



# Nanopartículas de prata biossintetizadas por *Mikania glomerata* Sprengel inibem o crescimento de *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus*

*Biosynthesized silver nanoparticles by Mikania glomerata Sprengel inhibit the growth of Candida albicans and Staphylococcus aureus.*

Brenda Kischkel<sup>1</sup> , Aleia Harumi Uchibaba Yamanaka<sup>1</sup> , Natália Depieri Brita<sup>1</sup> , Melyssa Negri<sup>2</sup> 

<sup>1</sup>Departamento de Biologia, Universidade Estadual de Maringá (UEM)-Maringá-Brasil, <sup>2</sup>Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá (UEM)-Maringá-Brasil

## Resumo

**Introdução:** Nos últimos anos ocorreu o aumento de casos relacionados com a infecção por *Candida* spp. e *Staphylococcus* spp., bem como o aparecimento de cepas resistentes a antibióticos convencionais. A biossíntese de nanopartículas consiste na redução de um íon metálico por compostos de origem natural como metabólitos secundários de plantas e organismos, sendo a forma mais indicada por apresentar menor toxicidade quando comparada à síntese química. Desta forma, a síntese biológica constitui uma alternativa para a obtenção de novos agentes ativos para o tratamento de infecções microbianas. **Objetivos:** Sintetizar nanopartículas de prata a partir do extrato aquoso de *Mikania glomerata* Sprengel e avaliar possível atividade microbiana e citotóxica. **Material e Métodos:** Para a síntese das nanopartículas de prata (AgNPs) foi utilizado um extrato aquoso das folhas de *M. glomerata* e uma solução de nitrato de prata. As AgNPs sintetizadas foram avaliadas por espectrofotômetro UV-vis e espectrometria de absorção atômica com chama. Além disso, a atividade antimicrobiana foi avaliada contra cepas de *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus* e atividade citotóxica contra linhagens celulares HeLa e Vero. **Resultados:** As AgNPs são mais eficientes no combate à linhagem de *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus* quando comparadas ao extrato puro administrado. Até a concentração de 100 mg/mL do extrato puro não foi observado efeito inibitório em ambos os micro-organismos. Entretanto quando em contato com as AgNPs, a concentração inibitória foi de 0,006 mg/mL e 0,1 mg/mL para *S. aureus* e *C. albicans*, respectivamente. O efeito citotóxico nas células se comportou de maneira dose-dependente, apresentando maior potencial citotóxico contra a linhagem celular cancerosa HeLa. **Conclusão:** As AgNPs sintetizadas apresentaram potencial antimicrobiano contra *C. albicans* e *S. aureus*, além de baixa atividade contra células normais, indicando sua confiabilidade para aplicação das AgNPs como forma alternativa de tratamento. Estes resultados são promissores e contribuem para pesquisa relacionada à produção de medicamentos utilizando extrato de plantas e metais.

**Descritores:** Síntese biológica; Guaco; Anti-Infeciosos.

## Abstract

**Introduction:** In recent years there has been an increase in cases related to infection by *Candida* spp. and *Staphylococcus* spp., as well as the appearance of strains resistant to conventional antibiotics. Nanoparticle biosynthesis consists of the reduction of a metal ion by compounds of natural origin as secondary metabolites of plants and organisms, being the most indicated form because it presents less toxicity when compared to the chemical synthesis. In this way, the biological synthesis is an alternative to obtain new active agents for the treatment of microbial infections. **Objective:** Synthesize silver nanoparticles from the aqueous extract of *Mikania glomerata* Sprengel and evaluate possible microbicidal and cytotoxic activity. **Material and Methods:** For the synthesis of the silver nanoparticles (AgNPs) an aqueous extract of the leaves of *Mikania glomerata* plus a solution of silver nitrate was used. AgNPs synthesized was evaluated by UV-vis spectrophotometer and FAAS. Furthermore, antimicrobial activity was evaluated against strains of *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* and cytotoxicity activity against HeLa and Vero cell lines. **Results:** AgNPs are shown to be more efficient in combating *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* strains when compared to the pure administered extract. Up to the concentration of 100 mg/mL of the pure aqueous extract no inhibitory effect was observed on both microorganisms. However when the strains were in contact with AgNPs, the inhibitory concentration was 0.006 mg/mL and 0.1 mg/mL for *S. aureus* and *C. albicans*, respectively. The cytotoxic effect on the cells behaves in a dose-dependent manner, presenting greater cytotoxic potential against the HeLa cancer cell line. **Conclusion:** Thus, these results are promising and contribute to research related to the production of drugs using plant extract and metals. The AgNPs synthesized presented the antimicrobial potential against *C. albicans* and *S. aureus*, in addition to low activity against normal cells, indicating their reliability for application of AgNPs as an alternative form of treatment.

**Descriptors:** Biological Synthesis; Guaco; Anti-Infective Agents.

**Contribuição dos autores:** BK coleta, delineamento do estudo, elaboração do manuscrito e redação do manuscrito, AHUY coleta, delineamento do estudo, elaboração do manuscrito e redação do manuscrito, NBD coleta, delineamento do estudo, elaboração do manuscrito e redação do manuscrito, MN orientação do projeto, discussão dos achados, delineamento do estudo, elaboração do manuscrito.

**Contato para correspondência:**  
Melyssa Negri

**E-mail:**  
mfingrassi2@uem.br

**Conflito de interesses:** Não

**Recebido:** 25/07/2018  
**Aprovado:** 28/11/2018



## Introdução

A síntese de nanopartículas (NPs) de metais nobres vem ganhando destaque devido às suas características como tamanho, forma, morfologia e ainda, podem ser atribuídas propriedades como aumento da atividade catalítica<sup>1,2</sup>. A síntese destas NPs consiste em reduzir um íon metálico de um substrato, seja este de natureza química ou biológica. No entanto, os solventes inorgânicos utilizados durante a redução química podem ser tóxicos, bem como produtos residuais, especialmente quando se trata de uma produção em grande escala<sup>3</sup>. Pensando nisso, fontes alternativas e menos nocivas ao meio ambiente foram desenvolvidas. Um exemplo é a síntese de compostos biológicos, conhecida como biossíntese ou síntese verde, que pode reduzir significativamente os riscos de produção de compostos tóxicos. A síntese verde pode empregar partes de plantas (folhas, caule, raízes, frutos), bactérias, fungos e secreções de animais, como o leite<sup>4</sup>.

