



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA
DE SANTANA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA**



ANDREZZA LÓREN DE GÓES NASCIMENTO

**ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO EXTRATO
ETANÓLICO DE *Spondias tuberosa* Arruda E DAS
NANOPARTÍCULAS DE PRATA SINTETIZADAS POR
ROTA VERDE CONTRA BACTÉRIAS PATOGÊNICAS**

ANDREZZA LÓREN DE GÓES NASCIMENTO

**ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO EXTRATO
ETANÓLICO DE *Spondias tuberosa* Arruda E DAS
NANOPARTÍCULAS DE PRATA SÍNTETIZADAS POR
ROTA VERDE CONTRA BACTÉRIAS PATOGÊNICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Raquel Guimarães Benevides

Coorientadores: Prof^ª Dr^ª Angélica Maria Lucchese e Prof. Dr. Edrian Mania

Feira de Santana - BA
2023

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 WILLIAM LEONARDO DA SILVA
Data: 22/09/2023 09:13:02-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. William Leonardo da Silva
(Universidade Franciscana - RS)



Dra. Carla Santos Ribeiro Pinheiro
(Centro Universitário Nobre – UNIFAN - BA)

Documento assinado digitalmente
 RAQUEL GUIMARAES BENEVIDES
Data: 31/10/2023 15:56:29-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Raquel Guimarães Benevides
(Universidade Estadual de Feira de Santana)
Orientadora e Presidente da Banca

Feira de Santana – BA
2023

Ficha Catalográfica - Biblioteca Central Julieta Carteado - UEFS

Nascimento, Andrezza Lóren de Góes
N193a Análise da atividade antibacteriana do extrato etanólico de *Spondias tuberosa*
Arruda e das nanopartículas de prata sintetizadas por rota verde contra bactérias
patogênicas. / Andrezza Lóren de Góes, 2023.
70 f.; il.

Orientadora: Raquel Guimarães Benevides
Coorientadores: Angélica Maria Lucchese, Edrian Mania

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Feira de Santana. Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia, Feira de Santana, 2023.

1.Umbu. 2.Folhas. 3.AgNPs. 3.Síntese verde. 4.Potencial Antibacteriano.
5.Resistência I.Benevides, Raquel Guimarães, orient. II. Lucchese, Angélica Maria,
coorient. III.Mania, Edrian, coorient. IV.Universidade Estadual de Feira de Santana.
V. Título.

CDU: 615.281:634.442

Maria de Fátima de Jesus Moreira - Bibliotecária - CRB-5/1120

À minha vó e minha mãe,
com carinho.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sua presença constante ao meu lado, por sua incomparável e inconfundível bondade. E por sempre compreender meus anseios, me dando força e coragem para atingir meus objetivos.

Aos meus familiares e amigos, pelo incentivo e compreensão em toda fase e realização deste trabalho. Especialmente, à minha mãe, a quem eu serei eternamente grata, pela incansável e constante dedicação para comigo, à ela dedico todos os meus esforços.

À minha orientadora, Raquel Benevides, pela excelente orientação, pela oportunidade e confiança para a realização deste projeto, e por todo o auxílio e atenção prestados.

Aos professores Angélica Lucchese e Edrian Mania, por terem me coorientado e serem generosos e pacientes ao compartilhar comigo seus conhecimentos.

Às professoras Soraya Trindade e Reyjane Patricia pela ajuda nos testes de viabilidade celular e escolha da espécie vegetal, respectivamente.

Aos colegas de trabalho, pela convivência, discussões e contribuições. Especialmente Rebeca, Natanael, Carlos, Vinicius e Hemilly pela ajuda e apoio durante alguns experimentos e coletas. À toda equipe dos laboratórios onde realizei os experimentos, Laboratório de Microbiologia Aplicada (LAPEM), Laboratório de Química de Produtos Naturais e Bioativos (LAPRON), Laboratório de Espectroscopia, Nanomateriais e Sensores (LENS) e Laboratório de Biologia Oral (LABOR).

À Universidade Estadual de Feira de Santana e o Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, pelo espaço físico e pelo ensino de qualidade que me proporcionou, assim como aos professores que colaboraram direta ou indiretamente para a minha formação acadêmica.

À CAPES pelo suporte financeiro que permitiu a realização desse trabalho. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

“A essência do saber não está em somar verdades ou em subtrair incertezas e sim em compartilhar o conhecimento compreendido.”

Diego Góes

RESUMO

A resistência antimicrobiana e a consequente ineficiência dos antibióticos são os principais problemas enfrentados pela medicina. Diante disso, inúmeras pesquisas têm sido voltadas à busca de novos agentes com atividade antibacteriana, como os extratos naturais, em virtude da presença de uma série de substâncias fenólicas polares e apolares com ação antioxidante e antimicrobiana. Os compostos presentes nas folhas da *Spondias tuberosa* Arruda são fatores que influenciam na atividade antibacteriana dos extratos formados e na estabilização e redução do precursores metálicos para a síntese de nanopartículas metálicas (MNPs). Assim, este estudo tem como objetivo avaliar a ação antibacteriana do extrato etanólico das folhas de *Spondias Tuberosa* e das nanopartículas de prata (AgNPs) produzidas por rota verde, avaliando o potencial em ação de troca de antibióticos. Para avaliação das amostras foi realizado testes de sensibilidade em microdiluição contra as bactérias *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* sp., além de caracterização de AgNP, e citotoxicidade das amostras. Na técnica de microdiluição foi verificado uma maior sensibilidade da cepa *B. Cereus* perante as amostras em concentração de 2,60 mg/mL para o extrato aquoso, e 60 µg/mL para AgNPs, enquanto as demais cepas tiveram menor sensibilidade. Na caracterização, das AgNPs foi verificado seu tamanho em média de 41,81 nm, com absorvância da solução coloidal em UV-Visível em 412 nm. Além disso, ambos os produtos, extrato e AgNPs, demonstraram baixa toxicidade em suas concentrações mais elevadas. Diante dos resultados obtidos pode-se concluir que o extrato etanólico de *S. tuberosa* e as AgNPs apresentaram atividade antibacteriana positivamente para o efeito contra bactérias multirresistentes, porém estudos futuros são necessários descobrir o mecanismo de ação de tal atividade.

Palavras-chave: Umbu. Folhas. AgNPs. Síntese verde. Potencial Antibacteriano. Resistência.

ABSTRACT

Antimicrobial resistance and the consequent inefficiency of antibiotics are the main problems facing medicine. Given this, numerous researches have been focused on the search for new agents with antibacterial activity, such as natural extracts, due to the presence of a series of polar and non-polar phenolic substances with antioxidant and antimicrobial action. The compounds present in the leaves of *Spondias tuberosa* Arruda are factors that influence the antibacterial activity of the extracts formed and the stabilization and reduction of metallic precursors for the synthesis of metallic nanoparticles (MNPs). Thus, this study aims to evaluate the antibacterial action of the ethanolic extract of *Spondias tuberosa* leaves and silver nanoparticles (AgNPs) produced by the green route, evaluating the potential in action of switching antibiotics. To evaluate the samples, sensitivity tests were carried out in microdilution against the bacteria *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* sp., in addition to AgNP characterization and cytotoxicity of the samples. In the microdilution technique, a greater sensitivity of the *B. Cereus* strain was found to samples at a concentration of 2.60 mg/mL for the aqueous extract, 60 µg/mL for AgNPs, while the other strains had lower sensitivity. In the characterization, the AgNPs were found to have an average size of 41.81 nm, with absorbance of the colloidal solution in UV-Visible at 412 nm. Furthermore, both products, extract and AgNPs, demonstrated low toxicity at their highest concentrations. Given the results obtained, it can be concluded that the ethanolic extract of *S. tuberosa* and the AgNPs presented positive antibacterial activity against multi-resistant bacteria, however future studies are necessary to discover the mechanism of action of such activity.

Keywords: Umbu. Leaves. AgNPs. Green synthesis. Antibacterial Potential. Resistance.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** **A.** *Spondias tuberosa* Arruda no campus da UEFS. **B.** Folhas coletadas para produção do extrato. 24
- Figura 2.** **A.** Material vegetal seco e puerizado em moinho de facas. **B.** Material vegetal já imerso no solvente, etanol, para a maceração. **C.** Extrato no rotaevaporador para recuperar parte do solvente. 25
- Figura 3.** Disposição das amostras em placa de 96 poços. Unidade de medida utilizada: mg/mL. C.P.: Controle Positivo. C.N.: Controle Negativo. 27
- Figura 4.** Esquematização da microplaca utilizada na viabilidade celular por MTT. 29
- Figura 5.** **A.** Extrato etanólico bruto. **B.** Extrato etanólico diluído e filtrado. 30
- Figura 6.** Placas de microdiluição demonstrando a sensibilidade das cepas utilizadas perante as concentrações do extrato etanólico. A cor azul indica a inatividade bacteriana e a cor rosa indica a presença de bactérias. **A.** *Bacillus cereus*. **B.** *Escherichia coli*. **C.** *Staphylococcus aureus*. **D.** *Salmonella* sp. 31
- Figura 7.** Gráfico com a média da absorbância de 570 nm e a média do desvio padrão para as concentrações do extrato etanólico de *Spondias tuberosa* Arruda. Controle Negativo: DMSO 50 %, Controle Positivo: Meio. 32
- Figura 8.** **A.** Extrato a 10% antes da filtragem. **B.** Filtragem do extrato com o papel filtro. **C.** Extrato 10% filtrado.. 48
- Figura 9.** **A.** Extrato diluído a concentração de 2%. **B.** Extrato 2% com pH 10 ajustado. 49
- Figura 10.** **A.** Extrato 2% pH 10 no aquecendo até a temperatura média. **B.** Solução após adição de AgNO₃ 3mM. 50
- Figura 11.** Ilustração da placa de 96 poços com a disposição das amostras no teste. Unidade de medida utilizada: mg/mL. C.P.: Controle Positivo. C.N.: Controle Negativo. 53
- Figura 12.** Esquematização da placa para viabilidade celular das AgNPs. 54
- Figura 13.** Aspecto visual da solução coloidal de nanopartículas de prata. 56

Figura 14. Espectro de UV-Vis da solução coloidal de AgNP diluída em água pura na proporção de em 1:1 (v/v)	57
Figura 15. Espalhamento de Luz dinâmico da amostra coloidal.	57
Figura 16. Imagem de MET da solução coloidal.	58
Figura 17. Resultado do potencial ZETA.	58
Figura 18. Placas de microdiluição demonstrando a sensibilidade das cepas utilizadas perante as concentrações das amostras. A cor azul indica a inatividade bacteriana e a cor rosa indica a presença de bactérias. A. <i>Bacillus cereus</i> . B. <i>Escherichia coli</i> . C. <i>Staphylococcus aureus</i> . D. <i>Salmonella sp</i> .	60
Figura 19. Resultado do crescimento bacteriano em placas de <i>Petri</i> para a cepa <i>Escherichia coli</i> . A. AgNO ₃ 0,79 mg/mL sem crescimento bacteriano. B. AgNP 4,25 mg/mL sem crescimento bacteriano. C. AgNP 2,12 mg/mL com crescimento controlado da bactéria. D. AgNP 1,06 mg/mL com crescimento descontrolado da cepa <i>E. coli</i> .	61
Figura 20. Gráfico com a média da absorvância de 570 nm e a média do desvio padrão para as concentrações das AgNPs sintetizadas a partir do extrato aquoso das folhas de <i>Spondias tuberosa</i> Arruda. Controle Negativo: DMSO 50 %, Controle Positivo: Meio.	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultado da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) do extrato etanólico de <i>Spondias tuberosa</i> Arruda.	31
Tabela 2. Resultado da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) das amostras testadas.	59

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Abs	Absorbância
μL	Microlitro
AgNO₃	Nitrato de Prata
AgNP	Nanopartícula de Prata
AgNPc	Nanopartícula de Prata Centrifugada
AMH	Ágar Müeller-Hinton
C.N.	Controle Negativo
C.P.	Controle Positivo
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CCMB	Coleção de Cultura de Microrganismos da Bahia
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMH	Caldo Müeller-Hinton
DLS	Espalhamento Dinâmico de Luz
DMSO	Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
G	Gramas
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
mg/mL	Miligramas por Mililitro
mM	Milimolar
NaOH	Hidróxido de Sódio
Nm	Nanômetro
	Paleontology Statistics Software Package for Education and Data
PAST	Analysis
Pext	Peso do extrato seco
Pfolhas	Peso das folhas secas
Re	Rendimento total do extrato
Rpm	Rotações por minuto
UEFS	Universidade Estadual de Feira de Santana
UV-VIS	Ultravioleta Visível

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO GERAL	14
	OBJETIVOS	16
	OBJETIVO GERAL	16
	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
1	CAPÍTULO 1: AVALIAÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO DE <i>Spondias tuberosa</i> ARRUDA COMO ANTIBACTERIANO CONTRA CEPAS PATOGÊNICAS	17
1.1	INTRODUÇÃO	17
1.2	REVISÃO DA LITERATURA	20
1.2.1	<i>Spondias tuberosa</i> ARRUDA	20
1.2.2	EXTRATO ETANÓLICO	20
1.2.3	ATIVIDADE ANTIBACTERIANA	21
1.2.4	CITOTOXICOLOGIA	22
1.3	MATERIAIS E MÉTODOS	24
1.3.1	PRÉ-TRATAMENTO DAS FOLHAS DE UMBU	24
1.3.2	OBTENÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO	24
1.3.3	RENDIMENTO DO EXTRATO	25
1.3.4	CEPAS BACTERIANAS	25
1.3.5	PADRONIZAÇÃO DOS MICRORGANISMOS	26
1.3.6	CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)	26
1.3.7	CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)	27
1.3.8	CITOTOXICIDADE	28
1.3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	29
1.4	RESULTADOS	30
1.4.1	CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO	30
1.4.2	ATIVIDADE ANTIBACTERIANA	30
1.4.3	CITOTOXICIDADE	32
1.4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
1.5	DISCUSSÃO	33
1.6	CONCLUSÃO	34
	REFERÊNCIAS	35
2	CAPÍTULO 2: ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA SINTETIZADAS A PARTIR DO EXTRATO DE <i>Spondias tuberosa</i> ARRUDA CONTRA BACTÉRIAS PATOGÊNICAS	41
2.1	INTRODUÇÃO	41
2.2	REVISÃO DA LITERATURA	44
2.2.1	NANOPARTÍCULAS DE PRATA POR ROTA VERDE	44
2.2.2	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS	45
2.2.3	ATIVIDADE ANTIBACTERIANA	46
2.2.4	CITOTOXICIDADE	46
2.3	MATERIAIS E MÉTODOS	48
2.3.1	AQUISIÇÃO DE MATÉRIA-PRIMA	48

2.3.2	OBTENÇÃO DO EXTRATO	48
2.3.3	PADRONIZAÇÃO DO EXTRATO	49
2.3.4	SÍNTESE DE NANOPARTÍCULA DE PRATA	49
2.3.5	CENTRIFUGAÇÃO	50
2.3.6	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA	50
2.3.6.1	ESPECTROMETRIA UV – VIS	50
2.3.6.2	POTENCIAL ZETA	51
2.3.6.3	ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO (DLS)	51
2.3.6.4	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)	51
2.3.7	MICROORGANISMOS	51
2.3.8	PADRONIZAÇÃO DOS MICRORGANISMOS	51
2.3.9	CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)	52
2.3.10	CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)	53
2.3.11	CITOTOXICIDADE	54
2.3.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA	55
2.4	RESULTADOS	56
2.4.1	SÍNTESE DE NANOPARTÍCULA DE PRATA	56
2.4.2	CARACTERIZAÇÃO	56
2.4.3	ATIVIDADE ANTIBACTERIANA	59
2.4.4	CITOTOXICOLOGIA	61
2.4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	62
2.5	DISCUSSÃO	63
2.6	CONCLUSÃO	64
	REFERÊNCIAS	65
	CONSIDERAÇÕES GERAIS	69

INTRODUÇÃO GERAL

Este trabalho foi dividido em dois capítulos, onde será discutido no capítulo 1 sobre a obtenção do extrato etanólico de *Spondias tuberosa* Arruda, sua atividade antibacteriana contra quatro cepas patogênicas, e a citotoxicidade do extrato produzido. No capítulo 2, a discussão será a partir da síntese de nanopartículas de prata a partir do extrato aquoso de *S. tuberosa*, a caracterização das nanoestruturas, sua atividade antibacteriana frente as cepas do estudo, e por fim, a citotoxicidade das nanopartículas formadas.

A crescente preocupação com o aumento da resistência bacteriana aos antibióticos convencionais tem levado à busca incessante por alternativas terapêuticas eficazes e sustentáveis (Silva *et al.*, 2019). Nesse contexto, os extratos de plantas têm emergido como uma fonte promissora de compostos bioativos com propriedades antimicrobianas. A espécie *Spondias tuberosa* Arruda é uma planta nativa de regiões tropicais, que caracteriza-se por apresentar compostos com atividade antibacteriana (Santos *et al.*, 2020), tornando-a um candidato potencial para a síntese de nanopartículas de prata (AgNPs) por rota verde (Silva *et al.*, 2019).

