

BIOSSÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA UTILIZANDO EXTRATO DAS RAÍZES DE *Gomphrena vaga* (*G. vaga*) E ESTUDO DO SEU POTENCIAL ANTIMICROBIANO

Palavras-Chave: Nanopartículas de prata (AgNP), Plantas medicinais, Potencial antimicrobiano

Autores/as:

UEDSON NEVES, IQ, UNICAMP

THYERRE COSTA, IQ, UNICAMP

SYMONE CASTRO, IQ, UNICAMP

Prof.^(a) Dr.^(a) LJUBICA TASIC (orientadora) IQ, UNICAMP

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a nanotecnologia tem emergido como uma área de destaque na comunidade científica, devido à possibilidade de desenvolvimento de materiais inovadores, com características e propriedades únicas. Essas propriedades incluem atributos ópticos, eletrônicos, mecânicos, catalíticos e biológicos, que resultam da morfologia e das dimensões reduzidas dos nanomateriais, quando comparado aos materiais convencionais. Isso possibilita inúmeras aplicações tecnológicas e medicinais em diversas áreas do conhecimento, incluindo a área de alimentos, agricultura, cosméticos, entrega controlada de fármacos, desenvolvimento de sensores avançados, dentre outras aplicações.^[1,2]

Nesse cenário, as nanopartículas de prata (AgNP) se constituem como um dos principais nanomateriais utilizados devido a suas propriedades biológicas, antimicrobianas e antivirais, sendo incorporadas em diversos produtos visando alcançar tais finalidades. As AgNP podem ser sintetizadas utilizando diferentes métodos, tais como: (1) físicos, empregando técnicas como evaporação-condensação, sputtering e ablação a laser; (2) químicos, com a utilização de agentes redutores como borohidreto de sódio, e agentes estabilizantes diversos, ou (3) biogênicos. Todavia, os dois primeiros métodos possuem limitações, como: métodos trabalhosos, com elevado custo associado e a utilização ou produção de materiais tóxicos ao meio ambiente.^[1-3]

Por outro lado, os métodos biogênicos são ecológicos, uma vez que utiliza materiais e extratos obtidos de fontes naturais, tais como plantas e microrganismos, cujas principais biomoléculas e metabólitos secundários atuam como agentes redutores

e estabilizantes das nanopartículas. Este método é sustentável, devido à redução do uso de substâncias tóxicas, à fácil obtenção dos materiais, ao baixo custo e à elevada compatibilidade com organismos vivos. Além disso, a utilização de materiais que apresentam compostos bioativos em sua composição, tais como flavonoides, alcaloides e proteínas, potencializa as características funcionais das AgNP e confere propriedades adicionais, como atividade antioxidante, anti-inflamatória, inibição de crescimento de células tumorais, entre outras.^[1-4]

Dessa forma, este projeto propõe um estudo exploratório do extrato das raízes de *Gomphrena vaga* (*G. vaga*), também conhecida como Pustemeira, uma planta com estudos escassos na literatura, mas amplamente utilizada na medicina tradicional como analgésico, anti-inflamatório, para o tratamento de asma e alergias, problemas gastrointestinais, dentre outros.^[4] A Pustemeira (*G. vaga*) é uma espécie endêmica do Brasil, com ampla distribuição nos biomas da Caatinga, Cerrado e Campos Rupestres. O objetivo do projeto envolve a utilização deste extrato para a biossíntese e caracterização de nanopartículas de prata e avaliação do seu potencial antimicrobiano, a investigação da influência das AgNP obtidas no metabolismo microbiano e sua posterior incorporação em um hidrogel com propriedades hidratantes, cicatrizantes e antimicrobianas.