A prata é um metal seguro e eficaz, uma vez que é não tóxico para as células animais e altamente tóxico para as células bacterianas<sup>5</sup>. A reação de redução da síntese de nanopartículas de prata (AgNPs) por meio do extrato vegetal baseia-se nas propriedades químicas dos íons de prata ( $\text{Ag}^+$ ) capazes de captar os elétrons dos metabólitos presentes no extrato e estabilizá-los. Assim, as NPs sintetizadas podem ser exploradas quanto à especificidade do alvo para o diagnóstico e terapia<sup>6</sup>, uma vez que devido ao tamanho reduzido, podem interagir com as biomoléculas presentes na superfície ou no interior da célula<sup>7</sup>.

A espécie *Mikania glomerata* Sprengel., pertence à família Asteraceae e é popularmente conhecida no Brasil como guaco. É uma planta trepadeira e terrestre, amplamente utilizada na medicina popular devido a propriedades farmacológicas como antimicrobiano, anti-inflamatório, vasodilatador, espasmódica, anti-estresse, entre outros<sup>8,9</sup>. Neste estudo foi considerado o extrato aquoso das folhas de *M. glomerata*, uma vez que estudos fitoquímicos já identificaram diversos compostos secundários presentes nas folhas, como esteroides, cumarinas, taninos, saponinas e alcalóides<sup>10</sup>.

*C. albicans* é uma espécie de fungo que faz parte da microbiota vaginal comum da mulher, no entanto, trata-se de uma espécie oportunista, que pode ocasionar graves casos de infecção pela colonização de superfícies mucosas, podendo progredir para uma infecção sistêmica, principalmente em pacientes imunocomprometidos pelo HIV<sup>11</sup>. *S. aureus* é uma bactéria comensal e patógeno humano relatado como uma das principais causas de bacteremia e endocardite<sup>12</sup>. Além disso, nos últimos anos o número de infecções hospitalares e adquiridas na comunidade causadas por *S. aureus* resulta em aproximadamente 50.000 mortes a cada ano apenas nos EUA<sup>11</sup>. Diversos estudos já relataram o co-isolamento de ambas as espécies citadas em doenças como a periodontite, estomatite e cerite<sup>13,14</sup>.

Desta forma, consideramos neste estudo a síntese verde de NPs utilizando extratos vegetais para o tratamento de infecções causadas por *C. albicans* e *S. aureus*, uma vez que se trata de um método com várias vantagens, como econômica, rápida, ecológica, segurança para uso humano<sup>15</sup> e ampla disponibilidade de fontes<sup>16</sup>, o que favorece a produção de NPs em grande escala. Atualmente, muitos trabalhos estão sendo desenvolvidos para a síntese de NPs a partir de extratos de diferentes partes de plantas, para uso em diferentes áreas, como preservação de embalagens de alimentos, cosméticos e medicamentos<sup>16</sup>.

Este estudo teve como objetivo preparar emulsões de AgNPs a partir do extrato aquoso de *Mikania glomerata* Sprengel como agente redutor e estabilizador utilizando os fundamentos da química verde. Além disso, as AgNPs sintetizadas foram avaliadas por espectrofotômetro UV-vis e espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS). A atividade antimicrobiana foi avaliada contra cepas de *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus* e citotoxicidade contra linhagens celulares HeLa e Vero.

## Material e Métodos

### Preparação do extrato aquoso de *Mikania glomerata*

Folhas frescas da planta, *Mikania glomerata* Sprengel (guaco), foram coletadas em Maringá, Paraná, Brasil. A espécie foi identificada e autenticada, disponível no herbário da Universidade Estadual de Maringá (HUEM 31788). A solução de folhas frescas de *M. glomerata* foi cuidadosamente lavada com detergente seguido de enxágue vigoroso em água destilada. Um total de 10 g das folhas foram pesadas e maceradas utilizando água destilada para extração, suficiente para perfazer um volume final de 100 mL. Após a extração do extrato aquoso, a solução foi centrifugada e filtrada em membrana de 0,45 µm (Merck, EUA) e armazenada a 4°C para a síntese de NPs.

### Síntese de nanopartículas de prata

Para a síntese de AgNPs, cerca de 10 mL do extrato aquoso de *M. glomerata* foram adicionados a uma solução de 90 mL de  $\text{AgNO}_3$  a 1 mM (Synth, São Paulo, BR) e mantidos à temperatura ambiente. A síntese foi realizada de duas formas, na ausência e na presença de luz solar. Dois controles de reação negativa foram mantidos, um sem a adição do extrato na solução de nitrato de prata e outro sem a adição de nitrato de prata ao extrato.

A síntese de AgNPs foi observada por espectroscopia ultravioleta visível (UV-Vis). A biorredução de íons  $\text{Ag}^+$  foi medida pelos espectros de UV-vis da solução em Espectrofotômetro UV / VIS / NIR Perkin Elmer Lambda 1050, 350-700 nm operado a uma resolução de 1 nm. A mistura reacional foi centrifugada (Analytical - 420R) a 10.000 rpm durante 10 minutos e lavada com água destilada. Este processo foi repetido três vezes. Então, o sobrenadante que supostamente contém os AgNPs foi separado do material. Para quantificar a prata presente, a solução foi conduzida para FAAS. As leituras foram realizadas no espectrofotômetro de absorção atômica SpectrAA-50B (Varian, Califórnia, EUA), utilizando-se absorção atômica com chama, onde a solução padrão de prata pura (Merck, Darmstadt, Alemanha) foi utilizada como controle. Os procedimentos estão reunidos na Figura 1.