O uso do extrato etanólico de *Spondias tuberosa* como agente antibacteriano é um campo de pesquisa promissor que tem despertado interesse, devido às propriedades antimicrobianas associadas a essa planta (Santos *et al.*, 2019). *Spondias tuberosa*, também conhecida como umbuzeiro ou umbu, é uma árvore frutífera nativa do Brasil, amplamente distribuída na região semiárida do país. Além disso, seu extrato etanólico tem sido objeto de estudos devido à presença de compostos bioativos, como polifenóis e flavonoides, que demonstraram atividade antibacteriana em várias cepas de bactérias (Santos *et al.*, 2020). Embora promissor, o uso do extrato etanólico de *Spondias tuberosa* como agente antibacteriano enfrenta desafios, como a necessidade de identificar os compostos responsáveis por sua atividade, otimizar formulações para maior eficácia e avaliar sua segurança e toxicidade em estudos clínicos.

Por outro lado, as nanopartículas de prata têm sido amplamente estudadas devido às suas propriedades antimicrobianas notáveis (Rai *et al.*, 2015), oferecendo uma abordagem inovadora para o tratamento de infecções bacterianas, uma vez que podem combater uma variedade de cepas bacterianas, incluindo aquelas resistentes a antibióticos convencionais (Rai *et al.*, 2015). No entanto, os processos de síntese de

AgNPs convencionais envolvem o uso de agentes redutores químicos, muitos dos quais são prejudiciais ao meio ambiente e à saúde humana.

Neste contexto, a síntese de nanopartículas de prata por extrato de *Spondias tuberosa* representa uma abordagem de "rota verde" que se alinha com os princípios da química verde. Essa abordagem oferece uma alternativa sustentável e eficaz para a produção de AgNPs, potencialmente com menor impacto ambiental e menor toxicidade (Maciel *et al.*, 2016).

Neste contexto, a presente dissertação apresenta uma discussão sobre a importância da resistência antibacteriana, a relevância da *Spondias tuberosa* como fonte de compostos bioativos, a síntese de nanopartículas de prata por rota verde e o potencial do extrato etanólico e das AgNPs como agentes antibacterianos contra diversas cepas bacterianas patogênicas. Também destaco a necessidade de uma pesquisa contínua e investigações detalhadas nessa área, a fim de aproveitar todo o potencial dessa abordagem inovadora e sustentável no combate às infecções bacterianas.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial antibacteriano do extrato etanólico de *Spondias tuberosa* Arruda, bem como das nanopartículas de prata (AgNPs) sintetizadas a partir do extrato aquoso, para uso como antibacteriano, frente as cepas bacterianas patogênicas de *Bacillus cereus* (CCMB282), *Escherichia coli* (CCMB261), *Salmonella* sp. (CCMB281) e *Staphylococcus aureus* (CCMB262). Além de avaliar a citotoxicidade do extrato e AgNPs sintetizadas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar e caracterizar o extrato etanólico de *Spondias tuberosa* Arruda;
- Sintetizar e caracterizar as nanopartículas de prata;
- Avaliar o potencial antibacteriano do extrato etanólico da espécie vegetal e das AgNPs sintetizadas na inibição do crescimento das bactérias patogênicas do estudo, determinando a Concentração Inibitório Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM);
- Demonstrar a citotoxicidade do extrato e das AgNPs através da investigação da viabilidade celular.

1. CAPÍTULO 1: Avaliação do extrato etanólico de *Spondias tuberosa* Arruda como antibacteriano contra cepas patogênicas

1.1 INTRODUÇÃO

O extrato vegetal é uma substância obtida a partir de plantas vegeais, que pode ser utilizada em diversas áreas, como indústria farmacêutica, cosmética, alimentícia e agrícola. Essa substância é obtida por meio de processos de extração, que podem ser feitos por meio de solventes, destilação e maceração (Silva *et al.*, 2020). Os extratos vegetais possuem diversas propriedades benéficas para a saúde, como ação anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiana, entre outras (Silva *et al.*, 2020). Por isso, são muito utilizados na produção de medicamentos, suplementos alimentares e cosméticos.

Além disso, os extratos vegetais são uma alternativa mais sustentável e saudável em relação aos produtos químicos sintéticos, pois são obtidos a partir de fontes renováveis e não causam danos ao meio ambiente (Chouhan *et al.*, 2017).

Abordagens com produtos não sintéticos têm sido amplamente estudadas, pois podem interromper a virulência de um patógeno, inibindo a produção ou atividade de fatores de virulência, mas não interferem no crescimento ou viabilidade do patógeno. Assim supostamente produtos naturais antimicrobianos não impõem uma forte pressão seletiva sobre as bactérias e, portanto, não devem favorecer o surgimento de resistência antimicrobiana (Lima *et al.*, 2023). Os extratos vegetais têm sido estudados como uma alternativa aos antibióticos convencionais, devido à crescente preocupação com a resistência bacteriana (Cazella *et al.*, 2019; Chouhan *et al.*, 2017). Diversas plantas possuem compostos bioativos que apresentam atividade antibacteriana, como fenóis, flavonoides e terpenoides. Estudos têm demonstrado que extratos vegetais são eficazes contra várias cepas bacterianas patogênicas, incluindo *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, entre outras (Chouhan *et al.*, 2017).

O uso de etanol para a extração de compostos de folhas de plantas é uma prática comum, devido às suas propriedades solventes e de preservação. O etanol é um solvente polar eficaz que é capaz de extrair uma ampla gama de compostos, incluindo polifenóis, flavonoides, alcaloides e outros metabólitos secundários de plantas (Villanueva-Bermejo *et al.*, 2018). O etanol é eficaz na preservação de

compostos bioativos extraídos de plantas, agindo como um conservante natural e impedindo a deterioração de compostos sensíveis à oxidação durante o processo de extração (Kang *et al.*, 2020). O etanol é volátil e pode ser facilmente removido após a extração, deixando os compostos desejados em uma forma concentrada. Isso é importante em aplicações como a produção de extratos de plantas para produtos fitoterápicos e fitocosméticos (Da Silva *et al.*, 2020).

Além disso, esses extratos são considerados seguros para uso humano, não causando os efeitos colaterais associados aos antibióticos sintéticos. No entanto, são necessárias mais pesquisas para entender melhor o uso desses extratos para diferentes aplicações e para identificar os compostos ativos responsáveis pela atividade antibacteriana.

Spondias tuberosa Arruda, popularmente conhecida como umbu, é uma árvore frutífera nativa do semiárido brasileiro, principalmente da região Nordeste. A árvore pode chegar a até 10 metros de altura e produz frutos de casca verde-amarelada e polpa branca e suculenta, com sabor agridoce e levemente ácido (Lins Neto, 2010).

Além de ser uma fruta saborosa e nutritiva, o umbu também possui importância econômica e social para as comunidades do semiárido brasileiro, que dependem da sua produção para a subsistência e geração de renda (Silva-Luz *et al.*, 2022).

No entanto, apesar de sua importância, o umbuzeiro ainda é pouco valorizado e explorado comercialmente, o que representa uma oportunidade de desenvolvimento econômico e social para as comunidades do semiárido brasileiro. Além disso, é importante ressaltar a necessidade de preservação da espécie, que vem sofrendo com a degradação ambiental e a falta de políticas públicas voltadas para a sua conservação.

O extrato vegetal de *Spondias tuberosa* vem sendo estudado devido às suas propriedades medicinais e nutricionais. O umbu é rico em compostos antioxidantes, como os fenólicos e flavonoides, que possuem atividade antimicrobiana, anti-inflamatória e antitumoral (Ferreira, 2015; Yunes *et al.*, 2010).

Estudos têm demonstrado que o extrato etanólico das folhas de *S. Tuberosa* pode ser utilizado no tratamento de diversas doenças, incluindo diabetes, hipertensão arterial, inflamações e câncer (Santos *et al.*, 2021; Silva *et al.*, 2020; Ferreira, 2015; Yunes *et al.*, 2010). Além disso, o extrato também apresenta

atividade antifúngica e antiviral, sendo promissor no tratamento de infecções causadas por esses agentes (Silva *et al.*, 2020). No entanto, é importante ressaltar que mais pesquisas são necessárias para entender melhor as propriedades desse extrato e seus efeitos no organismo humano.

A escolha de utilizar o extrato de folhas em vez de outras partes vegetais de uma planta específica pode depender de vários fatores, incluindo a composição química das diferentes partes da planta, as propriedades desejadas do extrato e a finalidade de uso (Manganaris *et al.*, 2017). As diferentes partes de uma planta geralmente contêm compostos químicos específicos em diferentes concentrações. Por exemplo, as folhas podem conter compostos ativos, como flavonoides, polifenóis e alcaloides, os quais são desejáveis para um uso particular, como propriedades medicinais ou aromáticas (Manganaris *et al.*, 2017). Além das folhas de muitas plantas tendem a ser menos tóxicas, em comparação com outras partes, como sementes, casca ou raízes. Portanto, em muitos casos, as folhas podem ser mais seguras para consumo humano (Yang *et al.*, 2002).

Em algumas plantas, a colheita de folhas é menos prejudicial à planta, em comparação com a colheita de raízes ou casca, permitindo uma fonte renovável e sustentável do extrato (Calvo-Irabién *et al.*, 2020). As folhas podem ser mais fáceis de coletar, secar e preparar em comparação com outras partes da planta, o que pode reduzir custos de produção.

Diante do contexto apresentado, este estudo complementa os dados descritos em literatura, mostrando-se a fundamental importância do estudo de propriedades biológicas dos produtos naturais fabricados a partir da flora brasileira. Dessa forma, compostos químicos poderão ser buscados e avaliados, facilitando a procura por grupos de metabólitos relevantes para bioprospecção.

1.2 REFERENCIAL TEÓRICO

1.2.1 *Spondias tuberosa* Arruda

Spondias tuberosa Arruda, conhecida como umbu ou umbuzeiro, é uma planta da família Anarcadiaceae, de hábito arbóreo e pequeno porte, variando a altura de 4 a 7 metros, com folhas compostas e frutos globulares ou ovais, geralmente com casca fina e polpa suculenta (Silva-Luz *et al.*, 2022). Nativa do Brasil, especialmente encontrada na região semiárida do Nordeste, é uma espécie endêmica dos estados do Nordeste e alguns estados do sudeste, e tem sido amplamente estudada, devido ao seu valor nutricional, propriedades medicinais e potencial econômico (Silva-Luz *et al.*, 2022; Silva *et al.*, 2020).

A espécie *S. tuberosa* tem sido tradicionalmente usada na medicina popular, devido às suas propriedades medicinais. Por exemplo, estudos têm mostrado atividades antimicrobianas, antioxidantes, anti-inflamatórias e hepatoprotetoras em extratos de partes diferentes da planta (Araújo *et al.*, 2020; Barbosa *et al.*, 2021; Pereira *et al.*, 2020), em virtude de sua composição química, rica em flavonoides e terpenos.

A espécie tem um grande potencial econômico, devido ao seu uso na produção de polpas, sucos, doces e geleias, bem como sua árvore tem sido alvo de projetos de cultivo sustentável em áreas semiáridas, para fins comerciais (Silva *et al.*, 2018). A conservação da espécie e de seu habitat é uma preocupação crescente, visto que a exploração não controlada pode ameaçar a espécie (Santos *et al.*, 2019). É necessário pesquisas serem realizadas para promover práticas de manejo sustentável que permitam a coleta dos frutos e de outras partes do vegetal sem prejudicar a planta, pois a espécie tem uma importância grande, principalmente para a região semiárida do Brasil, fazendo parte da contribuição para a segurança alimentar e a saúde da população.

1.2.2 Extrato Etanólico

O extrato etanólico das folhas de *Spondias tuberosa* tem sido objeto de pesquisa, devido às suas potenciais propriedades medicinais e nutricionais. O extrato etanólico de *Spondias tuberosa* é conhecido por suas propriedades antioxidantes.

Estudos demonstraram sua capacidade de combater o estresse oxidativo, reduzindo a formação de radicais livres no organismo (Silva *et al.*, 2020).

Pesquisas recentes têm mostrado que o extrato etanólico das folhas de *S. tuberosa* também possui atividade antimicrobiana significativa contra uma variedade de microrganismos patogênicos, como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, entre outras cepas bacterianas e alguns fungos (Silva *et al.*, 2020). Isso sugere seu potencial como agente antimicrobiano natural.

Estudo *in vitro* e *in vivo* Maia *et al.* (2018), têm demonstrado que o extrato etanólico de umbu possui propriedades anti-inflamatórias, reduzindo a produção de citocinas pró- inflamatórias e inibindo a resposta inflamatória.

Algumas pesquisas recentes por Santos *et al.* (2021), sugerem que o extrato etanólico de *Spondias tuberosa* pode ter potencial anticancerígeno, inibindo o crescimento de células cancerígenas em estudos *in vitro*. No entanto, mais pesquisas são necessárias para entender completamente esse potencial. E nas pesquisas de Alves *et al.* (2017) também foi evidenciado a atividade hipoglicemiante, o que pode ser benéfico no controle da glicose no sangue em pessoas com diabetes.

Estas pesquisas destacam o potencial do extrato etanólico das folhas de *Spondias tuberosa* em várias áreas, incluindo antioxidantes, atividade antimicrobiana, anti-inflamatória, anticancerígena e hipoglicemiante. No entanto, é importante observar que mais pesquisas são necessárias para entender completamente esses benefícios e determinar as doses seguras e eficazes para uso humano.

1.2.3 Atividade Antibacteriana

O extrato etanólico das folhas de *Spondias tuberosa* tem despertado interesse como uma possível fonte de compostos com propriedades antibacterianas, devido à sua rica composição química. Vários estudos têm investigado a atividade antibacteriana do extrato etanólico de *S. tuberosa* contra uma variedade de bactérias patogênicas (Barbosa *et al.*, 2021; Pereira *et al.*, 2020; Santos *et al.*, 2019). Resultados indicam que o extrato possui potencial para inibir o crescimento de bactérias, incluindo aquelas resistentes a antibióticos convencionais, como as cepas de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Algumas pesquisas sugerem que os compostos presentes no extrato das folhas de *Spondias tuberosa* atuam na inibição da atividade bacteriana por

meio de diferentes mecanismos, como a interação com a membrana celular bacteriana e a interferência nos processos metabólicos das bactérias (Pereira *et al.*, 2021). Uma das descobertas promissoras é que o extrato etanólico das folhas de umbu demonstrou atividade contra cepas de bactérias resistentes a antibióticos, o que é de grande importância em tempos de aumento da resistência antimicrobiana (Santos *et al.*, 2019).

Estudos recentes também sugerem a possibilidade de usar o extrato das folhas, em combinação com antibióticos tradicionais para melhorar a eficácia do tratamento antibacteriano, reduzindo a resistência bacteriana (Santos *et al.*, 2021). Os estudos mostram que o extrato etanólico das folhas de *Spondias tuberosa* tem atividade antibacteriana, mesmo contra cepas resistentes a antibióticos. No entanto, mais pesquisas são necessárias para compreender completamente como ele funciona, sua segurança e eficácia como agente antibacteriano.

1.2.4 Citotoxicidade

A avaliação da toxicidade do extrato etanólico de *Spondias tuberosa* é fundamental para determinar sua segurança e seu potencial de uso em aplicações médicas e alimentares. No entanto, é importante notar que a pesquisa sobre a toxicidade do extrato ainda é relativamente limitada e há necessidade de mais estudos para uma compreensão abrangente.

Alguns estudos iniciais têm avaliado a toxicidade aguda do extrato etanólico de *Spondias tuberosa* em animais de laboratório. Um estudo recente em ratos não observou toxicidade aguda significativa após a administração do extrato, indicando um perfil de segurança inicial (Rodrigues *et al.*, 2019). A toxicidade crônica do extrato de *Spondias tuberosa* ainda precisa ser mais investigada. Estudos de longo prazo em animais podem ajudar a determinar os efeitos adversos em exposições prolongadas.

Além da toxicidade aguda, é importante avaliar a segurança do consumo de produtos alimentares que contenham o extrato etanólico de *Spondias tuberosa*. Alguns compostos presentes em extratos de plantas podem interferir com a absorção ou a eficácia de medicamentos.

O uso do extrato etanólico para fins medicinais reflete a preocupação crescente com a avaliação da toxicidade do extrato, particularmente quando utilizado em produtos farmacêuticos ou alimentares. É importante destacar que os

resultados podem variar dependendo das condições de cultivo, preparação do extrato e concentração utilizada, por isso é crucial continuar a pesquisa para determinar os níveis seguros de uso e os potenciais efeitos colaterais em seres humanos.

1.3 MATERIAIS E MÉTODOS

1.3.1 Pré-tratamento das folhas de umbu

A matéria-prima (Folhas de Umbu) foi coletada no período da manhã (7h – 7h30min) no mês de outubro de 2022 no campus da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), localizado na cidade de Feira de Santana (SISGEN AC0B3BB), Bahia, conforme a Figura 1.



Figura 1. (A). *Spondias tuberosa* Arruda no campus da UEFS e (B) Folhas coletadas para produção do extrato.

As folhas foram deixadas na sala de secagem do Laboratório de Química de Produtos Naturais e Bioativos (LAPRON) (Figura 1:B) para secagem em temperatura ambiente (25° C) e ao abrigo da luz, durante um período de duas semanas (Magalhães, 2015).

