



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DA BAHIA – UNEB
PROGRAMA PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS – PPGFARMA**

MILENE DIAS FERREIRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE
NANOPARTÍCULAS DE PRATA BIOSSINTETIZADAS A PARTIR DA
Schinus terebinthifolius Raddi**

**SALVADOR
2021**

MILENE DIAS FERREIRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE
NANOPARTÍCULAS DE PRATA BIOSINTETIZADAS A PARTIR DA
Schinus terebinthifolius Raddi**

Dissertação apresentada ao Programa Pós-Graduação *Stricto Sensu* Em Ciências Farmacêuticas (PPGFARMA), da Universidade do Estado da Bahia (UNEB) como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Walter Nei Lopes dos Santos

Linha de Pesquisa: 2 – Avaliação de Fármacos, Biomarcadores, Produtos Naturais e Sintéticos.

**SALVADOR
2021**

Universidade do Estado da Bahia

Sistema de Biblioteca

Ficha Catalográfica - Produzida pela

Biblioteca Edivaldo Machado

Boaventura

Ferreira, Milene Dias.

Avaliação da atividade antimicrobiana de nanopartículas de prata biossintetizadas a partir da *Schinus terebinthifolius* Raddi / Milene Dias Ferreira.-- Salvador, 2021.

95p.: il.

Orientador: Prof. Dr. Walter Nei Lopes dos Santos

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado da Bahia.
Departamento de Ciências da Vida. Campus I. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas - PPGFARMA, 2021

1. Atividade antimicrobiana. 2. Nanopartículas de prata. 3. *Schinus terebinthifolius* Raddi. 4. Síntese verde. I. Santos, Prof. Dr. Walter Nei Lopes Campus I.

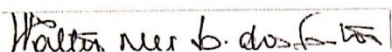
CDD: 615

FOLHA DE APROVAÇÃO

"AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA
BIOSSINTETIZADAS A PARTIR DA SCHINUS TEREBINTHIFOLIUS RADDI"

MILENE DIAS FERREIRA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas – PPGFARMA, em 12 de fevereiro de 2021, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestra em Ciências Farmacêuticas pela Universidade do Estado da Bahia, conforme avaliação da Banca Examinadora:



Professor(a) Dr.(a) WALTER NEI LOPES DOS SANTOS
Universidade do Estado da Bahia - UNEB
Doutorado em Química
Universidade Federal da Bahia - UFBA



Professor(a) Dr.(a) ANDRÉ LACERDA BRAGA TELES
Universidade do Estado da Bahia - UNEB
Doutorado em Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
Universidade Estadual de Feira de Santana - UEFS



Professor(a) Dr.(a) LOURDES CARDOSO DE SOUZA NETA
Universidade do Estado da Bahia - UNEB
Doutorado em Química
Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

A minha família pelo incentivo e apoio
em toda minha trajetória acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que me permitiu chegar até aqui, dando-me forças para concluir a etapa acadêmica mais importante da minha vida.

A minha família pelo apoio e incentivo durante toda trajetória acadêmica.

Ao meu amor, Edson Neto, por todo carinho e cuidado.

Ao GPDQA pela amizade, apoio, paciência, risos e todo auxílio durante o mestrado, e ao meu orientador, professor Walter Nei.

A todos que auxiliaram na caracterização das nanopartículas: Vilberto, Antônia, Geovani, Lucas Malone, João Daniel, Maurício e João Perini.

A minha turma 1 do PPGFARMA pelo companheirismo e cumplicidade.

Ao PPGFARMA, especialmente, o professor Aníbal e secretária Léia pela atenção e prestatividade durante todo o mestrado.

A professora Lourdes Neta pela atenção e disponibilidade na realização da atividade antimicrobiana.

A professora Débora pela atenção e disponibilidade na realização do ensaio sobre composição química.

A professora Mabel Proence que deu o pontapé inicial para minha entrada no mestrado.

A Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), Câmpus Araraquara, pela realização da MEV.

A Universidade Federal da Bahia (UFBA) pela realização do DRX e identificação botânica.

A CAPES pela bolsa de mestrado concedida.

“Seja forte e corajoso.
Não se apavore nem desanime, pois o Senhor,
o seu Deus, estará com você por onde você andar”.
Josué 1:9

RESUMO

FERREIRA, D. M. **Avaliação da atividade antimicrobiana de nanopartículas de prata biossintetizadas a partir da *Schinus terebinthifolius* Raddi** (dissertação). Departamento de Ciências da Vida, Universidade do Estado da Bahia, 2021; 94p.

Introdução: A resistência microbiana e a carência de novos antimicrobianos são problemáticas de saúde pública que reduzem as alternativas de tratamento de doenças infecciosas. Nesse contexto, as nanopartículas de prata (AgNPs) apresentam-se como uma nova perspectiva antimicrobiana. As AgNPs produzidas através da síntese verde empregando extrato vegetal derivados de plantas medicinais, como a *S. terebinthifolius*, podem apresentar maior potencial biológico e menor toxicidade em virtude do revestimento superficial por compostos orgânicos oriundos do vegetal. **Objetivos:** Avaliar a atividade antimicrobiana das nanopartículas de prata sintetizadas a partir do extrato aquoso das folhas da *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Materiais e Métodos:** O planejamento fatorial completo 2^3 foi realizado para triagem das variáveis significantes, posteriormente o desenho Box Behnken foi empregado para definir as condições ótimas para síntese verde das AgNPs. A caracterização através das técnicas de DRX, MEV e FTIR. A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada através da metodologia de microdiluição em caldo de acordo CLSI com modificações e concentração microbicida mínima (CMM). **Resultados:** Os três fatores estudados no planejamento foram significativos para síntese das nanopartículas, a partir disso foi realizado o Box Behnken para obtenção das condições ótimas para síntese. Os ensaios antimicrobianos demonstraram maior efetividade das AgNPs em comparação ao extrato aquoso das folhas da *S. terebinthifolius* contra todos os microrganismos testados, como também ação bactericida contra *P. aeruginosa*. **Considerações Finais:** O extrato aquoso das folhas da aroeira foi eficaz na síntese das AgNPs. A atividade antimicrobiana evidenciou que as AgNPs apresentaram ação contra todos microrganismos testados com CIM menor em comparação com o extrato aquoso das folhas da aroeira.

Palavras-chave: Atividade antimicrobiana; Nanopartículas de prata; *Schinus terebinthifolius* Raddi; Síntese verde.

ABSTRACT

FERREIRA, D. M. **Evaluation of the antimicrobial activity of silver nanoparticles biosynthesized from *Schinus terebinthifolius* Raddi** (dissertation). Department of Life Sciences, State University of Bahia, 2021; 94p.

Introduction: Microbial resistance and the lack of new antimicrobials are public health problems that reduce the alternatives for treating infectious diseases. In this context, silver nanoparticles (AgNPs) present themselves as a new antimicrobial perspective. AgNPs produced through green synthesis using plant extracts derived from medicinal plants, such as *S. terebinthifolius*, may have greater biological potential and less toxicity due to the surface coating by organic compounds from the plant. **Objectives:** To evaluate the antimicrobial activity of silver nanoparticles synthesized from the aqueous extract of the leaves of *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Materials and Methods:** The complete factorial design 2^3 was carried out to screen the significant variables, later the Box Behnken drawing was used to define the optimal conditions for green synthesis of AgNPs. Characterization using XRD, SEM and FTIR techniques. The evaluation of antimicrobial activity was carried out using the microdilution broth methodology according to CLSI with modifications and minimum microbicidal concentration (CMM). **Results:** The three factors studied in the planning were significant for the synthesis of the nanoparticles, from which the Box Behnken was performed to obtain the optimum conditions for synthesis. The antimicrobial tests showed greater effectiveness of AgNPs compared to the aqueous extract of the leaves of *S. terebinthifolius* against all the microorganisms tested, as well as bactericidal action against *P. aeruginosa*. **Final Considerations:** The aqueous extract of the aroeira leaves was effective in the synthesis of AgNPs. The antimicrobial activity showed that the AgNPs showed action against all microorganisms tested with minor MIC compared to the aqueous extract of the leaves of the aroeira.

Keywords: Antimicrobial activity; Green synthesis; *Schinus terebinthifolius*; Raddi; Silver nanoparticles.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AgNPs – Nanopartículas de prata

ATP – Adenosina trifosfato

BBD – Box Behnken

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CMM – Concentração Microbicida Mínima

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DRX - Difração de raios X

EROS – Espécies reativas do oxigênio

FTIR – Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

MET – Microscopia eletrônica de transmissão

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

MFA – Microscopia de força atômica

MTT – Brometo de (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl) - 2,5-diphenyltetrazolio)

NPMs – Nanopartículas metálicas

pH – Potencial hidrogeniônico

UFBA – Universidade Federal da Bahia

UNEB – Universidade do Estado da Bahia

UV – Ultravioleta visível

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

- Figura 1.** Folha e fruto da *Schinus terebinthifolius* Raddi, campus I – UNEB. **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 2.** Árvore da *Schinus terebinthifolius* Raddi, campus I – UNEB. **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 3.** Processo de síntese verde. **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 4.** Áreas de aplicação das nanopartículas de prata. **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 5.** Métodos top-down e bottom-up. **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 6.** Esquema da síntese verde de AgNPs mediada por recursos biológicos. **Erro! Indicador não definido.4**
- Figura 7.** Mecanismos envolvidos na ação microbiana das AgNPs. **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 8.** Imagens de MEV (A e B) e microscopia eletrônica de varredura (C e D) de *E. coli* O157: H7. A e C: células não tratadas (controle); B e D: células tratadas com diferentes concentrações de AgNPs. **Erro! Indicador não definido.8**
- Figura 9.** Representação esquemática do modelo proposto para o mecanismo de ação das AgNPs contra células de *Candida*. **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 10.** Imagens de microscopia de transmissão: (a) controle: células de *C. albicans* não tratadas com AgNPs. (b e c) células tratadas com 250 µg mL⁻¹ e 500 µg mL⁻¹ de AgNPs. **Erro! Indicador não definido.1**
- Figura 11.** Micrografias de MEV. (a) controle: células de *C. albicans* não tratadas com AgNPs. (b) células tratadas com 40 µg mL⁻¹ de AgNPs. **Erro! Indicador não definido.2**
- Figura 12.** Gráfico de Pareto evidenciando as variáveis e interações significativas. **Erro! Indicador não definido.3**
- Figura 13.** Espectroscopia de absorção UV das nanopartículas de prata. **Erro! Indicador não definido.4**
- Figura 14.** BBD: tempo X pH **Erro! Indicador não definido.7**
- Figura 15.** BBD: massa foliar X pH **Erro! Indicador não definido.7**
- Figura 16.** FTIR do extrato aquoso das folhas de aroeira e da AgNP sintetizadas. **Erro! Indicador não definido.8**
- Figura 17.** Difratoograma: estrutura cristalina das AgNPs sintetizadas. 49

Figura 18. Microscopia eletrônica de varredura das AgNPs sintetizadas..... **Erro!**
Indicador não definido.0

LISTA DE TABELAS E QUADROS

- Quadro 1.** Matriz do planejamento fatorial completo 2^3 **Erro!** **Indicador** **não definido.**6
- Quadro 2.** Matriz da superfície de resposta Box Behnken**Erro!** **Indicador** **não definido.**7
- Quadro 3.** Triagem fitoquímica do extrato etanólico das folhas de**Erro!** **Indicador não definido.**1
- Quadro 4.** Resultado do planejamento fatorial completo 2^3 **Erro!** **Indicador** **não definido.**3
- Quadro 5.** Matriz da superfície de resposta Box Behnken com a resposta absorbância**Erro!** **Indicador não definido.**6
- Quadro 6.** Atividade antimicrobiana do extrato aquoso das folhas de *S. terebinthifolius* e AgNPs, expressos em valores de CIM e CMM, ambos em $\mu\text{g mL}^{-1}$ **Erro!** **Indicador não definido.**1

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	143
2. JUSTIFICATIVA.....	165
3. OBJETIVOS.....	17
3.1 Objetivo geral	176
3.2 Objetivos específicos.....	176
4. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	187
4.1 <i>Schinus terebinthifolius Raddi</i>.....	187
4.2 Síntese verde de nanopartículas de prata (AgNPs)	20
4.3 Nanopartículas de prata (AgNPs)	22
4.4 Atividade antibacteriana das nanopartículas de prata.....	26
4.5 Atividade antifúngica das nanopartículas de prata.....	30
5. MATERIAIS E MÉTODOS	34
5.1 Composição fitoquímica.....	34
5.1.1 Alcaloides	353
5.1.2 Glucosídeos Cardiotônicos.....	35
5.1.3 Cumarinas voláteis	35
5.1.4 Triterpenos e/ou esteróides.....	35
5.1.5 Taninos.....	36
5.1.6 Saponinas	36
5.2 Extrato vegetal.....	36
5.3 Otimização da síntese verde de nanopartículas de prata.....	37
5.3.1 Planejamento fatorial completo 2 ³	37
5.3.2 Superfície de resposta: Box Behnken	37
5.4 Síntese verde de nanopartículas de prata (AgNPs)	38
5.5 Caracterização das nanopartículas	38
5.5.1 Espectroscopia de absorção no UV-vis.....	38
5.5.2 Difração de raios-X (DRX).....	39
5.5.3 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	39
5.5.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	39
5.6 Atividade antimicrobiana.....	40
5.6.1 Preparo das amostras	40
5.6.2 Microrganismos testados.....	40

5.6.3 Microdiluição em Caldo	41
5.6.7 Concentração mínima bactericida (CMB)	41
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
6.1 Composição fitoquímica	42
6.2 Otimização da síntese verde de nanopartículas de prata	432
6.2.1 Planejamento fatorial completo 2 ³ e análise das variáveis	432
6.2.2 Superfície de resposta: Box Behnken	476
6.3. Caracterização das nanopartículas de prata	487
6.3.1 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	487
6.3.2 Difração de Raios-X (DRX)	49
6.3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	51
6.4 Avaliação da atividade antimicrobiana	521
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	543
REFERÊNCIAS	543
ANEXOS	665
Anexo A: Evaluation of the antimicrobial activity of silver nanoparticles biosynthesized from <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	665
Anexo B: Comprovante de submissão do artigo	92

1. INTRODUÇÃO

O aumento da resistência microbiana representa uma problemática de saúde pública, visto que, reduz as alternativas de tratamento de doenças infecciosas e encarece o atendimento dos pacientes nos sistemas de saúde. Assim como, a ausência de novos antimicrobianos no mercado impacta no combate aos microrganismos resistentes, logo, favorece a disseminação e por isso, torna-se urgente a busca por soluções antimicrobianas (SOARES *et al.*, 2017; BALAKUMARAN *et al.*, 2016). Diante do exposto, os avanços na área da nanobiotecnologia possibilitaram o advento de uma nova perspectiva farmacêutica, as nanopartículas de prata (AgNPs) (ZHANG *et al.*, 2010; RUDRAMURTHY *et al.*, 2016).

O processo de síntese de nanopartículas prata abrange as estratégias de produção “*top-down*”, “*bottom-up*” e síntese verde (JAMKHANDI *et al.*, 2019). A síntese verde compreende uma metodologia que emprega recursos biológicos vegetais, microrganismos e biomoléculas como agentes redutores do sal metálico para produzir as nanopartículas, sendo essa abordagem menos tóxica e com maior potencial biológico em relação a outras técnicas (KHAN; SAEED; KHAN, 2017). Preferencialmente, o reino vegetal é o recurso mais empregado na biossíntese, principalmente, plantas de caráter medicinal que apresentam propriedades antimicrobianas, larvicidas, antioxidantes e antitumorais devido aos metabólitos secundários e demais fitocompostos presentes (MURUGAN *et al.*, 2014). Por conseguinte, o nanomaterial sintetizado poderá apresentar atividade biológica potencializada e menor nanotoxicidade devido ao revestimento do nanoestruturado por compostos orgânicos oriundos dos vegetais (FAHIMIRAD; AJALLOUEIAN; GHORBANPOUR, 2019; ROY *et al.*, 2019).

As plantas medicinais se apresentam como um importante recurso terapêutico, principalmente, como uma alternativa em relação aos fármacos comercializados. Tal como, a *Schinus terebinthifolius* Raddi, popularmente conhecida como pimenta-rosa, aroeira-vermelha e aroeira-pimenteira é uma árvore nativa brasileira e amplamente utilizada na medicina popular (COLE *et al.*, 2014; CARVALHO *et al.*, 2017).

O óleo essencial derivado da fruta, pimenta rosa, apresenta atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli*; *Klebsiella oxytoca*; *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus* do grupo D (COLE *et al.*, 2014). Fedel-Miyasato *et al.* (2014) em seu trabalho com extrato metálico das folhas da aroeira evidenciou atividade cicatrizante, anti-inflamatória e quimiopreventiva, bem como, potencial preventivo e reparativo a nível de DNA em processos mutagênicos. Suas ações terapêuticas são atribuídas aos compostos fitoquímicos presentes no vegetal, tais como, polifenóis, flavonoides, terpenos, esteroides, alcaloides e taninos distribuídos por toda planta, sendo o seu uso medicinal justificado pela eficácia biológica que exerce no tratamento de diversas patologias (FALCÃO *et al.*, 2015).

Desde a antiguidade, a prata era empregada como agente antimicrobiano em tratamento de feridas, produtos antissépticos, medicamentos, sistemas de purificação de água, dispositivos médicos e cosméticos (PADALIA; MOTERIYA; CHANDA, 2015). Devido a essa eficácia, as nanopartículas de prata se apresentam como uma perspectiva antimicrobiana, sendo a atividade biológica dependente das suas características, tais como, tamanho, morfologia, carga e revestimento (GE *et al.*, 2014). Essas propriedades apresentadas pelas AgNPs e o grupo microbiano exposto são fatores que interferem na sua ação biológica (MITTAL *et al.*, 2014). A atividade antimicrobiana é exercida através de alguns mecanismos, tais como: inibição do biofilme, interação direta com a parede e membrana, geração de espécies reativas do oxigênio (EROS) e efeitos intracelulares a partir de interações com o DNA e proteínas (WANG; HU; SHAO, 2017).

2. JUSTIFICATIVA

Atualmente, a falta de novas perspectivas terapêuticas e a resistência microbiana aos fármacos disponíveis comercialmente tem aumentado em ritmo alarmante, sendo essa uma problemática de saúde pública em escala global. Em virtude disso, há uma crescente necessidade de pesquisas sobre novas terapias, nesse sentido, os avanços na área da nanobiotecnologia possibilitaram o advento de uma nova alternativa antimicrobiana a partir do emprego de nanopartículas de prata (AgNPs). Ademais, as AgNPs podem ser produzidas a partir de um processo biológico, denominado síntese verde, o qual, possibilita a produção de nanopartículas de prata mais biofuncionais devido ao revestimento por compostos bioquímicos.

Outrossim, a *Schinus terebinthifolius* Raddi, conhecida como aroeira-vermelha, é uma planta medicinal empregada popularmente como agente antitérmico, analgésico e anti-inflamatório. Por conseguinte, seu uso é justificado através da atividade biológica que exerce. Diante do exposto, as nanopartículas de prata revestidas por compostos orgânicos presentes na *S. terebinthifolius* poderão exibir efeitos biológicos potencializados e menor toxicidade, consequentemente, apresentam-se como uma nova possibilidade antimicrobiana para ser estudada; por isso, pesquisas na temática abordada no trabalho são justificáveis.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antimicrobiana de nanopartículas de prata (AgNPs) sintetizadas a partir do extrato aquoso das folhas da *Schinus terebinthifolius* Raddi.

3.2 Objetivos específicos

Otimizar o procedimento de síntese verde para produção de nanopartículas de prata a partir do extrato aquoso das folhas da *S. terebinthifolius*.

Estabelecer a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Microbicida Mínima (CMM)

Comparar a atividade antimicrobiana das nanopartículas de prata sintetizadas em relação ao extrato aquoso das folhas da *S. terebinthifolius*.

4. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

4.1 *Schinus terebinthifolius* Raddi

As plantas medicinais se apresentam como um importante recurso terapêutico no tratamento de patologias, visto que, apresentam compostos fitoquímicos com propriedades antioxidantes, antimicrobianas, antitumorais, anti-inflamatórias e cicatrizantes. Apresentam-se como uma alternativa medicamentosa em relação aos antimicrobianos comercializados, principalmente, quando a resistência microbiana é um fenômeno crescente em todo mundo (COLE *et al.*, 2014). A *Schinus terebinthifolius* Raddi (figura 1 e 2), popularmente conhecida como pimenta-rosa, aroeira-vermelha e aroeira-pimenteira; pertence à família Anacardiaceae, árvore de porte médio, nativa da América do Sul e no Brasil, pode ser encontrada desde a região Nordeste até o Sul do país (CARVALHO *et al.*, 2017). Suas aplicações biológicas são descritas desde a primeira edição da Farmacopéia Brasileira, publicada em 1926, sendo recomenda como agente anti-inflamatório natural (SILVA *et al.*, 2017).

Figura 1. Folha e fruto da *Schinus terebinthifolius* Raddi, campus I – UNEB.



Fonte: AUTORIA PRÓPRIA, 2019.

Figura 2. Árvore da *Schinus terebinthifolius* Raddi, campus I – UNEB.



Fonte: AUTORIA PRÓPRIA, 2019.

A *S. terebinthifolius* tem sido estudada em relação a sua composição química e atividade terapêutica devido a sua natureza medicinal, sendo amplamente utilizada na terapia popular como todo: casca, folhas e frutos (SILVA *et al.*, 2017). No trabalho de Cole *et al.* (2014), o estudo a partir do óleo essencial do fruto, a pimenta rosa, evidenciou atividade antibacteriana contra *Bacillus* sp, *Enterobacter* sp, *Klebsiella oxytoca* *Escherichia Coli*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus* do grupo D. Os óleos essenciais são substâncias voláteis composta por hidrocarbonetos encontradas em, praticamente, todo o tecido vivo de plantas e desempenham um papel importante papel na proteção contra microrganismos (COLE *et al.*, 2014). O estudo Amorim e Santos (2003) demonstrou a eficácia do gel de aroeira no tratamento da vaginose bacteriana com taxa de cura de 84% em relação ao placebo que não continha a extrato hidroalcoólico do *Schinus terebinthifolius* Raddi.

A casca do caule e as folhas da *Schinus terebinthifolius* Raddi são utilizadas popularmente no tratamento de infecções bacterianas, processos de cicatrização e como anti-inflamatório (FEDEL-MIYASATO *et al.*, 2014).

Estudos farmacológicos com extratos obtidos de folhas relataram propriedades antioxidantes, antialérgicas, antimicrobianas, anti-inflamatórias, antiúlcera e cicatrizante (SILVA *et al.*, 2017). As ações terapêuticas da aroeira-vermelha podem ser atribuídas aos metabólitos secundários presentes nos vegetais, tais como, polifenóis, flavonoides, terpenos, taninos e saponinas que estão distribuídos nas folhas, cascas, frutos, flores e sementes (FALCÃO *et al.*, 2015).

Os metabólitos secundários são compostos orgânicos presentes em baixas concentrações em espécies do Reino Plantae, sendo essas substâncias envolvidas nos processos de proteção vegetal e interações com o meio ambiente, como também, esses componentes vegetais apresentam propriedades biológicas que despertem o interesse da indústria farmacêutica e estão associadas a efeitos sobre a saúde humana, tais como: antimicrobiano, anti-inflamatório e antioxidante. Esses compostos fitoquímicos despertam interesse da área de farmacologia devido aos efeitos biológicos que exercem. São oriundos do metabolismo secundário, o qual, é responsável pela produção de substâncias relacionadas a proteção vegetal contra herbívoros e microrganismos, atração para animais e mediação das interações entre plantas e ecossistema (PEREIRA; CARDOSO, 2012).

4.2 Síntese verde de nanopartículas de prata (AgNPs)

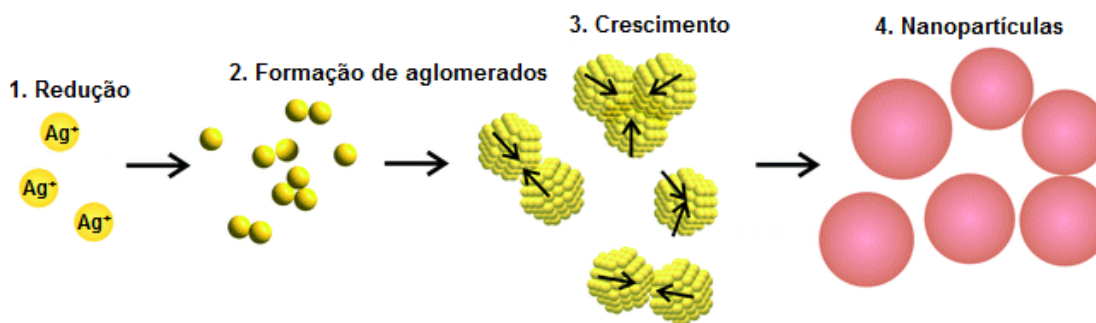
A produção de nanopartículas que envolve processos físico-químicos apresentam alto custo e maior toxicidade para o meio ambiente e organismos vivos em relação ao método de síntese verde. Essa metodologia alternativa é mais econômica, visto que, permite a redução nos custos de materiais e processos; menos tóxica para organismos vivos e ambientalmente mais segura (KHARISSOVA *et al.*, 2013; AKTER *et al.*, 2018). O procedimento de síntese verde utiliza recursos biológicos: microrganismos, vegetais e biomoléculas que atuam como agentes redutores e estabilizantes; sendo essas nanopartículas mais compatíveis para o uso biomédico e ambiental, em virtude do revestimento superficial do nanomaterial por compostos orgânicos oriundos do extrato vegetal (VERMA; MEHATA, 2016; SHARMA; KANCHI; BISETTY, 2015).