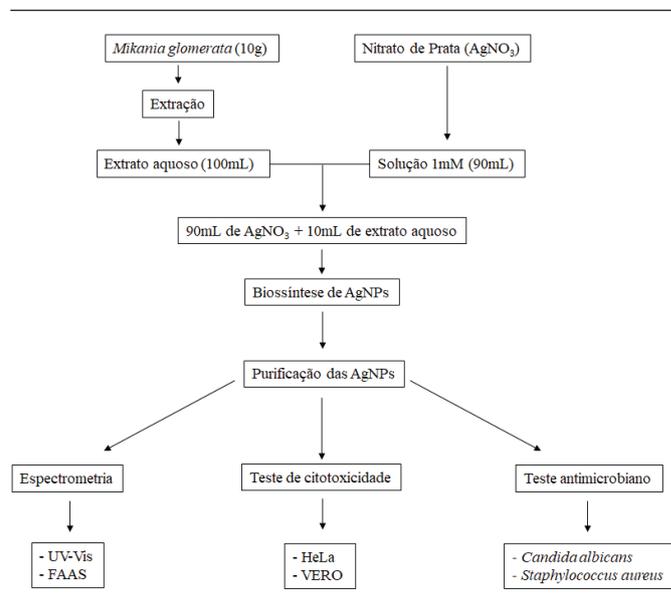


Figura 1. Fluxograma do procedimento de biossíntese de AgNPs e testes biológicos.

### Avaliação da atividade antimicrobiana das nanopartículas de prata sintetizadas

Neste estudo, foram utilizadas estirpes de referência de *Candida albicans* ATCC 90028 e *Staphylococcus aureus* 29213 da American Type Culture Collection (Rockville, MD, EUA). Para o teste de suscetibilidade, utilizou-se o método de microdiluição em caldo de acordo com os protocolos do *Clinical and Laboratory Standards*

Institute, M27-A3 para leveduras e o M7-A6 para bactérias, com algumas modificações para produtos naturais. O inóculo para *C. albicans* foi ajustado para 2,5 a  $5 \times 10^3$  unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC)/mL em RPMI 1640 (Instituto Roswell Park Memorial, Gibco, EUA). O inóculo de *S. aureus* foi ajustado à turbidez de 0,5 McFarland em caldo Mueller-Hinton (Difco, EUA). O extrato da planta foi testado nas concentrações de 100, 50, 25, 12,5, 6,2, 3,1, 1,5, 0,7, 0,3 e 0,1 mg/mL, enquanto as AgNPs foram testadas para nas concentrações de 1,6, 0,8, 0,4, 0,2, 0,1, 0,05, 0,025, 0,012, 0,006, 0,003 mg/mL. Foi adicionado 100  $\mu$ L de extrato e AgNPs de cada concentração com 100  $\mu$ L do inóculo em uma placa de poliestireno de 96 poços (Kasvi, Itália). As placas foram incubadas a 35°C durante 48 horas. A concentração inibitória mínima (CIM) foi considerada a menor concentração na qual nenhum crescimento fúngico e bacteriano foi evidente. Na sequência, a determinação da concentração microbicida mínima (CMM) foi realizada através da semeadura em placas contendo meio para crescimento de leveduras, agar Sabouraud dextrose (SDA; Kasvi, Itália) ou de bactérias, ágar Mueller-Hinton (MHA; Difco, EUA). Após 24 horas de incubação a 30°C, as leituras das CMMs foram realizadas com base no crescimento dos controles e expressas em UFC/mL, sendo considerada CMM, a menor concentração da droga que impediu o crescimento visível do subcultivo.

### Ensaio de Citotoxicidade

A avaliação da citotoxicidade do extrato vegetal e das AgNPs foi realizada utilizando MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio; Invitrogen, EUA). Este método mede a atividade mitocondrial de células viáveis na metabolização de sais de tetrazólio. Utilizou-se linhagens celulares HeLa (adenocarcinoma cervical) e VERO (rim de macaco verde africano). Aproximadamente  $2 - 2,5 \times 10^5$  mL células em sua fase de crescimento exponencial em DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium; Gibco, EUA) contendo 10% de soro bovino fetal (FS; Gibco, EUA) e 1% de penicilina / estreptomicina (P / S, Gibco, EUA), foram semeadas em placa de poliestireno de 96 poços e incubadas durante 24 horas a 37°C a 5% de CO<sub>2</sub>. Após 24 horas os poços foram lavados com PBS, o extrato vegetal e as AgNPs diluídas em DMEM foram adicionados às mesmas concentrações descritas anteriormente e incubados por 24 horas a 37°C sob 5% de CO<sub>2</sub>. Subsequentemente, os poços foram lavados duas vezes com PBS e adicionados MTT a 0,2 mg/mL e incubados por 4 horas na ausência de luz. Após este período os possíveis cristais sintetizados após a redução da enzima desidrogenase mitocondrial foram diluídos em DMSO (Synth, São Paulo, BR) e a absorbância lida a 550 nm utilizando um leitor de microplacas ASYS (Biochrom, Holliston, MA, EUA). Poços contendo apenas meio de cultura e meio de cultura com células, foram utilizados como controle negativo e positivo, respectivamente.

A partir dos valores obtidos pelo leitor, calculou-se a média da densidade óptica (DO) e descontou o valor do controle negativo para atingir a viabilidade celular média (%) em relação ao controle

celular positivo, considerado 100%. Por meio do qual o índice de citotoxicidade (IC50%) foi encontrado, o que significa a concentração do extrato que induziu 50% de lise ou morte celular.