METODOLOGIA

- Obtenção do material vegetal

As raízes da planta foram coletadas em uma área rural do município de Malhada-BA, local que possui as coordenadas geográficas S14°37' 14,4"; W043°39'32,5", no ano de 2018.^[4]

- **Obtenção e caracterização dos extratos**

As amostras secas foram trituradas, e 5 g do material foram adicionadas a 50 mL de água. A mistura foi submetida a banho ultrassônico de 100 W por 1 h, repousando à temperatura ambiente por 72 h sob proteção da luz, com banho ultrassônico diário. Após três dias, a mistura foi filtrada e o extrato (GVE1) foi armazenado. Para outro extrato, o mesmo procedimento foi repetido com metanol. Após 24 h, a mistura foi filtrada, e o resíduo sólido foi extraído novamente com metanol fresco por dois dias. Os filtrados foram combinados e concentrados para obter o extrato bruto (GVE2), posteriormente dissolvido em NaOH 5 mmol.L⁻¹ para obter uma solução de 1600 µg.mL⁻¹, a ser utilizada na síntese das AgNP.

Os extratos foram caracterizados por espectroscopia UV-Vis, além da determinação de fenóis e flavonoides totais pelos métodos de Folin-Ciocalteu e complexação com AlCl₃, respectivamente. A atividade antioxidante foi avaliada pelo método do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH•), utilizando curvas analíticas de padrões conhecidos e soluções metanólicas dos extratos. Os extratos também foram analisados por LC-MS para investigar sua composição.

- **Biossíntese das AgNP**

Uma vez determinado o melhor procedimento para a obtenção dos extratos, foi realizada a otimização das condições de síntese das nanopartículas utilizando o extrato (AgNP@GVE). Diferentes volumes de extrato (5-50% do volume total) foram utilizados e volumes proporcionais de uma solução de nitrato de prata (AgNO₃) a 1 mmol L⁻¹ foram adicionados. A mistura foi mantida sob agitação branda por 25 min à temperatura ambiente, observando-se a mudança na coloração do sistema. A influência da temperatura na síntese das AgNP foi verificada repetindo os experimentos a 80 °C. Todas as AgNP tiveram seu pH ajustado para a faixa de 7,0-7,4.

As AgNP@GVE obtidas foram caracterizadas por espectroscopia UV-Vis a 450 nm e por espalhamento dinâmico de luz (DLS) no Zeta Size Nano (Malvern Instruments) para verificar o tamanho e estabilidade, a fim de determinar as melhores condições de síntese.

- **Caracterização e quantificação da AgNP@GVE**

Além da espectroscopia UV-Vis e DLS, as nanopartículas obtidas foram caracterizadas por microscopia eletrônica de transmissão de varredura (STEM) e microscopia de força atômica (AFM). As AgNP foram quantificadas indiretamente através dos íons prata (Ag⁺) livres na dispersão, utilizando um método colorimétrico baseado no uso de soluções padrão de Ag⁺ (1 a 15 ppm),

3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB) e tampão acetato (NaAc/AcH) pH 4, conforme descrito por Gonzalez e colaboradores.^[5]

- **Atividade antimicrobiana das AgNP@GVE**

As bactérias utilizadas foram obtidas da Coleção de Culturas Tropicais da Fundação André Tosello (Campinas, SP) para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM), seguindo procedimentos relatados na literatura.^[3] A CIM foi determinada em placas de 96 poços, com controles positivo e negativo e diluições de AgNP em meio Mueller Hinton (MH) estéril. As placas foram incubadas a 35 °C por 24 h e a leitura foi feita visualmente e por leitor de placas a 600 nm. O procedimento foi repetido para o extrato GVE2. Para determinar a CBM, pequenas alíquotas dos poços com concentrações correspondentes à CIM, CIM-2 e CIM+2 foram inoculadas em ágar MH sólido. Após incubação (35 °C, 24 h), o crescimento bacteriano foi avaliado visualmente para identificar a CBM onde não houve crescimento.