A associação de nanotecnologia com síntese verde é uma abordagem promissora que emprega o conceito de economia sustentável ao unir a sustentabilidade das atividades humanas com redução de impacto ambiental associado a ganhos econômicos (SILVA *et al.*, 2016). Nesse contexto, os recursos vegetais são os elementos preferíveis no processo de síntese verde de nanopartículas devido ao processo de biossíntese mais simplificado e eliminação do procedimento de cultura microbiana. Os extratos derivados das folhas são a opção mais utilizada para realizar a síntese a partir de plantas, mas outras partes vegetais também podem ser empregadas, tais como: sementes, cascas, flores, frutos, tubérculos e raízes (SILVA *et al.*, 2016).

As biomoléculas e metabólitos secundários presentes nas plantas, como peptídeos, aminoácidos, polissacarídeos, enzimas, flavonoides, terpenoides, saponinas, polifenóis, taninos e alcaloides estão envolvidos nas etapas de redução do sal metálico e estabilização das nanopartículas (SOOD; CHOPRA, 2018). Esses compostos fitoquímicos também apresentam propriedades antimicrobianas, antioxidantes e antitumorais. Assim, o revestimento de nanopartículas por esses componentes vegetais pode potencializar a ação biológica e reduzir a toxicidade do material sintetizado (FAHIMIRAD; AJALLOUEIAN; GHORBANPOUR, 2019; ROY *et al.*, 2019).

A síntese verde (figura 3) das AgNPs mediada por recursos vegetais é uma abordagem simples e fácil (MALIK *et al.*, 2014). Os metabólitos secundários e biomoléculas atuam como agentes redutores dos cátions de prata (Ag^+) a um átomo neutro (Ag^0) através do mecanismo de biorredução (AJITHA *et al.*, 2018). Posteriormente a redução do sal metálico, ocorre o processo de formação de pequenos aglomerados e crescimento até atingir o tamanho final das nanopartículas. A adsorção de compostos orgânicos à superfície das nanopartículas durante este processo permite a estabilização, como também, o revestimento das AgNPs que confere características diferenciadas, tais como, atividade biológica (POLTE, 2015).

Figura 3. Processo de síntese verde.



Fonte: POLTE, 2015.

O processo de síntese verde pode ser afetado por uma série de fatores que condicionam a biossíntese e interferem nas características apresentadas pelas AgNPs. O pH do extrato vegetal influencia na formação das nanopartículas de prata, visto que, as cargas das biomoléculas do extrato afetam a capacidade de redução do sal metálico, por consequência, interfere diretamente no processo de síntese (MAKAROV *et al.*, 2014). Verma e Mehata (2016) evidenciaram que o maior tempo de reação promoveu o aumento da concentração de AgNPs, bem como, que o pH básico foi mais favorável para a síntese de AgNPs empregado o extrato de *Azadirachta indica*, devido a maior disponibilidade de grupos funcionais no meio reacional.

Em relação à temperatura, quanto mais elevada, maior a velocidade e eficácia da reação (JAIN; MEHATA, 2017). Os resultados do estudo de Guan, Xia e Li (2018) com nanopartículas de prata sintetizadas através do extrato da *Hibiscus sabdariffa*, sugerem que o aumento na temperatura proporciona uma reação redutora mais rápida. No que tange à concentração do extrato vegetal, Khalil *et al.* (2014) verificaram que o aumento da concentração do extrato das folhas de *Olea europaea* diminuiu o tamanho das partículas formadas, visto que, há uma disponibilidade maior de agentes redutores.

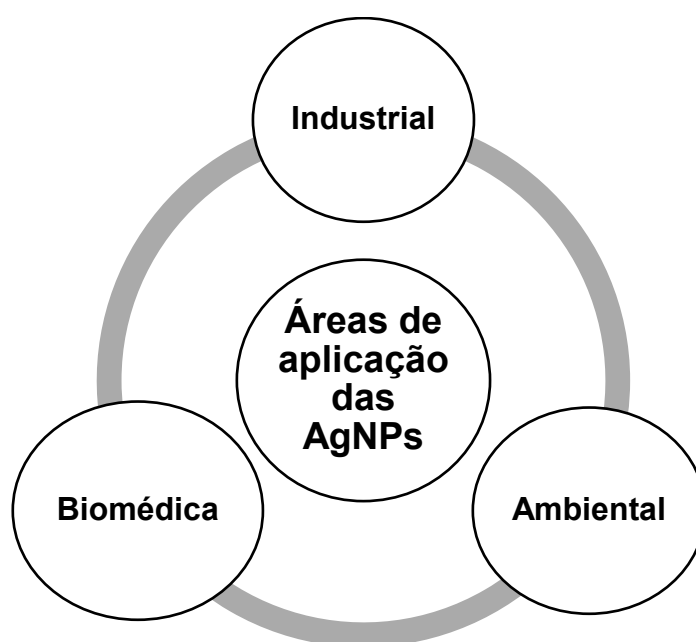
4.3 Nanopartículas de prata (AgNPs)

A prata é um elemento utilizado desde as civilizações antigas na conservação de alimentos e purificação da água, sendo presente no organismo devido à exposição por inalação ou ingestão em baixa concentração (MARX; BARILLO, 2014).

Anteriormente ao advento da antibioticoterapia, a prata já era utilizada devido a sua atividade antisséptica e antimicrobiana no tratamento de queimaduras e feridas (RAI *et al.*, 2012). O uso da prata como agente antibacteriano após o emprego dos antibióticos foi drasticamente reduzido, contudo, diante da resistência bacteriana aos antimicrobianos, a prata retornou como elemento promissor para o desenvolvimento de novos antimicrobianos; tal como, o fármaco sulfadiazina de prata que possui amplo espectro de ação, inclusive contra a bactéria *P. aeruginosa*, sendo utilizado no tratamento de infecções de pacientes queimados (ANTUNES *et al.*, 2013; SCHNEIDER, 2017; SOUZA *et al.*, 2013).

As AgNPs são partículas Ag^0 com tamanho entre 1 nm a 100 nm. São empregadas em diversas áreas desde a biomédica até industrial (figura 4) e despertam interesse da área farmacêutica devido a sua ação antimicrobiana. São empregadas na cosmetologia, oncologia, dispositivos como cateteres e válvulas; bem como, as AgNPs podem ser empregadas na indústria têxtil para produção de têxteis antimicrobianos, na área ambiental para o tratamento antimicrobiano da água e podem ser integradas em curativos para feridas, materiais de embalagem e revestimentos de superfície (CHERNOUSOVA; EPPLE, 2012; LIAO; LI; TJONG, 2019).

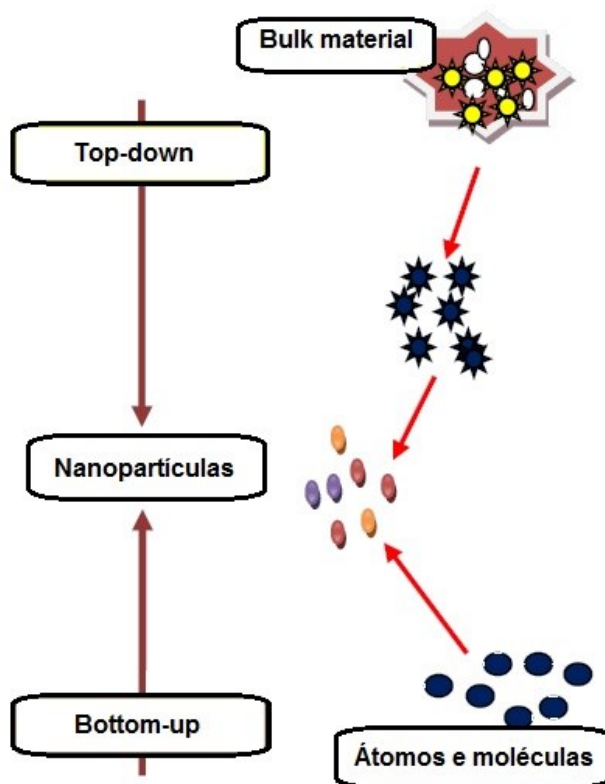
Figura 4. Áreas de aplicação das nanopartículas de prata.



Fonte: AUTORIA PRÓPRIA, 2019.

A produção de nanopartículas envolve as abordagens “*top-down*”, “*bottom-up*” (figura 5) e a síntese verde. No modelo “*top-down*” o material macroestruturado é convertido em nanomaterial através de métodos físico-químicos, como ablação a laser e pulverização catódica. A estratégia “*bottom-up*” consiste na síntese de nanopartículas a partir de interações atômicas e moleculares a partir de metodologias físico-químicas, tais como: processo sol-gel e pirólise (JAMKHANDE *et al.*, 2019). Dentro as estratégias “*bottom-up*”, a síntese verde apresenta-se como uma alternativa menos tóxica e biologicamente mais segura (SILVA *et al.*, 2016).

Figura 5. Métodos top-down e bottom-up.

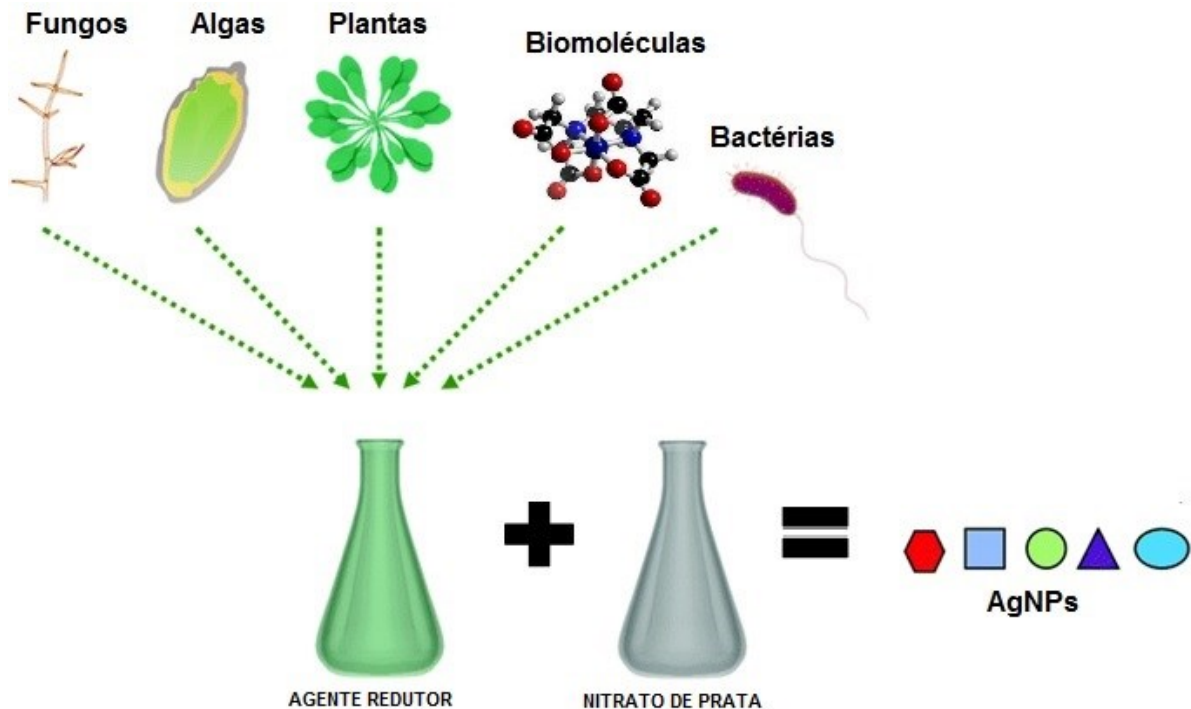


Fonte: JAMKHANDE *et al.* (2019).

A síntese verde (figura 6) utiliza recursos biológicos: vegetais biomoléculas e microrganismos para biossintetizar nanopartículas, sendo o reino vegetal preferível como agente redutor no processo de síntese. Os metabólitos secundários e biomoléculas presentes nos vegetais atuam como redutores e estabilizadores durante o processo de biorredução para a formação das nanopartículas (SILVA *et al.*, 2016).

Alguns compostos vegetais expressam atividade biológica, por conseguinte, o revestimento das nanopartículas de prata por esses componentes pode potencializar a ação das nanopartículas, bem como, reduzir a nanotoxicidade (FAHIMIRAD; AJALLOUEIAN; GHORBANPOUR, 2019).

Figura 6. Esquema da síntese verde de AgNPs mediada por recursos biológicos.



Fonte: ROY *et al.* (2019).

A caracterização das nanopartículas envolve uma série de técnicas que permitem avaliar o nanomaterial sintetizado quanto à forma, tamanho, carga, composição e estrutura (EL-NOUR *et al.*, 2010). Para tal, métodos espectroscópicos e microscópicos, tais como, espectrofotometria UV, espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia eletrônica de transmissão (MET), microscopia de força atômica (MFA) e difração de raios X (DRX) são aplicados (INGALE, 2013). Inicialmente, a biossíntese das nanopartículas é evidenciada a partir da alteração da coloração da solução composta pelo agente redutor e solução de nitrato de prata. A espectrofotometria UV é utilizada para presumir a formação das nanopartículas (PARK, 2014).

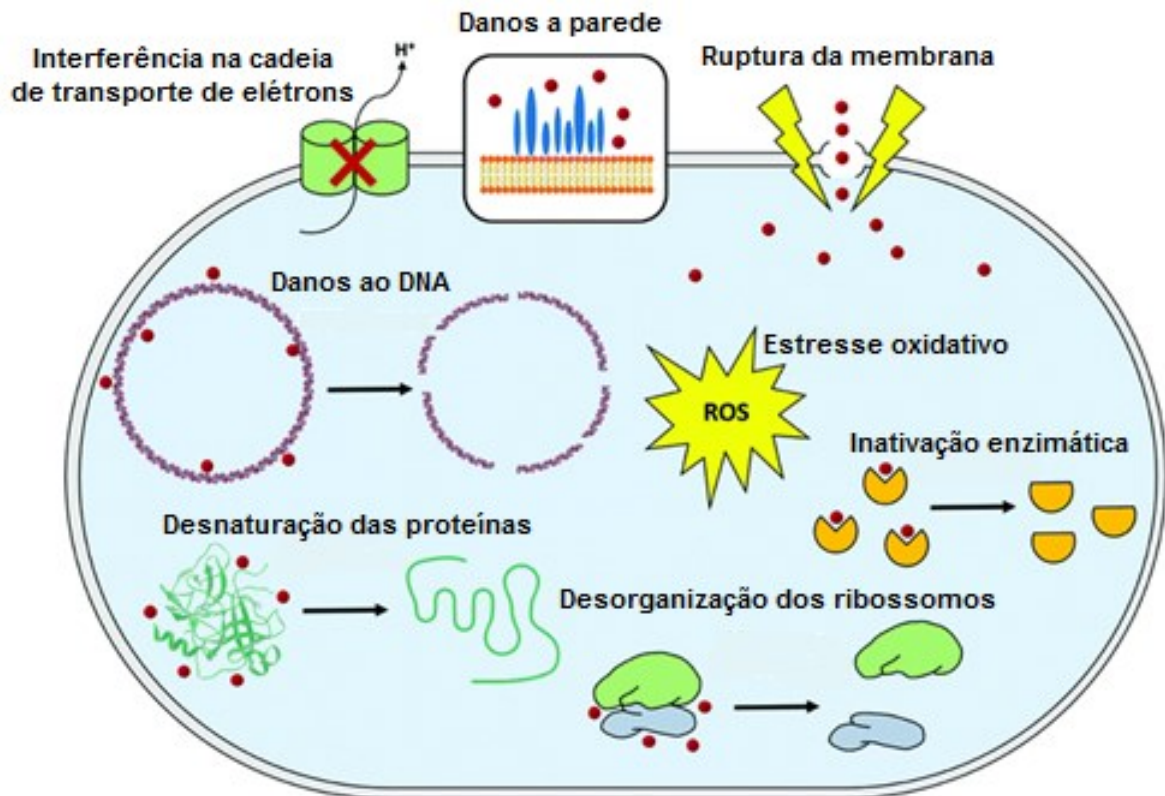
A FTIR é empregada para caracterizar a composição química superficial que reveste as nanopartículas e o extrato biológico redutor empregado. O tamanho e a forma são comumente visualizados e medidos empregando os métodos microscópicos: MEV, MET e MFA. A avaliação da cristalinidade das AgNPs é confirmada através da análise de DRX (MITTAL; CHISTI; BANERJEE, 2013).

4.4 Atividade antibacteriana das nanopartículas de prata

Previamente a introdução dos antimicrobianos na terapia medicamentosa na década de 40, a prata já era empregada, desde as antigas civilizações, como droga antibacteriana devido as suas propriedades biocida e antisséptica (BARILLO; MARX, 2014). Medicamentos antimicrobianos inibem o crescimento de bactérias e fungos, sendo utilizados no tratamento e prevenção de infecções. Entretanto, o uso indiscriminado favoreceu o surgimento da resistência microbiana, sendo esse um problema global de saúde pública. (RUDRAMURTHY *et al.*, 2016). Nesse contexto, as nanopartículas de prata se apresentam como uma nova perspectiva terapêutica e para controle vetorial, devido às suas propriedades físico-químicas aprimoradas e interações biológicas (BAPTISTA *et al.*, 2018).

A atividade biológica das nanopartículas de prata é dependente de algumas características, tais como tamanho, morfologia, carga e revestimento (MÖHLER *et al.*, 2018). Em relação ao tamanho, as nanopartículas menores apresentam maior toxicidade microbiana devido a uma maior área superficial, consequentemente, maior área de interação e penetração intracelular (RAI *et al.*, 2012). Outro fator importante na atividade microbiana é a carga das nanopartículas, por exemplo, nanopartículas carregadas positivamente são capazes de aumentar sua toxicidade devido a atração eletrostática com a carga negativa da parede celular bacteriana, sendo ainda mais eficazes (SLAVIN *et al.*, 2017). Os mecanismos envolvidos na atividade antibacteriana das nanopartículas de prata (figura 7) ainda não são completamente conhecidos, porém algumas hipóteses elucidam tais mecanismos: interação com a membrana microbiana, geração de espécies reativas do oxigênio (EROS) e indução de efeitos intracelulares a partir de interações com o DNA e proteínas (HAJIPOUR *et al.*, 2012).

Figura 7. Mecanismos envolvidos na ação microbiana das AgNPs.



Fonte: ROY *et al.* (2019).

A composição da parede celular bacteriana também é um fator que interfere no potencial antibacteriano, sendo as bactérias Gram-negativas mais suscetíveis à ação das nanopartículas de prata por causa da menor espessura da parede celular e quantidade reduzida de peptidoglicano, como também a presença de lipopolissacarídeos (LPS) que auxilia na adesão das AgNPs a membrana citoplasmática pela carga negativa que apresenta (DAKAL *et al.*, 2016). Segundo a pesquisa de Rajeshkumar (2016) com nanopartículas de prata sintetizadas a partir da casca de *Pongamia pinnata*, as AgNPs apresentaram atividade de inibição significativa contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, porém uma maior zona de inibição foi observada contra *Klebsiella planticola*, bactéria Gram-negativa em relação a *Staphylococcus aureus*, bactéria Gram-positiva. Essa diferença na atividade inibitória das nanopartículas de prata deve-se à composição da parede celular.

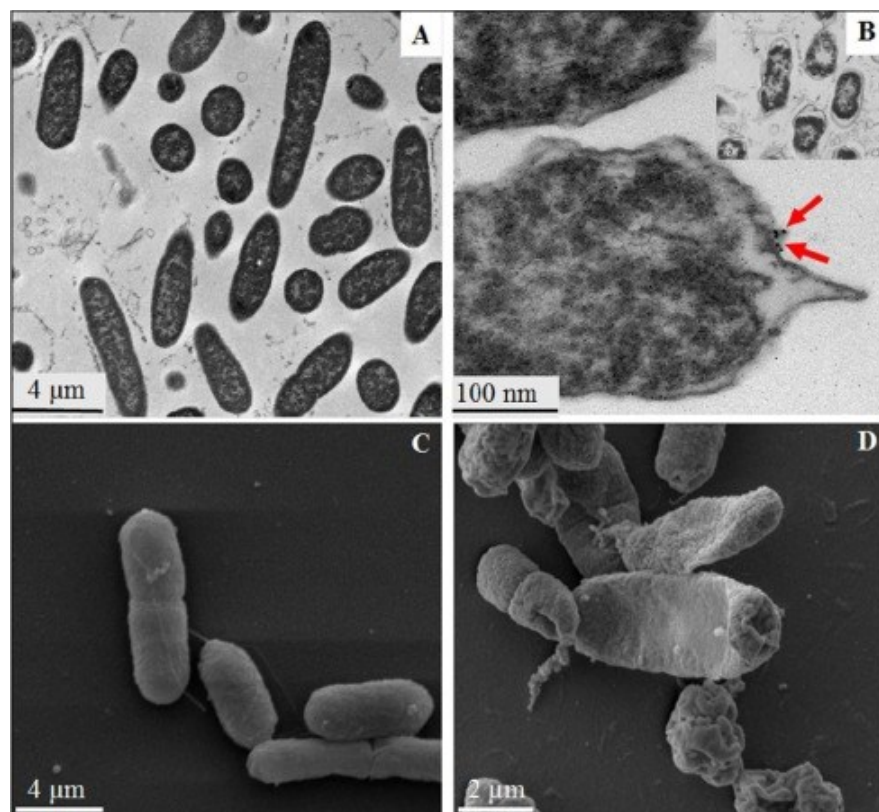
A interação de nanopartículas de prata com os microrganismos induz o estresse oxidativo através da produção de espécies reativas do oxigênio (EROS), sendo este o principal mecanismo antimicrobiano derivado das nanopartículas (SLAVIN *et al.*, 2017). Os mecanismos antioxidantes presentes nas células bacterianas atuam na regulação da concentração das espécies reativas do oxigênio e no limiar do estresse oxidativo, no entanto, o desequilíbrio entre a geração dos EROS e a função regulatória, resulta no estresse oxidativo (OUAY; STELLACCI, 2015). As nanopartículas de prata, supostamente, causam disfunção na cadeia respiratória celular, por consequência, o aumento nos níveis de EROS ocasiona desequilíbrio no sistema de defesa antioxidante bacteriano e desencadeamento do estresse oxidativo (KĘDZIORA *et al.*, 2018).

Ademais, outros eventos nocivos para a célula bacteriana são induzidos pelo aumento nos níveis de EROS, tais como, mutações gênicas, desativação enzimática e hiperoxidação de lipídios (DAKAL *et al.*, 2016). Na pesquisa de Das *et al.* (2017) foi demonstrado que a geração de espécies reativas do oxigênio contribuiu para a citotoxicidade desencadeada por nanopartículas de prata sintetizadas a partir do extrato da folha *Ocimum gratissimum* contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, ambas cepas resistentes aos antimicrobianos, como também, que o tratamento com as AgNPs aumentou a geração de EROS nas bactérias *E. coli* e *S. aureus* em 85,68% e 89,36%, respectivamente. Bem como, possíveis mecanismos antibacterianos são mediados a partir da interação com as membranas bacterianas e componentes celulares (RAJESHKUMAR; BHARATH, 2017).

Os íons de prata, Ag^+ , liberados pelas nanopartículas de prata podem se ligar aos grupos tiol de proteínas e enzimas encontradas na superfície celular ocasionando a desestabilização da membrana celular e quebra da via de síntese de ATP (VIMBELA *et al.*, 2017). As AgNPs acumulam-se na superfície da membrana provocando modificações estruturais que alteram a permeabilidade bacteriana e promovem a penetração das nanopartículas de prata para o ambiente interno celular (ZHENG *et al.*, 2018).