### Análise estatística

Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. O software OriginPro 8.0 (OriginLab Corporation, Northampton, EUA) foi utilizado para análise estatística. Os dados foram avaliados estatisticamente por análise de variância unidirecional (ANOVA) e as comparações das médias dos grupos individuais foram realizadas pelo teste de Tukey. Valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.

### Resultados

A biossíntese das AgNPs a partir da solução aquosa de nitrato de prata a 0,1mM, incubada com o extrato aquoso da planta *Mikania glomerata* à temperatura ambiente foi evidenciada pela cor castanho (Figura 2C). Esta mudança de cor da solução não é apenas indicativa da síntese de AgNPs, ela também pode ser usada como um parâmetro para o tempo de reação. Em nosso estudo preliminar foi possível perceber que a mistura incubada na ausência de luz demora muito tempo para mudar de cor, em torno de 12 horas. Em contraste, a mistura exposta ao sol levou cerca de 2 minutos para reduzir e formar as AgNPs com mudança de cor da solução para castanho escuro (Figura 2D). Assim, visando a otimização dos experimentos, a síntese das AgNPs foram realizadas por meio da catálise pela luz solar.

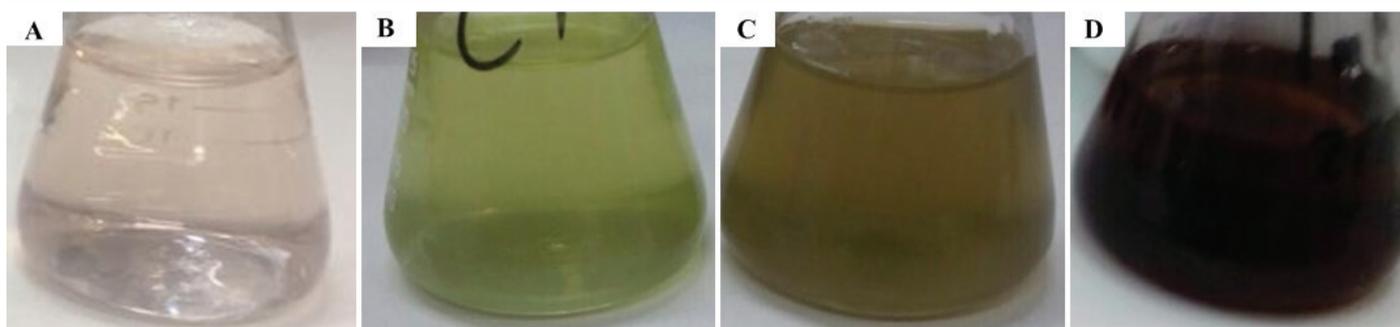
O perfil de absorção UV-Vis para as AgNPs sintetizadas é apresentado na Figura 3. Para síntese realizada na ausência de luz foi observado  $\lambda_{max}$  433 nm, enquanto que para a luz solar,  $\lambda_{max}$  443 nm, ambos indicando a presença de AgNPs.

Em nosso estudo, utilizamos a espectrometria de absorção atômica com chama para quantificar a quantidade de prata presente na amostra, através de uma curva de calibração usando diluições da solução de prata padrão. A concentração encontrada foi de 3.278 mg/L.

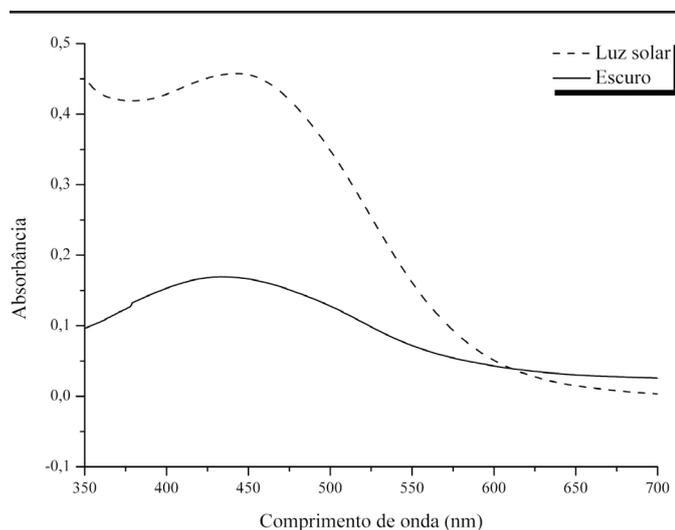
Na Figura 4 A é possível notar que o extrato aquoso de *M. glomerata* não apresentou atividade antimicrobiana contra *S. aureus* e *C. albicans* nas concentrações analisadas. O oposto foi observado pelas AgNPs (Fig. 2 B), cuja CMM e CIM foi observado a 0,006 mg/mL e 0,1 mg/mL para *S. aureus* e *C. albicans*, respectivamente.

Em nosso estudo, o ensaio MTT foi utilizado para avaliar a viabilidade celular de cepas HeLa e Vero, após exposição a AgNPs biossintetizadas a partir do extrato aquoso de *M. glomerata*. De acordo com a Figura 5, é possível observar que o efeito citotóxico nas células se comporta de maneira dose-dependente para ambos os produtos analisados. O extrato aquoso de *M. glomerata* foi menos citotóxico para as células testadas, apresentando 50% de morte celular apenas para células Vero em concentrações acima de 50 mg/mL (Figura 3 A).

A linhagem celular Vero demonstrou maior suscetibilidade



**Figura 2.** Síntese de AgNPs utilizando extrato aquoso de *Mikania glomerata* Sprengel. **A.** Controle negativo 1: contendo solução de nitrato de prata + diluente do extrato (água destilada). **B.** Controle negativo 2: extrato aquoso de *M. glomerata* + diluente do nitrato de prata (água destilada). **C.** Solução contendo nitrato de prata + extrato, após a síntese de AgNPs na ausência de luz. **D.** Solução contendo nitrato de prata + extrato após a síntese de AgNPs sob a presença de luz solar.