- **Formulação inicial de hidrogéis de carboximetilcelulose**

As formulações de hidrogéis de carboximetilcelulose (CMC) foram desenvolvidas a partir da adaptação do estudo realizado por Monteiro e colaboradores, que sugerem concentrações 2% e 3,5% de CMC como ideais para hidrogéis com boas propriedades de viscosidade e espalhabilidade.^[6] Três formulações foram preparadas: (1) contendo 2% (m/m) de CMC, 0,1% (m/m) de fenoxietanol e etilhexilglicerina (PEHG), 10% (m/m) de glicerina e água destilada suficiente para completar 50 g; (2) 2,75% (m/m) de CMC, 0,1% (m/m) de PEHG, 12,5% (m/m) de glicerina e água destilada até 50 g e (3) 3,5% (m/m) de CMC, 0,1% (m/m) de PEHG, 15% (m/m) de glicerina e água até 50 g. Essas formulações visavam fornecer informações iniciais para a posterior incorporação das AgNP@GVE no hidrogel e sua subsequente caracterização.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

- **Obtenção e caracterização dos extratos**

Os extratos GVE1 e GVE2 obtidos apresentam características distintas: GVE1 resultou em uma solução amarelo-alaranjado, levemente turva e com pH 6,10, enquanto GVE2 apresentou-se como uma solução límpida, levemente amarelada e com pH 8,60. Os espectros UV-Vis comparativos dos extratos (**Figura 1**) apresentam picos de absorção nas mesmas regiões, sugerindo composição semelhante das amostras, apesar dos diferentes métodos de obtenção. O espectro bem definido de GVE2, aliado ao seu aspecto límpido, indica menor quantidade de impurezas ou interferentes, como compostos suspensos

ou com baixa solubilidade. Esses resultados, juntamente com os dados iniciais da síntese das AgNP, levaram à escolha do extrato GVE2 para as análises posteriores.

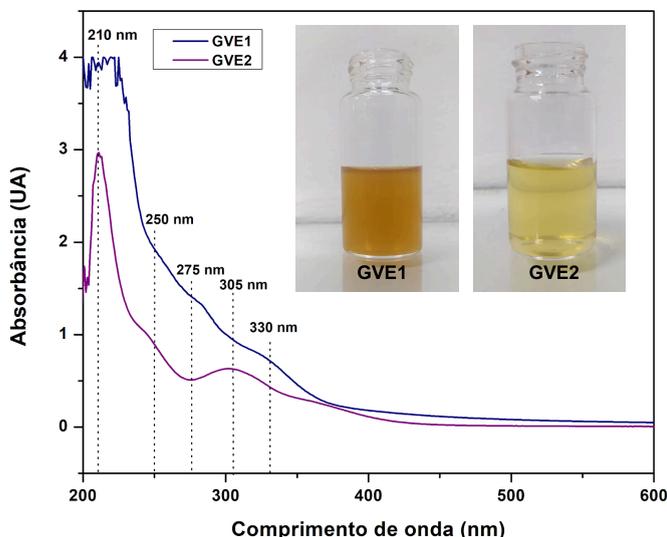


Figura 1. Espectros de UV-Vis dos extratos obtidos.

- Determinação do teor de fenóis e flavonoides totais e da atividade antioxidante in vitro do extrato

Para a determinação do teor de fenóis totais (FT), flavonoides totais (FlavT) e atividade antioxidante (AA), foram construídas curvas analíticas utilizando padrões de ácido gálico (AG); quercetina (Q) e rutina (R); e DPPH, respectivamente. Os resultados foram expressos em termos de miligramas de equivalentes dos padrões por gramas de extrato, conforme detalhado na Tabela 1. A Figura 2, apresenta os resultados obtidos para a atividade antioxidante. Os resultados obtidos são consistentes com os dados da literatura, indicando a presença de agentes redutores na amostra.^[4, 7] Isso é corroborado pelos valores crescentes de %AA, conforme a concentração do extrato aumentava. Contudo, a Figura 2 indica que embora GVE2 contenha compostos antioxidantes, sua concentração é baixa em comparação com os padrões utilizados.

Tabela 1. Dados das curvas analíticas e resultados de caracterização do extrato GVE2.

