PZ) das AgNPs obtido foi de -13,77 mV. Esse valor é um indicativo da estabilidade do sistema coloidal, uma vez que o PZ reflete a carga superficial das partículas em relação ao líquido no qual estão dispersas. Valores elevados de PZ, sejam negativos ou positivos, favorecem a repulsão entre as partículas, enquanto valores baixos indicam uma tendência de atração (Singh; Bharti, Meena, 2014). Um sistema é geralmente considerado estável quando o PZ está dentro da faixa de ± 30 mV, o que inclui o valor obtido nesta amostra, indicando que as AgNPs estão em um estado estável (Vanitha *et al.*, 2017).

5.5 Quantificação dos compostos e metabólitos secundários do mel

Os resultados obtidos da análise do mel foram resumidos na tabela 1.

Tabela 1 - Compostos e metabólitos secundários presente no mel

Compostos	Quantidades em relação ao mel
Flavonóides totais	55,88 mgEQ/Kg
Polifenóis	347,4 mg/Kg
Taninos	251,25 mg/Kg
Açúcares redutores	87,9%

Fonte: Dados da pesquisa (2024).

Legenda: EQ: Equivalente de quecertina; Kg: quilograma; g: grama

O mel analisado apresentou uma concentração de flavonoides de 55,88 EQ/Kg e de polifenóis de 347,4 mg/Kg. Quanto aos taninos, foi obtido um valor de 251,25 mg/Kg. Além disso, observou-se uma porcentagem de 87,9% de açúcares redutores. A composição do mel pode variar dependendo da espécie de abelha, da flora local e de fatores climáticos (Souza *et al.*, 2024). Esses compostos presentes no mel desempenham um papel fundamental no processo de biorredução do íon Ag^+ e também atuam como agentes de cobertura, sendo responsáveis pela redução e pela estabilidade das nanopartículas de prata (AgNPs) (Keskin *et al.*, 2023).

5.6 Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana

5.6.1 Determinação da *Concentração Inibitória Mínima* e *Concentração Fungicida/Bactericida Mínima*.

Os resultados da atividade antifúngica e antibacteriana realizada pela técnica de microdiluição em caldo, foram resumidos na Tabela 2.

Tabela 2 - Determinação do CIM e CBM/CFM da AgNPs, em part./mL

Microrganismo	ATCC	CIM (part./mL)	CBM/CFM (part./mL)
<i>C. albicans</i>	10231	$\geq 1,41 \times 10^7$	$\geq 7,05 \times 10^6$
<i>S. aureus</i>	25223	$\geq 7,05 \times 10^6$	$\geq 3,53 \times 10^6$
<i>E. coli</i>	25992	$\geq 2,82 \times 10^7$	$\geq 2,82 \times 10^7$

Fonte: Dados da pesquisa (2024).

Legenda: ATCC: American Type Culture Collection; CIM: concentração inibitória mínima; CBM: concentração bacteriostática mínima; CFM: concentração fungistática mínima; mL: mililitro; part: partícula.

Na literatura, os resultados relativos a atividade antimicrobiana são comumente expressos em $\mu\text{g/mL}$ se baseando na concentração das AgNP por processos de secagem como a liofilização, ou em outros parâmetros físicos como a concentração em massa de um dos ingredientes utilizados, a exemplo do próprio nitrato de prata (AgNO_3), e os resultados obtidos são expressos em $\mu\text{g/mL}$. No entanto, neste estudo, os resultados foram obtidos em termos de partículas/mL (part./mL), conforme a concentração medida pelo método de NTA. Para *C. albicans*, foi determinada uma CIM de $\geq 1,41 \times 10^7$ part./mL, enquanto a CFM foi de $7,05 \times 10^6$. Para o *S. aureus*, a CIM foi de $\geq 7,05 \times 10^6$ part.mL e a CBM de $\geq 3,53 \times 10^6$ part.mL. Em comparação, para *E. coli*, obtiveram-se valores de CIM e CBM de $\geq 2,82 \times 10^7$ de part.mL.

Entre os microrganismos testados, a *Candida albicans* apresentou uma resposta inibitória menor em relação às bactérias. Essa diferença de sensibilidade pode ser atribuída à maior complexidade estrutural das células fúngicas em comparação com as células bacterianas, o que dificulta a ação de agentes antimicrobianos, incluindo as AgNPs. Enquanto as células bacterianas possuem uma parede celular mais simples, as células fúngicas têm uma estrutura mais complexa, com uma parede celular composta por polissacarídeos, proteínas e quitina, além de uma membrana lipídica, que pode atuar como uma barreira adicional contra a penetração das AgNPs (Lenardon *et al.*, 2020; Mansoor *et al.*, 2021). como resultado, são necessárias concentrações mais elevadas de AgNPs para alcançar um efeito inibitório satisfatório.