**Figura 3.** Espectro UV-Vis - pico de ressonância plasmática de superfície (SPR) para nanopartículas de prata biossintetizadas com extrato aquoso de *Mikania glomerata* na presença e ausência de luz natural.

quando comparada com as células HeLa na presença de AgNPs biossintetizadas com extrato aquoso de *M. glomerata*. A concentração necessária para causar 50% de morte celular foi de 0,01 mg/mL para HeLa e 0,2 mg/mL para Vero (Figura 3 B).

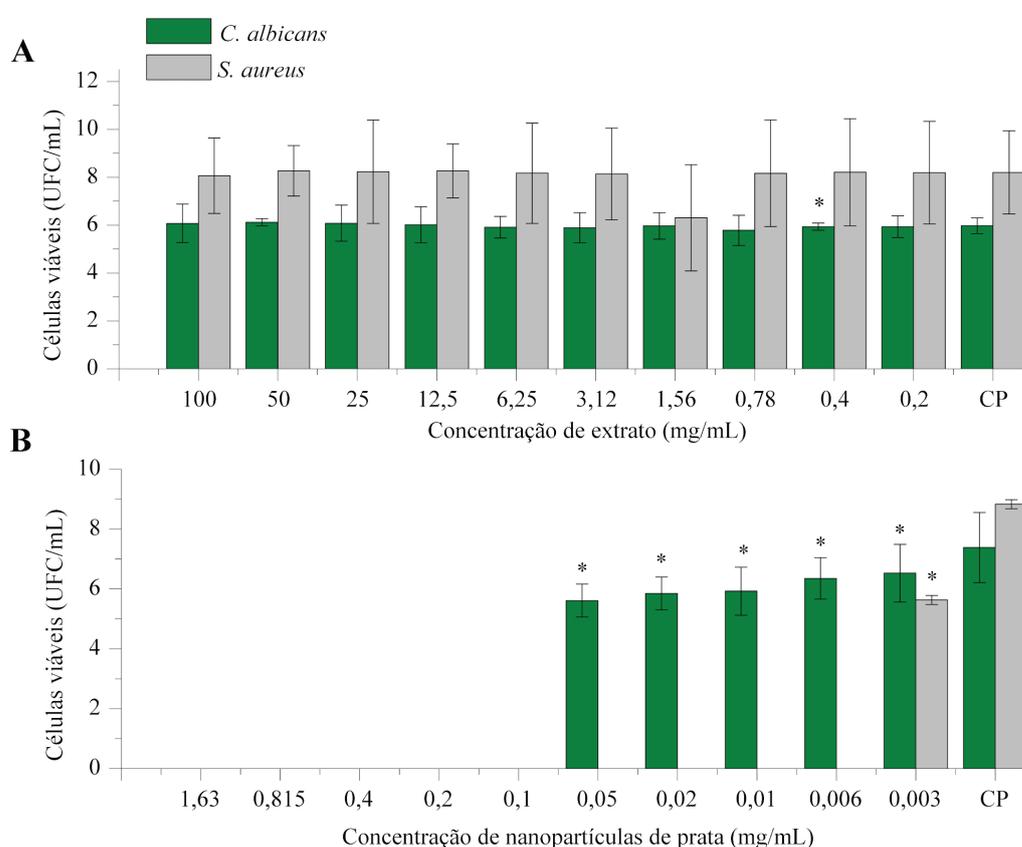
## Discussão

A nanotecnologia verde permite o desenvolvimento de produtos que levam em consideração a sustentabilidade, utilizando materiais e métodos não-tóxicos e renováveis, na tentativa de criar produtos

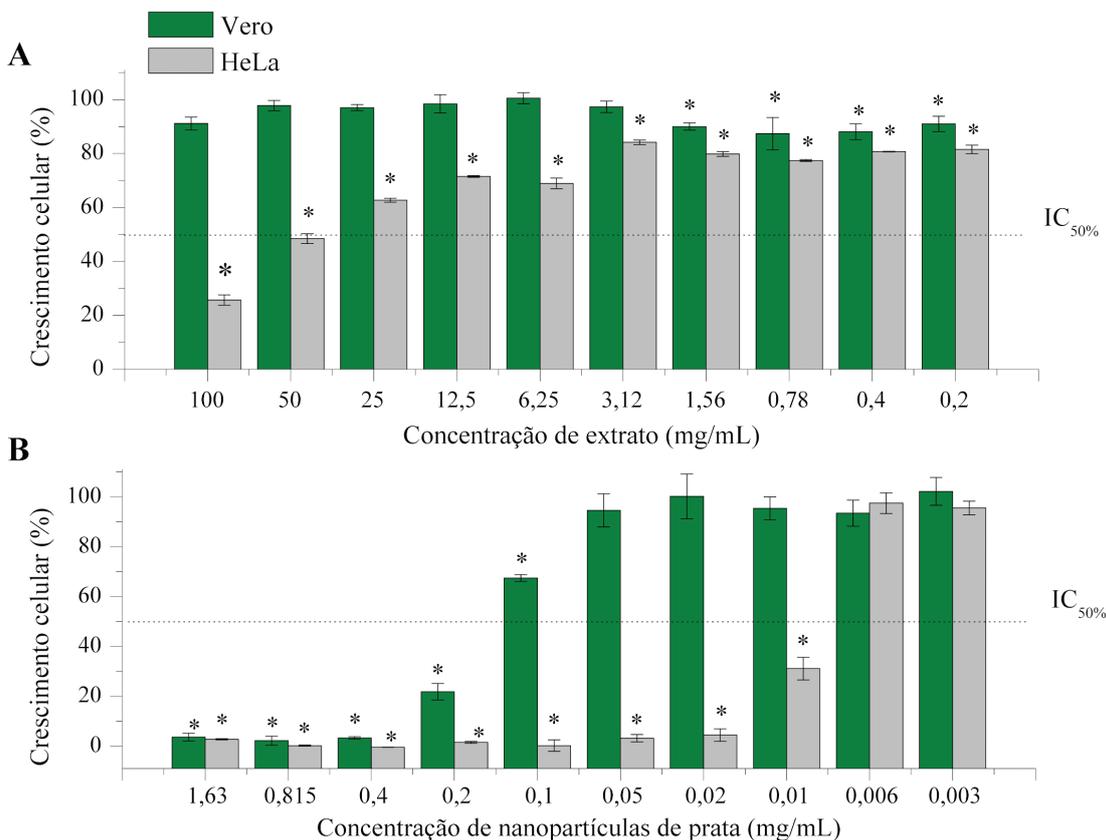
com impactos ambientais reduzidos<sup>3</sup>. Neste contexto, AgNPs biologicamente sintetizadas vêm ganhando destaque na área biomédica por exibir propriedade antimicrobiana, antioxidante e anticancerígena<sup>5</sup>, uma vez que possuem a combinação de prata e metabólitos secundários da planta de estudo. Neste estudo, o extrato de *Mikania glomerata*, popularmente conhecido como guaco e há muito tempo utilizado pela medicina natural, foi empregado com sucesso para obtenção de AgNPs através de síntese verde, podendo ser considerado um possível agente redutor para sua obtenção.