Análise/ Curva	Equação (y = ax + b)	R ²	Resultado
FT: AG	a = 0,00463 b = 0,00739	0,9998	329,24 ± 4,26 (mg EAG/ g extrato)
FlavT: quercetina	a = 0,00157 b = 0,05731	0,9983	373,56 ± 16,41 (mg EQ/ g extrato)
FlavT: rutina	a = 0,00104 b = 0,07614	0,9527	491,51 ± 24,78 (mg ER/ g extrato)
AA	a = 0,02079 b = 0,02244	0,9961	-----

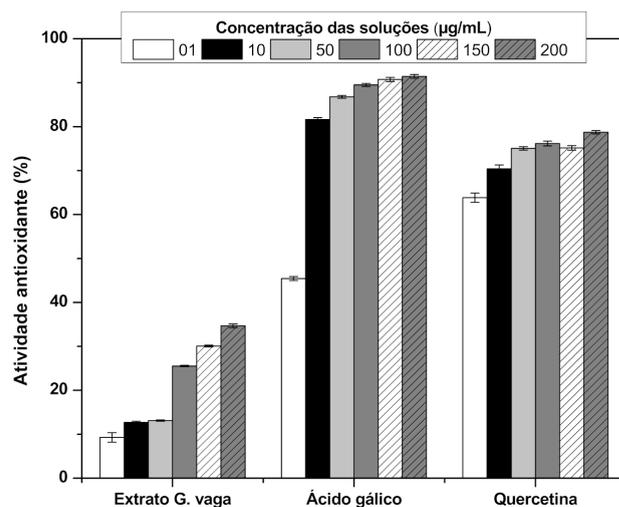


Figura 2. Atividade antioxidante do extrato pelo método de DPPH frente a padrões de ácido gálico e quercetina.

- Otimização da síntese das AgNP

Durante a otimização da síntese das AgNP@GVE, variando as concentrações dos extratos (5%-50% de GVE1 e GVE2) e a temperatura (25 °C e 80 °C), observou-se a mudança de coloração em todos os sistemas, com picos de absorção UV-Vis na faixa de 420-450 nm, característicos de nanopartículas de prata, atribuídos ao fenômeno de ressonância de plasmon de superfície (SPR).^[3] As análises por UV-Vis e DLS revelaram que as sínteses realizadas com GVE2 resultaram em nanopartículas com melhores características de absorvância, tamanho e estabilidade. Além disso, a 80 °C, foram obtidos melhores resultados em comparação com as sínteses realizadas a 25 °C, indicando que o aumento da temperatura favorece a biossíntese das AgNP@GVE.

Entre todas as concentrações de extrato utilizadas nas sínteses (Tabela 2), verifica-se que a concentração de 10% (v/v) mostrou a melhor combinação entre a absorvância a 450 nm, diâmetro médio, índice de polidispersividade (PDI) e potencial zeta (ζ). Esses resultados sugerem a obtenção de AgNP com dimensões reduzidas, o que, conforme a literatura, facilita a liberação de íons prata e potencializa a atividade biológica; além de serem eletrostaticamente estáveis e com distribuição de tamanho consideravelmente homogênea na dispersão.^[1-3] Portanto, a AgNP@GVE2 a 10% (v/v) foi a escolhida para as análises subsequentes.

- Caracterização das AgNP@GVE2 10%

As análises UV-Vis permitiram monitorar o aumento da intensidade do pico SPR ao longo do tempo após a síntese (Figura 3), indicando o aumento da concentração das AgNP no meio.

Tabela 2. Resultados obtidos com análise UV-Vis e DLS para as AgNP@GVE2 obtidas com diferentes concentrações do extrato a 80 °C

[GVE2] %(v/v)	AgNP@GVE2					
	5%	10%	20%	30%	40%	50%
Abs* (450 nm)	0,6751	0,5574	0,4996	0,4852	0,3926	0,2761
DM*(nm)	45,8 ± 14,9	33,3 ± 9,6	30,8 ± 9,7	27,1 ± 9,2	31,6 ± 10	31,6 ± 9,2
PdI	0,164	0,170	0,193	0,256	0,413	0,327
ζ (mV)	-36,6 ± 11,9	-35,9 ± 6,20	-35,5 ± 5,18	-42,9 ± 9,18	-41,2 ± 7,20	-45,1 ± 7,23

*Abs: absorvância; DM: diâmetro médio;. Resultados expressos em: valores ± desvio padrão da média.