O estudo de Alsammarraie *et al.* (2018) com nanopartículas de prata sintetizadas a partir do extrato de *Curcuma longa* observou alterações na membrana celular, separação da membrana citoplasmática da parede celular e extravasamento do conteúdo citoplasmático da bactéria *Escherichia coli* O157:H7 (figura 8). Outrossim, as AgNPs também interagem com as biomoléculas ricas em enxofre e fósforo, como proteínas e DNA, na qual, a prata iônica interage com os pares de bases promovendo mutações no material genético, e finalmente a morte bacteriana (CHUNG *et al.*, 2016; MARX; BARILLO, 2014). A pesquisa de Velusamy *et al.* (2016) investigou a capacidade das nanopartículas de prata para induzir danos ao DNA das bactérias *Escherichia coli* e *Bacillus Subtilis*. De acordo com este estudo, a quantidade de danos ao material genético bacteriano aumentou com a concentração crescente de AgNPs.

Figura 8. Imagens de MET (A e B) e MEV (C e D) de *E. coli* O157: H7. A e C: células não tratadas (controle); B e D: células tratadas com diferentes concentrações de AgNPs.



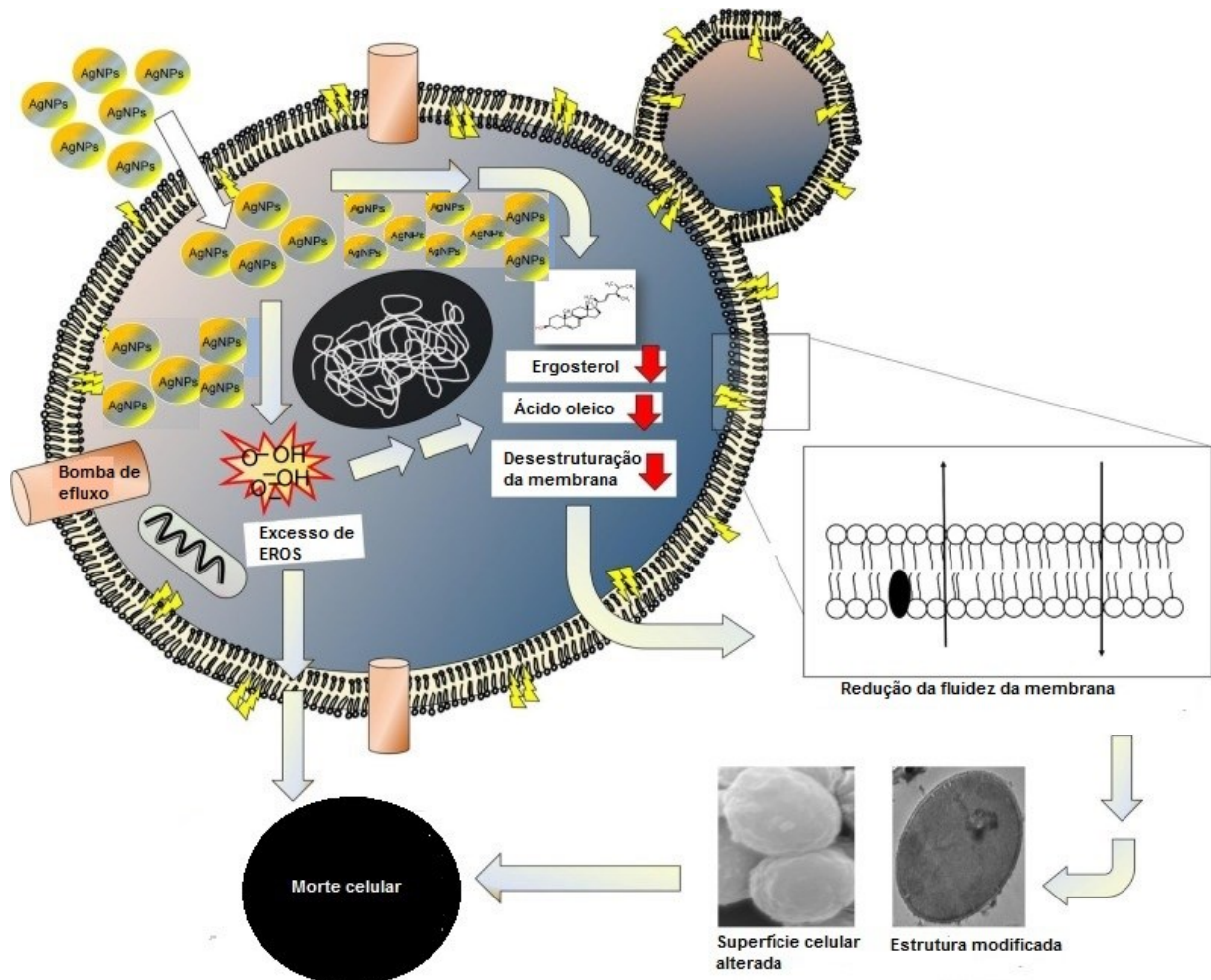
Fonte: ALSAMMARRAIE (2018).

4.5 Atividade antifúngica das nanopartículas de prata

As infecções fúngicas representam um problema de saúde pública com difícil controle e ampla propagação. A candidíase é a doença fúngica mais comum, sendo uma patologia importante no ambiente hospitalar. Dentre as espécies de *Candida*, a *Candida albicans* é o principal agente relacionado a esse tipo de infecção. As infecções fúngicas invasivas são menos predominantes, mas apresentam altas taxas de morbidade e mortalidade. Nas últimas décadas, a resistência antifúngica tornou-se uma ameaça para o tratamento eficaz das infecções fúngicas, principalmente, as invasivas; o que implica em menos opções terapêuticas, aumento no tempo de internação e encarecimento dos custos do tratamento. Diante do exposto, as nanopartículas metálicas se apresentam como uma estratégia antifúngica para auxiliar no tratamento e potencializar os antifúngicos presentes no mercado (SOUSA *et al.*, 2020).

As nanopartículas metálicas podem ser empregadas como agente antifúngico, principalmente, as nanopartículas de prata devido ao potencial antimicrobiano apresentado pelo elemento prata, sendo utilizado desde os egípcios. Os mecanismos envolvidos na ação antifúngica das nanopartículas de prata (figura 9) estão relacionados ao aumento na produção de EROS, interação com componentes intracelulares e desestruturação da membrana plasmática e parede celular. Tais eventos desencadeiam respostas celulares que resultam na morte celular: estresse oxidativo resultante do desequilíbrio entre a produção de EROS e a capacidade do sistema antioxidante celular, disfunção mitocondrial, danos ao material genético, alterações morfofisiológicas na parede e membrana e interrupção do ciclo celular (SOUSA *et al.*, 2020)

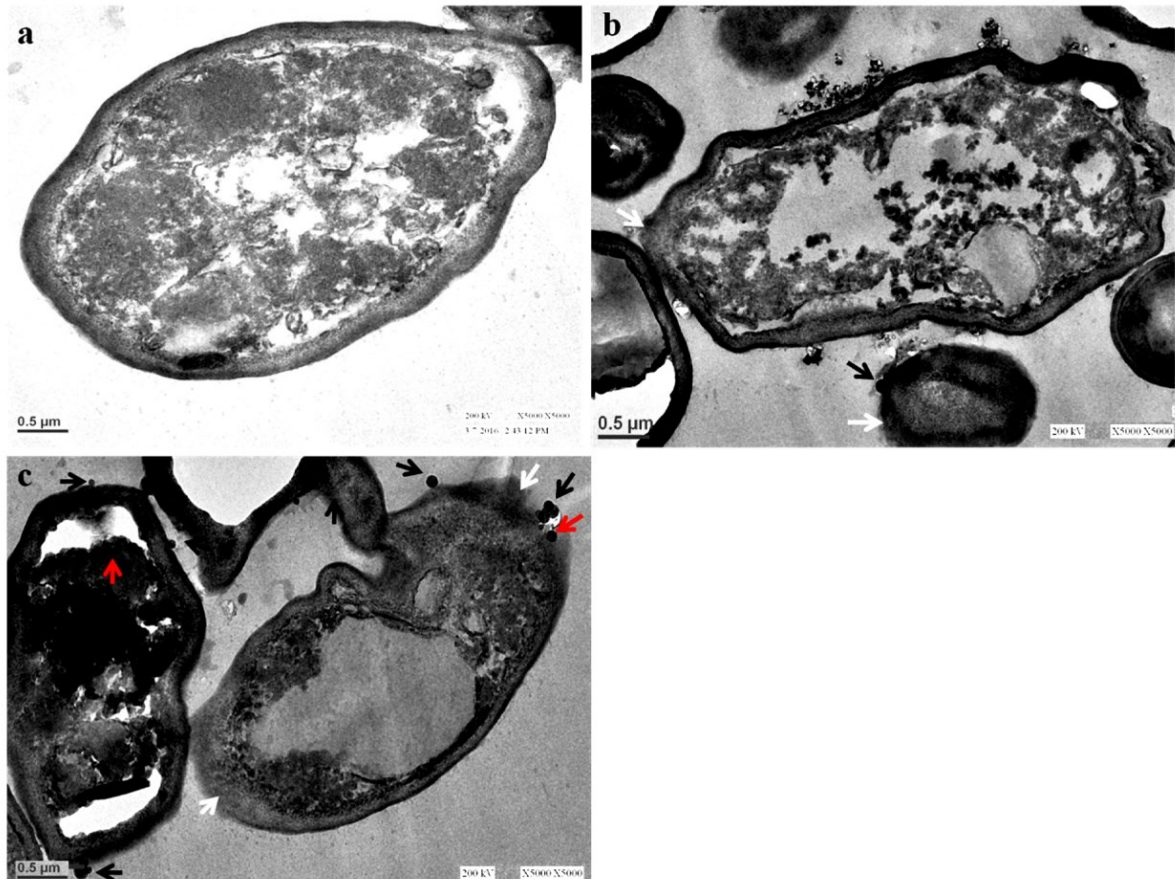
Figura 9. Representação esquemática do modelo proposto para o mecanismo de ação das AgNPs contra células de *Candida*.



Fonte: RADHAKRISHNAN *et al.* (2018).

Em relação a atividade antifúngica, as nanopartículas de prata apresentam potencial antifúngico semelhante aos medicamentos comercializados, como fluconazol e a anfotericina (KUPPUSAMY *et al.*, 2016). Em relação ao mecanismo fungicida das AgNPs, Jalal *et al.* (2019) demonstraram modificações morfológicas (figura 10) nas células de *C. albicans* causadas por nanopartículas de prata sintetizadas a partir do extrato aquoso das sementes de *Syzygium cumini*. As alterações observadas foram: desestruturação da parede e da membrana, como também, inibição da formação de biofilme e do tubo germinativo em cepas de *C. albicans* tratadas.

Figura 10. Imagens de microscopia de transmissão: (a) controle: células de *C. albicans* não tratadas com AgNPs. (b e c) células tratadas com $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ de AgNPs.



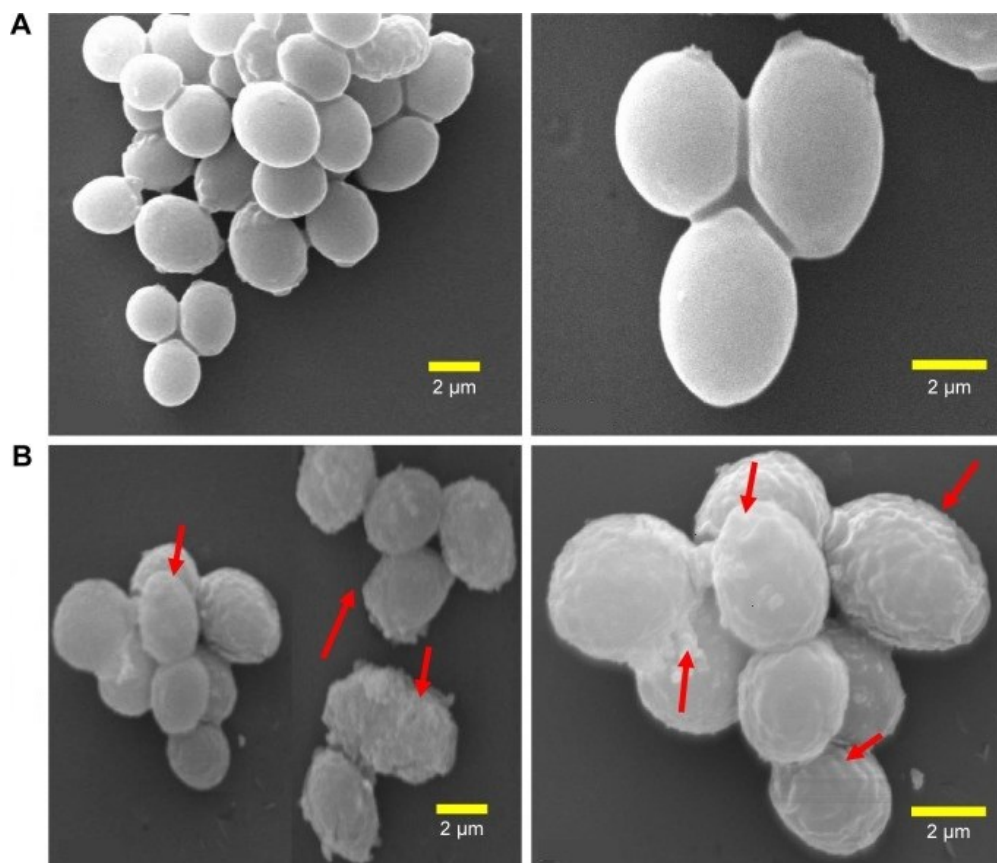
Setas pretas: fixação das nanopartículas. Setas vermelhas: penetração das AgNPs. Setas brancas: degradação da parede celular e membrana plasmática.

Fonte: JALAL *et al.*, 2019.

Ademais, outros mecanismos relacionados com a atividade antifúngica foram relatados em outros estudos. Kim *et al.* (2008) demonstraram que as AgNPs provocam inibição de processos celulares, tais como, a interrupção do ciclo celular na mitose de *C. albicans*. Neste mesmo trabalho também foi observado que as nanopartículas promovem a desestruturação da bicamada lipídica da membrana plasmática, a formação de poros e interfere no potencial elétrico da membrana; esses eventos ocasionam a liberação de componentes intracelulares, como glicose, trealose e íons, por conseguinte a morte celular.

O trabalho de Radhakrishnan *et al.* (2018) evidenciou a ação antifúngica das nanopartículas de prata mediada por estresse oxidativo através do aumento intracelular de EROS. Observou-se que o nível de EROS nas células de *C. albicans* tratadas com AgNPs aumentou significativamente em relação as células controle, sendo esse evento dependente da dose empregada. Além deste mecanismo, as AgNPs provocaram alterações morfológicas na superfície fúngica (figura 11) e modificações na composição lipídica da membrana: redução do nível de ergosterol, aumento dos ácidos graxos saturados e a diminuição dos ácidos graxos insaturados. A alteração nos ácidos graxos é uma ferramenta compensatória diante da diminuição do ergosterol, resultando na redução da fluidez de membrana após o tratamento.

Figura 11. Micrografias de MEV. (a) controle: células de *C. albicans* não tratadas com AgNPs. (b) células tratadas com 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AgNPs.



As setas vermelhas apontam para a parede celular com aspecto rugoso após o tratamento com AgNPs.

Fonte: RADHAKRISHNAN *et al.* (2018)

As nanopartículas de prata também exercem atividade antifúngica contra dermatófitos, grupo fúngico composto por fungos filamentosos causadores de micoses em pelo, cabelo e unhas. O trabalho de Rónavári *et al.* (2018) analisou a ação de nanopartículas de prata e nanopartículas de ouro contra *Trichophyton tonsurans*, *Microsporum gypseum* e *T. mentagrophytes* e obteve como resultado uma inibição de crescimento de 80% nos três dermatófitos quando tratados com AgNPs, enquanto que, nenhuma das espécies reagiu ao tratamento com AuNPs, indicando que as nanopartículas de ouro não são adequadas para a inibição do crescimento dos fungos dermatófitos causadores de micose cutâneas.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Composição fitoquímica

A composição fitoquímica foi realizada no Laboratório de Química Analítica Ambiental na UNEB, a partir de testes qualitativos, a fim de indicar a presença de alguns dos a presença de alguns metabólitos secundários presentes no extrato etanólico das folhas de *S. terebinthifolius*. Para tal, preparou-se o extrato etanólico utilizando 12,5 mL de etanol com 2,5 gramas das folhas previamente lavadas com água ultrapura e secas a temperatura e deixadas em repouso a temperatura ambiente por 24 horas. Após 7 dias, a mistura foi filtrada e utilizada para realização dos ensaios seguindo os procedimentos propostos no trabalho de Bessa, Terrones e Santos (2007) com adaptações. Os seguintes metabólitos secundários foram pesquisados:

5.1.1 Alcaloides

Adicionou-se 1,0 mL de ácido clorídrico (HCl) 10% v/v a 1 mL extrato etanólico e essa mistura foi aquecida por 10 minutos. Posteriormente, a mistura foi esfriada, filtrada e o filtrado colocado em tubo de ensaio para reagir com algumas gotas do reativo Dragendorff. A presença de leve turbidez ou precipitado; respectivamente, roxo a laranja, branco a creme e marrom indica possível presença de alcaloides no material analisado.

Reagente Dragendorff: são feitas duas soluções para posterior mistura em partes iguais. solução A: dissolveu-se 1,7 g de nitrato de bismuto (III) e 20 g de ácido tartárico em 80 mL de água; solução B: dissolveu-se 16 g de iodeto de potássio em 40 mL de água.

5.1.2 Glicosídeos cardiotônicos

Adicionou-se 1,5 mL de solução de acetato de chumbo 10% e 1 mL de água destilada a 1,0 mL da solução de extrato etanólico. Essa mistura foi aquecida por 10 minutos. Posteriormente, a mistura foi filtrada e agitada com 5 mL de clorofórmio. A fase clorofórmica foi separada em um tubo, seca e adicionou-se o reativo de Liebermann-Burchard. O resultado positivo é visualizado a partir da coloração verde, azul esverdeado e roxo a azul.

Reagente de Liebermann-Burchard: misturou-se 10 mL de anidrido acético e duas gotas de ácido sulfúrico concentrado.

5.1.3 Cumarinas voláteis

Adicionou-se 1,0 mL do extrato etanólico em um tubo, tampou-se com papel de filtro impregnado de NaOH a 10% m/v. Posteriormente, o tubo foi aquecido em banho de água por alguns minutos. O papel filtro foi removido e examinado sob luz UV. A fluorescência amarela indica a presença de cumarinas na amostra.

5.1.4 Triterpenos e/ou esteróides

Adicionou-se 2,5 mL de clorofórmio a 1 mL do extrato etanólico. A mistura foi filtrada e dividida em dois tubos: em cada um dos tubos realizou-se as reações de Liebermann-Burchard e Salkowski. Os triterpenos desenvolvem coloração estável e os esteróides desenvolvem coloração mutável com o tempo.

Reagente de Salkowski: ácido sulfúrico concentrado.

5.1.5 Taninos

Adicionou-se 2,5 mL de água destilada a 1 mL do extrato etanólico. A mistura foi filtrada e adicionou-se uma gota de solução de cloreto férrico 10%. A coloração azul indica possível presença de taninos hidrolisáveis enquanto a verde, a presença de taninos condensados

5.1.6 Saponinas

Adicionou-se 2,5 mL de água fervendo a 1 mL do extrato etanólico. Posteriormente, a mistura foi esfriada, agitada e permaneceu em repouso por 20 minutos. A formação de espumas é indica presença de saponinas.

5.2 Extrato vegetal

As folhas da *S. terebinthifolius* foram coletadas no Campus I da Universidade do Estado da Bahia (UNEB) e identificadas no Herbário Alexandre Leal Costa localizado no Departamento de Botânica do Instituto de Biologia (IBIO) da Universidade Federal da Bahia (UFBA).

O extrato vegetal foi preparado no Laboratório de Química Analítica na UNEB. O material vegetal recolhido foi lavado com água ultrapura e seco a temperatura ambiente por 24 horas. Posteriormente, para a obtenção do extrato aquoso das folhas de *S. terebinthifolius*, as quantidades de folhas descritas no planejamento e Box Behnken foram colocadas em contato com 100 mL de água ultrapura em fervura por 5 minutos de acordo com Ghosh, Paul e Basak (2014). O extrato foi obtido por filtração e armazenado a 4°C. O pH dos extratos foi alterado de acordo com os valores descrito no planejamento e Box Behnken, para tal, foram empregados os tampões de citrato 0,1 mol L⁻¹ ou mol/L para pH 5; fosfato 0,1 mol/L para pH 7 e borato 0,1 mol/L para pH 8; 9; 9,5 e 10.

5.3 Otimização da síntese verde de nanopartículas de prata

5.3.1 Planejamento fatorial completo 2^3

As variáveis que podem influenciar no processo de síntese verde das AgNPs: pH, massa foliar e tempo de reação, foram selecionadas de acordo com artigos científicos que abordavam a temática apresentada neste trabalho. O planejamento fatorial completo 2^3 (quadro 1) foi realizado a fim de verificar a significância das variáveis analisadas e suas interações perante a resposta adotada, a absorbância. A análise estatística foi realizada utilizando o software Statistica 7.

Quadro 1. Matriz do planejamento fatorial completo 2^3

	pH	Massa foliar (g)	Tempo (min)
1	-1 (5)	-1 (2)	-1 (30)
2	+1 (9)	-1 (2)	-1 (30)
3	-1 (5)	+1 (6)	-1 (30)
4	+1 (9)	+1 (6)	-1 (30)
5	-1 (5)	-1 (2)	+1 (90)
6	+1 (9)	-1 (2)	+1 (90)
7	-1 (5)	+1 (6)	+1 (90)
8	+1 (9)	+1 (6)	+1 (90)
9	0 (7)	0 (4)	0 (60)
10	0 (7)	0 (4)	0 (60)
11	0 (7)	0 (4)	0 (60)

5.3.2 Superfície de resposta: Box Behnken

Posteriormente, a otimização foi realizada através da metodologia de superfície de resposta Box Behnken (BBD) (quadro 2). Os fatores significativos no planejamento foram reavaliados a fim de estabelecer as condições críticas para o procedimento estudado.

Quadro 2. Matriz da superfície de resposta Box Behnken

	pH	Massa foliar (g)	Tempo (min)
1	-1 (8)	-1 (6)	0 (120)
2	+1 (10)	-1 (6)	0 (120)
3	-1 (8)	+1 (10)	0 (120)
4	+1 (10)	+1 (10)	0 (120)
5	-1 (8)	0 (8)	-1 (60)
6	+1 (10)	0 (8)	-1 (60)
7	-1 (8)	0 (8)	+1 (180)
8	+1 (10)	0 (8)	+1 (180)
9	0 (9)	-1 (6)	-1 (60)
10	0 (9)	+1 (10)	-1 (60)
11	0 (9)	-1 (6)	+1 (180)
12	0 (9)	+1 (10)	+1 (180)
13	0 (9)	0 (8)	0 (120)
14	0 (9)	0 (8)	0 (120)
15	0 (9)	0 (8)	0 (120)

5.4 Síntese verde de nanopartículas de prata (AgNPs)

A síntese verde das AgNPs foi realizada no Laboratório de Preparo Analítico localizado na UNEB. A solução de 200 mL de nitrato de prata (AgNO_3) 1 mM foi preparada utilizando nitrato de prata da Cromoline e água ultrapura. Em seguida, com auxílio da bomba peristáltica, modelo LDP 105-6, a solução de AgNO_3 foi bombeada a uma taxa de fluxo de $5,0 \text{ mL min}^{-1}$ para o erlenmeyer contendo 10 mL do extrato aquoso das folhas da *S. terebinthifolius* à temperatura ambiente (28°C). O tempo de reação seguiu o descrito no planejamento e Box Behnken. Após essa etapa, o material sintetizado foi centrifugado a 3.500 rpm durante 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em água ultrapura para posterior congelamento e liofilização.

5.5 Caracterização das nanopartículas

5.5.1 Espectroscopia de absorção no UV

Para obtenção dos dados de absorbância do material sintetizado foi utilizado o espectrofotômetro UV-2600 da Shimadzu do Laboratório de Pesquisa Materiais e Catálise da UNEB. A leitura foi feita de 200 nm a 800 nm. Como branco, foi utilizada água ultrapura. O resultado foi expresso por meio de gráficos de absorbância por comprimento de onda (nm) obtidos pelo software OriginPro 8.6.

5.5.2 Difração de raios-X (DRX)

O procedimento foi realizado Laboratório de Raio-X do Instituto de Química da UFBA. Para tal análise, utilizou-se o difratômetro de raios XRD-6000 da Shimadzu, tendo como fonte de radiação $\text{CuK } \alpha$ com voltagem de 40 kV e corrente de 30 mA. A varredura foi realizada na região 2θ , de 5° a 80° com taxa de velocidade de 2°min^{-1} . A cristalinidade foi obtida através do software Xpert Highscore e o difratograma pelo software OriginPro 8.0.