A mudança de cor na solução de síntese é indicativo da formação de AgNPs e esta reação consiste na dissociação do nitrato de prata em  $\text{Ag}^+$  e  $\text{NO}_3^-$ , seguida da redução do íon ( $\text{Ag}^+$ ) a um átomo de prata ( $\text{Ag}^0$ ) pelos metabólitos presentes no extrato<sup>17</sup>. Quando esse processo acontece, a mudança de cor da solução é observada para amarelo, com uma faixa intensa entre 380-400 nm no espectro de absorção<sup>18</sup>. O átomo de prata é encontrado em um tamanho menor que o comprimento da luz visível, podendo ser visto apenas através do espectro infravermelho<sup>19</sup>. Após a redução, os átomos se aglomeram e causam uma mudança definitiva na cor da solução, tornando-se marrom avermelhada. Essa mudança ocorre devido à excitação da ressonância plasmática de superfície (RPS) nas NPs metálicas<sup>20</sup>.

O procedimento de síntese de AgNPs por meio da catálise pela luz solar foi utilizado em nosso estudo visando a otimização dos experimentos, estando de acordo com outros autores<sup>21,22</sup>. Em nosso estudo, a reação sob a presença de luz solar demonstrou ser mais eficiente, reduzindo o tempo de reação para 2 minutos com mudança completa da cor. A biossíntese de AgNPs por fotoindução foi relatada em vários estudos<sup>23,24,25,26</sup>, entre eles, através da utilização de extratos de *Euphorbia hirta*, *Polyalthia longifolia*, *Xanthium strumarium* e *Cynodon dactylon* como agentes redutores, cuja síntese catalisada pela luz solar levou apenas alguns minutos. Outras alternativas para catálise da reação de síntese de



**Figura 4.** Efeito do extrato aquoso de *Mikania glomerata* e das nanopartículas de prata biossintetizadas a partir deste extrato aquoso em *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus* expresso em unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL). **A.** Efeito do extrato aquoso de *M. glomerata*. **B.** Efeito das nanopartículas de prata biossintetizadas a partir do extrato aquoso de *M. glomerata*. CP: controle positivo, apenas os isolados sem a adição dos compostos. Os resultados foram apresentados como a média de três experimentos independentes realizados em três repetições, \*  $p < 0,05$  em comparação ao grupo controle.



**Figura 5.** Citotoxicidade do extrato aquoso de *Mikania glomerata* e das nanopartículas de prata biossintetizadas a partir deste extrato aquoso em linhagens celulares HeLa e Vero. **A.** Extrato aquoso de *M. glomerata*. **B.** Nanopartículas de prata biossintetizadas a partir do extrato aquoso de *M. glomerata*. IC<sub>50%</sub>: Índice de citotoxicidade. Os resultados foram apresentados como a média de três experimentos independentes realizados em três repetições, \* p < 0,05 em comparação ao grupo controle.

NPs e excitação de elétrons, já foi relatada, tais como: laser, radiação ionizante e microondas<sup>27,28,29</sup>.

O perfil de absorção UV-Vis observado em nosso estudo para as nanopartículas sintetizadas corrobora com aqueles obtidos por outros autores<sup>20,30</sup> que observaram  $\lambda_{max}$  440 nm. Entretanto, AgNPs triangulares cuja absorção foi em torno de  $\lambda_{max}$  565 nm já foram relatadas<sup>31</sup>. Estas diferenças observadas no pico máximo são devidas ao deslocamento da banda de ressonância plasmática das diferenças de tamanho, forma da nanopartícula<sup>30</sup>, ambiente químico, espécies adsorvidas na superfície e constante dielétrica<sup>19</sup>. Portanto, como comprovado pelo espectro de absorção, é evidente que os compostos presentes em *M. glomerata* podem ser empregados como um substrato viável para a biossíntese de AgNPs utilizando de forma eficiente a luz solar como catalisador de reação. Fato este observado quando avaliamos a concentração de prata na solução de AgNPs em espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS), em que o comprimento de onda utilizado neste estudo foi de 328,1 nm, correspondendo ao comprimento de onda da absorção de radiação pela prata<sup>32</sup>.