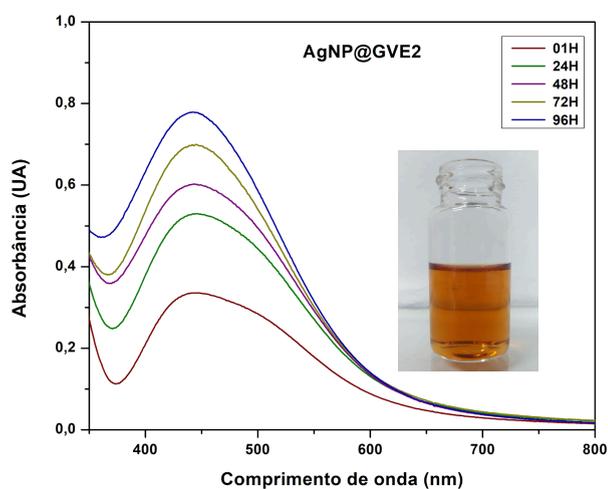


Figura 3. Acompanhamento da formação das AgNP@GVE2 em função do tempo por espectroscopia UV-Vis.

Os resultados das análises por STEM e AFM (**Figura 4**), mostraram que as AgNP obtidas, embora se apresentem como aglomerados com diferentes tamanhos e morfologias (**Figura 4-A**) em algumas regiões da amostra analisada, possuem majoritariamente a morfologia esférica, o que corresponde ao esperado para AgNP biogênicas obtidas em condições similares. Além disso, a construção do histograma com a curva de distribuição de tamanhos das AgNP@GVE2 (**Figura 5**) revelou um diâmetro médio de $4,26 \pm 0,08$ nm. Esse valor é

consideravelmente menor quando comparado ao diâmetro médio determinado por DLS. Isso ocorre porque o DLS mede o tamanho hidrodinâmico das partículas em suspensão, considerando a camada de solvatação e moléculas aderidas à superfície das nanopartículas.^[3] Em contraste, a análise por STEM mede o tamanho das partículas secas, sem influência do solvente ou outros interferentes, o que confere à técnica maior precisão na determinação do tamanho real das nanopartículas.^[3]

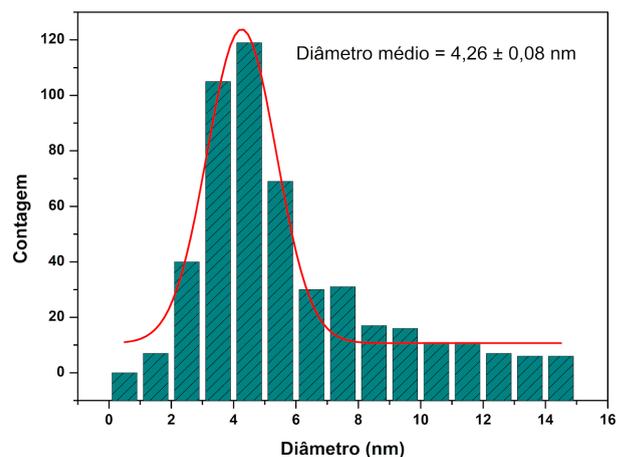


Figura 5. Histograma e curva de distribuição de tamanho das partículas, obtidas a partir da análise por STEM.

A quantificação das AgNP pelo método do reagente TMB, indicou uma concentração de $0,6110 \pm 0,0111$ mmol.L⁻¹ na primeira semana de síntese. Isso corresponde a um rendimento de cerca de $68 \pm 1\%$, considerado satisfatório. Esse rendimento inicial pode aumentar com o tempo devido à cinética lenta de redução da prata, onde a formação de AgNP continua progressivamente após a síntese inicial, conforme mencionado anteriormente.