A maior atividade inibitória observada no *S. aureus* em relação ao *E. coli* pode estar relacionada à maior quantidade de mecanismos de defesa das bactérias gram-negativas contra AgNPs, quando comparadas às gram-positivas. O envelope celular das bactérias

gram-negativas, formado por proteínas, fosfolipídios e lipopolissacarídeos, oferece maior resistência às AgNPs, em comparação com as gram-positivas, nas quais a presença de peptidoglicano e ácidos teicóicos facilita a penetração das nanopartículas. Além disso, a carga superficial das nanopartículas garante maior seletividade contra certas bactérias (Salas-Orozco *et al.*, 2019). Contudo, o tamanho e a concentração das nanopartículas também devem ser considerados para garantir uma atividade antimicrobiana eficaz contra determinadas cepas.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As nanopartículas de prata foram obtidas por meio de síntese verde, utilizando mel a 3% como agente estabilizador. A caracterização das AgNPs pelas técnicas de NTA, DLS e monitoramento de sua estabilidade através de espectroscopia UV-vis permitiram observar um sistema estável por 90 dias e a análise do mel possibilitou determinar a concentração de seus componentes responsáveis pela síntese e estabilidade das nanopartículas. A avaliação antimicrobiana apresentou resultados promissores contra *C. albicans*, *S. aureus* e *E. coli*. Dessa forma, as AgNPs obtidas com o mel se mostraram uma alternativa sustentável e estável, com potencial promissor contra esses microrganismos como no revestimento de materiais médico-hospitalares.

REFERÊNCIAS

- ABDI, N. *et al.* Synthesis of nanomaterials using various top-down and bottom-up approaches, influencing factors, advantages, and disadvantages: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 300, p. 102597, 2022.
- Anvisa. Resolução RDC nº 751, de 15 de setembro de 2022. Ministério da Saúde - MS. **Agência Nacional da Vigilância Sanitária - Anvisa**.
- ALARCON, R. *et al.* Ostwald Ripening and Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Capped by Anti-Inflammatory Ligands. **Nanomaterials**, v. 13, n. 3, p. 428–428, 20 jan. 2023.
- BAHARI, N. *et al.* Role of Honey as a Bifunctional Reducing and Capping/Stabilizing Agent: Application for Silver and Zinc Oxide Nanoparticles. **Nanomaterials**, v. 13, n. 7, p. 1244, 2023.
- BARILLO, David J.; MARX, David E. Silver in medicine: A brief history BC 335 to present. **Burns**, v. 40, p. S3–S8, 2014.
- BAYDA, S. *et al.* The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical–Physical Applications to Nanomedicine. **Molecules**, v. 25, n. 1, p. 112, 2019.
- BRUNA, T. *et al.* Silver Nanoparticles and Their Antibacterial Applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 13, p. 7202, 2021.
- CHANDRA, S.; MEJÍA, E. G. Polyphenolic Compounds, Antioxidant Capacity, and Quinone Reductase Activity of an Aqueous Extract of *Ardisia compressa* in Comparison to Mate (*Ilex paraguariensis*) and Green (*Camellia sinensis*) Teas. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, p. 3583, 2004.
- CHANG, E. H. *et al.* Nanomedicine: Past, present and future – A global perspective. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 468, n. 3, p. 511–517, 2015.
- CHUGH, Deeksha; VISWAMALYA, V .S.; DAS, B. Green synthesis of silver nanoparticles with algae and the importance of capping agents in the process. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 19, n. 1, p. 126, 2021.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). **M27 Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts**. 4th ed, v. 37, n. 13. Wayne, PA, USA: CLSI, 2017. 4th ed, v. 37, n. 13. Wayne, PA, USA: CLSI, 2017.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). **M07 Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**. 11th ed, v. 37, n. 13. [Wayne, PA, USA]: CLSI, 2018.
- CRISAN, C. M.; MOCAN, T.; MANOLEA, M.; *et al.* Review on Silver Nanoparticles as a Novel Class of Antibacterial Solutions. **Applied Sciences**, v. 11, n. 3, p. 1120, 2021.

DAWADI, Sonika *et al.* Current Research on Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Applications. **Journal of Nanomaterials**, v. 2021, p. 1–23, 2021.

DHAND, C. *et al.* Methods and strategies for the synthesis of diverse nanoparticles and their applications: a comprehensive overview. **RSC Advances**, v. 5, n. 127, p. 105003–105037, 2015.