Vários estudos que aplicam o conceito de síntese verde para obtenção de nanopartículas não têm avaliado a quantidade de prata presente na solução após síntese e purificação, por métodos como a espectrometria de absorção atômica. Ao contrário da síntese química, na qual existe uma ampla gama de estudos na área. Porém, AgNPs já foram obtidas através de síntese química utilizando citrato de sódio e borohidreto de sódio como agentes redutores e obteve-se 22,18 mg/L e 27,18 mg/L de AgNPs, respectivamente<sup>33</sup>. Embora a síntese verde não seja a forma mais rentável de produção de NPs quando comparada com a síntese química, essa ainda é a técnica que oferece menos riscos ao manipulador, que leva a um produto menos tóxico e ecologicamente correto<sup>4</sup>. Desta forma, é de extrema importância o estudo de novas fontes alternativas para a síntese de AgNPs que possam se igualar a síntese química em rentabilidade.

Estudos já foram realizados para comprovar a atividade antimicrobiana dos extratos de *M. glomerata*<sup>34</sup>. Apesar disso, em nossos experimentos o extrato aquoso de *M. glomerata* sozinho apresentou uma baixa atividade antibacteriana e antifúngica. O mesmo já foi observado por outros autores, porém com concentrações de extratos superiores às aplicadas neste estudo e utilizando extratos alcoólicos, como exemplo, extrato metanólico, no qual foi observado baixa atividade contra *S. aureus* (CIM 90% de 3,8 mg/mL), porém, o extrato atua sinergicamente com antibióticos com maior eficiência antimicrobiana<sup>35</sup>. Fato que também pode ser observado neste estudo, no qual a inibição significativa do *S. aureus* só foi realizada através das AgNPs produzidas pelo extrato. Por outro lado, a atividade do extrato de *M. glomerata* depende também do tipo de solvente utilizado para extração, uma vez que o extrato hidroalcoólico da planta já foi utilizado com sucesso contra *S. aureus* a uma concentração mais baixa (0,5 mg/mL)<sup>36</sup>.

Em relação a atividade antifúngica do extrato de *M. glomerata*, estudos mostraram que o extrato hidroalcoólico não é capaz de inibir a proliferação de *C. albicans*<sup>34</sup>. Da mesma forma, o extrato etanólico foi completamente inativo. Esses resultados corroboram com o observado na Figura 4B. Este resultado também foi encontrado para outras espécies de *Candida*, onde o extrato etanólico foi ineficaz contra *C. parapsilosis* até 1 mg/mL apresentando melhor atividade contra *C. krusei* e *C. tropicalis* a 0,5 mg/mL de extrato<sup>36</sup>.

Nossos resultados foram satisfatórios, uma vez que, as AgNPs produzidas a partir do extrato de *Cynodon dactylon* apresentaram atividade contra *S. aureus* a uma concentração mais elevada de 0,01 mg/mL<sup>26</sup>. Contudo, para *C. albicans*, AgNPs obtidas através de biossíntese utilizando o fungo endofítico *Aspergillus clavatus*, inibiram seu crescimento a 0,009 mg/mL<sup>37</sup>. Desta forma, levando em consideração a dose necessária para inibir o crescimento do microrganismo, as NPs obtidas apresentaram maior eficiência contra

a bactéria testada.

Atualmente, poucos estudos foram realizados para verificar os efeitos citotóxicos de nanopartículas biossintetizadas. Em sua maioria, mostram que o aumento da concentração de NPs leva ao aumento da citotoxicidade em várias linhagens celulares<sup>38</sup>, corroborando com o observado na Figura 5. Como exemplo, AgNPs sintetizadas pelo extrato aquoso de *Melia azedarach* e testado contra células HeLa, apresentou IC<sub>50%</sub> a 0,3 mg/mL<sup>39</sup>, concentração muito superior à observada neste estudo. AgNPs em células HeLa são capazes de desencadear a apoptose e aumentar a regulação dos níveis de expressão dos genes de resposta ao estresse<sup>40</sup>. Enquanto para a linhagem celular não carcinogênica (Vero), as AgNPs apresentaram citotoxicidade em concentração muito superior à necessária para inibir os microrganismos testados (0,2 mg/mL).

Esses resultados são muito importantes, uma vez que as AgNPs apresentaram seletividade ao ser potencialmente tóxico para linhagem celular tumoral (HeLa) do que para a linhagem celular celular normal, portanto, o produto obtido pode ser considerado confiável, com nível de toxicidade abaixo da concentração para inibir microrganismo como *S. aureus* e *C. albicans*.

## Conclusão

A obtenção de AgNPs a partir extrato aquoso de folhas de *M. glomerata* é um método alternativo sustentável e menos prejudicial ao meio ambiente e à saúde humana se comparado a métodos químicos e físicos. As AgNPs se mostraram eficientes na inibição do crescimento por *C. albicans* e *S. aures*, representando uma formulação alternativa para o tratamento de infecções causadas por esses patógenos. Além disso, a maior seletividade contra a célula tumoral torna a formulação apresentada neste estudo de extremo interesse para o desenvolvimento de um novo fármaco. Desta forma, o próximo passo deste estudo consistirá na adoção de novas estratégias para validação do uso das AgNPs obtidas para tratamento clínico.

## Agradecimentos

Agradecemos a concessão do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - Número do Processo 552276 / 2011-1), Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa da Universidade Estadual de Maringá (COMCAP-UEM).