5.5.3 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A análise de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) foi realizada no Laboratório de Pesquisa DRX na UNEB utilizando o equipamento PERKIN ELMER, modelo Spectrum100-FT-IR, na região de 4000 cm^{-1} até 400 cm^{-1} . Os sólidos foram analisados em forma de pastilhas da amostra diluída em brometo de potássio na proporção de 200:1, utilizando-se uma resolução de 4 cm^{-1} e uma acumulação de 32 varreduras. Os espectros do FTIR foram obtidos através do software OriginPro 8.0.

5.5.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A caracterização morfológica foi realizada no Laboratório de Microscopia Avançada no Centro de Caracterização e Desenvolvimento de Protocolos para Nanotecnologia (CCDPN) localizado na Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), Campus Araraquara por microscopia eletrônica de varredura emissão por campo (FEG-SEM), utilizando um microscópio modelo 7500 F (JEOL, Tóquio, Japão).

A amostra de nanopartícula de prata revestida com fitocompostos da aroeira foi recoberta, por evaporação com 1 fio de carbono, equivale a 11,4 nm, no equipamento da marca Bal-Tec SCD 050 Sputter Coater.

5.6 Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi realizada no Laboratório de Bioensaios localizado na UNEB, através do método de microdiluição em caldo para determinar as concentrações inibitórias mínimas (CIM), segundo as normas CLSI com modificações de Araújo *et al*, 2017 e Caires, *et al.*, 2018 e determinação da concentrações microbiana mínimas (CMM).

5.6.1 Preparo das amostras

Para o preparo das soluções estoques do extrato aquoso das folhas da aroeira e das nanopartículas de prata, 32 mg de ambas amostras foram solubilizadas em 4 mL da solução de 800 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) 20% e 3200 µL de água ultrapura autoclavada. Ao final, a concentração da solução estoque foi 8000 e a faixa de concentração testada no ensaio foi de 2000 µg mL⁻¹ a 15,62 µg mL⁻¹.

5.6.2 Microrganismos testados

Os ensaios de atividade antimicrobiana foram realizados contra as bactérias: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538); *Bacillus subtilis* (ATCC 6633); *Bacillus cereus* Frankland & Frankland (Nº CCT 0096); *Pseudomonas aeruginosa* (Nº CCT 0090; ATCC 27853) e os fungos: *Candida albicans* (ATCC 18804) e *C. glabrata* (CCT 0728). Todas as cepas foram adquiridas da Fundação André Tosello. A manutenção das culturas dos microrganismos foram em meios de cultivo apropriados para bactérias (meio ágar nutriente) e para os fungos (meio ágar levedura e malte), ambos da marca Acumedia. Os períodos de incubação foram de 24 horas a 36°C e 72 horas a 26°C, para as bactérias e fungos, respectivamente.

5.6.3 Microdiluição em Caldo

Adicionou-se 100 μL do meio de cultivo apropriado para cada microrganismo em todos os poços de uma placa de 96 poços. Em seguida, foram transferidas alíquotas de 100 μL das soluções estoque, do extrato aquoso da aroeira e das nanopartículas de prata preparadas a partir deste extrato, em triplicata, nos poços da fileira A, da placa de 96 poços. Os antimicrobianos empregados foram Gentamicina (faixa testada: 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 3,90 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e Benzilpenicilina (faixa testada: 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 0,19 $\mu\text{g mL}^{-1}$) para as bactérias Gram-negativa e Gram-positiva, respectivamente. Em relação aos fungos, foram utilizados a Anfotericina (faixa testada: 31,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 0,24 $\mu\text{g mL}^{-1}$) para *C. glabrata* e Ciclopirox olamina (faixa testada: 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 1,56 $\mu\text{g mL}^{-1}$) contra *C. albicans*. O controle do diluente foi uma solução de DMSO em água a 20% v v⁻¹.

Em seguida, a diluição seriada foi realizada com auxílio de uma micropipeta multicanal e subsequentemente, 100 μL do inóculo bacteriano ajustado de acordo com a escala 0,5 de McFarland (aproximadamente 10^8 UFC mL^{-1}) foi adicionado nos poços. Por fim, as placas com inóculos bacterianos foram lacradas e incubadas por 24 horas na temperatura de 37°C e as placas com inóculos fúngicos por 72 horas a 26°C. O resultado da microdiluição foi confirmado através de observação visual da ausência de crescimento microbiano nos poços da placa e por adição de 10 μL de uma solução de 5 mg mL^{-1} de MTT (brometo de (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolio), nos poços onde foram observados ausência de crescimento microbiano com posterior incubação nas mesmas condições descritas anteriormente.

5.6.7 Concentração microbicida mínima (CMM)

Posteriormente a leitura do ensaio de microdiluição em caldo, retirou-se uma alçada dos poços que apresentaram inibição do crescimento e semeou-se nos meios ágar nutriente para as bactérias ágar de levedura e malte para os fungos. As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C para bactérias e para fungos por 72 horas a 26°C. Após o período de incubação, foi realizada a leitura das placas para avaliar a ocorrência de crescimento microbiano.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Composição fitoquímica

A análise da triagem fitoquímica do extrato etanólico das folhas de *S. terebinthifolius* permitiu inferir os metabólitos secundários presentes. O resultado desta triagem (quadro 3) apresentou positividade para cumarinas voláteis, triterpenos no teste de Liebermann-Burchard, taninos hidrolisáveis e esteróides no teste de Salkowski no extrato etanólico das folhas de *S. terebinthifolius*. No trabalho de Miranda *et al.* (2016) (2015), realizado no município de São Luís, estado do Maranhão, também foi evidenciada a presença de taninos hidrolisáveis, esteróides e triterpenos nos extratos hidroalcoólicos da casca do caule de amostras de *S. terebinthifolius* analisadas.

Quadro 3. Triagem fitoquímica do extrato etanólico das folhas de *S. terebinthifolius*

Metabólitos	Extrato foliar
Alcaloides	-
Glicosídeos Cardiotônicos	-
Cumarinas voláteis	+
Triterpenos	+ (Liebermann-Burchard)
Esteróides	+ (Salkowski)
Taninos hidrolisáveis	+
Saponinas	-

O sinal (+) indica presença e (-) indica ausência do metabólito secundário no extrato foliar testado.

As cumarinas, estruturalmente, são lactonas do ácido o-hidroxicinâmico (2H-1-benzopiran-2-ona) (WANG *et al.*, 2020). São compostos de baixo peso molecular, presentes em plantas e podem ser sintetizados quimicamente. Apresentam efeitos biológicos, tais como: atividade antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, antiarrítmica e antiviral, por isso, despertam interesse da área farmacêutica. Atualmente, alguns anticoagulantes como a varfarina, derivado cumarina, são amplamente empregados no tratamento de trombozes e derrames isquêmicos (OSTROWSKA, 2020).

Os triterpenos são constituídos por subunidades de isopreno e pertencem ao grupo dos terpenos. Apresentam atividades antimicrobiana, anti-inflamatória, antitumoral, cardioprotetor e analgésica (MUFFLER *et al.*, 2011; CANO-FLORES, 2013). Os esteroides vegetais são estruturalmente semelhantes ao colesterol. Os fitoesteróis exercem efeitos biológicos relacionados a redução da absorção do colesterol da dieta, por conseguinte, exibe atividade cardioprotetora (PEREIRA; CARDOSO, 2012). Os taninos são compostos fenólicos classificados em dois grupos: hidrolisáveis e condensados. São solúveis em água e responsáveis pela propriedade adstringente presente em determinadas frutas e produtos vegetais. Esses compostos exercem atividade antimicrobiana, anticarcinogênica, cicatrizante, anti-inflamatória e antisséptica (MONTEIRO *et al.*, 2005).

6.2 Otimização da síntese verde de nanopartículas de prata

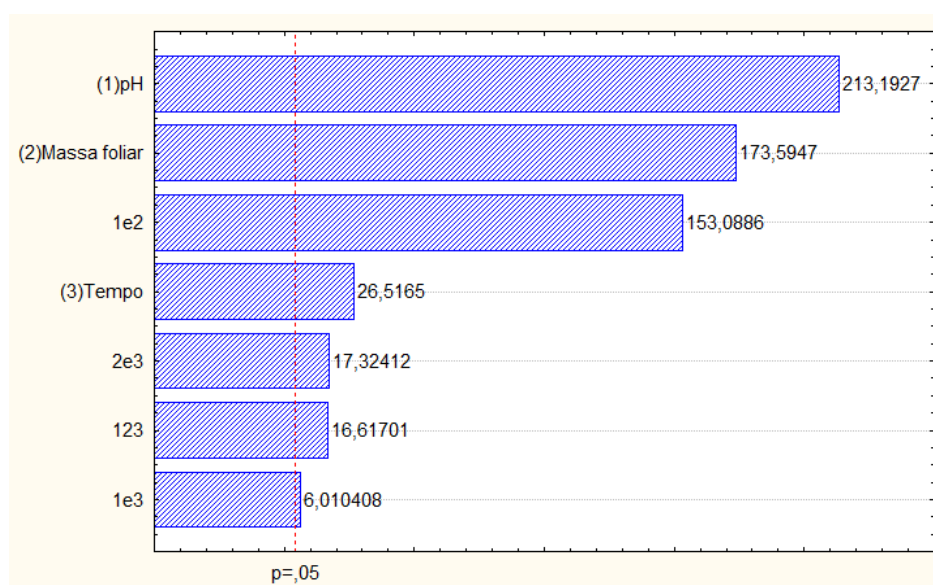
6.2.1 Planejamento fatorial completo 2^3 e análise das variáveis

Os procedimentos de otimização multivariados permitem a redução do número de experimentos, são mais econômicos, mais rápidos e possibilitam avaliar os efeitos das interações entre os fatores (TARLEY *et al.*, 2009). Nesse sentido, os planejamentos fatoriais são empregados na etapa inicial de triagem da otimização, na qual, todos os fatores são testados para indicar aqueles mais significativos sobre o processo analisado (NOVAES *et al.*, 2017). A resposta para o planejamento foi a absorbância (quadro 4), visto que, este parâmetro está relacionado com o rendimento na formação das nanopartículas num sistema coloidal. De acordo quadro baixo, no experimento oito, no qual, os fatores foram analisados no maior nível, obteve-se a maior absorbância.

Quadro 4. Resultado do planejamento fatorial completo 2³

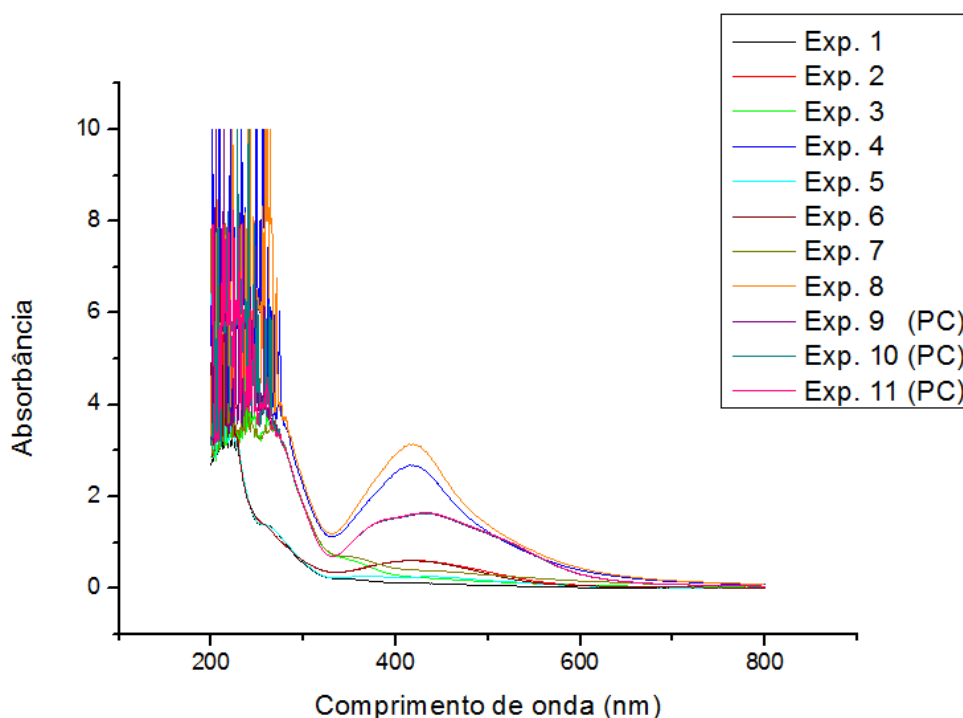
	pH	Massa foliar (g)	Tempo (min)	Absorbância
1	-1 (5)	-1 (2)	-1 (30)	0,11
2	+1 (9)	-1 (2)	-1 (30)	0,61
3	-1 (5)	+1 (6)	-1 (30)	0,25
4	+1 (9)	+1 (6)	-1 (30)	2,68
5	-1 (5)	-1 (2)	+1 (90)	0,25
6	+1 (9)	-1 (2)	+1 (90)	0,60
7	-1 (5)	+1 (6)	+1 (90)	0,40
8	+1 (9)	+1 (6)	+1 (90)	3,15
9	0 (7)	0 (4)	0 (60)	1,60
10	0 (7)	0 (4)	0 (60)	1,61
11	0 (7)	0 (4)	0 (60)	1,62

O gráfico de Pareto permite a identificação dos fatores que afetam a síntese das nanopartículas de prata a partir do extrato aquoso das folhas da *S. terebinthifolius*. Nesse gráfico, as barras horizontais indicam os efeitos das variáveis principais e das interações entre as mesmas, bem como, a linha de significância do $p = 0,05$ demonstra se os fatores e as interações foram estatisticamente significativos. Neste trabalho, as três variáveis estudadas: pH, massa foliar e tempo de acordo com o Pareto foram significativas sobre a síntese, bem como as suas interações (figura 12).

Figura 12. Gráfico de Pareto evidenciando as variáveis e interações significativas.

A figura 13 apresenta os espectros de absorção UV das onze reações de síntese de acordo com o planejamento fatorial completo 2^3 e no comprimento de onda 418 nm observou-se o pico de absorção. De acordo com a literatura, as nanopartículas de prata apresentam uma banda de absorção localizada na faixa entre 400 nm a 500 nm no espectro UV, sendo dependente da morfologia, tamanho e metabólitos secundários do meio (VINAYAGAM; VARADAVENKATESAN; SELVARAJ, 2018).

Figura 13. Espectroscopia de absorção UV das nanopartículas de prata.



Primeiramente, a mudança de cor na solução coloidal é o primeiro sinal indicativo da formação de nanopartículas. Tal fato, pode ser atribuído a redução dos íons de prata pelo extrato aquoso das folhas da *S. terebinthifolius*. No que tange a influência das variáveis analisadas: pH, massa foliar e tempo de reação sobre a síntese verde das AgNPs; o aumento do tempo de reação resultou no aumento gradual da absorbância e intensidade da cor durante o período de reação indicando aumento na concentração de nanopartículas, sendo o mesmo evento evidenciado no trabalho de Verma e Mehata (2016) com o extrato aquoso de folhas de *Azadirachta indica* para sintetizar AgNPs, como também demonstrado por Jalilian et al. (2020) no seu estudo com o extrato aquoso de *Allium ampeloprasum*.

Em relação ao extrato aquoso das folhas de *S. terebinthifolius*, o aumento da massa foliar resultou no aumento dos espectros de absorbância o que indica maiores rendimentos na síntese das nanopartículas. Asimuddin *et al.* (2018) em seu trabalho com extrato de folhas da *Azadirachta indica* como agente redutor para síntese de AgNPs e no estudo de Azizian-Shermeh, Einali e Ghasemi (2017) sobre síntese de nanopartícula de prata a partir do extrato aquoso das folhas *Maclura pomifera* também observaram esse fato. Os compostos fitoquímicos presentes nas folhas atuam como agentes redutores dos cátions de prata (Ag^+), por consequência, à medida que a concentração do extrato da folha aumenta, maior quantidade de biomoléculas são disponíveis no meio (GOMATHI *et al.*, 2020; BENAKASHANI; ALLAFCHIAN; JALALI, 2016).

No que se refere ao pH, em meio básico e neutro, pH 9 e 7, respectivamente, a mudança de cor ocorreu rapidamente, em relação ao meio ácido, pH 5. O ambiente ácido suprimiu a síntese de AgNPs, sendo esse fato evidenciado também por Yadav *et al.* (2019), que concluiu a partir dessa evidência que a intensidade das bandas de absorção e a cor da mistura eram dependentes do pH. Parthiban *et al.* (2019) afirmou com base nos resultados encontrados no seu trabalho que a alta concentração de moléculas protonadas no extrato da *Annona reticulata*, devido ao pH em torno de 6,5, impediu a redução do nitrato de prata. Contudo, a alteração do pH após a adição de hidróxido de sódio (NaOH) provoca ionização das biomoléculas presentes do extrato e consequentemente, a síntese de nanopartículas.

Em relação aos experimentos que empregaram o pH básico, o processo de biossíntese ocorreu em todos com aumento da taxa de reação de redução, tal fato, observado com a coloração intensa durante o período de síntese e maiores espectros de absorbância. Nos trabalhos de Khalil *et al.* (2014) e Azizian-Shermeh, Einali e Ghasemi (2017) o pH básico também se apresentou melhor para biossintetizar as AgNPs. O pH do meio é um parâmetro importante que interfere nas cargas elétricas das biomoléculas. A mudança do pH altera a carga dos fitoquímicos contidos no extrato, o que afeta as etapas do processo de síntese, ou seja, o pH interfere na ionização dos fitocompostos presentes no extrato da folha (AJITHA *et al.*, 2018).

6.2.2 Superfície de resposta: Box Behnken (BBD)

Os fatores significativos do planejamento serão analisados novamente através do desenho experimental de superfície de resposta para estabelecer as condições críticas para o processo estudado. O desenho Box Behnken (figuras 14 e 15) permite obter superfícies de respostas e a partir dos resultados gerados por essa metodologia as condições críticas para a síntese de nanopartículas otimizadas foram determinadas (FERREIRA *et al.*, 2018). Posteriormente a etapa de planejamento fatorial completo 2^3 , foi realizada a otimização através da metodologia de superfície de resposta BBD para três fatores dando o total de quinze experimentos (quadro 5).

Quadro 5. Matriz da superfície de resposta Box Behnken com a resposta absorvância

	pH	Massa foliar (g)	Tempo (min)	Absorvância
1	-1 (8)	-1 (6)	0 (120)	2,80
2	+1 (10)	-1 (6)	0 (120)	3,88
3	-1 (8)	+1 (10)	0 (120)	3,53
4	+1 (10)	+1 (10)	0 (120)	4,09
5	-1 (8)	0 (8)	-1 (60)	2,49
6	+1 (10)	0 (8)	-1 (60)	3,78
7	-1 (8)	0 (8)	+1 (180)	2,76
8	+1 (10)	0 (8)	+1 (180)	4,28
9	0 (9)	-1 (6)	-1 (60)	3,62
10	0 (9)	+1 (10)	-1 (60)	3,39
11	0 (9)	-1 (6)	+1 (180)	4,05
12	0 (9)	+1 (10)	+1 (180)	5,31
13	0 (9)	0 (8)	0 (120)	3,87
14	0 (9)	0 (8)	0 (120)	3,87
15	0 (9)	0 (8)	0 (120)	3,81

De acordo com os dados apresentados nas superfícies de resposta (figuras 14 e 15), pode-se concluir a partir da área com tonalidade mais intensa, vermelho escuro, os parâmetros para a condição ideal do processo de otimização: pH 9,5; massa foliar de 10 gramas e tempo de reação de 180 minutos.

Figura 14. BBD: tempo X pH

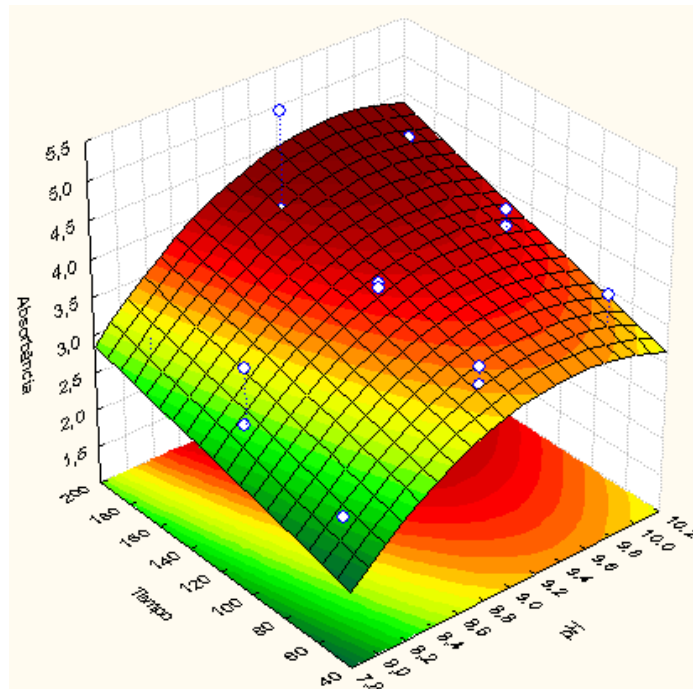
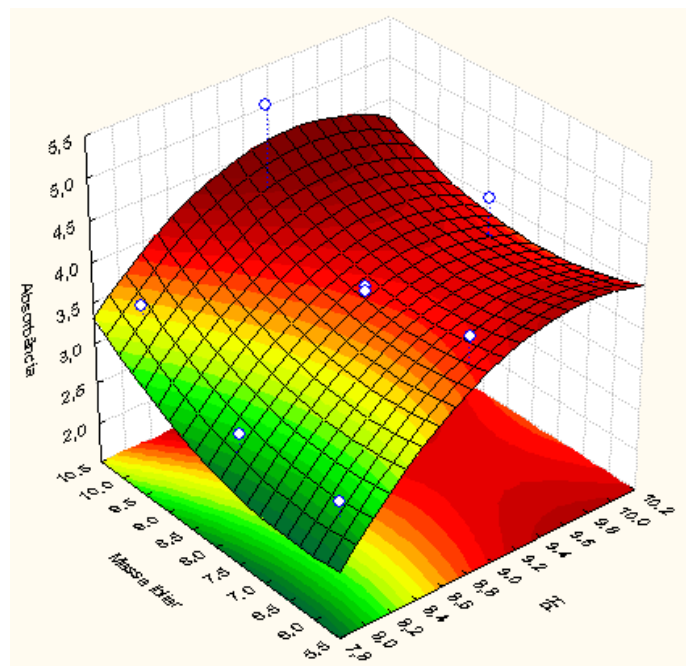


Figura 15. BBD: massa foliar X pH



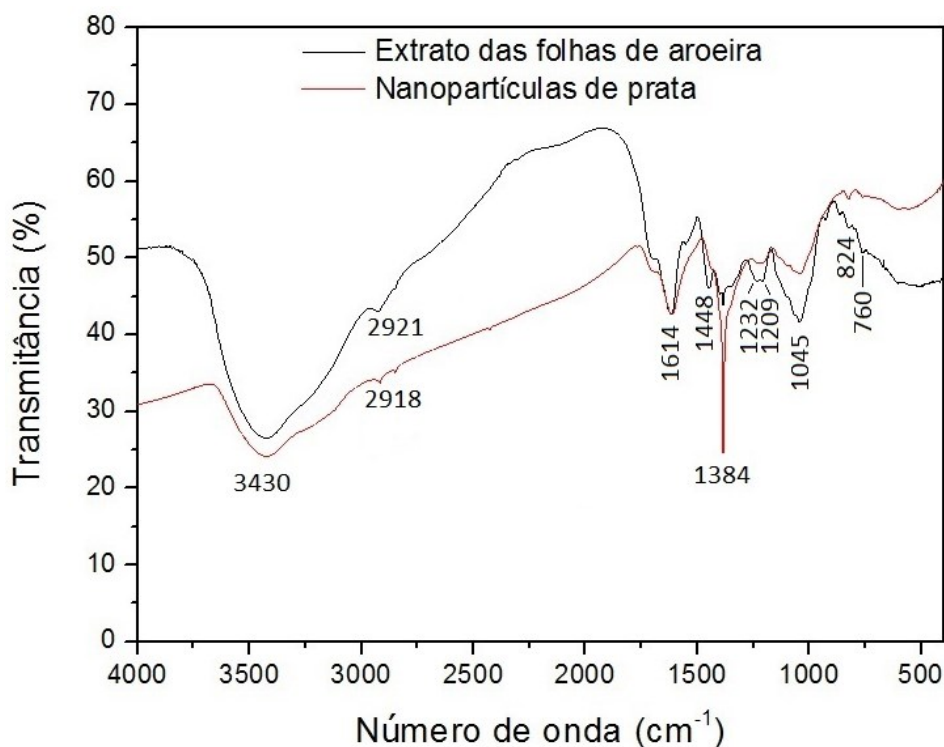
6.3. Caracterização das nanopartículas de prata

6.3.1 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

As nanopartículas de prata sintetizadas e o extrato aquoso das folhas de *S. terebinthifolius* foram analisadas por FTIR a fim de investigar a presença de grupos funcionais que contribuíram para a redução dos íons Ag^+ a Ag^0 e revestimento das AgNPs. A figura 16, mostra os espectros obtidos por FTIR do extrato aquoso das folhas da aroeira e das nanopartículas de prata sintetizadas a partir desse extrato. Analisando esta figura, observa-se que a banda 3430 cm^{-1} que corresponde ao grupo OH presente em álcoois e compostos fenólicos (DEV *et al.*, 2018).