1.3.2 Obtenção do extrato etanólico

Para a obtenção do extrato etanólico bruto de *S. tuberosa*, as folhas após secagem foram trituradas em moinho de facas, a fim de uniformizar sua granulometria. Após, o material foi pesado (100 g) (Figura 2A) e submetido à extração, três vezes consecutivas, por maceração com etanol, em recipientes de vidro (Figura 2B). O extrato bruto foi concentrado em evaporador rotatório, sob pressão reduzida, em temperaturas entre 45 e 50 °C (Figura 2C). O resíduo de solvente foi retirado por evaporação em capela de exaustão e o extrato bruto foi

deixado em capela pelo período de 15 dias para secagem completa em temperatura ambiente (25° C) (Magalhães, 2015).

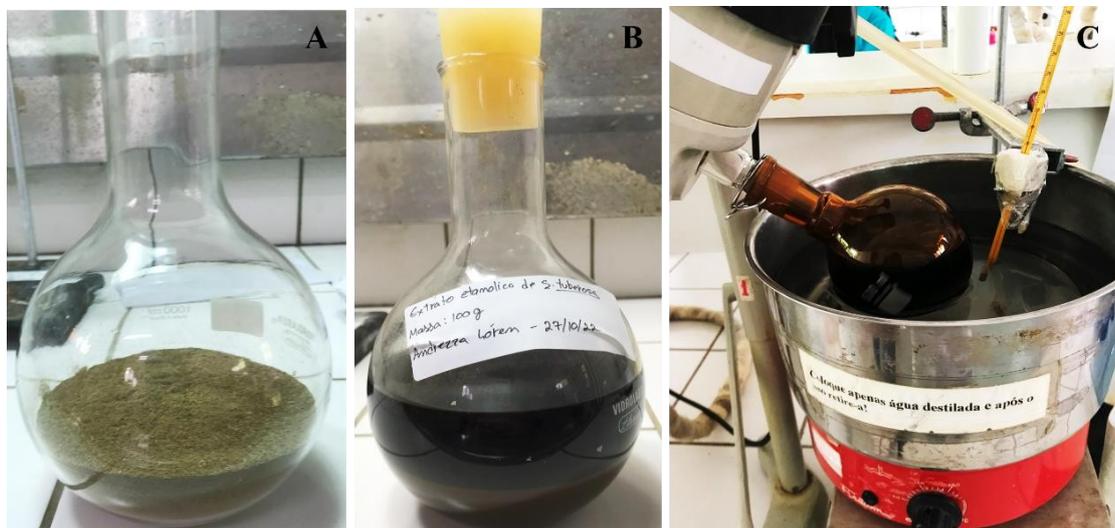


Figura 2. A. Material vegetal seco e puvizado em moinho de facas. B. Material vegetal já imerso no solvente, etanol, para a maceração. C. Extrato no rotaevaporador para recuperar parte do solvente.

1.3.3 Rendimento do extrato

Após a secagem foi retirado 1 g de extrato bruto e diluída em 9 mL de água destilada autoclavada e 1 mL de Tween 20, obtendo-se um extrato com concentração de 100 mg/mL, o extrato foi filtrado em membrana de celulose estéril ($\phi = 0,22 \mu\text{m}$) para uso nos testes antibacterianos.

A Equação (1) foi utilizada para o cálculo do rendimento total de extrato.

$$Re(\%) = \frac{P_{ext}}{P_{folhas}} \times 100 \quad (1)$$

Onde Re é o rendimento total do extrato (%); P_{ext} a massa de extrato seco (g); e P_{folhas} a massa de folhas secas (g).

1.3.4 Cepas bacterianas

As cepas bacterianas utilizadas foram obtidas na Coleção de Cultura de Microrganismos da Bahia, Universidade Estadual de Feira de Santana (CCMB/UEFS), sendo cepas-padrão das espécies CCMB282 *Bacillus cereus*, CCMB261 *Escherichia coli*, CCMB281 *Salmonella* sp. e CCMB262 *Staphylococcus*

aureus.

1.3.5 Padronização dos microrganismos

A padronização foi realizada seguindo o método de suspensão direta das colônias (CLSI, 2012) no qual são retiradas cerca de 3-5 colônias de cada microrganismo, crescido em placas de Petri com meio Ágar Müeller-Hinton (AMH), e transferidas para um tubo tipo Falcon com 20 mL de solução salina estéril (0,85 %), segundo as recomendações da CLSI (2012), documentos M02-A11 e M2-A8, sendo a suspensão padronizada por meio da leitura do espectrofotômetro, 625 nm para bactérias, atingindo o nível de turvação 0,5 da escala de Mc Farland, utilizando-se como zero a solução salina estéril.

1.3.6 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A técnica de microdiluição foi utilizada para estimar a CIM do extrato para as bactérias estudadas, segundo os protocolos e adaptações propostos pela Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI (2003; 2012). Em uma microplaca de titulação com 96 poços e fundo em forma de “U” (fabricante KASVI) foram acrescidos 100 µL de caldo Müeller-Hinton (CMH) e 100 µL de cada amostra de extrato, realizando a diluição seriada em 12 concentrações variando de 41,66, 20,83, 10,41, 5,20, 2,60, 1,30, 0,65, 0,32, 0,16, 0,08, 0,04 e 0,02 mg/mL (Figura 3). Após a diluição foram aplicados 20 µL da suspensão bacteriana. As placas foram homogeneizadas e levadas à estufa (37°C por 24 horas). Após o período de incubação, foi acrescido 10 µL do revelador resazurina em cada poço, esperando-se 3 horas para a leitura dos resultados, em que a cor azul caracteriza a inexistência de crescimento bacteriano, e a cor rosa/lilás, o crescimento bacteriano.

Para o cálculo das concentrações foi utilizado a fórmula $C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$, no qual C_1 é a concentração inicial do extrato (50 mg/mL) diluído no primeiro poço, V_1 é o volume do primeiro poço (100 µL), C_2 é a concentração final no primeiro poço, e V_2 é o volume final do primeiro poço (120 µL).

alíquotas de 10 µL cada e semeadas em placas de *Petri* com Ágar Müller-Hinton (AMH), sendo espalhada por toda a placa com a ajuda de swabs estéreis. Posteriormente, foi adicionado o revelador nas microplacas e levadas a estufa, como citado acima. As placas para observação de crescimento bacteriano foram incubadas em estufa (37°C) e após o período de 24 horas foi verificado se há crescimento bacteriano ou se a concentração testada tem efeito bactericida ou bacteriostático.

1.3.8 Citotoxicidade

A citotoxicidade foi avaliada através do ensaio de viabilidade celular pelo método MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), de acordo com o protocolo de ensaio MTT para viabilidade e proliferação celular da empresa Sigma, no qual é uma técnica amplamente utilizada para determinar a viabilidade celular e avaliar a toxicidade de compostos em culturas celulares.

Em uma placa de 96 poços foi adicionado em cada poço 100 µL de uma solução com 1,1 % de células sanguíneas cultivadas, 1 % de antibiótico e antimicótico, 10 % de soro fetal bovino (SFB) e 87,9 % de meio RPMI, e após a adição do meio foi adicionado as 12 concentrações do extrato etanólico utilizadas nos testes de sensibilidade microbiana. Como controle negativo de viabilidade foi utilizado 100 µL de DMSO (Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo) 50 % e o controle positivo de viabilidade foi 100 µL de meio puro e 100 µL da solução com água destilada estéril e Tween 20 na proporção de 9:1, que também foi utilizado como branco para a leitura no espectrofotometro (Figura 4). Todas as amostras foram realizadas em triplicatas.

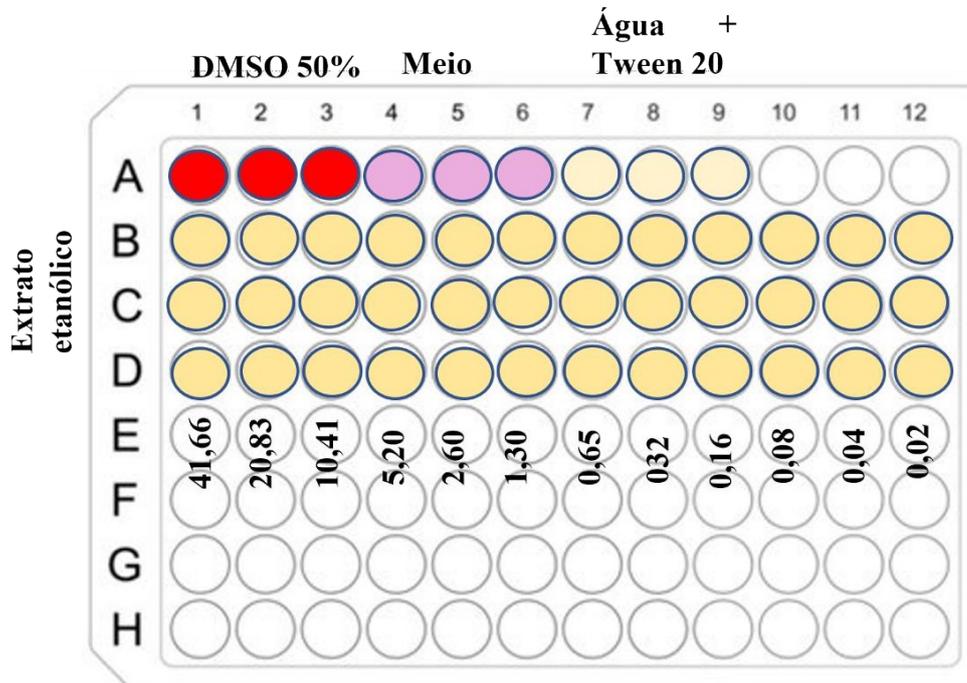


Figura 4. Esquematização da microplaca utilizada na viabilidade celular por MTT após 48 horas.

A microplaca foi levada a câmara de CO₂ a concentração de 2,7 % durante um período de 48h, conforme protocolo. Após o período de incubação a microplaca foi retirada e foi adicionado 10 µL de MTT em todos os poços e levada a câmara de CO₂ novamente por um período de 4h. Após a incubação foi adicionado 100 µL do solubilizante do KIT de MTT para dissolver os cristais de formazan formados e a placa foi posta em espectrofotômetro de microplaca para leitura de absorbância em uma faixa de 570 nm.

1.3.9 Análise estatística

Os dados foram submetidos ao teste de análise de variância (ANOVA – One Way). Para avaliar as diferenças significativas entre as médias ($p < 0,05$) foi utilizado o teste de Tukey. Para estas análises foi utilizado o programa de estatística Paleontology Statistics Software Package for Education and Data Analysis (PAST) versão 2.17.

1.4 RESULTADOS

1.4.1 Caracterização do extração etanólico

A Figura 5A apresenta o extrato etanólico bruto, entretanto para utilização nos testes foi necessário a diluição do extrato em água destilada autoclavada com Tween 20 em uma proporção de 9:1 v v⁻¹, obtendo-se um extrato com concentração de 100 mg/mL (Figura 5B). Destaca-se que após a diluição, o extrato foi filtrado em uma membrana de celulose estéril (0,22 µm), a fim de evitar interferência nos testes devido às partículas grandes do extrato bruto, bem como remover qualquer tipo de contaminante que poderia ter na amostra.



Figura 5. (A) Extrato etanólico bruto e (B) Extrato etanólico diluído e filtrado.

Assim, após ser concentrado em evaporador rotatório e seco em capela de exaustão, foram obtidas 6,40 g de extrato etanólico bruto a partir das 100 g iniciais, correspondendo a 6,4% do rendimento em massa.

1.4.2 Atividade antibacteriana

Na técnica de microdiluição em caldo para determinar CIM e CBM, foram testadas as 12 concentrações da amostra contra as bactérias patogênicas. Para todas as cepas bacterianas, o extrato demonstrou atividade bactericida e/ou bacteriostática (Tabela 1, Figura 6), sendo a cepa de *Bacillus cereus* a mais sensível perante o uso do extrato etanólico.

Tabela 1. Resultado da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) do extrato etanólico das folhas de *Spondias tuberosa* Arruda.

Amostra/ Bactérias	<i>Bacillus cereus</i>		<i>Escherichia coli</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Salmonella sp.</i>	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
Extrato etanólico	2,60	5,20	10,41	20,83	5,20	10,41	5,20	10,41

Unidade de medida utilizada: mg/mL.

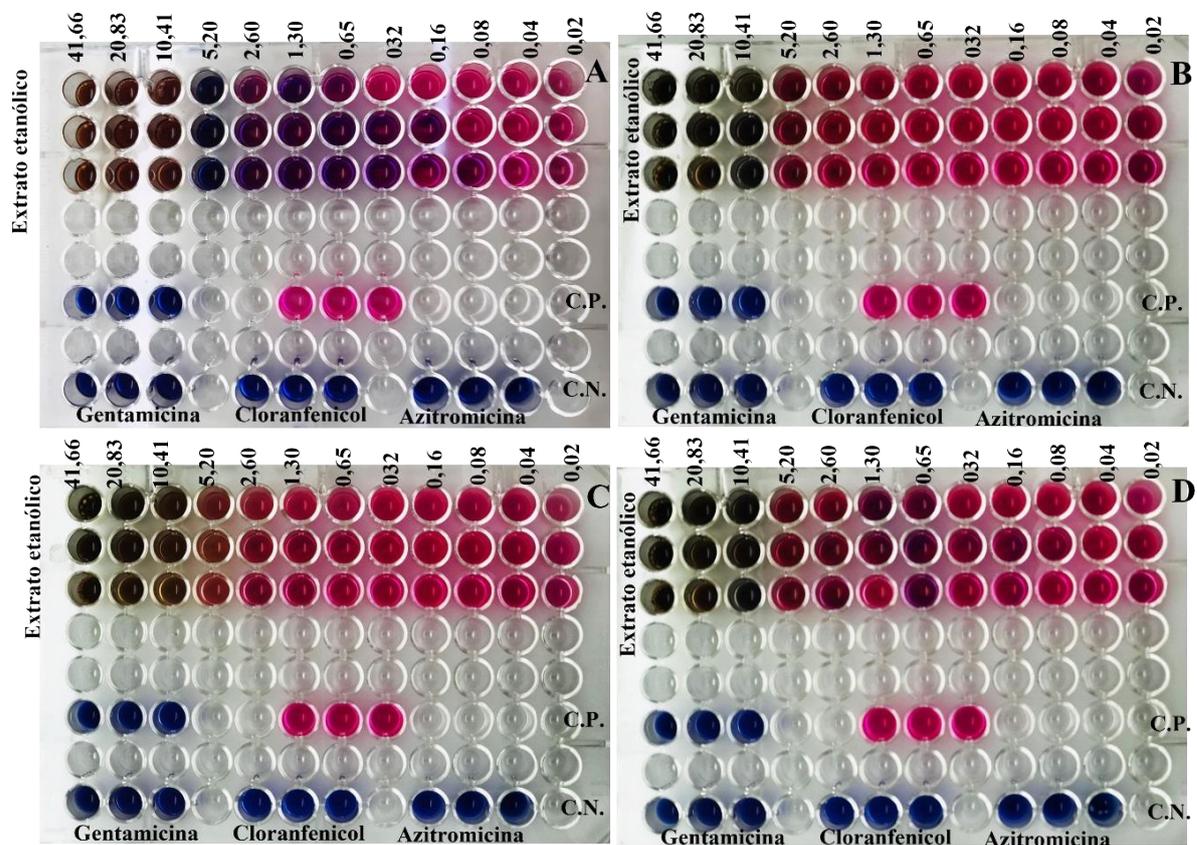


Figura 6. Placas de microdiluição demonstrando a sensibilidade das cepas utilizadas perante as concentrações do extrato etanólico. A cor azul indica a inatividade bacteriana e a cor rosa indica a presença de bactérias. (A) *Bacillus cereus*. (B) *Escherichia coli*., (C) *Staphylococcus aureus* E (D) *Salmonella sp.* Padrão dos poços está ilustrado na figura 3.

Para *B. Cereus*, a menor concentração para atividade bactericida foi de 5,20 mg/mL, e para bacteriostática foi de 2,60 mg/mL. A cepa de *Escherichia coli* foi a menos sensível ao extrato, obtendo-se efeito bacteriostático de 10,41 mg/mL, e

bactericida na concentração de 20,83 mg/mL. Para *Staphylococcus aureus* a ação bacteriostática foi correspondente a concentração de 5,20 mg/mL e bactericida de 10,41 mg/mL. A cepa *Salmonella* sp apresentou apenas atividade bactericida em 10,41 mg/mL e na concentração 5,20 mg/mL ocorreu crescimento bacteriano sem controle.

1.4.3 Citotoxicidade

Para a viabilidade celular o teste de MTT foi realizado em leitura de 570 nm no espectrofotômetro. As amostras obtiveram resultados satisfatórios, pois de acordo com o controle positivo de viabilidade celular ocorreu preservação das células, diferente do controle negativo que teve uma diminuição das células viáveis. Apenas as concentrações de 0,04 mg/mL e 0,02 mg/mL tiveram uma diminuição das células viáveis, quando comparado com os poços dos meios, mas ainda assim é superior aos poços com DMSO 50 %.