Além dos testes realizados, as AgNP foram monitoradas ao longo de 5 meses, com análises mensais. Foi possível verificar poucas mudanças em seus principais parâmetros durante esse período para as amostras armazenadas sob proteção da luz, na geladeira (8 °C) e à temperatura ambiente.

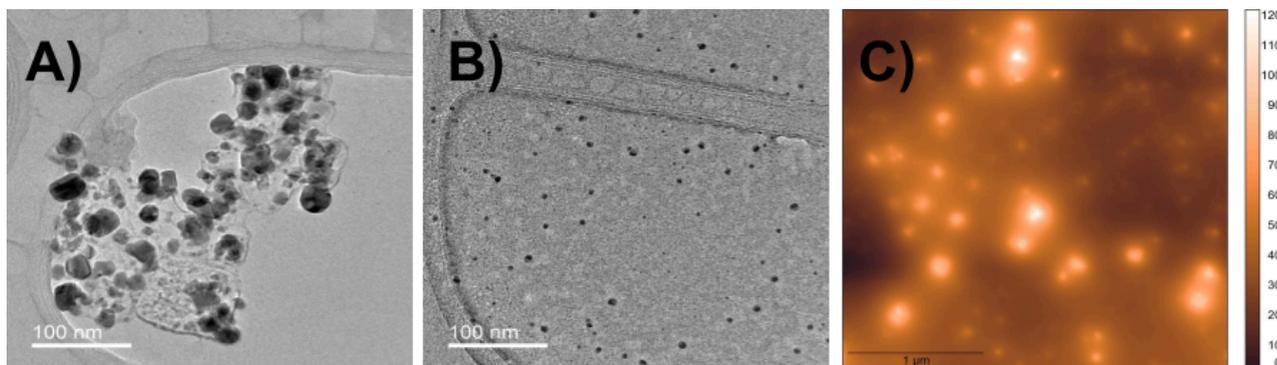


Figura 4. Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão de varredura (A-B) e microscopia de força atômica (C) para as AgNP@GVE2 10% sintetizadas.

- Ensaio de atividade antimicrobiana

Os ensaios de atividade antimicrobiana revelaram que tanto o extrato GVE2 quanto as nanopartículas possuem capacidade bacteriostática. No entanto, o extrato GVE2 demonstrou eficácia reduzida em comparação com as nanopartículas, com CIM e CBM não determinadas nas concentrações do extrato utilizadas no experimento. Em contraste, as AgNP@GVE2 exibiram considerável capacidade bacteriostática e bactericida contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, conforme mostrado na **Figura 6** e na **Tabela 3**. Esses resultados são satisfatórios e estão alinhados com dados relatados para outras nanopartículas de prata biogênicas na literatura.^[3]

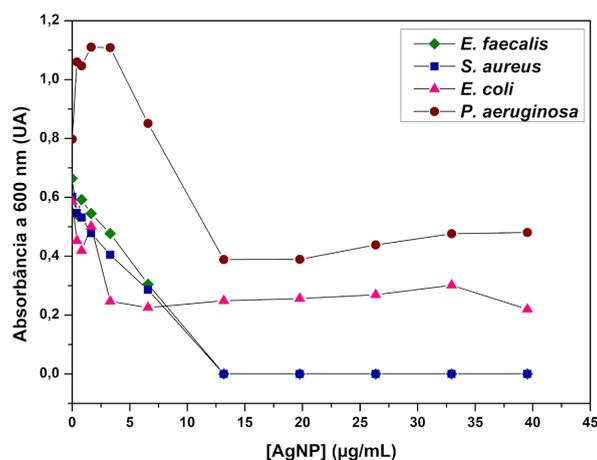


Figura 6. Curva de inibição do crescimento bacteriano em função da concentração de AgNP@GVE2.