As bandas 2918 cm^{-1} e 2921 cm^{-1} referem-se ao grupo C-H que constituem a estrutura química de grupos orgânicos e a banda 1614 cm^{-1} indica a presença de C=C de anéis aromáticos presentes em taninos hidrolisáveis e cumarinas (A VIJAYAKUMARI; A SINTHIYA, 2018). As bandas 1448 cm^{-1} e 1384 cm^{-1} podem representar dobramentos CH_2 e CH_3 , respectivamente, sendo associados a estrutura de compostos orgânicos (QAIS *et al.*, 2020). As bandas 1232 cm^{-1} , 1209 cm^{-1} e 1045 cm^{-1} podem ser atribuídas ao grupamento C-O presente em álcoois e ésteres (RAJ; MALI; TRIVEDI, 2018).

Figura 16. FTIR do extrato aquoso das folhas de aroeira e da AgNP sintetizadas.

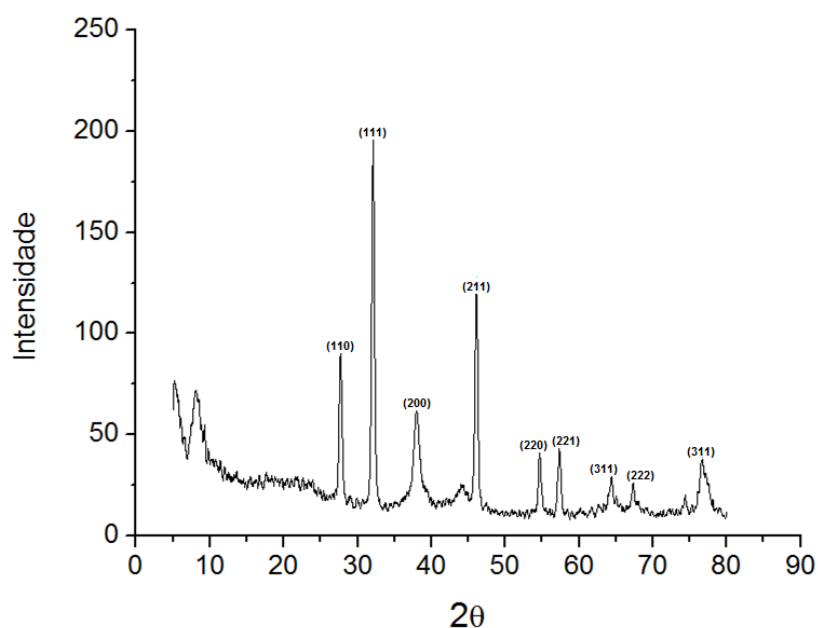


6.3.2 Difração de Raios-X (DRX)

A estrutura cristalina das nanopartículas de prata sintetizadas foi confirmada por análise de DRX. A figura 17 demonstra a presença dos picos de difração observados na região 2θ , sendo encontrados nos ângulos $26,64^\circ$, $32,78^\circ$, $38,03^\circ$, $47,04^\circ$, $54,88^\circ$, $58,51^\circ$, $68,71^\circ$, $77,47^\circ$ e $65,41^\circ$; correspondentes aos planos cristalográficos (110), (111), (200), (211), (220), (221), (222) e (311), respectivamente. O resultado evidenciou que as nanopartículas apresentavam estrutura cristalina cúbica de face centrada e demonstrou a formação de nanopartículas de prata (ICDD: 04-0783) e de nanopartículas de óxido de prata (ICDD: 76-1393) provavelmente, ocorreram reações químicas paralelas a redução da prata metálica.

No trabalho de Dangi *et al.* (2020) também foi relatado a presença de picos característicos, tendo como possíveis causas a presença de óxido de prata e compostos fitoquímicos que atuaram como agentes redutores. Tal fato, pode indicar o revestimento das AgNPs por grupos orgânicos presentes no extrato aquoso, em conformidade com o resultado do FTIR (HAMED; SHOJAOSADATI, 2019). O estudo de Jemal, Sandeep e Pola (2017) revelou a partir do DRX a presença de picos correspondentes a nanopartículas de óxido de prata.

Figura 17. Difratoograma: estrutura cristalina das AgNPs sintetizadas.

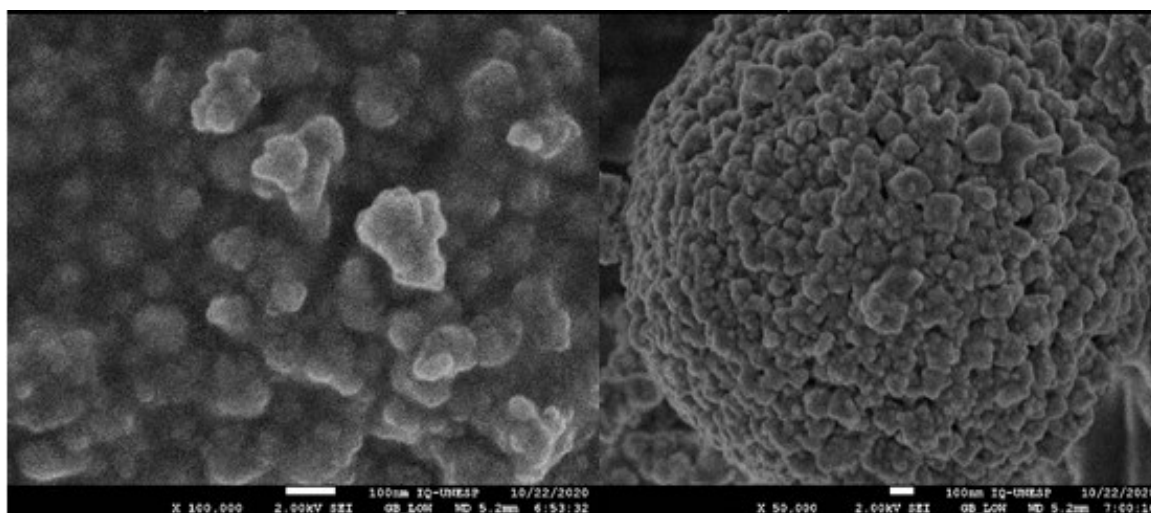


O DRX permite a estimativa do tamanho do cristalito a partir da equação de Scherrer, $D = K\lambda / \beta \cos\theta$. D é o tamanho do cristalito; λ é o comprimento de onda (1,542); β é a largura a meia altura do pico cristalográfico (FWHM); θ é o ângulo de difração de Bragg e K é constante que depende da forma das partículas (esférica = 0,94) (ESMAILE; KOOHESTANI; ABDOLLAH-POUR, 2020; UVAROV; POPOV, 2013). No presente trabalho, o tamanho médio estimado do cristalito foi de 40,62 nm. Contudo, durante o processo de biorredução foram sintetizadas nanopartículas de prata e paralelamente, a formação de nanopartículas de óxido de prata, como observado do difratograma. Assim como, a presença de picos característicos de ambas nanopartículas, fato que pode interferir no tamanho médio estimado do cristalito encontrado nesse estudo.

6.3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia das nanopartículas foi avaliada através do MEV. A partir da análise da figura 18, pode-se inferir que as AgNPs apresentam formato predominante esférico, como também, algumas nanopartículas não apresentam esférico bem definido. Observa-se a presença de aglomerados sem ocorrer a fusão das nanopartículas. Kumar *et al.* (2019) em seu trabalho também verificou a presença de nanopartículas esféricas e seus aglomerados. De acordo com o mesmo autor, o revestimento das nanopartículas de prata pelos metabólitos secundários do extrato vegetal empregado como agente redutor, é o principal fator para a formação dos agregados.

Figura 18. Microscopia eletrônica de varredura das AgNPs sintetizadas.



6.4 Avaliação da atividade antimicrobiana

O resultado da atividade antimicrobiana (quadro 6) das AgNPs sintetizadas e do extrato aquoso das folhas de *S. terebinthifolius* estão em conformidade a literatura. As Ag NPs apresentaram efeito fungistático contra as espécies de *Candida* testadas com valor de CIM de 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ enquanto que, o extrato mostrou esse efeito apenas contra *C. albicans* com valor de CIM de 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Umai, Vikranth e Meenambiga (2020), demonstraram a atividade das nanopartículas de prata sintetizadas a partir da *Olea europaea* contra *C. albicans*, bem como a sua atividade antibiofilme contra o mesmo fungo. Dutta *et al.* (2020) também evidenciaram a eficácia antifúngica e antibiofilme das AgNPs sintetizadas a partir *Citrus limetta* contra *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. albicans* e *C. parapsilosis*.

A partir dos dados expostos, também é possível inferir que as nanopartículas de prata sintetizadas expressaram maior eficácia antifúngica em comparação ao extrato foliar da aroeira. O trabalho de Kischkel *et al.* (2018) com nanopartículas de prata sintetizadas a partir do extrato da *Mikania glomerat* Sprengel, apresentou resultado semelhante, as AgNPs exibiram efeito antifúngico e o extrato não mostrou atividade. Segundo Dutta *et al.* (2020), as nanopartículas de prata provocam danos a membrana e parede fúngica aumentando a permeabilidade das AgNPs, promovem o aumento de espécies reativas de oxigênio e extravasamento de componentes intracelulares.

Quadro 6: Atividade antimicrobiana do extrato aquoso das folhas de *S. terebinthifolius* e AgNPs, expressos em valores de CIM e CMM, ambos em $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Amostras	Sa		Bc		Bs		Pa		Ca		Cg	
	CIM	CMM	CIM	CMM	CIM	CMM	CIM	CMM	CIM	CMM	CIM	CMM
EST	1000	-	1000	-	2000	-	2000	-	500	-	-	-
AgNPs	500	-	125	-	250	-	250	1000	250	-	250	-
Benzil-penicilina	0,19	-	3,12	-	0,19	-	-	-	-	-	-	-
Gentamicina	-	-	-	-	-	-	3,90	-	-	-	-	-
Anfotericina B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,95	-
Ciclopirox olamina	-	-	-	-	-	-	-	-	12,5	-	-	-

Sa – *Staphylococcus aureus*; **Bc** – *Bacillus cereus*; **Bs** – *Bacillus subtilis*; **Pa** – *Pseudomonas aeruginosa*; **Ca** – *Candida albicans*; **Cg** – *Candida glabrata*; **EST** – extrato aquoso das folhas de *S. terebinthifolius*; **AgNPs** – nanopartículas de prata sintetizadas a partir do extrato aquoso das folhas de *S. terebinthifolius*; **CMM** – concentração microbicida mínima; **CIM** – concentração inibitória mínima.

Os resultados obtidos demonstraram que tanto o extrato com CIM de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*; e 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa*; quanto as AgNPs sintetizadas a partir do extrato com CIM de 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para *P. aeruginosa*, 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para *B. cereus*, 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para *S. aureus* e 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para *B. subtilis* apresentaram efeito bacteriostático para todas as bactérias testadas. Assim como, as AgNPS demonstraram atividade bactericida contra *P. aeruginosa* com CMM de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Devi *et al.* (2020) também evidenciaram a maior efetividade das nanopartículas de prata sintetizadas a partir do extrato metanólico de *Aegle marmelos* frente ao extrato da mesma fruta contra *P. aeruginosa*, *B. cereus* e *S. aureus*. Bem como, Tamilarasi e Meena (2020) observaram atividade antibacteriana das nanopartículas de prata sintetizadas a partir do extrato da folha *Gomphrena globosa* contra *B. subtilis*.

Dentre os microrganismos avaliados, as AgNPs apresentaram melhor atividade contra a bactéria *P. aeruginosa*. Ravichandran *et al.* (2016), no seu trabalho sobre atividade antimicrobiana de nanopartículas de prata sintetizadas a partir do extrato de *Atrocarpus altilis* também evidenciaram maior suscetibilidade de bactérias Gram-negativas, *Escherichia coli* e *P. aeruginosa*, a ação antimicrobiana das AgNPs. De acordo com Yin *et al.* (2020), o grupo bacteriano Gram-negativo é mais suscetível a ação das nanopartículas de prata devido à parede bacteriana delgada que apresenta menor quantidade de peptidoglicano, por conseguinte, permite maior penetração das AgNPs.

O efeito das nanopartículas contra *P. aeruginosa* foi relevante já que esta bactéria é comumente associada as Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS), que representa uma problemática no ambiente das unidades de saúde, devido a sua capacidade de expressar resistência aos antimicrobianos (ARAÚJO; PEREIRA, 2017). Esse tipo de infecção em âmbito hospitalar ocorre após as primeiras 72 horas de internação ou posteriormente, a alta do paciente no prazo de 72 horas e os custos dessas infecções impõem um encarecimento do atendimento, devido ao aumento das demandas terapêuticas, como gastos com medicações, permanência hospitalar e da morbimortalidade (SANTOS; ALMEIDA NETO; FREITAS, 2016; SOARES *et al.*, 2017).

Assim, nesse contexto, as nanopartículas de pratas apresentam-se como uma nova perspectiva antimicrobiana que futuramente, após mais estudos sobre sua citotoxicidade, segurança e eficácia, podem ser empregadas terapeuticamente.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O extrato aquoso das folhas da *Schinus terebinthifolius* Raddi foi um agente redutor eficaz para sintetizar nanopartículas de prata, demonstrando que o processo de síntese verde mediado por extratos vegetais é simples, apresenta baixo custo e resulta em nanocompostos ambientalmente mais seguros com maior potencial biológico. O resultado do planejamento fatorial 2^3 realizado neste trabalho, indicou que as três variáveis analisadas: pH, tempo e massa foliar foram significantes na síntese verde de nanopartícula de prata sintetizadas a partir do extrato da *S terebinthifolius*. A partir das informações adquiridas nessa primeira etapa da otimização foi possível a realização do Box Behnken para obtenção das condições ótimas para a síntese verde das AgNPs. A avaliação da atividade antimicrobiana evidenciou que as nanopartículas de prata apresentaram maior efetividade contra todos os microrganismos testados em relação ao extrato aquoso das folhas; bem como ação bactericida das AgNPs contra *P. aeruginosa*, demonstrando a eficácia do nanomaterial biossintetizado frente a uma bactéria de importância no ambiente hospitalar.

REFERÊNCIAS

AHMED, Shakeel et al. A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: A green expertise. *Journal Of Advanced Research*, v. 7, n. 1, p.17-28, jan. 2016.

AJITHA, B. et al. Synthesis of silver nanoparticles in an eco-friendly way using *Phyllanthus amarus* leaf extract: Antimicrobial and catalytic activity. **Advanced Powder Technology**, v. 29, n. 1, p.86-93, jan. 2018.

AKTER, Mahmuda et al. A systematic review on silver nanoparticles-induced cytotoxicity: Physicochemical properties and perspectives. **Journal Of Advanced Research**, v. 9, p.1-16, jan. 2018.

ALSAMMARRAIE, Fouad K. et al. Green synthesis of silver nanoparticles using turmeric extracts and investigation of their antibacterial activities. *Colloids And Surfaces B: Biointerfaces*, v. 171, p.398-405, nov. 2018.

AMORIM, Melania Maria Ramos de; SANTOS, Luiz Carlos. Tratamento da vaginose bacteriana com gel vaginal de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi): ensaio clínico randomizado. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 25, n. 2, p.95-102, mar. 2003

ANTUNES, Fabiana Sedina *et al.* Synthesis, characterization and application of silver nanoparticles as antimicrobial agents. **Estudos Tecnológicos em Engenharia**, v. 9, n. 1, p.20-26, jan. 2013.

ARAÚJO, Beatriz Torres; PEREIRA, Daniella Cristina Rodrigues. Policies for control Health Care-Related Infections (IRAS) in Brazil, 2017. *Comunicação em Ciências da Saúde*, v. 3, n. 28, p. 333-342, 2017.

ARAÚJO, Floricéa M. *et al.* Antibacterial activity and chemical composition of the essential oil of *Croton heliotropiifolius* Kunth from Amargosa, Bahia, Brazil. **Industrial Crops And Products**, [S.L.], v. 105, p. 203-206, out. 2017.

ASIMUDDIN, M. *et al.* Azadirachta indica based biosynthesis of silver nanoparticles and evaluation of their antibacterial and cytotoxic effects. **Journal Of King Saud University - Science**, p.1-9, set. 2018.

A VIJAYAKUMARI,; A SINTHIYA,. Biosynthesis of Phytochemicals Coated Silver Nanoparticles Using Aqueous Extract of Leaves of *Cassia alata* – Characterization, Antibacterial and Antioxidant Activities. **International Journal Of Pharmaceutical And Clinical Research**, S.i, v. 10, n. 5, p. 138-149, 2018.

AZIZIAN-SHERMEH, Omid; EINALI, Alireza; GHASEMI, Ali. Rapid biologically one-step synthesis of stable bioactive silver nanoparticles using Osage orange (*Maclura pomifera*) leaf extract and their antimicrobial activities. **Advanced Powder Technology**, v. 28, n. 12, p.3164-3171, dez. 2017.

BALAKUMARAN, M.D. *et al.* Mycosynthesis of silver and gold nanoparticles: Optimization, characterization and antimicrobial activity against human pathogens. **Microbiological Research**, v. 182, p.8-20, jan. 2016.

BAPTISTA, Pedro V. et al. Nano-Strategies to Fight Multidrug Resistant Bacteria — “A Battle of the Titans”. **Frontiers In Microbiology**, v. 9, p.1-26, 2 jul. 2018.

BARILLO, David J.; MARX, David E. Silver in medicine: A brief history BC 335 to present. **Burns**, v. 40, p.3-8, dez. 2014.

BEHRAVAN, Mahmoodreza *et al.* Facile green synthesis of silver nanoparticles using Berberis vulgaris leaf and root aqueous extract and its antibacterial activity. **International Journal Of Biological Macromolecules**, v. 124, p.148-154, mar. 2019.

BENAKASHANI, F.; ALLAFCHIAN, A.R.; JALALI, S.A.H.. Biosynthesis of silver nanoparticles using Capparis spinosa L. leaf extract and their antibacterial activity. **Karbala International Journal Of Modern Science**, v. 2, n. 4, p.251-258.

BESSA, Tatiana; TERRONES, Manuel Gonzalo Hernandez; SANTOS, Douglas Queiroz. Avaliação fitotóxica e identificação de metabólitos secundários da raiz de Cenchrus echinatus. **Revista Horizonte Científico**, Uberlândia, v. 1, n. 1, p.1-17, mar. 2007.

BEYTH, Nurit *et al.* Alternative Antimicrobial Approach: Nano-Antimicrobial Materials. **Evidence-based Complementary And Alternative Medicine**, v. 2015, p.1-16, 2015.

CAIRES, Taiara Aguiar *et al.* Biotechnological potential of Neolyngbya (Cyanobacteria), a new marine benthic filamentous genus from Brazil. **Algal Research**, v. 36, p. 1-9, dez. 2018.

CANO-FLORES, Arturo. Biotransformación de triterpenos con diferentes microorganismos. **Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas**, México, v. 44, n. 4, p. 7-16, abr. 2013.

CARVALHO, J. A. M. *et al.* Composição Química e Avaliação da Atividade Antimicrobiana do Óleo de Pimenta Rosa (Schinus terebinthifolius). **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, p.59-63, abr. 2017.

CHERNOUSOVA, Svitlana; EPPLE, Matthias. Silver as Antibacterial Agent: Ion, Nanoparticle, and Metal. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 52, n. 6, p.1636-1653, 17 dez. 2012.

CHUNG, III-Min *et al.* Plant-Mediated Synthesis of Silver Nanoparticles: Their Characteristic Properties and Therapeutic Applications. **Nanoscale Research Letters**, v. 11, n. 1, p.1-14, 28 jan. 2016.

COLE, E.R. *et al.* Chemical composition of essential oil from ripe fruit of *Schinus terebinthifolius* Raddi and evaluation of its activity against wild strains of hospital origin. **Brazilian Journal Of Microbiology**, v. 45, n. 3, p.821-828, set. 2014.

DAKAL, Tikam Chand *et al.* Mechanistic Basis of Antimicrobial Actions of Silver Nanoparticles. **Frontiers In Microbiology**, v. 7, p.1-17, 16 nov. 2016.

DANGI, Subas *et al.* Green synthesis of silver nanoparticles using aqueous root extract of *Berberis asiatica* and evaluation of their antibacterial activity. **Chemical Data Collections**, v. 28, p. 1-10, ago. 2020.

DAS, Balaram *et al.* Green synthesized silver nanoparticles destroy multidrug resistant bacteria via reactive oxygen species mediated membrane damage. **Arabian Journal Of Chemistry**, v. 10, n. 6, p.862-876, set. 2017.

DEV, Sona S. *et al.* Green synthesis of silver nanoparticles using leaf extract of *Ayapana triplinervis* and its antibacterial activity. **International Journal Of Pharmaceutical Sciences And Research**, v. 9, n. 9, p. 3897-3902, 2018.

DEVI, Mamta *et al.* Green synthesis of silver nanoparticles using methanolic fruit extract of *Aegle marmelos* and their antimicrobial potential against human bacterial pathogens. **Journal Of Traditional And Complementary Medicine**, v. 10, n. 2, p. 158-165, mar. 2020.

DUTTA, Tanmoy *et al.* Green synthesis of antibacterial and antifungal silver nanoparticles using *Citrus limetta* peel extract: experimental and theoretical studies. **Journal Of Environmental Chemical Engineering**, v. 8, n. 4, p. 1-9, ago. 2020.

EL-NOUR, Kholoud M.M. Abou *et al.* Synthesis and applications of silver nanoparticles. **Arabian Journal Of Chemistry**, v. 3, n. 3, p.135-140, jul. 2010.

ESMAILE, Faezeh; KOOHESTANI, Hassan; ABDOLLAH-POUR, Hassan. Characterization and antibacterial activity of silver nanoparticles green synthesized using *Ziziphora clinopodioides* extract. **Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management**, v. 14, p. 1-8, dez. 2020.

FAHIMIRAD, Shohreh; AJALLOUEIAN, Fatemeh; GHORBANPOUR, Mansour. Synthesis and therapeutic potential of silver nanomaterials derived from plant extracts. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, v. 168, p.260-278, jan. 2019.

FALCÃO, M. P. M. M. *et al.* Schinus terebinthifolius Raddi (Aroeira) e suas propriedades na Medicina Popular. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 10, n. 2, p.23-27, 9 dez. 2015.

FEDEL-MIYASATO, Lis E.S. *et al.* Evaluation of anti-inflammatory, immunomodulatory, chemopreventive and wound healing potentials from Schinus terebinthifolius methanolic extract. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, n. 5, p.565-575, set. 2014.

FERREIRA, Sergio L.C. *et al.* Multivariate optimization techniques in analytical chemistry - an overview. **Microchemical Journal**, v. 140, p.176-182, jul. 2018.

FERREIRA, Sergio L.C. *et al.* Multivariate optimization techniques in food analysis – A review. **Food Chemistry**, v. 273, p.3-8, fev. 2019.

FRANCI, Gianluigi *et al.* Silver Nanoparticles as Potential Antibacterial Agents. **Molecules**, v. 20, n. 5, p.8856-8874, 18 maio 2015.

GAILLET, Sylvie; ROUANET, Jean-max. Silver nanoparticles: Their potential toxic effects after oral exposure and underlying mechanisms – A review. **Food And Chemical Toxicology**, v. 77, p.58-63, mar. 2015.

GE, Liangpeng *et al.* Nanosilver particles in medical applications: synthesis, performance, and toxicity. **International Journal Of Nanomedicine**, p.2399-2407, maio 2014.

GHOSH, Nilanjana; PAUL, Samrat; BASAK, Piyali. Silver nanoparticles of moringa oleifera – green synthesis, characterisation and its antimicrobial efficacy. **Journal Of Drug Delivery And Therapeutics**, p.42-46, 25 jun. 2014.

GILBERT, Benjamin; FAVORETO, Rita. Schinus terebinthifolius Raddi. **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, v. 6, n. 1, p.43-56, dez. 2011.

GOMATHI, M. *et al.* Green synthesis of silver nanoparticles using Gymnema sylvestre leaf extract and evaluation of its antibacterial activity. **South African Journal Of Chemical Engineering**, v. 32, p.1-4, abr. 2020.