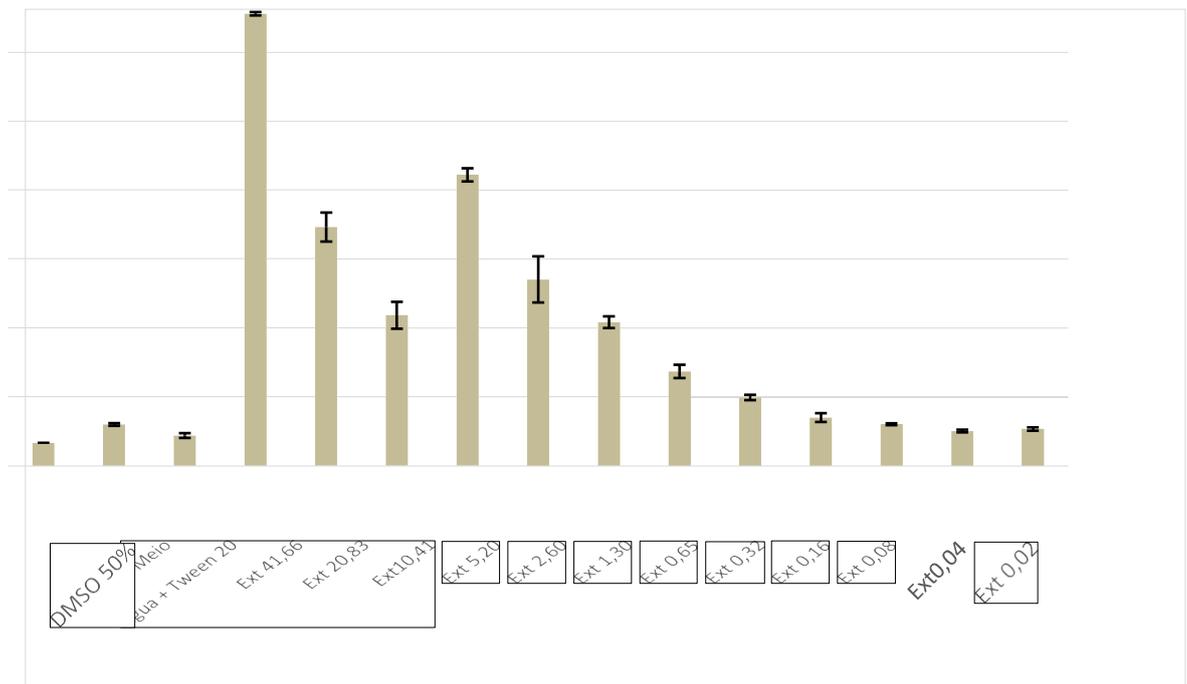


Figura 7. Gráfico com a média da absorbância de 570 nm e a média do desvio padrão para as concentrações do extrato etanólico de *Spondias tuberosa* Arruda. Controle Negativo: DMSO 50 %, Controle Positivo: Meio.

1.4.4 Análise estatística

Foi realizado as análises estatísticas de ANOVA One Way e teste de Tukey's

para ambas leituras, onde verificou haver uma diferença significativa entre as concentrações aplicadas evidenciando o valor de $p < 0,02$.

1.5 DISCUSSÃO

Estudos referentes a fitoterápicos têm se desenvolvido no Brasil nas últimas décadas, sendo parte deles envolvendo espécies nativas do nordeste, especificamente do bioma caatinga (Agra *et al.*, 2008, Albuquerque; Andrade; Silva, 2005). Alguns trabalhos vêm demonstrando a atividade antimicrobiana de extratos etanólico de folhas da flora nordestina contra as cepas bacterianas mais utilizadas, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Pode-se citar a *Amburana cearensis* (Bravo *et al.*, 1999), *Hymenaea courbaril*, (Nogueira *et al.*, 2001), *Borreria verticillata* (Peixoto-Neto *et al.*, 2002), *Croton sonderianus* (McChesney; Clark; Silveira, 1991) e *Hyptis suaveolens* (Iwu *et al.*, 1990). Fernandes, Santos e Pimenta (2005) verificaram atividade antimicrobiana dos extratos hidroalcóolicos de *G. ulmifolia* e *H. courbaril* para *E. coli*.

Os resultados experimentais deste estudo mostraram diferentes níveis de sensibilidade das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. O extrato etanólico de *Spondias tuberosa*. demonstrou inibição no crescimento dos microrganismos *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. e *Staphylococcus aureus*. Estes dados indicam a presença de promissoras substâncias com atividades antibacterianas. Estes dados são condizentes com os descritos na literatura para um grande número de extratos de plantas estudado em relação à atividade antimicrobiana (Costa *et al.*, 2013; Freitas *et al.*, 2022, Santos *et al.*, 2020).

Corroborando com os achados neste estudo, já é registrado na literatura o uso popular da espécie vegetal na medicina tradicional. O umbu é frequentemente usado na medicina popular para tratar infecções gastrointestinais (Almeida *et al.*, 2003). As folhas e a casca do umbuzeiro são usadas em remédios tradicionais para tratar problemas de pele, incluindo infecções bacterianas, picadas de insetos e feridas (Silva *et al.*, 2021; Cavalcante *et al.*, 2007). É importante destacar que a eficácia desses usos populares da *Spondias tuberosa* como antibacteriano não foi totalmente validada por estudos clínicos controlados.

Os extratos vegetais possuem inúmeras atividades biológicas, bioquímicas e fisiológicas e a eficácia das propriedades presentes nos extratos, dependendo de sua

composição/espécie vegetal. Os resultados deste estudo estão conforme literatura para as cepas *E. coli* e *S. aureus* (Silva *et al.*, 2020). Entretanto, Silva *et al.* (2020) utilizaram a parte do caule de *S. tuberosa*, porém trabalhos como o de Silva *et al.* (2021) utilizaram o extrato proveniente das folhas do vegetal tiveram resultados semelhantes a este estudo com bactérias multiresistentes e concentrações próximas as testadas.

Diferentes tipos de extratos têm sido investigados quanto às suas propriedades antimicrobianas, antitumoral, antidiabéticas, anti-inflamatórias, antioxidantes e cicatrizantes (Silva *et al.*, 2020). As informações fornecidas aqui evidenciam a necessidade de avaliações sobre as atividades biológicas e os potenciais dos extratos. Estudos futuros devem se concentrar no uso de extratos no combate à resistência antibacteriana, uma vez que este produto pode estar disponível na maior parte do país e é relativamente barato a sua obtenção em comparação com antibióticos convencionais. Além disso, os estudos devem identificar a composição dos extratos vegetais, incluindo análises de metabólitos secundários, para determinar os fatores responsáveis pela sua atividade antibacteriana.

1.6 CONCLUSÃO

Neste estudo, foi investigado a potencial aplicação do extrato etanólico de *Spondias tuberosa* Arruda como um agente antibacteriano eficaz e sua relevância em aplicações biomédicas e farmacêuticas. Demonstrando de que o extrato etanólico possui propriedades antibacterianas, inibindo o crescimento e a viabilidade das quatro cepas bacterianas testadas. Essa atividade antibacteriana pode ser explorada em várias aplicações, desde tratamentos médicos até a conservação de alimentos. As propriedades antibacterianas do extrato etanólico sugerem seu potencial uso como uma alternativa eficaz aos antibióticos tradicionais no tratamento de infecções bacterianas, para o uso do extrato nas concentrações testadas que obtiveram viabilidade celular testada. Isso é particularmente relevante à luz da crescente resistência bacteriana aos antibióticos convencionais. Embora os resultados sejam promissores, existem desafios a serem superados, incluindo a identificação dos componentes ativos do extrato, a otimização de formulações e a avaliação de toxicidade em modelo *in vivo*. Essas etapas são cruciais antes da aplicação clínica. Por conseguinte, o presente estudo contribui para a crescente compreensão das propriedades antibacterianas dos extratos etanólicos de origem natural, servindo como base para futuras pesquisas que buscam desenvolver terapias mais seguras e sustentáveis contra infecções bacterianas.

REFERÊNCIAS

- AGRA, M. F.; SILVA, K. N.; BASÍLIO, I. J. L. D.; FREITAS, P. F.; BARBOSA FILHO, J. M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 472-508, 2008.
- ALBUQUERQUE, U. P.; ANDRADE, L. H. C.; SILVA, A. C. O. Use of plant resources in a seasonal dry forest (Northeastern Brazil). **Acta Botânica Brasileira**, v. 19, n. 1, p. 27-38, 2005.
- ALMEIDA, M. M. B. *et al.* Antibacterial activity of *Spondias tuberosa* Arruda against *Helicobacter pylori*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34(1), p. 58-61, 2003.
- ALVES, D. S. *et al.* Hypoglycemic effect of *Spondias tuberosa* (umbu) leaves and fruits in rats. **Pharmaceutical Biology**, v. 55(1), p. 1314-1320, 2017.
- ARAÚJO, S. R. *et al.* Antimicrobial and anti-inflammatory activities of *Spondias tuberosa* (Anacardiaceae) stem bark ethanol extract. **Industrial Crops and Products**, v. 144, 112046, 2020.
- BARBOSA, R. G. *et al.* Antimicrobial activity of *Spondias tuberosa* fruit extract and its impact on biofilm formation. **Food Science and Technology**, v. 41, p. 370-377, 2021.
- BRAVO, J. A.; SAUVAIN, M.; GIMENEZ, A.; MUNOZ, V.; CALLAPA, J.; LE MEN-OLIVER, L.; MASSIOT, G.; LAVAUD, C. Bioactive phenolic glycosides from *Amburana cearensis*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 50, n. 1, p. 71-74. 1999.
- CALVO-IRABIÉN, L. M. *et al.* Ethnobotanical assessment of the wild food plants used by the Seri people in northwestern Mexico. **Sustainability**, v. 12(7), 2913, 2020.
- CAVALCANTI, M. S. *et al.* Etnobotânica da Umbuzeiroa (*Spondias tuberosa*, Anacardiaceae) em comunidades rurais da Caatinga da Paraíba, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 21(4), p. 887-897, 2007.
- CAZELLA, L. N.; GLAMOCLIJIA, J.; SOKOVIC, M.; GONÇALVES, J. E.; LINDE, G. A.; COLAUTO, N. B.; GAZIM, Z. C. Antimicrobial Activity of Essential Oil of *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) Aerial Parts at Flowering Period. **Front. Plant Sci.** 10:27. 2019.
- CHOUHAN, S.; SHARMA, K.; GULERIA, S. Antimicrobial Activity of Some Essential Oils—Present Status and Future Perspectives. **Medicines**, v. 4, n. 58. 2017.
- COSTA, E. M. M. B.; BARBOSA, A. S.; FLORENTINO, V. G. B.; SILVA, J.

D. F.; TROVÃO, D. M. B. M.; MEDEIROS, A. C. D. In vitro antimicrobial activity of plant extracts of semi-arid region of Paraíba, PB, Brazil. **Rev Odonto Cienc.** V. 28(4) p. 101-104, 2013.

CLSI. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard – Ninth Edition.** CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard - Eighth Edition.** NCCLS document M2-A8. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2003.

DA SILVA, C. A. *et al.* Supercritical CO₂ extraction and low pressure solvent partitioning for obtaining functional properties of industrial potato peel by-products. **Food Chemistry**, 315, 126298, 2020.

FERNANDES, T. T.; SANTOS, A. T. F.; PIMENTA, F. C. Atividade antimicrobiana das plantas – *Plathymenia reticulata*, *Hymenaea courbaril* e *Guazuma ulmifolia*. **Revista de Patologia Tropical**, v. 34, n. 2, p. 113-122, 2005.

FERREIRA, C. F. S. L. **Screening fitoquímico e avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de *Spondias* sp e *Spondias tuberosa* Arr. Câm. de ocorrência no semiárido paraibano.** 2015, 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais), Universidade Federal de Campina Grande, Patos, Paraíba, 2015.

FREITAS, M. A. *et al.* HPLC–DAD analysis and antimicrobial activities of *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae). **Biotech** v. 12, n. 61, 2012. <https://doi.org/10.1007/s13205-022-03126-1>.

IWU, M. M.; EZEUGWU, C. O.; OKUNGI, C. O.; SANSON, D. R.; TEMPESTA, M. S. Antimicrobial activity and terpenoids of the essential oil of *Hyptis suaveolens*. **International Journal of Crude Drug Research**, v. 28, n. 1, p. 73-76, 1990.

KANG, Y. R., *et al.* Solvent effect on the phenolic compounds and antioxidant properties of *Stenoloma chusanum* (L.) Ching extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 145, 111975, 2020.

LIMA, E. M. F.; WINANS, S. C.; PINTO, U. E. Quorum sensing interference by phenolic compounds – A matter of bacterial misunderstanding. **Heliyon**, v. 9, 2023.

LINS NETO, E. M. F.; PERONI, N.; ALBUQUERQUE, U. P. Traditional knowledge and management of Umbu (*Spondias tuberosa*, Anacardiaceae): na endemic species from the semi– arid region of Northeastern Brazil. **Economic Botany**, v. 64, n. 1, p. 11-21, 2010.

- MAGALHÃES, A. O. **Isolamento e identificação de substâncias com ação espasmolítica de folhas de *Lippia thymoides* Mart. & Schauer (Verbenaceae)**. 2018, 125 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, Bahia, 2018.
- MAIA, R. T. *et al.* Anti-inflammatory effects of *Spondias tuberosa* Arruda leaf extract on LPS- stimulated RAW 264.7 macrophages. **International Immunopharmacology**, v. 60, p. 84-91, 2018.
- MANGANARIS, G. A. *et al.* Bioactive compounds content and antioxidant activity of different plant parts of endemic Ebenus species from Cyprus. **Industrial Crops and Products**, v. 107, p. 111-120, 2017.
- MCCHESENEY, J. D.; CLARK, A. M.; SILVEIRA, A. R. Antimicrobial diterpenes of *Croton sonderianus*. **Journal of Nature Product**, v. 54, n. 6, p. 1625-1633, 1991.
- NOGUEIRA, R. T.; SHEPHERD, G. J.; LAVERDE JÚNIOR, A.; MARSAIOLI, A. J.; IMAMURA, P. M. Clerodane-type diterpenes from the seed pods of *Hymenaea courbaril* var. *Stilbocarpa*. **Phytochemistry**, v. 58, n. 8, p. 1153-1157, 2001.
- PEIXOTO-NETO, P. A. S.; SILVA, M. V.; CAMPOS, N. V. C.; PORFÍRIO, C. Z.; CAETANO, L. C. Antibacterial activity of *Borreria verticillata* roots. **Fitoterapia**, v. 73, n. 6, p. 529-531, 2002.
- PEREIRA, E. M. R. *et al.* Safety assessment of the hydroethanolic extract of *Spondias tuberosa* fruits: Subacute and subchronic toxicity studies in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 156, 2021.
- PEREIRA, S. F. *et al.* Evaluation of antibacterial activity and mechanisms of action of an ethanolic extract of *Spondias tuberosa* Arruda (Anacardiaceae) leaves. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 17(5), p. 294-300, 2020.
- RODRIGUES, D. P. *et al.* Acute oral toxicity and anti-inflammatory activity of hydroethanolic extract of *Spondias tuberosa* Arruda leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 238, 2019.
- SANTOS, A. D. *et al.* Antibacterial activity of ethanol extract from *Spondias tuberosa* fruit against multidrug-resistant strains. **Natural Product Research**, v. 33(16), p. 2383-2386, 2019.
- SANTOS, A. T. L. dos.; CARNEIRO, J. N. P.; ANDRADE-PINHEIRO, J. C.; ARAÚJO-NETO, J. B. de.; SALES, D. L.; FREITAS, M. A. de.; ALMEIDA-BEZERRA, J. W.; BATISTA, F. L. A.; MAGALHÃES, F. E. A.; PEREIRA, C. C. S. S.; LUCIANO-TORRES, M. de L. A.; LIMA, E. E.; COUTINHO, H. D. M.;

- MORAIS-BRAGA, M. F. B. . Antibacterial and antioxidant potential of *Spondias tuberosa* Arruda (Anacardiaceae) extracts. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 9, n. 12, 2020. DOI: 10.33448/rsd- v9i12.10845.
- SANTOS, J. P. O. *et al.* Sustainable management of *Spondias tuberosa* Arruda in different use regimes in the semi-arid region of Brazil. **Forest Ecology and Management**, v. 443, p. 37-45, 2019.
- SANTOS, R. L. *et al.* *Spondias tuberosa* Arruda leaf extract induces apoptosis via mitochondrial dysfunction in MCF-7 breast cancer cells. **PLoS One**, v. 16(3), 2021.
- SANTOS, R. L. *et al.* Synergistic effects between *Spondias tuberosa* extract and antibiotics on clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. **PLoS One**, v. 16(2), 2021.
- SILVA-LUZ, C.L.; PIRANI, J.R.; PELL, S.K.; MITCHELL, J.D. **Anacardiaceae in Flora e Funga do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB4405>. Acesso em: 20 out. 2022.
- SILVA, A. M. *et al.* In vitro antimicrobial activity of the ethanol extract of *Spondias tuberosa* (Anacardiaceae) stem bark. **Brazilian Journal of Biology**, v. 80(1), p. 1-5, 2020.
- SILVA, C. G. *et al.* Nutritional and functional characterization of *Spondias tuberosa* Arruda (Umbu) fruit and agro-industrial residue. **Food Chemistry**, v. 324, 2020.
- SILVA, E. C. M. *et al.* Antioxidant and cytotoxic activities and chemical constituents of *Spondias tuberosa* (Anacardiaceae) stem bark. **South African Journal of Botany**, v. 135, p. 164-169, 2020.
- SILVA, M. G. *et al.* Genotoxicity and mutagenicity assessment of *Spondias tuberosa* fruit pulp extract using in vitro and in vivo assays. **Food and Chemical Toxicology**, v. 146, 2020.
- SILVA, M. L. A. *et al.* Assessment of technological, nutritional and economic aspects of the Umbuzeiro fruit (*Spondias tuberosa* Arruda) used in the preparation of food products. **LWT- Food Science and Technology**, v. 90, p. 572-577, 2018.
- SILVA, J. G. *et al.* Phytochemical Analysis, Antibacterial Activity, and Cytotoxicity of the Ethanolic Extract from the Leaves of *Spondias tuberosa* Arruda. *Journal of Chemistry*, 2021.
- YANG, R. Y., *et al.* Toxicity of velvet bean (*Mucuna pruriens*) seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50(3), p. 728-731, 2002.
- YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL, F. V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova** v. 24(1), p. 147-152, 2010.