DHAKA, A. *et al.* A review on biological synthesis of silver nanoparticles and their potential applications. **Results in Chemistry**, v. 6, p. 101108, 2023.

EID, N. *et al.* Ag@Sidr honey nanocomposite: Chemical profiles, antioxidant and microbicide procurator. **Biocatalysis and agricultural biotechnology**, v. 51, p. 102788–102788, 1 ago. 2023.

EL-GEHALY, A. S. *et al.* Green synthesis, characterization and medicinal uses of silver nanoparticles (Ag-NPs), copper nanoparticles (Cu-NPs) and zinc oxide nanoparticles (ZnO-NPs) and their mechanism of action: A review. **Biocatalysis and agricultural biotechnology**, v. 55, p. 103006–103006, 1 jan. 2024.

FERNANDES, M.; PEREIRA, S.; CLÁUDIA R. Z. resistência bacteriana pelo uso indiscriminado de antibióticos: uma questão de saúde pública. **REVISTA IBERO-AMERICANA DE HUMANIDADES, CIÊNCIAS E EDUCAÇÃO**, v. 6, N. 11, 12 dez. 2020.

FERNANDO, I.; ZHOU, Y. Impact of pH on the stability, dissolution and aggregation kinetics of silver nanoparticles. **Chemosphere**, v. 216, p. 297–305, 2019.

FURTADO, D. M. F. *et al.* Consumo de antimicrobianos e o impacto na resistência bacteriana em um hospital público do estado do Pará, Brasil, de 2012 a 2016. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 10, n. 0, set. 2019.

GHERASIM, O. *et al.* An Updated Review on Silver Nanoparticles in Biomedicine. **Nanomaterials**, v. 10, n. 11, p. 2318, 2020.

GONZÁLEZ F. *et al.* Synthesis and Characterization of Silver Nanoparticles Prepared with Honey: The Role of Carbohydrates. **Analytical Letters**, v. 50, n. 5, p. 877–888, 2016.

GRANBOHM, Henrika; LARISMAA, Juha; ALI, Saima; *et al.* Control of the Size of Silver Nanoparticles and Release of Silver in Heat Treated SiO₂-Ag Composite Powders. **Materials**, v. 11, n. 1, p. 80, 2018.

GUPTA, D. *et al.* Green and sustainable synthesis of nanomaterials: Recent advancements and limitations. **Green and sustainable synthesis of nanomaterials: Recent advancements and limitations**, v. 231, p. 116316–116316, 1 ago. 2023.

HALEEM, A. *et al.* Applications of nanotechnology in medical field: a brief review. **Global Health Journal**, v. 7, n. 2, p. 70–77, 2023.

HAMMAMI, I. *et al.* Gold nanoparticles: Synthesis properties and applications. **Journal of King Saud University - Science**, v. 33, n. 7, p. 101560, 1 out. 2021.

HARINISRI, K.; JAYANTHI, N.; SURESH KUMAR, R. Diverse application of green nanotechnology – A review. **Materials Today: Proceedings**, 2023.

HULLA, J.; SAHU, S.; HAYES, A. Nanotechnology. **Human & Experimental Toxicology**, v. 34, n. 12, p. 1318–1321, 2015.

KESKIN, M. *et al.* Green Synthesis, Characterization, Antioxidant, Antibacterial and Enzyme Inhibition Effects of Chestnut (*Castanea sativa*) Honey-Mediated Silver Nanoparticles. **Molecules**, v. 28, n. 6, p. 2762, 1 jan. 2023.

KHAN, Y. *et al.* Classification, Synthetic, and Characterization Approaches to Nanoparticles, and Their Applications in Various Fields of Nanotechnology: A Review. **Catalysts**, v. 12, n. 11, p. 1386, 2022.

KANG, H. *et al.* Stabilization of Silver and Gold Nanoparticles: Preservation and Improvement of Plasmonic Functionalities. **Chemical Reviews**, v. 119, n. 1, p. 664–699, 2018.

LENARDON, M. D. *et al.* Scalar nanostructure of the *Candida albicans* cell wall; a molecular, cellular and ultrastructural analysis and interpretation. **The Cell Surface**, v. 6, p. 100047, 2020.

LEERSNYDER, I. *et al.* Revealing the Importance of Aging, Environment, Size and Stabilization Mechanisms on the Stability of Metal Nanoparticles: A Case Study for Silver Nanoparticles in a Minimally Defined and Complex Undefined Bacterial Growth Medium. **Nanomaterials**, v. 9, n. 12, p. 1684, 2019.