GOMES, F.S. *et al.* Antimicrobial lectin from Schinus terebinthifolius leaf. **Journal Of Applied Microbiology**, v. 114, n. 3, p.672-679, 28 dez. 2012.

GUAN, Qingxin; XIA, Chanchan; LI, Wei. Bio-friendly controllable synthesis of silver nanoparticles and their enhanced antibacterial property. **Catalysis Today**, p.1-8, maio 2018.

HAJIPOUR, Mohammad J. et al. Antibacterial properties of nanoparticles. **Trends In Biotechnology**, v. 30, n. 10, p.499-511, out. 2012.

HAMEDI, Sepideh; SHOJAOSADATI, Seyed Abbas. Rapid and green synthesis of silver nanoparticles using Diospyros lotus extract: evaluation of their biological and catalytic activities. **Polyhedron**, v. 171, p. 172-180, out. 2019.

HASNAIN, M Saquib *et al.* Purple heart plant leaves extract-mediated silver nanoparticle synthesis: Optimization by Box-Behnken design. **Materials Science And Engineering**, v. 99, p.1105-1114, jun. 2019.

INGALE, Arun G. Biogenic Synthesis of Nanoparticles and Potential Applications: An Eco- Friendly Approach. **Journal Of Nanomedicine & Nanotechnology**, v. 04, n. 02, p.1-7, 2013.

JAIN, Siddhant; MEHATA, Mohan Singh. Medicinal Plant Leaf Extract and Pure Flavonoid Mediated Green Synthesis of Silver Nanoparticles and their Enhanced Antibacterial Property. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p.1-13, 20 nov. 2017.

JALAL, Mohammad *et al.* Biosynthesis of Silver Nanoparticles from Oropharyngeal Candida glabrata Isolates and Their Antimicrobial Activity against Clinical Strains of Bacteria and Fungi. **Nanomaterials**, v. 8, n. 8, p. 1-12, 1 ago. 2018.

JALILIAN, Fereshteh *et al.* Green synthesized silver nanoparticle from Allium ampeloprasum aqueous extract: characterization, antioxidant activities, antibacterial and cytotoxicity effects. **Advanced Powder Technology**, [s.l.], v. 31, n. 3, p. 1323-1332, mar. 2020

JAMKHANDE, Prasad Govindrao et al. Metal nanoparticles synthesis: An overview on methods of preparation, advantages and disadvantages, and applications. **Journal Of Drug Delivery Science And Technology**, v. 53, p.1-11, out. 2019.

JEMAL, Kero; SANDEEP, B. V.; POLA, Sudhakar. Synthesis, Characterization, and Evaluation of the Antibacterial Activity of Allophylus serratus Leaf and Leaf Derived Callus Extracts Mediated Silver Nanoparticles. **Journal Of Nanomaterials**, v. 2017, p. 1-11, 2017.

KĘDZIORA, Anna *et al.* Similarities and Differences between Silver Ions and Silver in Nanoforms as Antibacterial Agents. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 19, n. 2, p.1-17, 2 fev. 2018.

KHALIL, Mostafa M.H. *et al.* Green synthesis of silver nanoparticles using olive leaf extract and its antibacterial activity. **Arabian Journal Of Chemistry**, v. 7, n. 6, p.1131-1139, dez. 2014.

KHAN, Ibrahim; SAEED, Khalid; KHAN, Idrees. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. **Arabian Journal Of Chemistry**, p.1-24, maio 2017.

KHARISSOVA, Oxana V. *et al.* The greener synthesis of nanoparticles. **Trends In Biotechnology**, v. 31, n. 4, p.240-248, abr. 2013.

KIM, Keuk-Jun *et al.* Antifungal activity and mode of action of silver nano-particles on *Candida albicans*. **Biometals**, v. 22, n. 2, p. 235-242, 4 set. 2008.

KUMAR, Vijay *et al.* Green synthesis of silver nanoparticles using leaf extract of *Holoptelea integrifolia* and preliminary investigation of its antioxidant, anti-inflammatory, antidiabetic and antibacterial activities. **Journal Of Environmental Chemical Engineering**, v. 7, n. 3, p. 1-7, jun. 2019.

KISCHKEL, Brenda *et al.* Nanopartículas de prata biossintetizadas por *Mikania glomerata* Sprengel inibem o crescimento de *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus*. **Arquivos de Ciências da Saúde**, v. 25, n. 3, p. 46-52, 20 dez. 2018.

KUPPUSAMY, Palaniselvam *et al.* Biosynthesis of metallic nanoparticles using plant derivatives and their new avenues in pharmacological applications – An updated report. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 24, n. 4, p.473-484, jul. 2016.

JALILIAN, Fereshteh *et al.* Green synthesized silver nanoparticle from *Allium ampeloprasum* aqueous extract: characterization, antioxidant activities, antibacterial and cytotoxicity effects. : Characterization, antioxidant activities, antibacterial and cytotoxicity effects. **Advanced Powder Technology**, p. 1-10, jan. 2020.

LIAO, Chengzhu; LI, Yuchao; TJONG, Sie. Bactericidal and Cytotoxic Properties of Silver Nanoparticles. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 20, n. 2, p. 1-47, 21 jan. 2019.

LOGAN, Latania K.; WEINSTEIN, Robert A. The Epidemiology of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae: The Impact and Evolution of a Global Menace. **The Journal Of Infectious Diseases**, v. 215, n. 1, p.28-36, 15 fev. 2017.

MAKAROV, V. V. *et al.* Green Nanotechnologies: Synthesis of Metal Nanoparticles Using Plants. **Acta Naturae**, v. 6, n. 1, p.35-44, jan. 2014.

MALIK, Parth *et al.* Green Chemistry Based Benign Routes for Nanoparticle Synthesis. **Journal Of Nanoparticles**, v. 2014, p.1-14, 2014.

MARX, David E.; BARILLO, David J. Silver in medicine: The basic science. **Burns**, v. 40, p.9-18, dez. 2014.

MIJNENDONCKX, Kristel *et al.* Antimicrobial silver: uses, toxicity and potential for resistance. **Biometals**, v. 26, n. 4, p.609-621, 15 jun. 2013.

MIRANDA, M.V. *et al.* Controle de Qualidade de Amostras Comerciais de Schinus terebinthifolius Raddi (Aroeira) Adquiridas em Mercados Públicos da Cidade de São Luís-MA. **Biota Amazônia**, [S.L.], v. 6, n. 1, p. 83-90, 30 mar. 2016. Revista Biota Amazonia.

MITTAL, Jitendra *et al.* Phytofabrication of nanoparticles through plant as nanofactories. **Advances In Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology**, v. 5, n. 4, p.1-10, 4 nov. 2014.

MÖHLER, Jasper S. *et al.* Silver bullets: A new lustre on an old antimicrobial agent. **Biotechnology Advances**, v. 36, n. 5, p.1391-1411, set. 2018.

MONTEIRO, Julio Marcelino *et al.* Taninos: uma abordagem da química à ecologia. : uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 892-896, out. 2005

MUFFLER, Kai *et al.* Biotransformation of triterpenes. **Process Biochemistry**, [s.l.], v. 46, n. 1, p. 1-15, jan. 2011.

MURUGAN, Kasi *et al.* Biosynthesis of silver nanoparticles using Acacia leucophloea extract and their antibacterial activi. **International Journal Of Nanomedicine**, p.2431-2438, maio 2014.

NOVAES, Cleber G. *et al.* Optimization of Analytical Methods Using Response Surface Methodology - Part I: Process Variables. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 3, p.1184-1215, 2017.

OSTROWSKA, Kinga. Coumarin-piperazine derivatives as biologically active compounds. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 28, n. 2, p. 220-232, fev. 2020.

OUAY, Benjamin Le; STELLACCI, Francesco. Antibacterial activity of silver nanoparticles: A surface science insight. **Nano Today**, v. 10, n. 3, p.339-354, jun. 2015.

PADALIA, Hemali; MOTERIYA, Pooja; CHANDA, Sumitra. Green synthesis of silver nanoparticles from marigold flower and its synergistic antimicrobial potential. **Arabian Journal Of Chemistry**, v. 8, n. 5, p.732-741, set. 2015.

PAREEK, Vikram; GUPTA, Rinki; PANWAR, Jitendra. Do physico-chemical properties of silver nanoparticles decide their interaction with biological media and bactericidal action? A review. **Materials Science And Engineering**, v. 90, p.739-749, set. 2018.

PARK, Youmie. A New Paradigm Shift for the Green Synthesis of Antibacterial Silver Nanoparticles Utilizing Plant Extracts. **Toxicological Research**, v. 30, n. 3, p.169-178, 30 set. 2014.

PARTHIBAN, Ezhumalai *et al.* Green synthesis of silver-nanoparticles from *Annona reticulata* leaves aqueous extract and its mosquito larvicidal and anti-microbial activity on human pathogens. **Biotechnology Reports**, v. 21, p.1-10, mar. 2019.

PEREIRA, Renata Junqueira; CARDOSO, Maria das Graças. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal Of Biotechnology And Biodiversity**, Palmas, v. 4, n. 3, p. 146-152, nov. 2012.

POLTE, Jörg. Fundamental growth principles of colloidal metal nanoparticles – a new perspective. **Crystengcomm**, v. 17, n. 36, p. 6809-6830, 2015.

QAIS, Faizan Abul et al. Green synthesis of silver nanoparticles using *Carum copticum*: assessment of its quorum sensing and biofilm inhibitory potential against gram negative bacterial pathogens. **Microbial Pathogenesis**, v. 144, p. 104172, jul. 2020.

RADHAKRISHNAN, Venkatraman Srinivasan et al. In vitro studies on oxidative stress-independent, Ag nanoparticles-induced cell toxicity of *Candida albicans*, an opportunistic pathogen. **International Journal Of Nanomedicine**, [S.L.], v. 13, p. 91-96, mar. 2018.

RAI, M.K. *et al.* Silver nanoparticles: the powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria. **Journal Of Applied Microbiology**, v. 112, n. 5, p.841-852, 28 mar. 2012.

RAJ, Shani; MALI, Suresh Chand; TRIVEDI, Rohini. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Enicostemma axillare* (Lam.) leaf extract. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, v. 503, n. 4, p. 2814-2819, set. 2018.

RAJESHKUMAR, S. Synthesis of silver nanoparticles using fresh bark of *Pongamia pinnata* and characterization of its antibacterial activity against gram positive and gram negative pathogens. **Resource-efficient Technologies**, v. 2, n. 1, p.30-35, mar. 2016.

RAJESHKUMAR, S.; BHARATH, L.V..Mechanism of plant-mediated synthesis of silver nanoparticles – A review on biomolecules involved, characterisation and antibacterial activity. **Chemico-biological Interactions**, v. 273, p.219-227, ago. 2017.

RAVICHANDRAN, Veerasamy *et al.* Green synthesis of silver nanoparticles using *Atrocarpus altilis* leaf extract and the study of their antimicrobial and antioxidant activity. **Materials Letters**, v. 180, p. 264-267, out. 2016.

RÓNAVÁRI, Andrea *et al.* Biosynthesized silver and gold nanoparticles are potent antimycotics against opportunistic pathogenic yeasts and dermatophytes. **International Journal Of Nanomedicine**, v. 13, p. 695-703, fev. 2018.

ROY, Anupam *et al.* Green synthesis of silver nanoparticles: biomolecule-nanoparticle organizations targeting antimicrobial activity. **Rsc Advances**, v. 9, n. 5, p.2673-2702, 2019.

RUDRAMURTHY, Gudepalya *et al.* Nanoparticles: Alternatives Against Drug-Resistant Pathogenic Microbes. **Molecules**, v. 21, n. 7, p.836-865, 27 jun. 2016.

SANA, Siva Sankar; DOGIPARTHI, Lakshman Kumar. Green synthesis of silver nanoparticles using *Givotia moluccana* leaf extract and evaluation of their antimicrobial activity. **Materials Letters**, v. 226, p.47-51, set. 2018.

SANTOS, Lauro Ricardo de Lima; ALMEIDA NETO, Omar Pereira de; FREITAS, Efigênia Aparecida Maciel de. Infections related to health care in adult intensive care units of adult hospitals: integrative review. **Revista de Atenção à Saúde**, São Caetano do Sul, v. 14, n. 48, p.66-71, jul. 2016.

SCHNEIDER, Gregor. Antimicrobial silver nanoparticles – regulatory situation in the European Union. **Materials Today: Proceedings**, v. 4, p.200-207, 2017.

SHARMA, Deepali; KANCHI, Suvardhan; BISETTY, Krishna. Biogenic synthesis of nanoparticles: A review. **Arabian Journal Of Chemistry**, p.1-25, nov. 2015.

SILVA, Luciano Paulino *et al.* Nanotecnologia verde para síntese de nanopartículas metálicas. *In*: RESENDE, Rodrigo Ribeiro *et al.* **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria**. S.i: Edgard Blücher, 2016. p. 967-1011.

SLAVIN, Yael N. *et al.* Metal nanoparticles: understanding the mechanisms behind antibacterial activity. **Journal Of Nanobiotechnology**, v. 15, n. 1, p.1-20, 3 out. 2017.

SOARES, Sara Gabrielly de Sousa Costa *et al.* Characterization of the infections related to health care in a teaching hospital in the Northeastern of Brazil. **Revista de Enfermagem da UFPI**, Teresina, v. 4, n. 2, p.37-43, abr. 2017.

SOOD, Richa; CHOPRA, Dimple Sethi. Metal–plant frameworks in nanotechnology: An overview. **Phytomedicine**, v. 50, p.148-156, nov. 2018.

SOUSA, Filipa *et al.* Current Insights on Antifungal Therapy: novel nanotechnology approaches for drug delivery systems and new drugs from natural sources. **Pharmaceuticals**, v. 13, n. 9, p. 1-30, 15 set. 2020.

SOUZA, Gustavo Duarte de *et al.* Prata: Breve histórico, propriedades e aplicações. **Educación Química**, México, v. 24, n. 1, p.14-16, jan. 2013.

TAMILARASI, P.; MEENA, P. Green synthesis of silver nanoparticles (Ag NPs) using *Gomphrena globosa* (Globe amaranth) leaf extract and their characterization. **Materials Today: Proceedings**, v. 33, p. 2209-2216, 2020.

TARLEY, César Ricardo Teixeira *et al.* Chemometric tools in electroanalytical chemistry: Methods for optimization based on factorial design and response surface methodology. **Microchemical Journal**, v. 92, n. 1, p.58-67, maio 2009.

UMAI, Devasena; VIKRANTH, Ananth; MEENAMBIGA, Setti Sudharsan. A study on the green synthesis of silver nanoparticles from *Olea europaea* and its activity against oral pathogens. **Materials Today: Proceedings**, [S.L.], p. 1-5, dez. 2020

UVAROV, Vladimir; POPOV, Inna. Metrological characterization of X-ray diffraction methods at different acquisition geometries for determination of crystallite size in nano-scale materials. **Materials Characterization**, v. 85, p. 111-123, nov. 2013.

VELUSAMY, Palaniyandi *et al.* Bio-Inspired Green Nanoparticles: Synthesis, Mechanism, and Antibacterial Application. **Toxicological Research**, v. 32, n. 2, p.95-102, 30 abr. 2016.

VERMA, Aparajita; MEHATA, Mohan Singh. Controllable synthesis of silver nanoparticles using Neem leaves and their antimicrobial activity. **Journal Of Radiation Research And Applied Sciences**, v. 9, n. 1, p.109-115, jan. 2016.

VIMBELA, Gina *et al.* Antibacterial properties and toxicity from metallic nanomaterials. **International Journal Of Nanomedicine**, v. 12, p.3941-3965, maio 2017.

VINAYAGAM, Ramesh; VARADAVENKATESAN, Thivaharan; SELVARAJ, Raja. Green synthesis, structural characterization, and catalytic activity of silver nanoparticles stabilized with *Bridelia retusa* leaf extract. **Green Processing And Synthesis**, v. 7, n. 1, p. 30-37, 23 fev. 2018.

WANG, Linlin; HU, Chen; SHAO, Longquan. The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future. **International Journal Of Nanomedicine**, v. 12, p.1227-1249, fev. 2017.

YADAV, Renuka *et al.* Bioengineering of *Piper longum* L. extract mediated silver nanoparticles and their potential biomedical applications. **Materials Science And Engineering: C**, v. 104, p.1-17, nov. 2019.

YIN, Iris Xiaoxue *et al.* The Antibacterial Mechanism of Silver Nanoparticles and Its Application in Dentistry. **International Journal Of Nanomedicine**, [S.L.], v. 15, p. 2555-2562, abr. 2020.

ZHANG, Xi-feng; LIU, Zhi-guo; SHEN, Wei; GURUNATHAN, Sangiliyandi. Silver Nanoparticles: synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 17, n. 9, p. 1534, 13 set. 2016.

ZHENG, Kaiyuan et al. Antimicrobial silver nanomaterials. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 357, p.1-17, fev. 2018.

ANEXOS

Anexo A: Artigo “Evaluation of the antimicrobial activity of silver nanoparticles biosynthesized from *Schinus terebinthifolius* Raddi”

ORIGINAL ARTICLE

Evaluation of the antimicrobial activity of silver nanoparticles biosynthesized from *Schinus terebinthifolius* Raddi

Milene Dias Ferreira^a, Lourdes Cardoso de Souza Neta^a, Geovani Cardoso Brandão^b, Walter Nei Lopes dos Santos^{a*}

^a Departamento de Ciências Exatas e da Terra, Universidade do Estado da Bahia, Salvador, Brazil.

^b Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil.

*Corresponding author: Departamento de Ciências Exatas e da Terra, Universidade do Estado da Bahia, Salvador, Brazil.

Email: waltrs8@gmail.com, wlopes@uneb.br.

Abstract: Microbial resistance, as well as the shortage of new antimicrobials, is a global public health issue that reduces treatment alternatives. In this context, silver nanoparticles (AgNPs) show an antimicrobial perspective. This study aims to evaluate the antimicrobial activity of silver nanoparticles synthesized from the aqueous extract of *Schinus terebinthifolius* Raddi leaves. A complete 2³ factorial design was used to analyze the significant variables; subsequently, Box-Behnken design was used to define the optimal conditions for the green synthesis of AgNPs. The samples were characterized using XRD, SEM and FTIR.

Antimicrobial activity was evaluated using the broth microdilution method, according to the technical standards of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) and through the minimum bactericidal concentration (MBC). The three factors studied in the design were significant for the synthesis of nanoparticles. The optimal conditions from the Box-Behnken design were: pH 9.5; reaction time of 180 minutes and 10 grams of *Schinus terebinthifolius* Raddi leaves. AgNPs showed greater antimicrobial efficiency compared to the extract for both bacteria and fungi: bacteriostatic action against all tested bacteria and bactericidal action against *Pseudomonas aeruginosa*, as well as fungistatic action against *Candida* species. The aqueous extract of aroeira leaves was effective in the synthesis of AgNPs. The antimicrobial activity demonstrated that the biosynthesized nanomaterial has an action against all microorganisms tested with lower MIC values, compared to the aqueous extract of aroeira leaves.

Keywords: Silver nanoparticles; Green synthesis; Antimicrobial activity; *Schinus terebinthifolius* Raddi.

1. Introduction

The increase in microbial resistance represents a public health problem, since it reduces treatment alternatives and makes the care of patients in health systems more expensive. Furthermore, the absence of new antimicrobials on the market impacts the treatment of resistant microorganisms; consequently, it favors dissemination and, therefore, the search for antimicrobial solutions becomes urgent (SOARES *et al.*, 2017; BALAKUMARAN *et al.*, 2016). In view of the above, advances in the area of nanobiotechnology have enabled the advent of a new pharmaceutical perspective on silver nanoparticles (ZHANG *et al.*, 2010; RUDRAMURTHY *et al.*, 2016). The nanoparticle synthesis process encompasses the production strategies top-down, bottom-up and green synthesis (JAMKHANDE *et al.*, 2019). Green synthesis comprises a methodology that uses plant biological resources, microorganisms and biomolecules as metal salt reducing agents to produce nanoparticles; this approach is less toxic and has greater biological potential in relation to other techniques (KHAN; SAEED; KHAN, 2017).

The plant kingdom is preferably the most used resource in biosynthesis, mainly in the case of medicinal plants, which have antimicrobial, larvicidal, antioxidant and anti-tumor properties due to the secondary metabolites that comprise them (MURUGAN *et al.*, 2014). Consequently, the nanomaterial synthesized from this process may show enhanced biological activity and lower nanotoxicity levels due to the coating of the nanostructured material by organic compounds from plants (FAHIMIRAD; AJALLOUEIAN; GHORBANPOUR, 2019; ROY *et al.*, 2019). Medicinal plants are an important therapeutic resource, mainly as an alternative in relation to marketed drugs. *S. terebinthifolius*, popularly known as “pimenta-rosa”, “aroeira-vermelha” and “aroeira-pimenteira” is a native Brazilian tree, widely used in folk medicine (COLE *et al.*, 2014; CARVALHO *et al.*, 2017). Its therapeutic actions are assigned to the phytochemical compounds present in the plant, such as polyphenols, flavonoids, terpenes, steroids, alkaloids and tannins distributed throughout the plant, and its medicinal use is justified by its biological efficiency in the treatment of several pathologies (FALCÃO *et al.*, 2015). Since antiquity, silver has been used as an antimicrobial agent in the treatment of wounds, antiseptic products, medicines, water purification systems, medical and cosmetic devices (PADALIA; MOTERIYA; CHANDA, 2015). Due to this effectiveness, silver nanoparticles show an antimicrobial perspective, with biological activity dependent on their characteristics, such as size, morphology, charge and coating (GE *et al.*, 2014). The properties of silver nanoparticles and the exposed microbial group are factors that interfere with their biological action (MITTAL *et al.*, 2014). Antimicrobial activity occurs through some mechanisms, such as: biofilm inhibition, direct interaction with the wall and membrane, generation of reactive oxygen species (ROS) and intracellular effects from interactions with DNA and proteins (WANG; HU; SHAO, 2017). This study aims to evaluate the antimicrobial activity of silver nanoparticles synthesized from the aqueous extract of *S. terebinthifolius* leaves.

2. Material and methods

2.1 Phytochemical analysis

Phytochemical composition was analyzed from qualitative tests proposed in the study of Bessa, Terrones and Santos (2007), with adaptations, in order to identify the secondary metabolites present in the ethanolic extract of *Schinus terebinthifolius* Raddi leaves. Thus, the ethanolic extract was prepared using 12.5 mL of ethanol with 2.5 grams of *Schinus terebinthifolius* Raddi leaves previously washed with ultrapure water and dried at room temperature for 24 hours. After 7 days, the extract was filtered and used for the tests, following the procedures. The following phytochemicals were analyzed:

2.1.1 Alkaloids

1.0 mL of hydrochloric acid (HCl, 10% v/v) was added to 1 mL of ethanolic extract and this mixture was heated for 10 minutes. Subsequently, the mixture was cooled, filtered and the filtrate was placed in a test tube to react with a few drops of the Dragendorff reagent. The presence of a slight turbidity or precipitate (purple to orange, white to cream and brown, respectively) highlights the possible presence of alkaloids in the analyzed material.

Dragendorff reagent: two solutions are made for subsequent mixing in equal parts. Solution A: 1.7 grams of bismuth (III) nitrate and 20 grams of tartaric acid were dissolved in 80 mL of water; solution B: 16 grams of potassium iodide were dissolved in 40 mL of water.

2.1.2 Cardiotonic Glycosides

1.5 mL of 10% lead acetate solution and 1 mL of distilled water were added to 1.0 mL of the ethanolic extract solution. This mixture was heated for 10 minutes. Subsequently, the mixture was filtered and stirred with 5 mL of chloroform. The chloroform phase was separated into a tube, dried and the Liebermann-Burchard reagent was added. The positive result is observed from green, blue-green and purple to blue.

Liebermann-Burchard reagent: 10 mL of acetic anhydride and two drops of concentrated sulfuric acid were mixed.

2.1.3 Volatile coumarins

1.0 mL of the ethanolic extract was added in a tube and covered with filter paper impregnated with 10% (w/v) NaOH.

Subsequently, the tube was heated in a water bath for a few minutes. The filter paper was removed and examined under UV light. Yellow fluorescence indicates the presence of coumarins in the sample.

2.1.4 Triterpenes and/or steroids

2.5 mL of chloroform were added to 1 mL of the ethanolic extract. The mixture was filtered and divided into two tubes: Liebermann-Burchard and Salkowski reactions were conducted in each tube. Triterpenes develop a stable color and steroids develop changeable colors over time.

Salkowski reagent: concentrated sulfuric acid.

2.1.5 Tannins

2.5 mL of distilled water were added to 1 mL of the ethanolic extract. The mixture was filtered and a drop of 10% ferric chloride solution was added. The blue color indicates the possible presence of hydrolyzable tannins while the green color indicates the presence of condensed tannins.