VILLANUEVA-BERMEJO, D. *et al.* Ethanol as an alternative solvent for the efficient extraction of bioactive compounds from winery wastes. **Food Chemistry**, v. 262, p. 7-16, 2018.

2 CAPÍTULO 2: Atividade antibacteriana de nanopartículas de prata sintetizadas a partir do extrato de *Spondias tuberosa* Arruda contra bactérias patogênicas

2.1 INTRODUÇÃO

A nanotecnologia é uma área da ciência e da engenharia que lida com estruturas e materiais em escala nanométrica, ou seja, em uma escala extremamente pequena, na ordem de nanômetros (um nanômetro equivale a um bilionésimo de metro, ou 10^{-9} metros) (Asghar, *et al.*, 2012). A nanotecnologia envolve a manipulação, fabricação e aplicação de estruturas e dispositivos nessa escala, e tem uma ampla gama de aplicações em diversos campos, incluindo eletrônica, medicina, materiais, energia e demais áreas (Asghar *et al.*, 2012).

Nanomateriais são materiais que possuem pelo menos uma dimensão na escala nanométrica (entre 1 e 100 nm), ou seja, eles são compostos por estruturas ou partículas que têm tamanho nanométrico (Peralta-Videa *et al.*, 2011). Esses materiais podem exibir propriedades únicas devido ao seu tamanho diminuto e à alta relação área-superfície, o que os torna interessantes para uma variedade de aplicações (Peralta-Videa *et al.*, 2011). Exemplos de nanomateriais incluem nanotubos de carbono, nanopartículas metálicas, nanocompósitos, dentre outros.

As nanopartículas são partículas extremamente pequenas, com dimensões na escala de nanômetros, que apresentam propriedades físicas e químicas únicas (Williams, 2008). Essas partículas têm sido amplamente estudadas e utilizadas em diversas áreas, como medicina, eletrônica, energia e meio ambiente (Willems, 2005).

As nanopartículas representam uma revolução tecnológica com inúmeras aplicações em diversas áreas (Willems, 2005). No entanto, é importante que os impactos das nanopartículas na saúde e no meio ambiente sejam cuidadosamente avaliados e gerenciados para garantir que seus benefícios superem seus riscos.

Nanopartículas de prata (AgNPs) são compostas por prata iônica. A prata é conhecida por suas propriedades antibacterianas e antimicrobianas, e as nanopartículas de prata têm sido estudadas e usadas em várias aplicações (Couto *et al.*, 2019). As nanopartículas de prata são interessantes devido às suas propriedades únicas, como alta atividade antimicrobiana, alta condutividade elétrica, capacidade

de catalisar reações químicas eficientemente e versatilidade em aplicações em várias áreas (Couto *et al.*, 2019). Apesar do nitrato de prata ser tóxico para uso, uma alternativa é produzir essas AgNPs por rota verde, por meio de compostos naturais, como extratos de plantas.

A síntese de nanopartículas a partir de extratos de plantas tem se mostrado uma alternativa promissora e sustentável para a produção dessas partículas. Essa técnica utiliza compostos presentes nos extratos de plantas, como agentes redutores e estabilizadores das nanopartículas, evitando o uso de produtos químicos tóxicos e reduzindo o impacto ambiental (Maciel, 2016).

A síntese de nanopartículas a partir de extratos de plantas apresenta diversas vantagens em relação às técnicas convencionais. Além de ser uma técnica mais sustentável, apresenta baixo custo e de fácil acesso. Além disso, pode ser realizada em condições ambientais amenas, sem a necessidade de altas temperaturas ou pressões (Dykman e Khlebtsov, 2012; Maciel, 2016).

As nanopartículas têm sido estudadas como uma alternativa aos antibióticos convencionais no combate às infecções bacterianas. Essas partículas têm um tamanho extremamente reduzido, permitindo a penetração nas células bacterianas e danificar sua estrutura (Antunes *et al.*, 2013; Souza *et al.*, 2013).

Diversos tipos de nanopartículas têm sido investigados, incluindo prata, ouro, óxido de zinco, sílica, e outros materiais. Estudos têm demonstrado que essas nanopartículas apresentam atividade antibacteriana contra várias cepas patogênicas, incluindo *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, entre outras (Aravinthan *et al.*, 2015).

Apesar de promissoras, as nanopartículas como antibacterianos ainda estão em fase de estudo e desenvolvimento. É importante que sejam realizados mais estudos para avaliar sua eficácia e segurança antes de sua utilização em larga escala, para entender melhor o uso dessas nanopartículas em diferentes aplicações e para avaliar seus efeitos no organismo humano.

Diversas plantas têm sido utilizadas na síntese de nanopartículas, como a *Aloe vera*, *Camellia sinensis*, *Curcuma longa*, *Mentha piperita*, entre outras (An *et al.*, 2018). Essas plantas possuem compostos como polifenóis, flavonoides, terpenoides e ácidos orgânicos, que apresentam propriedades redutoras e estabilizadoras das nanopartículas.

Spondias tuberosa Arruda, popularmente conhecida como umbu, é uma

árvore frutífera nativa do semiárido brasileiro, principalmente da região Nordeste (Lins Neto, 2010). Além de ser uma fruta saborosa e nutritiva, o umbu também possui importância econômica e social para as comunidades do semiárido brasileiro, que dependem da sua produção para a subsistência e geração de renda (Silva-Luz *et al.*, 2022). Por *S. tuberosa* ser uma espécie endêmica do semiárido e pouco estudada, ainda são escassos os trabalhos sobre a aplicação dessa espécie na síntese de nanopartículas, sendo assim os estudos mais voltados a outras espécies do gênero.

A produção de nanopartículas de prata utilizando extrato de folhas de *Spondias tuberosa* pode resultar em nanopartículas com propriedades antibacterianas, devido à presença de compostos bioativos nas folhas da planta, como terpenos e flavonoides. Além disso, a segurança e a toxicidade das nanopartículas produzidas devem ser rigorosamente avaliadas antes de sua aplicação em ambientes clínicos ou industriais. Por este motivo o presente estudo tem como objetivo de produzir nanopartículas de prata a partir do extrato de folhas da *S. tuberosa* que sejam estáveis e possam ter atividade antibacteriana e baixa toxicidade para futuras aplicações.

2.2 REVISÃO DA LITERATURA

2.2.1 Nanopartículas de prata por rota verde

A síntese de nanopartículas de prata (AgNPs) por rota verde, que utiliza métodos ecológicos e mais sustentáveis, tem recebido considerável atenção na pesquisa em nanotecnologia devido ao seu potencial para aplicações variadas, incluindo medicina, meio ambiente, eletrônica e muitos outros campos. Assim, o presente processo envolve a utilização de agentes redutores naturais ou métodos que minimizam o uso de produtos químicos tóxicos e resíduos prejudiciais ao meio ambiente (Sint *et al.*, 2013). Exemplos comuns de agentes redutores incluem extratos de plantas, microrganismos, e outros compostos orgânicos derivados de fontes renováveis (An, *et al.*, 2018).

Os mecanismos exatos de formação das AgNPs por rota verde podem variar dependendo do agente redutor utilizado. Geralmente, os compostos bioativos presentes nos extratos de plantas ou microrganismos atuam como agentes redutores, reduzindo os íons de prata Ag^+ em AgNPs (Shankar *et al.*, 2003). A formação é frequentemente mediada por interações eletrostáticas e químicas entre os compostos redutores e os íons de prata (Shankar *et al.*, 2003). As AgNPs produzidas por rota verde possuem propriedades únicas devido ao tamanho nanométrico e à sua interação com os agentes redutores naturais, como atividade antimicrobiana, propriedades ópticas plasmônicas, capacidade de transporte de fármacos e potencial como agentes de imagem médica (Rai *et al.*, 2012). Elas são utilizadas em tratamentos médicos, como antibióticos alternativos e sistemas de entrega de medicamentos. Também são usadas em embalagens de alimentos antimicrobianas, tratamento de água, sensores, eletrônica e catálise (Rai *et al.*, 2015).

Um dos principais benefícios das AgNPs por rota verde é sua abordagem mais sustentável, em comparação com métodos tradicionais de síntese (Maciel, 2016). No entanto, a segurança ambiental e a toxicidade precisam ser cuidadosamente avaliadas para garantir seu uso responsável (Khanna *et al.*, 2019).

Há desafios a serem superados, como a padronização de protocolos de síntese e a compreensão completa dos mecanismos de ação. Pesquisas futuras podem se concentrar na aplicação clínica das AgNPs por rota verde e na resolução de questões relacionadas à toxicidade (Navqi *et al.*, 2019).

2.2.2 Caracterização das nanopartículas

A caracterização de nanopartículas de prata desempenha um papel crucial no entendimento de suas propriedades físicas, químicas e biológicas, existindo diversos métodos de caracterização (Zhang *et al.*, 2020). A caracterização das nanopartículas é essencial para garantir sua qualidade, segurança e eficácia em diversas aplicações. Além disso, a compreensão completa das características das nanopartículas impulsiona a inovação e a pesquisa em uma ampla gama de campos científicos e tecnológicos, contribuindo para avanços significativos em várias áreas (An *et al.*, 2018). Portanto, a caracterização de nanopartículas é uma etapa fundamental em qualquer pesquisa ou aplicação que envolva essas estruturas nanométricas.

A espectroscopia UV-Vis é utilizada para avaliar as propriedades ópticas das AgNPs, como a absorção de luz na região do espectro visível. As características espectrais podem fornecer informações sobre o tamanho e a concentração das AgNPs (An *et al.*, 2018). A Espectroscopia de Especkman é usada para estudar a estabilidade de coloides, incluindo AgNPs, fornecendo informações sobre o potencial zeta, carga superficial e estabilidade das partículas em suspensão (Huang *et al.*, 2018).

A caracterização de nanopartículas de prata por meio do potencial zeta é uma técnica comumente usada para avaliar a estabilidade coloidal das AgNPs em suspensão (Tamboli *et al.*, 2014). O potencial zeta está relacionado à carga elétrica na superfície das partículas e é uma medida importante para entender como as partículas interagem em uma solução. O Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) é usado para medir o tamanho hidrodinâmico das AgNPs em solução, fornecendo informações sobre a estabilidade coloidal e o comportamento de agregação (Amendola *et al.*, 2017).

A Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) é uma técnica para avaliar a morfologia, o tamanho e a forma das AgNPs em escala nanométrica, onde por meio dessa é possível obter imagens de alta resolução das nanopartículas (Khanna *et*

al., 2016).

Essas técnicas de caracterização são essenciais para compreender e controlar as propriedades das AgNPs, o que é fundamental para uma ampla gama de aplicações, incluindo terapias médicas, tecnologia de sensores, eletrônica e muitas outras (Zhang *et al.*, 2020). O uso combinado dessas técnicas proporciona uma caracterização completa e precisa das AgNPs, permitindo um melhor desenvolvimento e aplicação dessas nanopartículas.

2.2.3 Atividade antibacteriana

A resistência bacteriana aos antibióticos convencionais representa um desafio significativo para a medicina e a saúde pública. As nanopartículas de prata têm se destacado como uma alternativa promissora, devido às suas notáveis propriedades antibacterianas. Quando produzidas por métodos de "rota verde", que utilizam agentes redutores naturais e processos ecoamigáveis, as AgNPs oferecem uma abordagem sustentável para combater infecções bacterianas (Yari *et al.*, 2021; Singh *et al.*, 2020; Rodrigues *et al.*, 2018).

As AgNPs produzidas por métodos de rota verde apresentam um enorme potencial como agentes antibacterianos. Assim, a sua atividade antibacteriana é mediada por diversos mecanismos, incluindo danos à membrana celular e geração de espécies reativas de oxigênio (EROS), como superóxido e peróxido de hidrogênio, que danificam o DNA e proteínas bacterianos (Seo *et al.*, 2019). A caracterização adequada dessas nanopartículas é fundamental para entender suas propriedades e otimizar sua eficácia. A pesquisa contínua nessa área pode levar ao desenvolvimento de terapias antimicrobianas mais eficazes e sustentáveis, oferecendo esperança no combate à resistência bacteriana (Gahlawat; Choudhury, 2019).

2.2.4 Citotoxicidade

Nanopartículas de prata têm sido amplamente estudadas devido às suas notáveis propriedades antimicrobianas e potencial aplicação em várias áreas, incluindo medicina, eletrônica e indústria (D'Souza *et al.*, 2020). No entanto, a segurança das AgNPs é uma preocupação significativa, especialmente quando se

consideram suas possíveis implicações na saúde humana e no meio ambiente (Poon *et al.*, 2021).

A toxicidade das AgNPs é influenciada por vários fatores, incluindo tamanho, forma, concentração e revestimento de superfície. Estudos têm mostrado que as AgNPs podem causar danos celulares e genéticos em células humanas e em outros organismos (Kaur *et al.*, 2021). Isso pode incluir estresse oxidativo, danos ao DNA e indução de apoptose (Kaur *et al.*, 2021). A inalação de AgNPs em locais de produção ou uso pode levar a problemas respiratórios e inflamação pulmonar. Além disso, caso as AgNPs forem liberadas no meio ambiente podem ter impactos adversos em organismos aquáticos e terrestres, afetando a ecologia dos ecossistemas (Kaur *et al.*, 2021).

AgNPs menores geralmente exibem maior toxicidade devido à sua maior área de superfície, o que resulta em maior capacidade de interação com células e componentes celulares. AgNPs maiores tendem a ser menos tóxicas, mas ainda podem apresentar riscos dependendo da concentração e exposição (Li *et al.*, 2019).

Uma alternativa para reduzir a toxicidade é modificar a superfície das AgNPs com materiais como polímeros ou proteínas para reduzir a liberação de íons de prata e melhorar a estabilidade. Além de controlar rigorosamente o tamanho e a forma das AgNPs durante a síntese para otimizar a atividade antimicrobiana e minimizar a toxicidade (Kaur *et al.*, 2021).

As AgNPs produzidas por rota verde têm o potencial de oferecer benefícios significativos, mas também apresentam riscos de toxicidade, especialmente quando não são devidamente controladas. É crucial avaliar e mitigar esses riscos por meio de estratégias como revestimento de superfície e controle rigoroso do tamanho e forma das AgNPs. A pesquisa contínua nesta área é essencial para entender completamente os riscos e benefícios das AgNPs, garantindo seu uso seguro e responsável na sociedade e na indústria.

2.3 MATERIAIS E MÉTODOS

2.3.1 Aquisição da matéria-prima

A matéria-prima (Folhas de Umbu) foi coletada no campus da Universidade Estadual de Feira de Santana, localizado na cidade de Feira de Santana, Bahia, no período de fevereiro a abril de 2023, sempre no período da manhã, entre 6h40min – 7h30min, e escolhidas as folhas mais novas (Figura 1: A). As folhas coletadas foram lavadas com água ultrapura para evitar contaminante presente nas folhas (SISGEN AC0B3BB).

2.3.2 Obtenção do extrato

Para a obtenção do extrato aquoso de *S. tuberosa*, as folhas foram pesadas (20 g), e lavadas com água ultrapura para garantir a retirada de sujeira/contaminante. As folhas foram trituradas em liquidificador com 200 mL de água ultrapura. Após trituradas, o extrato foi peneirado para remover as partes fibrosas das folhas (Figura 8A) e filtrado com papel filtro (Figura 8B). Após esses processos o extrato com concentração em 10% (Figura 8C) foi armazenado para utilização na síntese das nanopartículas.