MAGDY, G. *et al.* A comprehensive review on silver nanoparticles: Synthesis approaches, characterization techniques, and recent pharmaceutical, environmental, and antimicrobial applications. **Microchemical Journal**, v. 196, p. 109615, 2024.

MANSOOR, S. *et al.* Fabrication of Silver Nanoparticles Against Fungal Pathogens. **Frontiers in Nanotechnology**, v. 3, 2021.

COURA, Mariana; ARROYOS, Guilherme; CORREIA, Lilian; *et al.* COMO OBTER NANOPARTÍCULAS DE OURO USANDO SUCO DE LIMÃO? **Química Nova**, 2018.

MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Vanillin-HCl method for condensed tannins: Effect of organic solvents used for extraction of tannins. **Journal of Chemical Ecology**, n. 4, v. 19, 1993.

MEDA, A.; LAMIEN, C. E.; ROMITO, M.; MILLOGO, J.; NACOULMA, O. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. **Food Chemistry**, v. 91, p. 571-577, 2005.

NASROLLAHZADEH, M. *et al.* An Introduction to Nanotechnology. *In: Interface Science and Technology*. [s.l.]: Elsevier, p. 1–27, 2019.

NGUYEN, N. T. T. *et al.* A critical review on the bio-mediated green synthesis and multiple applications of magnesium oxide nanoparticles. **Chemosphere**, v. 312, p. 137301, 2023.

PAPOLU, P.; BHOGI, A. Green synthesis of various metal oxide nanoparticles for the environmental remediation-An overview. **Materials Today: Proceedings**, maio 2023.

PETRIKAITĖ, V. *et al.* Stability and SERS signal strength of laser-generated gold, silver, and bimetallic nanoparticles at different KCl concentrations. **Heliyon**, v. 10, n. 15, p. e34815, 2024.

PHAN, H. T.; HAES, A. J. What Does Nanoparticle Stability Mean? **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 123, n. 27, p. 16495–16507, 2019.

RAMOS, A. P. *et al.* Biomedical applications of nanotechnology. **Biophysical Reviews**, v. 9, n. 2, p. 79–89, 2017.

REHAL, R. K. *et al.* Color-Tunable Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterizations, and Its Antimicrobial Activity. **BioNanoScience**, v. 13, n. 4, p. 2448–2457, 2023.

RÓNAVÁRI, A. *et al.* Green Silver and Gold Nanoparticles: Biological Synthesis Approaches and Potentials for Biomedical Applications. **Molecules**, v. 26, n. 4, p. 844, 2021.

SALAS-OROZCO, M. *et al.* Mechanisms of Resistance to Silver Nanoparticles in Endodontic Bacteria: A Literature Review. **Journal of Nanomaterials**, v. 2019, p. 1–11, 2019.

SAKTHI D. R. *et al.* Applications of Gold and Silver Nanoparticles in Theranostics. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 194, n. 9, p. 4187–4219, 2022.

SCEPANKOVA, H. *et al.* Role of Honey in Advanced Wound Care. **Molecules**, v. 26, n. 16, p. 4784, 2021.

SINGH, S.; BHARTI, A.; MEENA, V. K. Structural, thermal, zeta potential and electrical properties of disaccharide reduced silver nanoparticles. **Journal of Materials Science: Materials in Electronics**, v. 25, n. 9, p. 3747–3752, 2014.

SLEPIČKA, P. *et al.* Methods of Gold and Silver Nanoparticles Preparation. **Materials**, v. 13, n. 1, p. 1, 2019.

SOUZA, S. G. B. *et al.* Green synthesis and characterization of honey-mediated silver nanoparticles. **Applied Nanoscience**, v. 14, n. 1, p. 191–201, 2023.

THIPE, V. C. *et al.* Green nanotechnology—An innovative pathway towards biocompatible and medically relevant gold nanoparticles. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, p. 103256, 11 mar. 2022.

THOMS, S. *et al.* Plant-Based Synthesis, characterization Approaches, Applications and Toxicity of Silver Nanoparticles: A Comprehensive Review. **Journal of Biotechnology**, 2024.

TORTELLA, G.R.; RUBILAR, O.; DURÁN, N.; *et al.* Silver nanoparticles: Toxicity in model organisms as an overview of its hazard for human health and the environment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 390, p. 121974, 2020.

TRUONG, T. T. *et al.* Precision-engineered metal and metal-oxide nanoparticles for biomedical imaging and healthcare applications. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 332, p. 103263, 2024.

VANITHA, G. *et al.* Physiochemical charge stabilization of silver nanoparticles and its antibacterial applications. **Chemical Physics Letters**, v. 669, p. 71–79, 2017.