Tabela 3. Resultados de CIM e CBM para os microrganismos testados

Microrganismos testados	CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CBM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (CCT1476) (Gram negativa)	13,18	13,18
<i>Escherichia coli</i> (CCT1457) (Gram negativa)	13,18	19,77
<i>Staphylococcus aureus</i> (CCT1485) (Gram positiva)	13,18	13,18
<i>Enterococcus faecalis</i> (CCT1494) (Gram positiva)	13,18	19,77

- Formulação do hidrogel

Entre as três formulações de hidrogel, aquela com 2,0% de CMC e 10% de glicerina apresentou menor viscosidade em comparação às outras (**Figura 7**), o que está conforme o esperado segundo os dados de Gonzalez.^[5] No entanto, a formulação com 2,75% de CMC e 12,5% de glicerina mostrou-se promissora para a incorporação das AgNP devido à sua

viscosidade e espalhabilidade intermediárias, sendo escolhida para os testes iniciais.

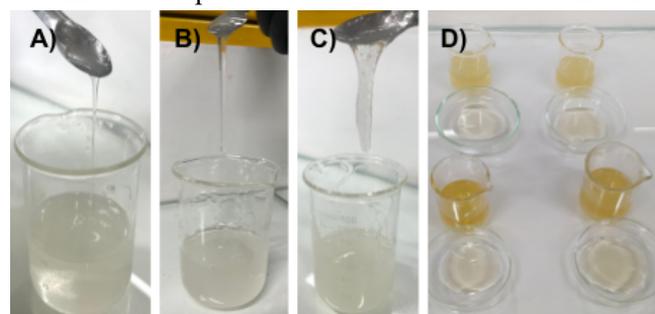


Figura 7. Hidrogéis obtidos com (A) 2,0% de CMC e 10% de glicerina e (B) 2,75% de CMC e 12,5% de glicerina. (C) 3,5% de CMC e 15% de glicerina; D) Hidrogéis iniciais obtidos com a incorporação das AgNP.

CONCLUSÕES

Embora o projeto ainda não tenha sido concluído, os principais objetivos foram alcançados: obtenção e caracterização do extrato, bem como a síntese inédita de nanopartículas esféricas com o extrato da *G. vaga*, com atividade antimicrobiana e estáveis por mais de cinco meses. As etapas futuras do projeto envolvem a conclusão da investigação da composição do extrato por LC-MS, a avaliação da influência das AgNP@GVE2 no metabolismo microbiano por ressonância magnética nuclear e o estudo da incorporação das nanopartículas no hidrogel, seguida da caracterização do material obtido.

BIBLIOGRAFIA

- [1] - NGUYEN, N. T. T. et al. Formation, antimicrobial activity, and biomedical performance of plant-based nanoparticles: a review. **Environmental Chemistry Letters**, 25 mar. 2022.
- [2] - BHAKYA, S. et al. Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their antioxidant and antibacterial activity. **Applied Nanoscience**, v. 6, n. 5, p. 755–766, 4 jul. 2015.
- [3] - BARROS, C. Henrique Nasi de. **Síntese e caracterização de nanopartículas de prata: estudo de interações com biomoléculas e atividade antimicrobiana**. Dissertação (Mestrado em Química). Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, p.135, 2017.
- [4] - CASTRO, S. C. de. **Avaliação do perfil químico e atividades biológicas in vitro de Gomphrena vaga mart. (amaranthaceae)**. Dissertação (Mestrado em Química). Centro de Ciências Exatas e das Tecnologias, Universidade Federal do Oeste da Bahia, Barreiras, 2019.
- [5] - GONZÁLEZ-FUENZALIDA, R.A. et al. In Situ Colorimetric Quantification of Silver Cations in the Presence of Silver Nanoparticles. **Analytical Chemistry**, v. 85, n. 21, p. 10013–10016, 21 out. 2013.
- [6] - MONTEIRO, M. S. et al. Desenvolvimento e avaliação de hidrogéis de carboximetilcelulose para o tratamento de feridas. **Infarma - Ciências Farmacêuticas**, v. 32, n. 1, p. 41–55, 6 abr. 2020.
- [7] - SOUSA, C. M. DE M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, p. 351–355, 1 abr. 2007.