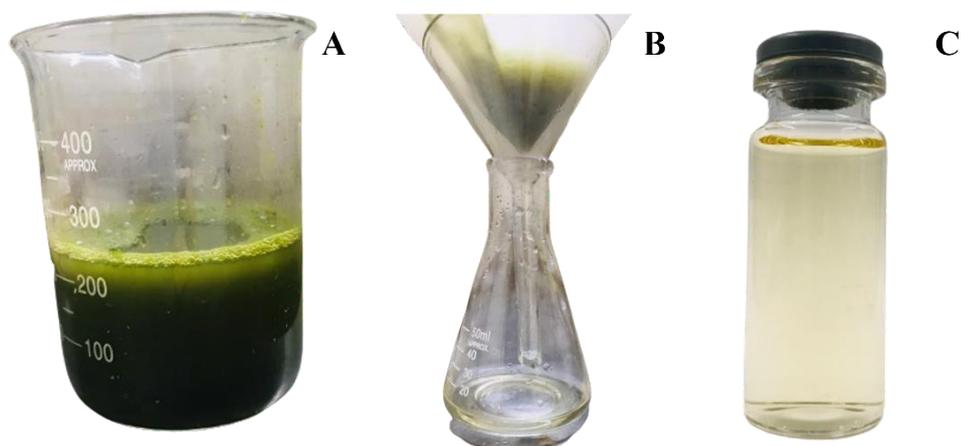


Figura 8. (A). Extrato a 10% antes da filtragem. (B) Filtragem do extrato com o papel filtro e (C) Extrato 10% filtrado.

2.3.3 Padronização do extrato

O extrato com 10%, com pH de 2,87, foi diluído para 2% (Figura 9 A), após diluição com água ultrapura foi realizado o ajuste do pH para obter um extrato com pH entre 9 a 10 (Figura 9B).



Figura 9. (A) Extrato diluído a concentração de 2% e (B) Extrato 2% com pH 10 ajustado.

O ajuste do pH foi realizado com o medidor de pH (pHmêtro) utilizando a água pura como branco. Como o extrato tem um pH ácido (entre 2,5 a 3) foi adicionado cerca de 350 μL de hidróxido de sódio (NaOH) a concentração de 1 mol L^{-1} .

2.3.4 Síntese de nanopartícula de prata

Para sintetizar as nanopartículas de prata a partir do extrato, foi utilizado 15 mL do extrato 2% com pH 9 – 10, levado para aquecer até atingir 80°C (Figura 10A), após aquecimento foi adicionado o agitador metálico no Becker e acrescido 3 mL de nitrato de prata (AgNO_3) (3 mmol L^{-1}), onde após a adição da prata o extrato já mudou a cor de um amarelo claro para castanho claro (Figura 10 B).

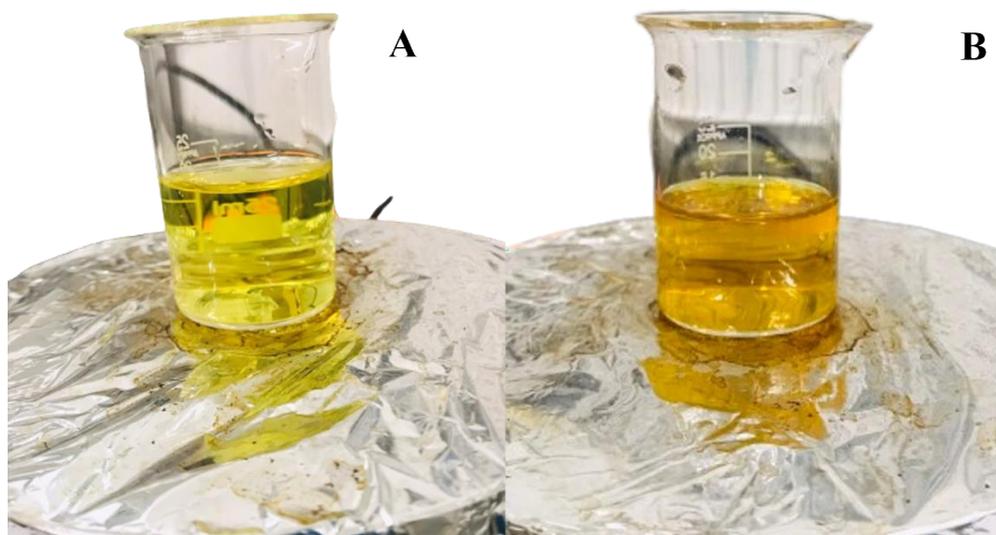


Figura 10. (A) Extrato 2% pH 10 no aquecendo até a temperatura média E (B) Solução após adição de AgNO_3 3mmol L^{-1} .

Após a mudança de cor, a solução foi retirada do aquecimento e armazenadas em fracos âmbar em geladeira (4°C) para utilização nos testes posteriores. A solução não apresentou formação de precipitados até o momento dos testes.

2.3.5 Centrifugação

Após a sintetização das AgNPs, parte das amostras foram centrifugadas em centrífuga refrigerada NT 835/ Nova Técnica, a 14000 rpm durante uma hora. Após, foi adicionado 1,5 mL de amostra em 24 eppendorfs para a centrifugação. Após o processo, foi retirado o sobrenadante e o pallet foi ressuspensionado em 0,5 mL de água ultrapura e armazenado para utilização nos testes antibacterianos.

2.3.6 Caracterização das Nanopartículas de Prata (AgNPs)

2.3.6.1 Espectrometria UV – VIS

A solução contendo as nanopartículas foram detectadas visualmente por meio da coloração apresentada e por espectroscopia de absorção. Assim, foi utilizado um espectrofotômetro UV-Visível na faixa espectral entre 200 e 800 nm. Para a leitura

no espectrofotômetro as soluções foram diluídas em proporção 1/1 ($v v^{-1}$).

2.3.6.2 Potencial Zeta

A análise de potencial zeta, que consiste em uma medida da força de repulsão eletrostática, fornecendo uma indicação do potencial de estabilidade do sistema coloidal. Com relação às análises do potencial zeta as mesmas foram realizadas com o objetivo de verificar a estabilidade das suspensões das partículas de prata produzidas, indicando o grau de repulsão entre elas.

2.3.6.3 Espalhamento de luz dinâmico (DLS)

Os raios hidrodinâmicos médios das nanopartículas foram determinados por Espalhamento de Luz Dinâmico (Dynamic Light Scattering – DSL), a partir da equação de Stokes-Einstein.

2.3.6.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) foi utilizada para a determinação do tamanho (diâmetro) e da estrutura das nanopartículas obtidas após secagem, com o objetivo de comparar com a avaliação dos dados de DLS.

2.3.7 Microrganismos

Os microrganismos utilizados no estudo foram obtidos na Coleção de Cultura de Microrganismos da Bahia, Universidade Estadual de Feira de Santana (CCMB/UEFS), são cepas-padrão das espécies CCMB282 *Bacillus cereus*, CCMB261 *Escherichia coli*, CCMB281

Salmonella sp. e CCMB262 *Staphylococcus aureus*.

2.3.8 Padronização dos microrganismos

A padronização foi realizada seguindo o método de suspensão direta das colônias, no qual são retiradas cerca de 3-5 colônias de cada microrganismo,

crescido em placas de Petri com meio Ágar Müeller-Hinton (AMH), e transferidas para um tubo tipo Falcon com 20 mL de solução salina estéril (0,85%), segundo as recomendações da CLSI (2012), documentos M02- A11 e M2-A8, sendo a suspensão padronizada por meio da leitura do espectrofotômetro, 625 nm para bactérias, atingindo o nível de turvação 0,5 da escala de Mc Farland, utilizando-se como zero a solução salina estéril.

2.3.9 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A técnica de microdiluição foi utilizada para estimar a CIM das nanopartículas para as bactérias estudadas, segundo os protocolos e adaptações propostos pela Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI (2003; 2012). Em uma microplaca de titulação com 96 poços e fundo em forma de “U” (fabricante KASVI) foram acrescidos 100 µL de caldo Müeller-Hinton (CMH) e 100 µL de cada amostra (extrato puro, nitrato de prata (AgNO_3), Nanopartícula de prata (AgNPs) e Nanopartícula de prata centrifugada (AgNPsc) realizando a diluição seriada em 6 concentrações (Figura 11). Após a diluição foram aplicados 20 µL da suspensão bacteriana. As placas foram homogeneizadas e levadas à estufa a 37°C por 24 horas. Após o período de incubação, foi acrescido 10 µL do revelador resazurina em cada poço, esperando-se 3 horas para a leitura dos resultados, em que a cor azul caracteriza a inexistência de crescimento bacteriano, e a cor rosa/lilás, o crescimento bacteriano.

Foi realizado o cálculo das concentrações pela fórmula $C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$, no qual C_1 é a concentração inicial das amostras diluídas no primeiro poço, V_1 é o volume do primeiro poço (100 µL), C_2 é a concentração final no primeiro poço, e V_2 é o volume final do primeiro poço (120 µL). Após cálculo foi obtido as seguintes concentrações: Extrato aquoso 2%: 1,6; 0,8; 0,4; 0,2; 0,1 e 0,05 µg/mL. AgNO_3 : 42,50; 21,25; 10,62; 5,31; 2,65 e 1,32 µg/mL. AgNPs: 7,08; 3,54; 1,77; 0,88; 0,44 e 0,22 µg/mL. AgNPsc: 14,16; 7,08; 3,54; 1,77; 0,88 e 0,44 µg/mL.

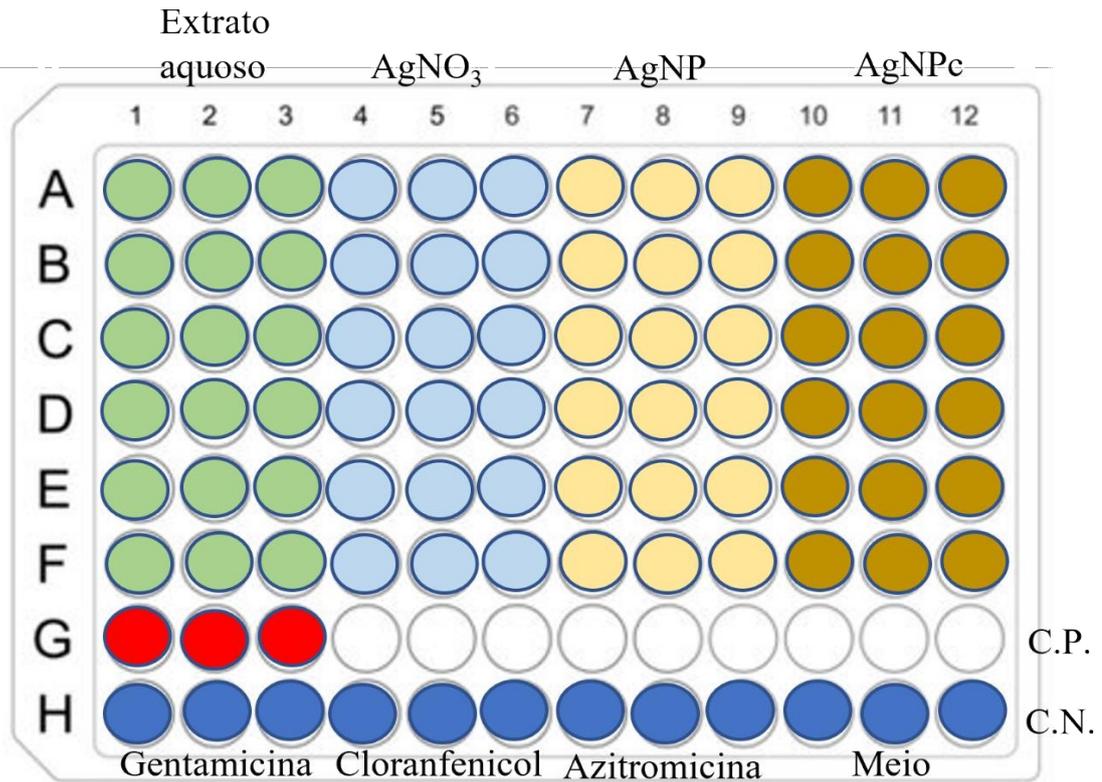


Figura 11. Ilustração da placa de 96 poços com a disposição das amostras no teste. Unidade de medida utilizada: mg/mL. C.P.: Controle Positivo. C.N.: Controle Negativo.

Como controle positivo para crescimento bacteriano foi utilizado 100 μ L do meio de cultura e 20 μ L da suspensão bacteriana; nos controles negativos foram utilizados 100 μ L do meio de cultura com 20 μ L dos antibióticos gentamicina 40 mg/mL, cloranfenicol 100 mg/mL e azitromicina 100 mg/mL e 20 μ L da suspensão, bem como 100 μ L de CMH puro para controle de esterilidade do meio. Além disso, foram realizadas triplicatas para confirmação dos resultados.

2.3.10 Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A determinação da CBM foi realizada após o crescimento bacteriano nas microplacas. Antes da adição do revelador, em cada poço que, a olho nu, não foi observado crescimento bacteriano, como turvação no poço, foram retiradas três alíquotas de 10 μ L cada e despejadas em placas de Petri com Ágar Müeller-Hinton (AMH), sendo espalhada por toda a placa com a ajuda de swabs estéreis. Posteriormente, foi adicionado o revelador nas microplacas e levadas a estufa. As placas para observação de crescimento bacteriano foram incubadas em estufa (37

°C) e após o período de 24 horas foi verificado se há crescimento bacteriano ou se a concentração testada tem efeito bactericida ou bacteriostático.

2.3.11 Citotoxicidade

A citotoxicidade foi avaliada por meio do ensaio de viabilidade celular pelo método MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), figura 12, no qual é uma técnica amplamente utilizada para determinar a viabilidade celular e avaliar a citotoxicidade de compostos em culturas celulares.

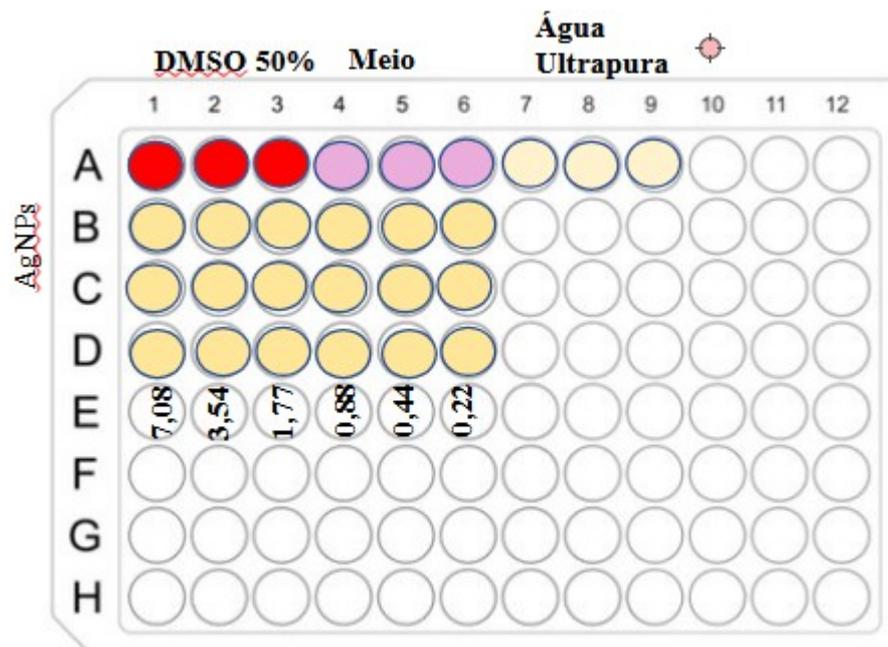


Figura 12. Esquematização da placa para viabilidade celular das AgNPs.

Em uma placa de 96 poços foi adicionado em cada poço 100 uL de uma solução com 1,1 % de células cultivadas, 1 % de antibiótico e antimicótico, 10 % de soro fetal bovino (SFB) e 87,9 % de meio RPMI, e após a adição do meio foi adicionado as 6 concentrações da nanopartículas de prata (3,75 – 120 µg/mL) utilizadas nos testes de sensibilidade microbiana. Como controle negativo foi utilizado 100 µL de DMSO (Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo) 50 % e o controle positivo foi 100 µL de meio puro e 100 µL de água ultrapura, que também foi utilizado como branco para a leitura no espectrofotometro (Figura 12). Todas as amostras foram realizadas em triplicatas.

A microplaca foi levada a câmara de CO₂ a concentração de 2,7% durante

um período de 48h. Após o período de incubação a microplaca foi retirada e foi adicionado 10 μ L de MTT em todos os poços e levada a câmara de CO₂ novamente por um período de 4h. Após a incubação foi adicionado 100 μ L do solubilizante do KIT de MTT para dissolver os cristais de formazan formados e a placa foi posta em espectrofotômetro de microplaca para leitura de absorbância na faixa de 570 nm.

2.3.12 Análise estatística

Os dados foram submetidos ao teste de análise de variância (ANOVA – One Way). Para avaliar as diferenças significativas entre as médias ($p < 0,05$) será utilizado o teste de Tukey. Para estas análises será utilizado o programa de estatística Paleontology Statistics Software Package for Education and Data Analysis (PAST) versão 2.17.

2.4 RESULTADOS

2.4.1 Síntese das nanopartículas de prata

A síntese das AgNPs resultou em uma solução de cor castanho-claro (Figura 13), e quando diluída em água ultrapura resulta na cor amarela, que é uma característica observada na prata coloidal resultado da absorção da radiação eletromagnética em ressonância com os plasmons de superfície.