2.1.6 Saponins

2.5 mL of boiling water were added to 1 mL of the ethanolic extract. Subsequently, the mixture was cooled, stirred and remained at rest for 20 minutes. Foaming is an indication of the presence of saponins.

2.2 Preparation of the aqueous plant extract from *Schinus terebinthifolius* Raddi

Schinus terebinthifolius Raddi leaves were collected at Campus I of Universidade do Estado da Bahia (UNEB), in Salvador, Bahia, Brazil. They were identified at Herbarium Alexandre Leal Costa, located in the Botany Department of the Institute of Biology (IBIO) of Universidade Federal da Bahia (UFBA), in Salvador, Bahia, Brazil. The collected plant material was washed with ultrapure water and dried at room temperature for 24 hours. Subsequently, for the obtention of the leaf aqueous extract, leaf mass was described in the Box-Behnken design and placed in contact with 100 mL of ultrapure water in a boil for 5 minutes. The extract was obtained by filtration and stored at 4 °C. The pH of the extracts was changed according to the values described in the Box-Behnken design; for this purpose, 0.1 mol.L⁻¹ citrate buffers were used at pH 5, 0.1 mol.L⁻¹ phosphate at pH 7 and 0.1 mol.L⁻¹ borate for pH 8; 9; 9.5 and 10.

2.3 Green synthesis optimization of silver nanoparticles

2.3.1 Full factorial design (2³)

The variables that can influence the green synthesis process of AgNPs, pH, leaf mass and reaction time, were selected according to scientific articles that addressed the theme presented in this study. The complete factorial design 2³ (chart 1) was carried out in order to verify the significance of the analyzed variables and their interactions before the adopted response, absorbance. Statistical analysis was performed using the Statistica 7 software.

Chart 1. Full factorial design matrix (2^3)

	pH	Leaf mass (g)	Time (min)
1	-1 (5)	-1 (2)	-1 (30)
2	+1 (9)	-1 (2)	-1 (30)
3	-1 (5)	+1 (6)	-1 (30)
4	+1 (9)	+1 (6)	-1 (30)
5	-1 (5)	-1 (2)	+1 (90)
6	+1 (9)	-1 (2)	+1 (90)
7	-1 (5)	+1 (6)	+1 (90)
8	+1 (9)	+1 (6)	+1 (90)
9	0 (7)	0 (4)	0 (60)
10	0 (7)	0 (4)	0 (60)
11	0 (7)	0 (4)	0 (60)

2.3.2 Response surface: Box-Behnken

Subsequently, optimization was performed using the Box-Behnken (BBD) response surface methodology (Table 2). The significant design factors were reassessed in order to establish the critical conditions for the studied procedure.

Chart 2. Box-Behnken response surface matrix

	pH	Leaf mass (g)	Time (min)
1	-1 (8)	-1 (6)	0 (120)
2	+1 (10)	-1 (6)	0 (120)
3	-1 (8)	+1 (10)	0 (120)
4	+1 (10)	+1 (10)	0 (120)
5	-1 (8)	0 (8)	-1 (60)
6	+1 (10)	0 (8)	-1 (60)
7	-1 (8)	0 (8)	+1 (180)
8	+1 (10)	0 (8)	+1 (180)
9	0 (9)	-1 (6)	-1 (60)
10	0 (9)	+1 (10)	-1 (60)
11	0 (9)	-1 (6)	+1 (180)
12	0 (9)	+1 (10)	+1 (180)
13	0 (9)	0 (8)	0 (120)
14	0 (9)	0 (8)	0 (120)
15	0 (9)	0 (8)	0 (120)

2.4 Green synthesis of silver nanoparticles

The 200-mL solution of 1 mM silver nitrate (AgNO_3) was prepared using Cromoline silver nitrate and ultrapure water. Subsequently, with the aid of a peristaltic pump (LDP 105-6), this AgNO_3 solution was pumped at a flow rate of 5.0 mL min^{-1} to an Erlenmeyer containing 10 mL of the aqueous extract of *Schinus terebinthifolius* Raddi leaves at room temperature (28°C). The reaction time followed that described in the Box-Behnken design. After this stage, the synthesized material was centrifuged at 3,500 rpm for 30 minutes. The supernatant was discarded and the pellet was resuspended in ultrapure water for later freezing and lyophilization.

2.5 Characterization of nanoparticles

The UV-vis absorption spectroscopy was performed to obtain the absorbance data of the synthesized material, using a Shimadzu UV-2600 spectrophotometer. Readings were made from 200 nm to 800 nm. Ultrapure water was used as a blank. The crystallinity of the nanomaterial was obtained through X-ray diffraction (XRD), using a Shimadzu XRD-6000 diffractometer. Morphology was obtained by field emission scanning electron microscopy (FEG-SEM), using a microscope (7500 F – JEOL, Tokyo, Japan). Fourier transform Infrared spectroscopy (FT-IR) was conducted using a PERKIN ELMER equipment (Spectrum100-FT-IR).

2.6 Antimicrobial activity

2.6.1 Broth microdilution method

Antimicrobial activity was tested against the bacteria: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538); *Bacillus subtilis* (ATCC 6633); *Bacillus cereus* Frankland & Frankland (N° CCT 0096); *Pseudomonas aeruginosa* (N° CCT 0090; ATCC 27853) and the fungi: *Candida albicans* (ATCC 18804) and *Candida glabrata* (CCT 0728). The broth microdilution method was used to determine the minimum inhibitory concentrations (MIC) and the concentration range tested in the assay ranged from $2000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ to $15.62 \mu\text{g.mL}^{-1}$ for biosynthesized nanoparticles and leaf extract.

The antimicrobials garamycin (500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) and benzylpenicillin (25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) were used as positive controls against Gram-negative and Gram-positive bacteria; in the case of fungi, amphotericin (31.25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) was used for *Candida glabrata* and ciclopirox olamine (200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) against *Candida albicans*. For diluent control, 100 μL of the 20% DMSO solution and autoclaved water were used and, for growth control, nutrient broth medium was used in the tests against bacteria, and yeast and malt broth in the tests against fungi. Microbial inocula were adjusted according to the McFarland 0.5 scale (approximately 10^8 CFU mL^{-1}). The plates with bacterial inocula were sealed and incubated for 24 hours at 37 °C and the plates with fungal inocula for 72 hours at 26 °C. The microdilution result was confirmed by the MTT colorimetric test (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide) to assess cell viability.

2.6.2 Minimum bactericidal concentration (MBC)

After reading the MTT test, a range of wells that showed growth inhibition was removed and seeded in nutrient agar medium for bacteria and yeast and malt agar for fungi. The plates were incubated for 24 hours at 37 °C for bacteria and for 72 hours at 26 °C for fungi. After the incubation period, the plates were read to assess the occurrence of microbial growth.

3. Results and discussion

3.1 Phytochemical composition

Secondary metabolites are organic compounds present at low concentrations in species of the plant kingdom, and these substances are involved in plant protection processes and interactions with the environment; furthermore, these plant components have biological properties that arouse the interest of the pharmaceutical industry and are associated with effects on human health, such as: antimicrobial, anti-inflammatory and antioxidant (PEREIRA; CARDOSO, 2012). The analysis of the phytochemical composition of *Schinus terebinthifolius* Raddi allowed the determination of the secondary metabolites present in the plant material used for the green synthesis of AgNPs.

The result of phytochemical screening (Table 3) was positive for the following plant metabolites: volatile coumarins, triterpenes in the Liebermann-Burchard test, hydrolyzable tannins and steroids in the Salkowski test in the ethanolic extract of *Schinus terebinthifolius* Raddi leaves.

Chart 3. Phytochemical screening of the ethanolic extract from *Schinus terebinthifolius* Raddi leaves

Metabolites	Leaf extract
Alkaloids	-
Cardiotonic glycosides	-
Volatile coumarins	+
Triterpenes	+ (Liebermann-Burchard)
Steroids	+ (Salkowski)
Hydrolyzable tannins	+
Saponins	-

The sign (+) indicates presence and (-) indicates the absence of the secondary metabolite in the tested leaf extract.

Structurally, coumarins are lactones of o-hydroxycinnamic acid (2H-1-benzopyran-2-one) (WANG *et al.*, 2020). They are low molecular weight, soluble compounds present in plants and can be chemically synthesized. They have biological effects, such as: antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory, antiarrhythmic and antiviral, which is why they arouse interest in the pharmaceutical area. Currently, some anticoagulants such as warfarin use active components derived from coumarin, are widely used in the treatment of thrombosis and ischemic stroke (OSTROWSKA, 2020). Triterpenes are made up of isoprene subunits and belong to the group of terpenes (MUFFLER *et al.*, 2011). Biologically, triterpenes have antimicrobial, anti-inflammatory, anti-tumor, cardioprotective and analgesic activity (CANO-FLORES, 2013). Plant steroids consist of 28 or 29 carbons, and are structurally similar to cholesterol. Phytosterols have biological effects related to reducing the absorption of cholesterol from the diet; therefore, it has cardioprotective activity (PEREIRA; CARDOSO, 2012). Tannins are phenolic compounds classified into two groups: hydrolyzable and condensed. They are soluble in water and responsible for the astringent property present in certain fruits and vegetable products. These compounds show antimicrobial, anticarcinogenic, healing, anti-inflammatory and antiseptic activity (MONTEIRO *et al.*, 2005).

3.2 Green synthesis optimization of silver nanoparticles

3.2.1 Complete factorial design (2^3) and analysis of variables

Multivariate optimization procedures allow the reduction in the number of experiments, are more economical, faster and make it possible to evaluate the effects of the interactions between factors (TARLEY *et al.*, 2009). In this context, factorial design is used at the initial screening stage for optimization, in which all factors are tested to indicate those most significant regarding the analyzed process (NOVAES *et al.*, 2017). The response for the design was absorbance (Table 4), since this parameter is related to the yield in the formation of nanoparticles in a colloidal system. According to the chart below, in experiment eight, in which the factors were analyzed at the highest level, the highest absorbance was obtained.

Chart 4. Complete factorial design (2^3)

	pH	Leaf mass (g)	Time (min)	Absorbance
1	-1 (5)	-1 (2)	-1 (30)	0.11
2	+1 (9)	-1 (2)	-1 (30)	0.61
3	-1 (5)	+1 (6)	-1 (30)	0.25
4	+1 (9)	+1 (6)	-1 (30)	2.68
5	-1 (5)	-1 (2)	+1 (90)	0.25
6	+1 (9)	-1 (2)	+1 (90)	0.60
7	-1 (5)	+1 (6)	+1 (90)	0.40
8	+1 (9)	+1 (6)	+1 (90)	3.15
9	0 (7)	0 (4)	0 (60)	1.60
10	0 (7)	0 (4)	0 (60)	1.61
11	0 (7)	0 (4)	0 (60)	1.62

The Pareto chart is presented in order to allow the identification of factors that affect the synthesis of silver nanoparticles from the aqueous extract of *Schinus terebinthifolius* Raddi leaves.

In this chart, the horizontal bars indicate the effects of the principal variables and the interactions between them, as well as the line of significance of $p = 0.05$ demonstrates whether the factors and interactions were statistically significant. In this study, the three variables studied: pH, leaf mass and time, according to Pareto, were significant for biosynthesis, as well as their interactions (Figure 1).

Figure 1. Pareto chart showing significant variables and interactions.

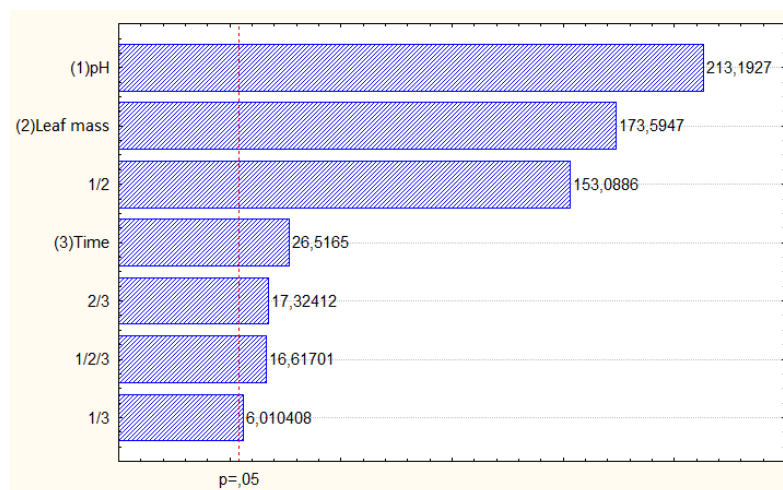
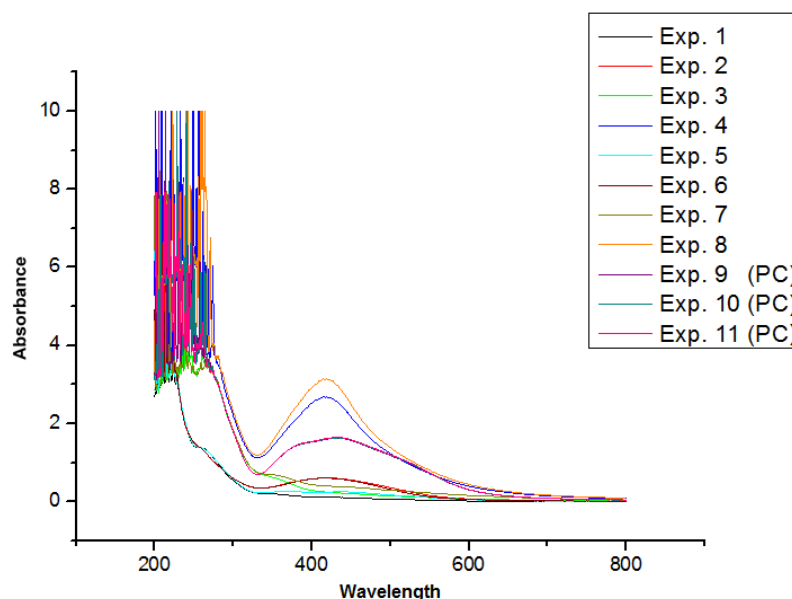


Figure 2 shows the UV-Visible absorption spectra of the eleven synthesis reactions according to the complete factorial design 2^3 and, as observed, at 418 nm, the absorption peak was observed. According to the literature, silver nanoparticles have an absorption band located in the range between 400 nm to 500 nm in the UV-Vis spectrum, dependent on morphology, size and secondary metabolites of the medium (VINAYAGAM; VARADAVENKATESAN; SELVARAJ, 2018).

Figure 2. UV-vis absorption spectroscopy of silver nanoparticles.



Regarding the influence of the variables analyzed: pH, leaf mass and reaction time on the green synthesis of AgNPs, firstly, the color change in the colloidal solution is the first sign indicating the formation of nanoparticles. This fact can be assigned to the reduction of silver ions by the aqueous extract of *Schinus terebinthifolius* Raddi leaves. The increase in reaction time resulted in a gradual increase in absorbance and color intensity during the reaction period, indicating an increase in the concentration of nanoparticles; the same event was evidenced in the study of Verma and Mehata (2016) with the aqueous extract of Neem leaves to synthesize AgNPs, as also demonstrated by Jalilian et al. (2020) in their study with *Allium ampeloprasum* aqueous extract.

In relation to the aqueous extract of *Schinus terebinthifolius* Raddi leaves, the increase in leaf mass resulted in an increase in the absorbance spectra, which indicates higher yields in the synthesis of nanoparticles. This fact was observed in a study with *Azadirachta indica* leaf extract as a reducing agent for the synthesis of AgNPs (Asimuddin et al., 2018) and in the study of Azizian-Shermeh, Einali and Ghasemi (2017), on the synthesis of silver nanoparticles from the aqueous extract of *Maclura pomifera* leaves.

The phytochemicals present in the leaves act as reducing agents for silver cations (Ag^+); therefore, as the concentration of the leaf extract increases, a greater amount of biomolecules available in the medium is observed (GOMATHI *et al.*, 2020; BENAKASHANI; ALLAFCHIAN; JALALI, 2016). With regard to pH, in basic and neutral medium, pH 9 and 7, respectively, the color change occurred quickly, in relation to the acid medium, pH 5.

The acidic environment suppressed the synthesis of AgNPs, and this fact is also evidenced by Yadav *et al.* (2019), who concluded from this evidence that the intensity of the absorption bands and the color of the mixture were dependent on pH. Based on the results found in their study, Parthiban *et al.* (2019) stated that the high concentration of protonated molecules in the extract of *Annona reticulata*, due to the pH around 6.5, prevented the reduction of silver nitrate. However, the change in pH after the addition of sodium hydroxide (NaOH) causes ionization of the biomolecules present in the extract and, consequently, the synthesis of nanoparticles.

Regarding the experiments that used the basic pH, the biosynthesis process occurred in all of them, with an increase in the reduction reaction rate, a fact that was observed with intense staining during the synthesis period and greater absorbance spectra. In the studies conducted by Khalil *et al.* (2014) and Azizian-Shermeh, Einali and Ghasemi (2017), the basic pH was also better for biosynthesizing AgNPs. The pH of the medium is an important parameter that interferes with the electrical charges of biomolecules. The change in pH changes the charge of phytochemicals in the extract, which affects the steps of reducing the metal salt, agglomeration of neutral atoms and adsorption of metabolite compounds, that is, PH interferes with the ionization of phytocomposites present in the leaf extract (AJITHA *et al.*, 2018).

3.2.2 Response surface: Box-Behnken

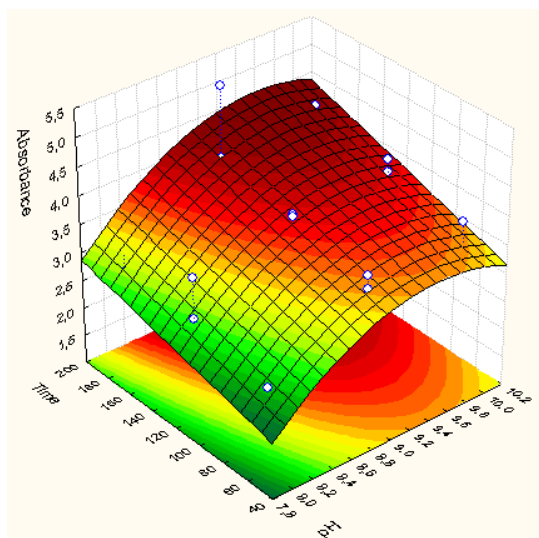
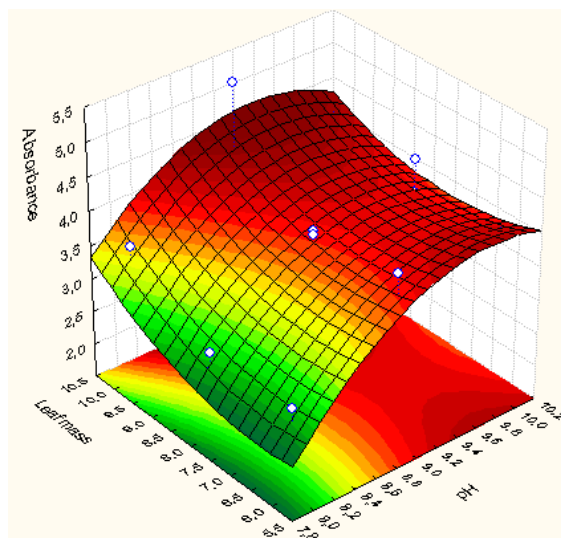
The significant design factors will be analyzed again through the experimental response surface design to establish the critical conditions for the studied process. The Box-Behnken design (Figures 3 and 4) allows to obtain response surfaces, relating two variables to the response.

From the results generated by this response surface methodology, the critical conditions for the synthesis of optimized nanoparticles were determined. (FERREIRA *et al.*, 2018). After the complete factorial design 2^3 , optimization was performed using the Box-Behnken response surface (BBD) methodology for three factors, yielding a total of fifteen experiments (Table 5).

Chart 5. Box Behnken response surface matrix with absorbance response

	pH	Leaf mass (g)	Time (min)	Absorbance
1	-1 (8)	-1 (6)	0 (120)	2.80
2	+1 (10)	-1 (6)	0 (120)	3.88
3	-1 (8)	+1 (10)	0 (120)	3.53
4	+1 (10)	+1 (10)	0 (120)	4.09
5	-1 (8)	0 (8)	-1 (60)	2.49
6	+1 (10)	0 (8)	-1 (60)	3.78
7	-1 (8)	0 (8)	+1 (180)	2.76
8	+1 (10)	0 (8)	+1 (180)	4.28
9	0 (9)	-1 (6)	-1 (60)	3.62
10	0 (9)	+1 (10)	-1 (60)	3.39
11	0 (9)	-1 (6)	+1 (180)	4.05
12	0 (9)	+1 (10)	+1 (180)	5.31
13	0 (9)	0 (8)	0 (120)	3.87
14	0 (9)	0 (8)	0 (120)	3.87
15	0 (9)	0 (8)	0 (120)	3.81

According to the data presented on the response surface, it is possible to conclude that, for this optimization procedure at pH 9.5, leaf mass of 10 grams and reaction time of 180 minutes, the region with higher absorbance values will be approached.

Figure 3. BBD: time X pH**Figure 4.** BBD: leaf mass X pH

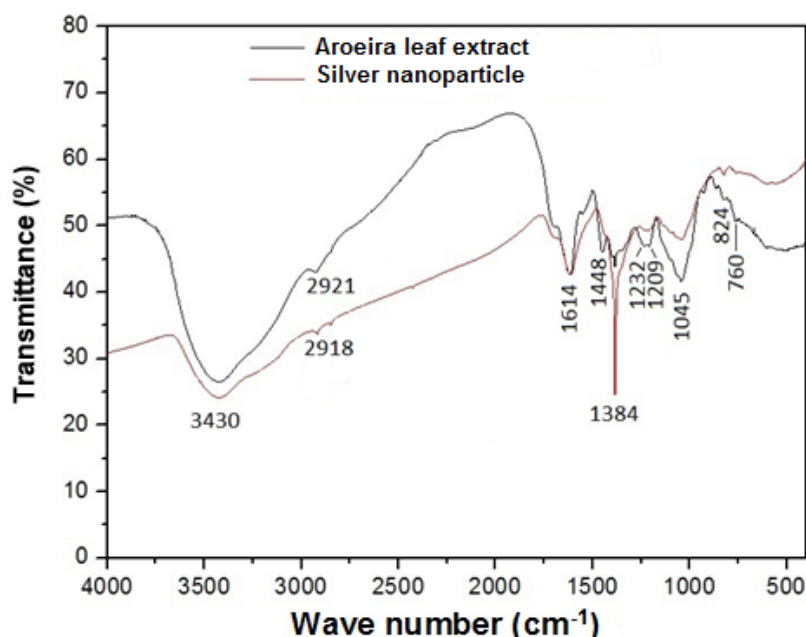
4. Characterization of silver nanoparticles

4.1 Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

The biosynthesized silver nanoparticles and the aqueous extract of *Schinus terebinthifolius* Raddi leaves were analyzed by FTIR in order to investigate the presence of functional groups that contributed to the reduction of ions Ag^+ to Ag^0 and nanoparticle coating, besides which compounds present in the extract coated the AgNPs. Figure 5 shows the FTIR spectra obtained from the aqueous extract of aroeira-vermelha leaves and the silver nanoparticles synthesized from this extract. Analyzing the figure below, it is observed that the band at 3430 cm^{-1} could be assigned to the OH group present in alcohols and phenolic compounds (DEV *et al.*, 2018).

The bands at 2918 cm^{-1} and 2921 cm^{-1} refer to the CH group that constitutes the chemical structure of organic groups and the band at 1614 cm^{-1} indicates the presence of C=C of aromatic rings present in flavonoids and alkaloids (A VIJAYAKUMARI; A SINTHIYA, 2018). The bands at 1448 cm^{-1} and 1384 cm^{-1} represent the CH_2 and CH_3 folds, respectively, being associated with the alkanes that make up the structure of organic compounds (QAIS *et al.*, 2020). The bands at 1232 cm^{-1} , 1209 cm^{-1} and 1045 cm^{-1} correspond to the group C-O present in alcohol, carboxylic acid, ester and ether (RAJ; MALI; TRIVEDI, 2018).