Figura 13. Aspecto visual da solução coloidal de nanopartículas de prata.

2.4.2 Caracterização

Na síntese foram produzidas nanopartículas de prata AgNPs estáveis, provenientes da rota verde, e com forte interação eletrostática. Na Figura 14 podem ser observados que por meio da espectrometria de UV- Vis, o pico obtido pela solução encontra-se em 412 nm, o que evidencia a presença de nanopartículas na amostra.

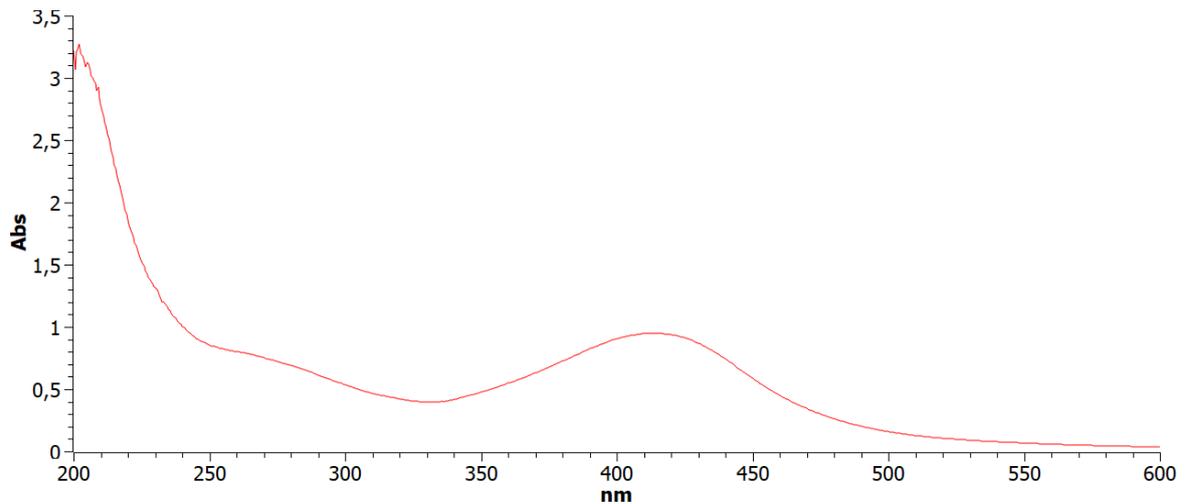


Figura 14. Espectro de UV-Vis da solução coloidal de AgNPs diluída em água pura na proporção de em 1:1 ($v v^{-1}$)

Na Figura 15 pode-se observar a distribuição do tamanho das nanopartículas obtida pelo ensaio de DLS, onde 90% das partículas apresentam um diâmetro médio de 41,81 nm e 10% das partículas um diâmetro de 3,08 nm.

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 26,60	Peak 1: 41,81	90,0	16,75
Pdl: 0,354	Peak 2: 3,089	10,0	0,6443
Intercept: 0,879	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

Result quality : Refer to quality report

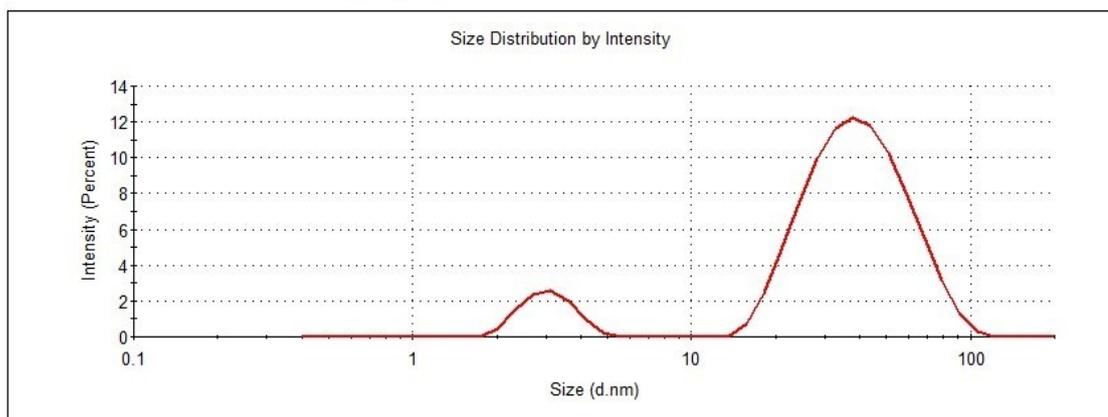


Figura 15. Espectro do DLS da amostra coloidal de AgNPs.

A Figura 16 apresenta a micrografia de MET da solução coloidal de AgNPs, na qual pode ser observado nanopartículas de prata com formato esférico. Esse resultado corrobora a análise de UV-Vis, conforme já foi descrito anteriormente.

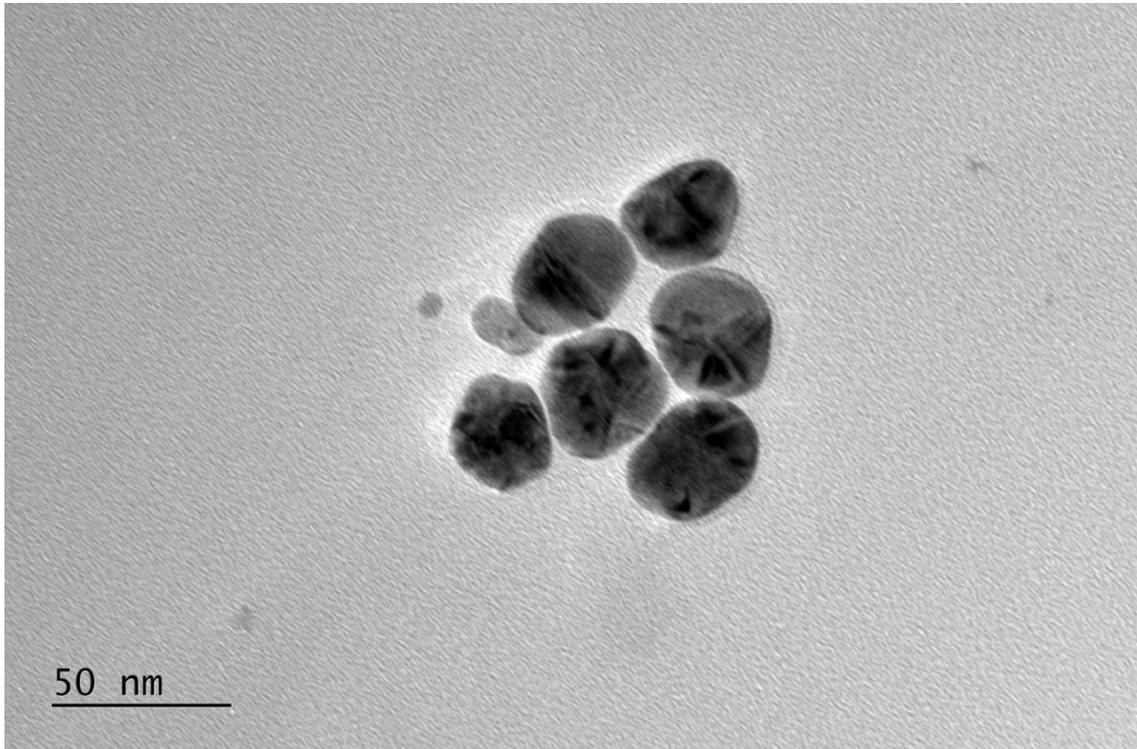


Figura 16. Micrografia de MET da solução coloidal de AgNPs.

A amostra de AgNPs demonstrou um potencial zeta negativo, com pico em -21 mV (Figura 17), isso significa que as partículas tendem a se dispersar e manter uma suspensão uniforme na solução.

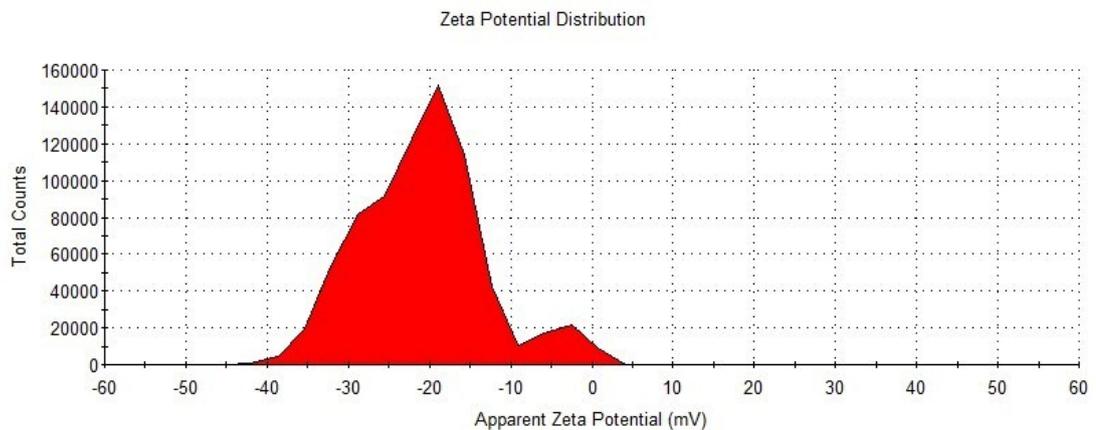


Figura 17. Resultado do potencial Zeta.

A carga negativa nas partículas cria uma repulsão eletrostática entre elas, o que impede a aglomeração e a sedimentação das partículas, tornando-as mais estáveis.

2.4.3 Atividade antibacteriana

As cepas *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* e *Salmonella* sp obtiveram sensibilidade as amostras (Tabela 2 e Figura 18), sendo a *B. Cereus* mais sensível para as AgNPs e AgNPsc e a única que foi sensível ao extrato em sua maior concentração. *Staphylococcus aureus* foi resistente as amostras e sensível apenas a AgNO₃ em concentrações 10,62 µg/mL.

Para *B. cereus* a menor concentração bactericida foi de 3,54 µg/mL para AgNPs e 1,77 µg/mL para AgNPc, não apresentando resultados bacteriostático. As cepas de *Escherichia coli* e *Salmonella* sp apresentaram resultados semelhantes de sensibilidade as nanopartículas. Ambas tiveram ação bactericida em 7,08 µg/mL e bacteriostática de 3,54 µg/mL para AgNPs e 3,54 µg/mL e 1,77 µg/mL, respectivamente.

Tabela 2. Resultado da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) das amostras testadas.

Amostras/Bactérias	<i>Bacillus cereus</i>		<i>Escherichia coli</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Salmonella sp.</i>	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
Extrato aquoso	1,60	1,60	-	-	-	-	-	-
AgNO₃	> 1,32	> 1,32	2,65	5,31	-	10,62	> 1,32	> 1,32
AgNPs	-	3,54	3,54	7,08	-	-	3,54	7,08
AgNPsc	-	1,77	1,77	3,54	-	-	1,77	3,54

Unidade de medida utilizada: µg/mL.

(-) ausência de atividade antibacteriana.

> Maior que.

AgNP: Nanopartículas de Prata

AgNPc: Nanopartículas de Prata centrifugada.

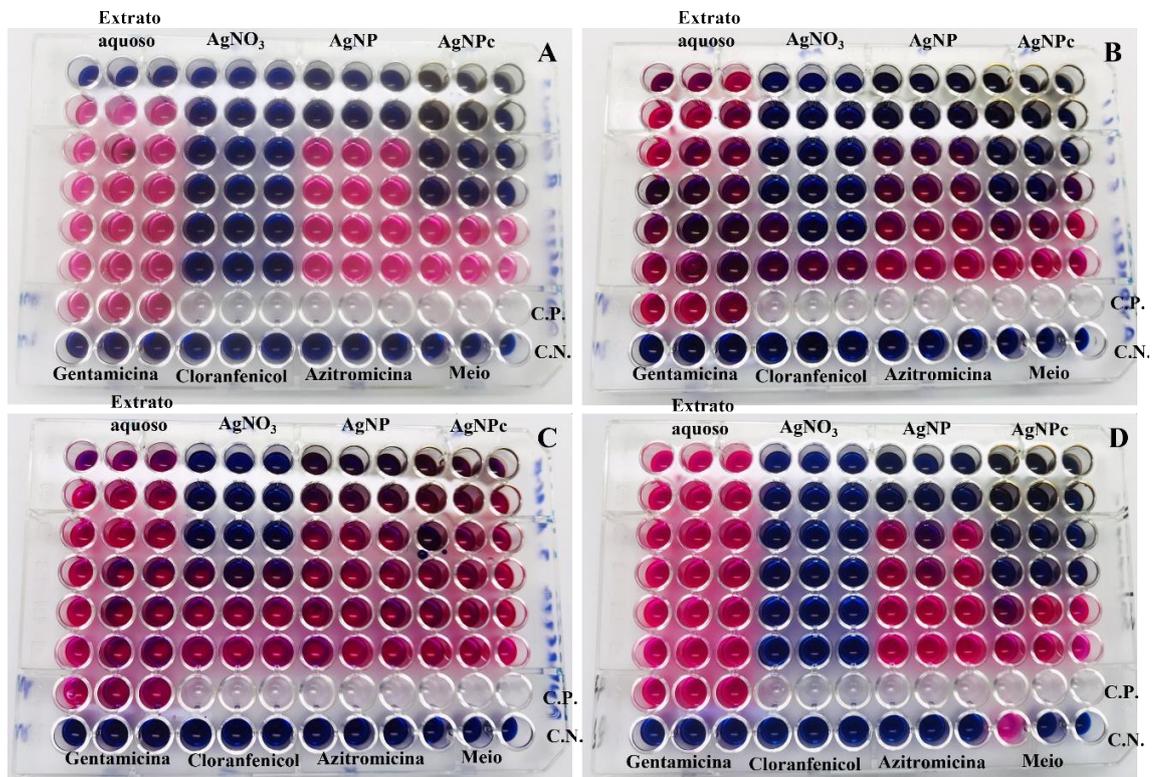


Figura 18. Placas de microdiluição demonstrando a sensibilidade das cepas utilizadas perante as concentrações das amostras. A cor azul indica a inatividade bacteriana e a cor rosa indica a presença de bactérias. **A.** *Bacillus cereus*. **B.** *Escherichia coli*. **C.** *Staphylococcus aureus*. **D.** *Salmonella sp.* Concentrações descritas na metodologia e no padrão da placa na figura 12.

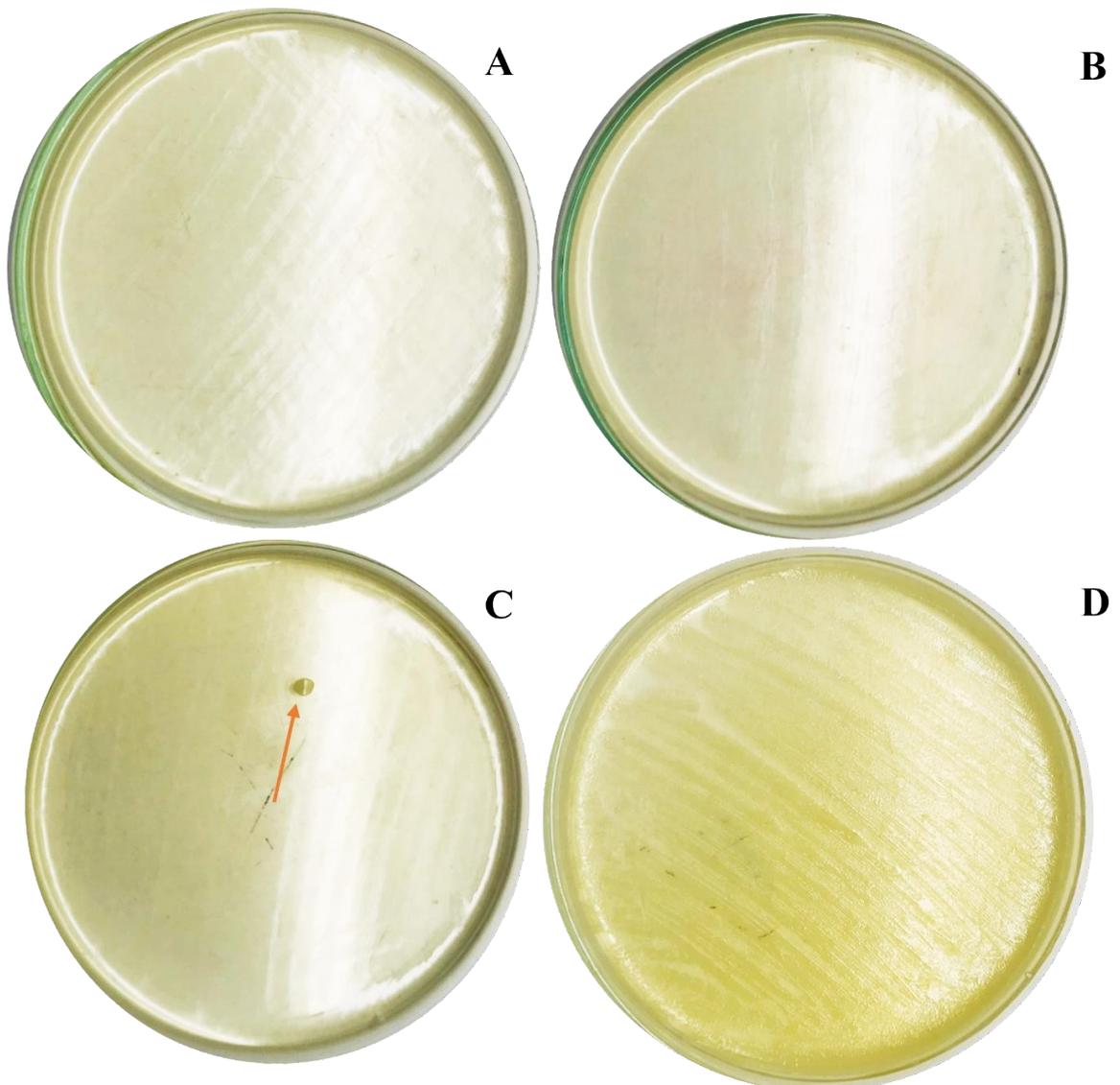


Figura 19. Resultado do crescimento bacteriano em placas de *Petri* para a cepa *Escherichia coli*. **A.** AgNO_3 2,65 $\mu\text{g/mL}$ sem crescimento bacteriano. **B.** AgNP 7,08 $\mu\text{g/mL}$ sem crescimento bacteriano. **C.** AgNP 3,54 $\mu\text{g/mL}$ com crescimento controlado da bactéria. **D.** AgNP 1,77 $\mu\text{g/mL}$ com crescimento descontrolado da cepa. As únicas cepas que obtiveram resultado de concentração bacteriostática mínima foram *E. coli* e *Salmonella* sp. Na figura 19 podemos conferir as placas de *Petri* onde não ocorreu crescimento bacteriano (Figura 19: A e B), ocorreu crescimento controlado (Figura 19: C) e teve crescimento descontrolado (Figura 19: D).