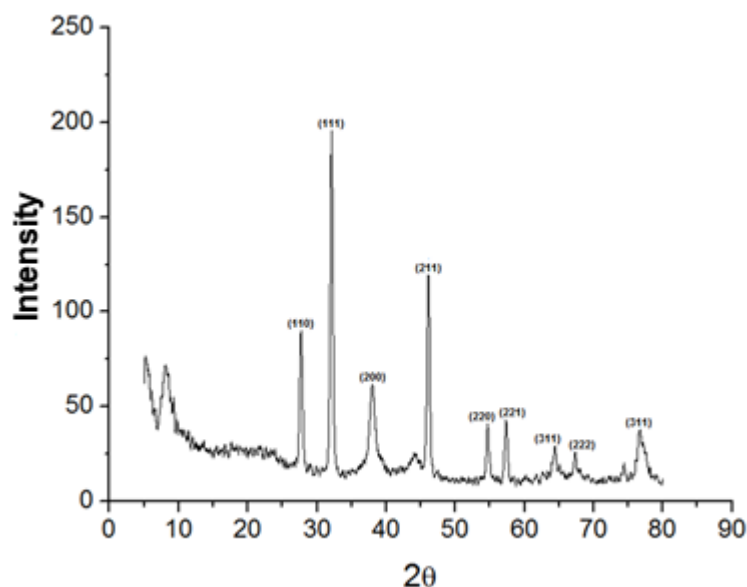
Figure 5. FTIR of the aqueous extract of aroeira leaves and biosynthesized nanoparticles.



4.2 X-Ray Diffraction (XRD)

The crystalline structure of the synthesized silver nanoparticles was confirmed by XRD analysis. Figure 6 shows the presence of diffraction peaks observed in the 2θ region, found at angles 26.64° , 32.78° , 38.03° , 47.04° , 54.88° , 58.51° , 68.71° , 77.47° and 65.41° ; corresponding to the crystallographic planes (110), (111), (200), (211), (220), (221), (222) and (311), respectively. This result showed that the nanoparticles had a cubic crystalline structure with a centered face and demonstrated the formation of silver nanoparticles (ICDD: 04-0783) and silver oxide (ICDD: 76-1393); there were probably chemical reactions parallel to the reduction of metallic silver. In the study of Dangi *et al.* (2020), the presence of characteristic peaks was also reported, with possible causes: the presence of silver oxide and phytochemicals that acted as reducing agents. This fact may indicate the coating of AgNPs by organic groups present in the aqueous extract, in accordance with the FTIR result (HAMED; SHOJAOSADATI, 2019). The study by Jemal, Sandeep and Pola (2017) revealed, from the XRD, the presence of peaks corresponding to silver oxide nanoparticles.

Figure 6. Diffractogram representing the crystalline structure of biosynthesized nanoparticles



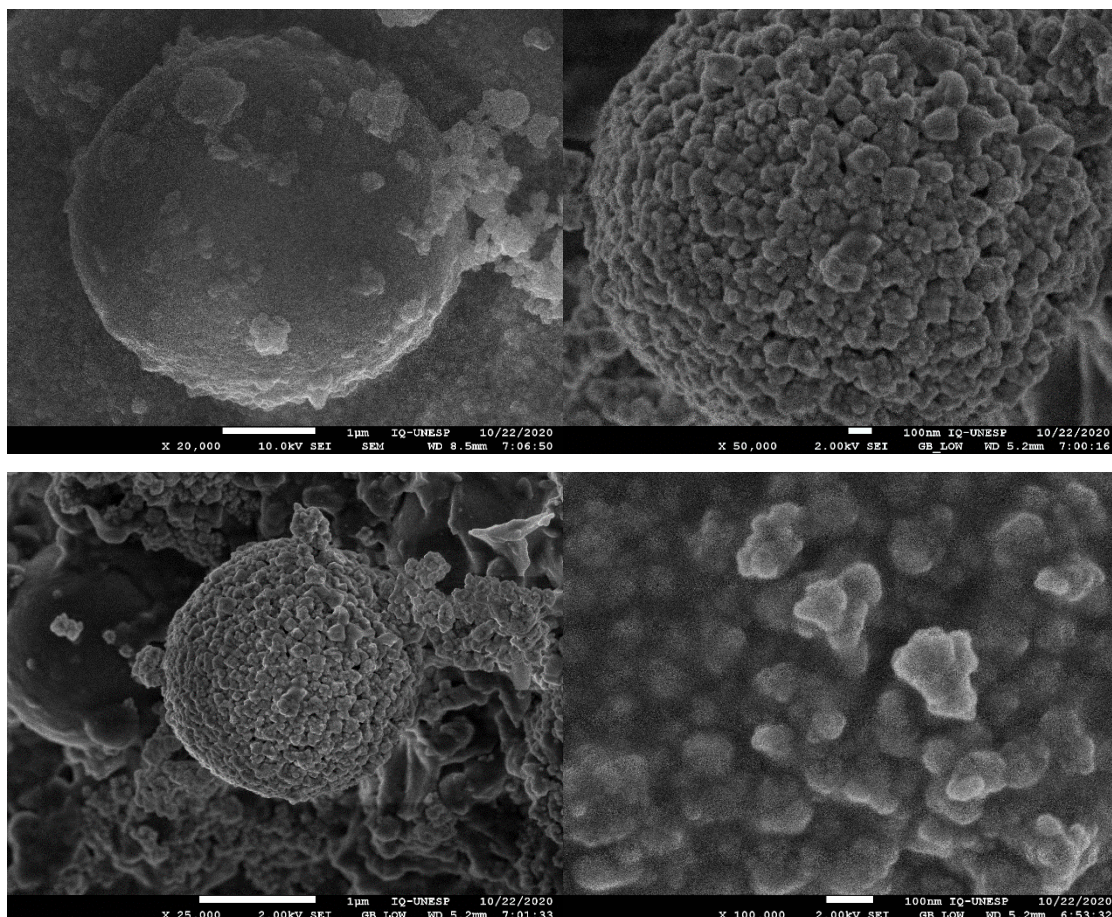
XRD allows the estimation of the crystallite size from the Scherrer equation, $D = K\lambda / \beta \cos\theta$. D is the size of the crystallite; λ is wavelength (1.542); θ is the width at half the height of the crystallographic peak (FWHM); θ is the Bragg diffraction angle and K is constant depending on the shape of the particles (spherical = 0.94) (ESMAILE; KOOHESTANI; ABDOLLAH-POUR, 2020; UVAROV; POPOV, 2013). In this study, the estimated average size of the crystallite was 40.62 nm. However, during the bioreduction process, silver nanoparticles were synthesized and, in parallel, the formation of silver oxide nanoparticles occurred, as observed in the diffractogram, as well as the presence of characteristic peaks of both nanoparticles, a fact that may interfere with the estimated average size of the crystallite found in this study.

4.3 Scanning Electron Microscopy (SEM)

The morphology of the nanoparticles was evaluated using SEM. From the analysis of Figure 7, it can be inferred that AgNPs have a predominantly spherical shape, as well as some nanoparticles do not have a well-defined spherical shape. The presence of clusters is observed without the fusion of nanoparticles. In their study, Kumar *et al.* (2019) also verified the presence of spherical nanoparticles and their clusters.

According to the same authors, the coating of silver nanoparticles by secondary metabolites of the plant extract used as a reducing agent, is the main factor for the formation of aggregates.

Figure 7. Scanning electron microscopy of the biosynthesized AgNPs.



4.4 Evaluation of antimicrobial activity

The results of the antimicrobial activity of the biosynthesized silver nanoparticles and the aqueous extract of *Schinus terebinthifolius* Raddi leaves obtained in this study are presented in Table 6. The obtained results demonstrated that both the extract and the nanoparticles presented bacteriostatic effect for all the tested bacteria and bactericidal activity against *Pseudomonas aeruginosa*. In addition, silver nanoparticles showed a fungistatic effect against the tested *Candida* species, whereas the extract showed this effect only against *Candida albicans*. From the exposed data, it is also possible to infer that the biosynthesized silver nanoparticles showed greater antimicrobial efficiency, compared to the aroeira leaf extract.

Devi et al. (2020) also found that the silver nanoparticles synthesized from the methanolic extract of the *Aegle marmelos* fruit were more effective than the extract of the same fruit against *P. aeruginosa*, *B. cereus* and *S. aureus*.

Chart 6: Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC)/Minimum Fungicidal Concentration (MFC) of the aqueous extract from *Schinus terebinthifolius* Raddi leaves and silver nanoparticles.

Samples	<i>Sa</i>		<i>Bc</i>		<i>Bs</i>		<i>Pa</i>		<i>Ca</i>		<i>Cg</i>	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CFM	CIM	CFM
EStR	1000	-	1000	-	2000	-	2000	-	500	-	-	-
AgNPs	500	-	125	-	250	-	250	1000	250	-	250	-
Benzylpenicillin	0.19	-	3.12	-	0.19	-	na	na	na	na	na	na
Garamycin	na	na	na	na	na	na	1.95	-	na	na	na	na
Amphotericin B	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1.95	-
Ciclopirox olamine	na	na	na	na	na	na	na	na	12.5	-	na	na

Sa – *Staphylococcus aureus*; **Bc** – *Bacillus cereus*; **Bs** – *Bacillus subtilis*; **Pa** – *Pseudomonas aeruginosa*; **Ca** – *Candida albicans*; **Cg** – *Candida glabrata*; **nt** – not tested; **na** – not applicable; **EStR** – aqueous extract of *Schinus terebinthifolius* Raddi leaves; **AgNPs** – silver nanoparticles.

Among the evaluated microorganisms, the nanoparticles showed better activity against the bacterium *Pseudomonas aeruginosa*, due to the bacteriostatic and bactericidal action of the nanoparticles at a concentration of 1000 µg/mL; this result demonstrates the effectiveness of the synthesized nanoparticles. According to Yin *et al.* (2020), the Gram-negative bacterial group is more susceptible to the action of silver nanoparticles due to the thin bacterial wall with a lower amount of peptidoglycan, thus allowing a greater nanoparticle penetration. In their study on the antimicrobial activity of silver nanoparticles synthesized from *Atrocarpus altilis* leaf extract, Ravichandran *et al.* (2016) also showed greater susceptibility of Gram-negative bacteria *Escherichia coli* and *P. aeruginosa*, to the antimicrobial action of nanoparticles.

Pseudomonas aeruginosa is a Gram-negative bacterium commonly related to Health Care-Related Infections (HCRI), which represents a problem in the environment of health facilities, due to its ability to express resistance to antimicrobials (ARAÚJO; PEREIRA, 2017).

This type of infection in the hospital occurs after the first 72 hours of hospitalization or afterwards; the patient discharged within 72 hours (SANTOS; ALMEIDA NETO; FREITAS, 2016) and the costs of these infections impose an increase in care, due to the increase in therapeutic demands, such as spending on medication, hospital stay, besides morbidity and mortality (SOARES *et al.*, 2017).

In this context, silver nanoparticles are presented as a new antimicrobial perspective that, in the future, can be used therapeutically. In relation to fungal activity, the nanoparticles demonstrated higher efficiency than the extract, being equally effective against *Candida albicans* and *Candida glabrata*, while the extract had no effect on *Candida glabrata*. The study of Kischkel *et al.* (2018) with silver nanoparticles biosynthesized from the leaf extract of *Mikania glomerata* Sprengel, showed a similar result: the nanoparticles exhibited antifungal effect and the extract showed no activity. According to Dutta *et al.* (2020), silver nanoparticles cause damage to the fungal wall and membrane, increasing the permeability of the nanoparticles, leading to an increase in reactive oxygen species and extravasation of intracellular components.

5. Conclusions

The aqueous extract of *Schinus terebinthifolius* Raddi leaves was an effective reducing agent to synthesize silver nanoparticles, demonstrating that the green synthesis process mediated by plant extracts is simple, has a low cost and results in environmentally safer nanocomposites with greater potential. The result of the 2³ factorial design used in this study indicated that the three variables analyzed: pH, time and leaf mass were significant in the green synthesis of silver nanoparticles biosynthesized from the *Schinus terebinthifolius* Raddi extract. From the information acquired in the first optimization stage, it was possible to use the Box-Behnken design for the obtention of the optimal conditions for the synthesis of nanoparticles. The antimicrobial activity showed that silver nanoparticles have bacteriostatic activity against all bacteria and bactericidal action against *P. aeruginosa*, demonstrating the efficiency of the biosynthesized nanomaterial against a bacterium of importance in the hospital environment; besides, it had a fungistatic action against the tested *Candida* species, whereas the aqueous extract of aroeira leaves was not effective against *Candida glabrata* and MIC was higher for all microorganisms evaluated.

References

- AJITHA, B. et al. Synthesis of silver nanoparticles in an eco-friendly way using *Phyllanthus amarus* leaf extract: Antimicrobial and catalytic activity. *Advanced Powder Technology*. 29, 86-93.
- ARAÚJO, Beatriz Torres; PEREIRA, Daniella Cristina Rodrigues. Policies for control Health Care-Related Infections (IRAS) in Brazil, 2017. *Comunicação em Ciências da Saúde*. 3, 333-342.
- ASIMUDDIN, M. et al. *Azadirachta indica* based biosynthesis of silver nanoparticles and evaluation of their antibacterial and cytotoxic effects. *Journal Of King Saud University - Science*. 1-9.
- A VIJAYAKUMARI,; A SINTHIYA,. Biosynthesis of Phytochemicals Coated Silver Nanoparticles Using Aqueous Extract of Leaves of *Cassia alata* – Characterization, Antibacterial and Antioxidant Activities. *International Journal Of Pharmaceutical And Clinical Research*. 10, 138-149.
- AZIZIAN-SHERMEH, Omid; EINALI, Alireza; GHASEMI, Ali. Rapid biologically one-step synthesis of stable bioactive silver nanoparticles using Osage orange (*Maclura pomifera*) leaf extract and their antimicrobial activities. *Advanced Powder Technology*. 28, 3164-3171.
- BALAKUMARAN, M.D. et al. Mycosynthesis of silver and gold nanoparticles: Optimization, characterization and antimicrobial activity against human pathogens. *Microbiological Research*. 182, 8-20.
- BENAKASHANI, F.; ALLAFCHIAN, A.R.; JALALI, S.A.H.. Biosynthesis of silver nanoparticles using *Capparis spinosa* L. leaf extract and their antibacterial activity. *Karbala International Journal Of Modern Science*. 2, 251-258.

BESSA, Tatiana; TERRONES, Manuel Gonzalo Hernandez; SANTOS, Douglas Queiroz. Avaliação fitotóxica e identificação de metabólitos secundários da raiz de *Cenchrus echinatus*. *Revista Horizonte Científico*. 1, 1-17.

CANO-FLORES, Arturo. Biotransformación de triterpenos con diferentes microorganismos. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, México*. 44, 7-16.

CARVALHO, J. A. M. *et al.* Composição Química e Avaliação da Atividade Antimicrobiana do Óleo de Pimenta Rosa (*Schinus terebinthifolius*). *Blucher Chemical Engineering Proceedings*. 59-63.

COLE, E.R. *et al.* Chemical composition of essential oil from ripe fruit of *Schinus terebinthifolius* Raddi and evaluation of its activity against wild strains of hospital origin. *Brazilian Journal Of Microbiology*. 45, 821-828.

DANGI, Subas *et al.* Green synthesis of silver nanoparticles using aqueous root extract of *Berberis asiatica* and evaluation of their antibacterial activity. *Chemical Data Collections*. 28, 1-10.

DEV, Sona S. *et al.* Green synthesis of silver nanoparticles using leaf extract of *Ayapana triplinervis* and its antibacterial activity. *International Journal Of Pharmaceutical Sciences And Research*. 9, 3897-3902.

DEVI, Mamta *et al.* Green synthesis of silver nanoparticles using methanolic fruit extract of *Aegle marmelos* and their antimicrobial potential against human bacterial pathogens. *Journal Of Traditional And Complementary Medicine*. 10, 158-165.

DUTTA, Tanmoy *et al.* Green synthesis of antibacterial and antifungal silver nanoparticles using *Citrus limetta* peel extract: experimental and theoretical studies. *Journal Of Environmental Chemical Engineering*. 8, 1-9.

ESMAILE, Faezeh; KOOHESTANI, Hassan; ABDOLLAH-POUR, Hassan. Characterization and antibacterial activity of silver nanoparticles green synthesized using *Ziziphora clinopodioides* extract. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*. 14, 1-8.

FAHIMIRAD, Shohreh; AJALLOUEIAN, Fatemeh; GHORBANPOUR, Mansour. Synthesis and therapeutic potential of silver nanomaterials derived from plant extracts. *Ecotoxicology And Environmental Safety*. 168, 260-278.

FALCÃO, M. P. M. M. *et al.* *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira) e suas propriedades na Medicina Popular. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*. 10, 23-27.

FERREIRA, Sergio L.C. *et al.* Multivariate optimization techniques in analytical chemistry - an overview. *Microchemical Journal*. 140, 176-182.

GE, Liangpeng *et al.* Nanosilver particles in medical applications: synthesis, performance, and toxicity. *International Journal Of Nanomedicine*. 2399-2407.

GOMATHI, M. *et al.* Green synthesis of silver nanoparticles using *Gymnema sylvestre* leaf extract and evaluation of its antibacterial activity. *South African Journal Of Chemical Engineering*. 32, 1-4.

HAMEDI, Sepideh; SHOJAOSADATI, Seyed Abbas. Rapid and green synthesis of silver nanoparticles using *Diospyros lotus* extract: evaluation of their biological and catalytic activities. *Polyhedron*. 171, 172-180.

JALILIAN, Fereshteh *et al.* Green synthesized silver nanoparticle from *Allium ampeloprasum* aqueous extract: characterization, antioxidant activities, antibacterial and cytotoxicity effects. *Advanced Powder Technology*. 31, 1323-1332.

JAMKHANDE, Prasad Govindrao *et al.* Metal nanoparticles synthesis: An overview on methods of preparation, advantages and disadvantages, and applications. *Journal Of Drug Delivery Science And Technology*. 53, 1-11.

JEMAL, Kero; SANDEEP, B. V.; POLA, Sudhakar. Synthesis, Characterization, and Evaluation of the Antibacterial Activity of *Allophylus serratus* Leaf and Leaf Derived Callus Extracts Mediated Silver Nanoparticles. *Journal Of Nanomaterials*. 1-11.

KHALIL, Mostafa M.H. et al. Green synthesis of silver nanoparticles using olive leaf extract and its antibacterial activity. *Arabian Journal Of Chemistry*. 7, 1131-1139.

KHAN, Ibrahim; SAEED, Khalid; KHAN, Idrees. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal Of Chemistry*. 1-24.

KISCHKEL, Brenda *et al.* Nanopartículas de prata biossintetizadas por *Mikania glomerata* Sprengel inibem o crescimento de *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus*. *Arquivos de Ciências da Saúde*. 25, 46-52.

KUMAR, Vijay et al. Green synthesis of silver nanoparticles using leaf extract of *Holoptelea integrifolia* and preliminary investigation of its antioxidant, anti-inflammatory, antidiabetic and antibacterial activities. *Journal Of Environmental Chemical Engineering*. 7, 1-7.

MITTAL, Jitendra *et al.* Phytofabrication of nanoparticles through plant as nanofactories. *Advances In Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*. 5, 1-10.

MONTEIRO, Julio Marcelino et al. Taninos: uma abordagem da química à ecologia: uma abordagem da química à ecologia. *Química Nova*. 28, 892-896.

MUFFLER, Kai et al. Biotransformation of triterpenes. *Process Biochemistry*. 46, 1-15.

MURUGAN, Kasi *et al.* Biosynthesis of silver nanoparticles using *Acacia leucophloea* extract and their antibacterial activity. *International Journal Of Nanomedicine*. 2431-2438.

NOVAES, Cleber G. *et al.* Optimization of Analytical Methods Using Response Surface Methodology - Part I: Process Variables. *Revista Virtual de Química*. 9, 184-1215.

OSTROWSKA, Kinga. Coumarin-piperazine derivatives as biologically active compounds. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 28, 220-232.

PADALIA, Hemali; MOTERIYA, Pooja; CHANDA, Sumitra. Green synthesis of silver nanoparticles from marigold flower and its synergistic antimicrobial potential. *Arabian Journal Of Chemistry*. 8, 732-741.

PARTHIBAN, Ezhumalai *et al.* Green synthesis of silver-nanoparticles from *Annona reticulata* leaves aqueous extract and its mosquito larvicidal and anti-microbial activity on human pathogens. *Biotechnology Reports*. 21, 1-10.

PEREIRA, Renata Junqueira; CARDOSO, Maria das Graças. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. *Journal Of Biotechnology And Biodiversity*. 4, 146-152.

QAIS, Faizan Abul *et al.* Green synthesis of silver nanoparticles using *Carum copticum*: assessment of its quorum sensing and biofilm inhibitory potential against gram negative bacterial pathogens. *Microbial Pathogenesis*. 144, 1-10.

RAJ, Shani; MALI, Suresh Chand; TRIVEDI, Rohini. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Enicostemma axillare* (Lam.) leaf extract. *Biochemical And Biophysical Research Communications*. 503, 2814-2819.

ROY, Anupam *et al.* Green synthesis of silver nanoparticles: biomolecule-nanoparticle organizations targeting antimicrobial activity. *Rsc Advances*. 9, 2673-2702.

RUDRAMURTHY, Gudepalya *et al.* Nanoparticles: Alternatives Against Drug-Resistant Pathogenic Microbes. *Molecules*. 21, 836-865.

SANTOS, Lauro Ricardo de Lima; ALMEIDA NETO, Omar Pereira de; FREITAS, Efigênia Aparecida Maciel de. Infections related to health care in adult intensive care units of adult hospitals: integrative review. *Revista de Atenção à Saúde, São Caetano do Sul*. 14, 66-71.

SOARES, Sara Gabrielly de Sousa Costa *et al.* Characterization of the infections related to health care in a teaching hospital in the Northeastern of Brazil. *Revista de Enfermagem da UFPI*. 4, 37-43.

TARLEY, César Ricardo Teixeira *et al.* Chemometric tools in electroanalytical chemistry: Methods for optimization based on factorial design and response surface methodology. *Microchemical Journal*. 92, 58-67.

UVAROV, Vladimir; POPOV, Inna. Metrological characterization of X-ray diffraction methods at different acquisition geometries for determination of crystallite size in nano-scale materials. *Materials Characterization*. 85, 111-123.

VERMA, Aparajita; MEHATA, Mohan Singh. Controllable synthesis of silver nanoparticles using Neem leaves and their antimicrobial activity. *Journal Of Radiation Research And Applied Sciences*. 9, 109-115.

VINAYAGAM, Ramesh; VARADAVENKATESAN, Thivaharan; SELVARAJ, Raja. Green synthesis, structural characterization, and catalytic activity of silver nanoparticles stabilized with *Bridelia retusa* leaf extract. *Green Processing And Synthesis*. 7, 30-37.

WANG, Jiaying *et al.* A functionalized surface modification with vanadium nanoparticles of various valences against implant-associated bloodstream infection. *International Journal Of Nanomedicine*. 12, 3121-3136.

WANG, Linlin; HU, Chen; SHAO, Longquan. The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future. *International Journal Of Nanomedicine*. 12, 1227-1249.

YADAV, Renuka *et al.* Bioengineering of *Piper longum* L. extract mediated silver nanoparticles and their potential biomedical applications. *Materials Science And Engineering: C*. 104, 1-17.

ZHANG, Xi-feng; LIU, Zhi-guo; SHEN, Wei; GURUNATHAN, Sangiliyandi. Silver Nanoparticles: synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches. International Journal Of Molecular Sciences. 17, 1-34.

Anexo B: Comprovante de submissão do artigo

Journal: Arabian Journal of Chemistry

Title: Evaluation of the antimicrobial activity of silver nanoparticles biosynthesized from *Schinus terebinthifolius* Raddi

Corresponding Author: Dr Walter Lopes dos Santos

Co-Authors: Milene Dias Ferreira; Lourdes Cardoso de Souza Neta; Geovani Cardoso Brandão

Manuscript Number:

Dear Milene Dias Ferreira,

Dr Walter Lopes dos Santos submitted this manuscript via Elsevier's online submission system, Editorial Manager, and you have been listed as a Co-Author of this submission. Elsevier asks Co-Authors to confirm their consent to be listed as Co-Author and track the papers status. In order to confirm your connection to this submission, please click here to confirm your co-authorship:

<https://www.editorialmanager.com/arabjc/l.asp?i=676335&l=QPDUPTSZ>

If you have not yet registered for the journal on Editorial Manager, you will need to create an account to complete this confirmation. Once your account is set up and you have confirmed your status as Co-Author of the submission, you will be able to view and track the status of the submission as it goes through the editorial process by logging in

at <https://www.editorialmanager.com/arabjc/>

If you did not co-author this submission, please contact the Corresponding Author directly at walters8@gmail.com

Thank you,

Arabian Journal of Chemistry

More information and support

FAQ: What is Editorial Manager Co-Author registration?

https://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/28460/supporthub/publishing/kw/co-author+editorial+manager/

You will find information relevant for you as an author on Elsevier's Author

Hub: <https://www.elsevier.com/authors>

FAQ: How can I reset a forgotten password?

https://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/28452/supporthub/publishing/

For further assistance, please visit our customer service

site: <https://service.elsevier.com/app/home/supporthub/publishing/>

Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about Editorial Manager via interactive tutorials. You can also talk 24/7 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Use the following URL: <https://www.editorialmanager.com/arabjc/login.asp?a=r>). Please contact the publication office if you have any questions.