2.4.4 Citotoxicidade

A citotoxicidade foi avaliada por meio da viabilidade celular o teste de MTT realizado leitura em 570 nm no espectrofotômetro. As amostras obtiveram resultados

satisfatórios, pois de acordo com o controle positivo ocorreu preservação das células (Figura 20), diferente do controle negativo que teve uma diminuição das celular viáveis. Entretanto as concentrações 0,44 $\mu\text{g/mL}$ e 0,22 $\mu\text{g/mL}$ tiveram uma diminuição das células viáveis quando comparado com os poços dos meios, mas ainda assim é superior aos poços com DMSO 50 %.

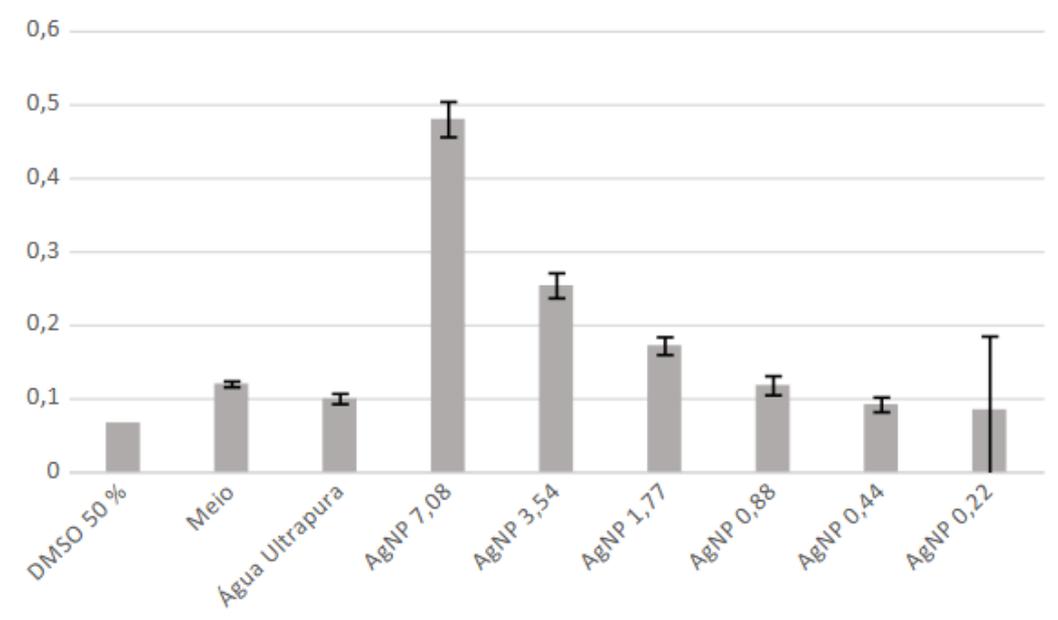


Figura 20. Gráfico com a média da absorbância de 570 nm e a média do desvio padrão para as concentrações das AgNPs sintetizadas a partir do extrato aquoso das folhas de *Spondias tuberosa* Arruda. Controle Negativo: DMSO 50 %, Controle Positivo: Meio.

2.4.5 Análise Estatística

Foi realizado as análises estatísticas de ANOVA One Way e teste de Tukey's para ambas leituras, onde verificou que haver não haver diferença significativa entre os tratamentos aplicados onde evidenciou o valor de $p < 0,35$.

2.5 DISCUSSÃO

A síntese "verde" das AgNPs evita o uso de produtos químicos tóxicos e solventes prejudiciais, reduzindo o impacto ambiental, essa técnica oferece várias vantagens notáveis. As AgNPs obtidas dessa maneira tendem a ser biocompatíveis e menos tóxicas em comparação com as AgNPs produzidas por métodos químicos tradicionais. Isso as torna atraentes para aplicações médicas, como sistemas de liberação de medicamentos e diagnóstico por imagem.

A utilização de nanopartículas de prata como agentes antibacterianos sintetizadas a partir de extratos de folhas de plantas é uma área de pesquisa em crescimento. Singhal *et al.* (2014), forneceram uma visão geral abrangente da síntese de AgNPs usando extratos de plantas como agentes redutores, também trouxe a discussão acerca das propriedades antibacterianas das AgNPs sintetizadas dessa forma. Iravani (2019), revisou o processo de síntese de AgNPs utilizando extratos de plantas como redução, destacando os mecanismos subjacentes, além de abordar as aplicações das AgNPs, incluindo atividade antibacteriana.

Venkateswarlu *et al.* (2018) realizaram a síntese de AgNPs a partir do extrato de folhas da *Spondias tuberosa*, onde é destacado suas propriedades, bem como suas possíveis aplicações em sensores químicos e biológicos. Silva *et al.* (2019) realizaram um estudo sobre a síntese de nanopartículas de prata provenientes do extrato hidroetanólico das folhas de *S. tuberosa* e seu uso como antibacteriano para as cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, onde caracterizou o tamanho das AgNPs por meio do UV-Vis e MET obtendo AgNPs entre 3,44 – 19,46 nm, e evidenciou um potencial antibacteriano das AgNPs contra as cepas do estudo, sobre tudo a bactéria gram-negativa, *P. aeruginosa*.

Neste presente estudo, as AgNPs sintetizadas a partir do extrato de *Spondias tuberosa* demonstraram atividade antibacteriana significativa contra cepas bacterianas testadas nesta pesquisa, incluindo bactérias resistentes a antibióticos. Isso é particularmente importante em um contexto onde a resistência bacteriana é uma preocupação global crescente. O desenvolvimento de mecanismos de resistência aos antibacterianos demonstrados por *Staphylococcus aureus* pode estar relacionado com os procedimentos empregados na sua antibioticoterapia (Santos *et al.*, 2007).

2.6 CONCLUSÃO

A utilização de nanopartículas de prata (AgNPs) sintetizadas a partir do extrato de *Spondias tuberosa* Arruda como potencial agente antibacteriano oferece resultados promissores. Ao longo desta pesquisa, foram realizados experimentos e análises que forneceram insights valiosos sobre as propriedades e o potencial antibacteriano dessas AgNPs. Os resultados dos testes antibacterianos realizados demonstraram de maneira convincente a eficácia das AgNPs sintetizadas a partir do extrato de *Spondias tuberosa* contra as cepas bacterianas. Essas AgNPs mostraram a capacidade de inibir o crescimento bacteriano e, em alguns casos, destruir as bactérias. Esse efeito antibacteriano é altamente promissor, pois sugere que as AgNPs podem ser usadas como agentes terapêuticos ou revestimentos antibacterianos em uma variedade de aplicações biomédicas e industriais. As AgNPs obtiveram sucesso contra cepas bacterianas resistentes a antibióticos convencionais, destacando seu potencial como alternativa aos antibióticos tradicionais. Isso é particularmente relevante em um momento em que a resistência bacteriana é uma ameaça global à saúde. A pesquisa aponta para possíveis aplicações em tratamentos médicos, como curativos antimicrobianos, dispositivos médicos e terapias específicas. Apesar dos resultados promissores, há desafios a serem abordados, como a otimização da formulação das AgNPs, a determinação de sua estabilidade a longo prazo, a compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes à atividade antibacteriana e citotoxicidade das AgNPs produzidas. Sugerindo que estudos adicionais de segurança e toxicidade são essenciais para avaliar o uso clínico e industrial dessas AgNPs.

REFERÊNCIAS

- AMENDOLA, V. et al. Size evaluation of gold nanoparticles by UV-Vis spectroscopy. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 121(25), p. 13118-13128, 2017.
- AN et al. A review on diverse silver nanoparticles and their antimicrobial activity. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 249, p. 100-114, 2018.
- ANTUNES, F. S.; DAL'ACQUA, N.; BERGMANN, C. P.; GIOVANELA, M. Síntese, caracterização e aplicação de nanopartículas de prata como agentes antimicrobianos. **Estudos Tecnológicos em Engenharia**, v. 9, n. 1, p. 20-26, 2013.
- ARAVINTHAN,
SELVAM,
rat splenocyte cytotoxic effects. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 1977-1983, 2015.
- International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 1977-1983, 2015.
- ASGHAR, A. *et al.* Applications and Implications of Nanotechnologies for the Food Sector. **Food Control**, 2012.
- CLSI. **Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts**; Approved Standard – Second Edition. CLSI document M44-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009.
- CLSI. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**; Approved Standard – Ninth Edition. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.
- CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**; Approved Standard - Eighth Edition. NCCLS document M2-A8. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2003.
- COUTO, L. L. *et al.* Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, 2019.
- D'SOUZA, S. *et al.* Silver nanoparticles in dentistry: A review. **Journal of Dental Research**, 97(5), 511-521, 2020.
- DYKMAN, L.; KHLEBTSOV, N. Point defects in double helix induced by Interaction of silver nanoparticles with DNA. **Physics**. arXiv: 1206.4816, 2012.
- GAHLAWAT, G.; CHOUDHURY, A. R. A review on the biosynthesis of metal and metal salt nanoparticles by microbes. **RSC Advances**, v. 9(24), p. 12944-12967, 2019.

- HUANG, L. *et al.* Effect of pH and ionic strength on the aggregation kinetics of Ag nanoparticles in a simulated wastewater. **Science of the Total Environment**, 626, 982-989, 2018.
- IRAVANI, S. Plant-Mediated Green Synthesis of Silver Nanoparticles: Mechanisms and Applications. **Environmental Chemistry Letters**, 2019.
- KAUR, S. *et al.* Genotoxicity of nanoparticles. In Handbook of Genotoxicity Assessment. **Springer**, p. 297-310, 2021.
- KHANNA, V. *et al.* Synthesis of silver nanoparticles from medicinal plants and evaluation of their antimicrobial activities. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 10(3), p. 209-215, 2019. KHANNA, V. *et al.* Transmission electron microscopy (TEM): Imaging and Analysis. **Springer**, 2016.
- LI, X. *et al.* Toxicity of silver nanoparticles to human dermal fibroblasts on microRNA level. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 15(1), p. 168-182, 2019.
- LINS NETO, E. M. F.; PERONI, N.; ALBUQUERQUE, U. P. Traditional knowledge and management of Umbu (*Spondias tuberosa*, Anacardiaceae): an endemic species from the semi-arid region of Northeastern Brazil. **Economic Botany**, v. 64, n. 1, p. 11-21, 2010.
- MACIEL, A. A. M. **Avaliação da atividade sinérgica entre miconazol e nanopartículas de prata produzidas por síntese verde contra cepas de *Candida parapsilosis***. 2016. 62 f. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.
- NAQVI, A. *et al.* Bioinspired nanomaterials: synthesis, characterization, and applications. **Journal of Nanomaterials**, 7294747, 2019.
- PERALTA-VIDEA, J. R.; ZHAO, L.; LOPEZ-MORENO, M. L.; DE LA ROSA, G.; HONG, J.; GARDEA-TORRESDEY, J. L. Nanomaterials and the environment: A review for the biennium 2008–2010. **Journal of Hazardous Materials**, v. 186(1), p. 1–15, 2011. doi:10.1016/j.jhazmat.2010.11.020.
- POON, V. K. *et al.* Nanoparticles in the fight against antibiotic resistance. **Emerging Microbes & Infections**, v. 10(1), p. 1-11, 2021.
- RAI *et al.* Nanoparticles and the immune system. Safety and effects. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 12(9), p. 3016-3026, 2012.
- RAI *et al.* Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. **Biotechnology Advances**, v. 27(1), p. 76-83, 2015.
- RODRIGUES, A. G. *et al.* Green synthesis of silver nanoparticles for encapsulation and

- in situ detection of a drug in plants. **Nanotechnology**, v. 29(28), 285101, 2018.
- SANTOS, A. L.; dos SANTOS, D. O.; FREITAS, C. C.; de FERREIRA, B. L. A.; AFONSO, I. F.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C. *Staphylococcus aureus* visitando uma cepa de importância hospitalar. **Bras Patol Med Lab.** v 43, n 6, p 413-423, 2007.
- SEO, Y. *et al.* Mechanistic Investigation on the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles against Carbapenem-Resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. **ACS Omega**, v. 4(9), p. 13988-13994, 2019.
- SHANKAR, S. *et al.* Biological synthesis of triangular gold nanoprisms. **Nature Materials**, v. 2(6), p. 387-390, 2003.
- SILVA-LUZ, C.L.; PIRANI, J.R.; PELL, S.K.; MITCHELL, J.D. Anacardiaceae in Flora e Funga Botânico Janeiro Disponível
- SILVA, J. *et al.* *Spondias tuberosa* Extract for Silver Nanoparticles Assisted Synthesis Against Multiresistant Bacteria. **American Scientific Publishers.** v. 11, n.11, p. 1041-1048(8), 2019.
- SINGH, P. *et al.* Green synthesis of silver nanoparticles: A review. **Green Chemistry Letters and Reviews**, v. 13(1), p. 22-45, 2020.
- SINGHAL, G.; BHAVESH, R.; KASARIYA, K.; SHARMA, A. R.; SINGH, R. P. Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Plant Extracts as Reducing Agents: A Review. **Bioinorganic Chemistry and Applications**, 2014.
- SINT *et al.* Green synthesis of silver nanoparticles using plant extracts. **Biotechnology Reports**, v. 1, p. 24-27, 2013.
- SOUZA, G. D. S.; RODRIGUES, M. A.; SILVA, P. P.; GUERRA, W. Prata: breve histórico, propriedades e aplicações. **Educación Química**, v. 24, n. 1, p. 14-16, 2013.
- TAMBOLI, D. P.; LEE, D. S.; KHANNA, P. K.; LEE, Y. S. Perspectives on biogenic, green, and eco-friendly synthesis of silver nanoparticles. **BioMed Research International**, p. 1-17, 2014.
- VENKATESWARLU, S.; KUMAR, B. N. P.; PRASAD, T. N. V. K. V.; RANGACHARYULU, P. V. *Spondias tuberosa* leaf extract-mediated synthesis of silver nanoparticles and their application in chemical and biological sensing. **Journal of Taibah University for Science**, v. 12(6), p. 512-521, 2018.
- WILLEMS, V. D. W. Roadmap report on nanoparticles. **W&W Espana sl**, Barcelona, Spain, v. 157, p. 1-57, 2005.

WILLIAMS, D. The relationship between biomaterials and nanotechnology. **Biomaterials**, v. 29, p. 1737-1738, 2008.

YARI, A. *et al.* Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Plant Extracts: A Review. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 9(8), p. 2768-2787, 2021.

ZHANG *et al.* A review on the recent developments of silver nanoparticles synthesis and antibacterial mechanism. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 22(5), p. 1-20, 2020.

CONSIDERAÇÕES GERAIS

As descobertas apoiam a viabilidade do extrato etanólico e das nanopartículas de prata sintetizadas a partir das folhas de *Spondias tuberosa*, como agentes antibacterianos promissores. Este estudo destaca a importância de continuar a pesquisa nesse campo, identificando oportunidades para desenvolver tratamentos mais eficazes e alternativas aos antibióticos tradicionais. À medida que enfrentamos desafios crescentes relacionados à resistência antimicrobiana e à necessidade de abordagens mais sustentáveis, o potencial do extrato etanólico e das nanopartículas oferece uma esperança valiosa para o futuro da saúde e da segurança pública.