## Referências

1. Abdel-Aziz M, Shaheen M, El-Nekeety A, Abdel-Wahhab M. Antioxidant and antibacterial activity of silver nanoparticles biosynthesized using *Chenopodium murale* leaf extract. *J Saudi Chem Soc.* 2014;18(4):356-63. doi: 10.1016/j.jscs.2013.09.011.
2. Silva LP, Bonatto CC, Pereira FDES, Silva, LD, Albernaz VL, Polez VLP. Nanotecnologia verde para síntese de nanopartículas metálicas. In: Resende RR (Org.). *Biotecnologia aplicada à Agro&Indústria*. São Paulo: Blucher; 2016. p. 967- 1012.
3. Paulkumar K, Rajeshkumar S, Gnanajobitha G, Vanaja M, Malarkodi C, Annadurai G. Biosynthesis of silver chloride nanoparticles using *Bacillus subtilis* MTCC 3053 and assessment of its antifungal activity. *Hindawi Publish Corporat.* 2013; Article ID 317963:1-8. doi: http://dx.doi.org/10.1155/2013/317963.
4. Singh K, Panghal M, Kadyan S, Chaudhary U, Yadav J. Antibacterial activity of synthesized silver nanoparticles from *Tinospora cordifolia* against multi drug resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. *J Nanomed Nanotechnol.* 2014;5:1-6. doi: 10.4172/2157-7439.1000192.
5. Pandey JK1, Swarnkar RK, Soumya KK, Dwivedi P, Singh MK, Sundaram S, et al. Silver nanoparticles synthesized by pulsed laser ablation: as a potent antibacterial agent for human enteropathogenic gram-positive and gram-negative bacterial strains. *Appl Biochem Biotechnol.* 2014;174(3):1021-31. doi: 10.1007/s12010-014-0934-y.
6. Rai M, Ingle A, Birla S, Yadav A, Santos C. Strategic role of selected noble metal nanoparticles in medicine. *Crit Rev Microbiol.* 2016;42(5):696-719. doi: 10.3109/1040841X.2015.1018131
7. Mathew T, Kuriakose S. Studies on the antimicrobial properties of colloidal silver nanoparticles stabilized by bovine serum albumin. *Colloides Surf. B.* 2013;101:14-8. doi: 10.1016/j.colsurfb.2012.05.017
8. Gasparetto JC, Peccinini RG, Francisco TMG, Cerqueira LB, Campos FR, Pontarolo R. A kinetic study of the main guaco metabolites using syrup formulation and the identification of

an alternative route of coumarin metabolism in humans. *Plos One.* 2015;10(3):e0118922. doi: 10.1371/journal.pone.0118922.

9. Fulanetti FB, Camargo GGR, Ferro MC, Randazzo-Moura P. Toxic effects of the administration of *Mikania glomerata* Sprengel during the gestational period of hypertensive rats. *Open Vet J.* 2016;6(1):23-9. doi: 10.4314/ovj.v6i1.4.
10. Santana LCLR, Brito MRM, Oliveira GLS, Citó AMGL, Alves CQ, David JP, et al. *Mikania glomerata*: Phytochemical, Pharmacological, and Neurochemical Study. *Evid Based Compl Alternat Med.* 2014;11(Article ID 710410):1-11. doi: 10.1155/2014/710410.
11. Schlecht LM, Peters BM, Krom BP, Freiberg JA, Häscher GM, Filler SG et al. Systemic *Staphylococcus aureus* infection mediated by *Candida albicans* hyphal invasion of mucosal tissue. *Microbiol.* 2015;161(Part1):168-81. doi: 10.1099/mic.0.083485-0.
12. Tong SYC, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler Jr VG. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin Microbiol Rev.* 2015;28(3):603-61. doi: 10.1128/CMR.00134-14.
13. Cuesta AI, Jewtuchowicz V, Brusca MI, Nastro ML, Rosa AC. Prevalence of *Staphylococcus* spp and *Candida* spp in the oral cavity and periodontal pockets of periodontal disease patients. *Acta Odontol Latinoam.* 2010;23(1):20-6.
14. Lim NC, Lim DK, Ray M. Polymicrobial versus monomicrobial keratitis: a retrospective comparative study. *Eye Contact Lens.* 2013;39(5):348-54. doi: 10.1097/ICL.0b013e3182a3024e.
15. Zhang XF, Liu ZG, Shen W, Gurunathan S. Silver Nanoparticles: synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches. *Int J Mol Sci.* 2016;17(9): pii: E1534 1534. doi: 10.3390/ijms17091534.
16. Sithara R, Selvakumar P, Arun C, Anandan S, Sivashanmugam P. Economical synthesis of silver nanoparticles using leaf extract of *Acalypha hispida* and its application in the detection of Mn(II) ions. *J Adv Res.* 2017;8(6):561-68. doi: 10.1016/j.jare.2017.07.001.
17. Paulkumar K, Gnanajobitha G, Vanaja M, Rajeshkumar S, Malarkodi C, Pandian K, et al. Piper nigrum leaf and stem assisted green synthesis of silver nanoparticles and evaluation of its antibacterial activity against agricultural plant pathogens. *Scient World J.* 2014;2014:829894. doi: 10.1155/2014/829894.
18. Shah M, Fawcett D, Sharma S, Tripathy SK, Poinern GEJ. Green synthesis of metallic nanoparticles via biological entities. *Mater.* 2015;8(11):7278-308. doi: 10.3390/ma8115377.
19. Mulvaney P. Surface plasmon spectroscopy of nanosized metal particles. *Langmuir.* 1996;12:788-800. doi: 10.1021/la9502711.
20. Ahmad N, Sharma S, Alma MK, Singh VN, Shamsi SF, Mehta BR, et al. Rapid synthesis of silver nanoparticles using dried medicinal plant of basil. *Colloids Surf B: Biointerfaces.* 2010;81(1):81-6. doi: 10.1016/j.colsurfb.2010.06.029.
21. Phatak RS, Hendre A. Sunlight induced green synthesis of silver nanoparticles using sundried leaves extract of *Kalanchoe pinnata* and evaluation of its photocatalytic potential. *Scholars Res Libr.* 2015;7(5):313-24.
22. Kumar B, Smita K, Cumbal L, Debut A. Green synthesis of silver nanoparticles using Andean blackberry fruit extract. *Saudi J Biol Sci.* 2017;24(1):45-50. doi: 10.1016/j.sjbs.2015.09.006
23. Kumar V, Gundampati RK, Singh DK, Jagannadham MV, Sundar S, Hasan SH. Photo-induced rapid biosynthesis of silver nanoparticle using aqueous extract of *Xanthium strumarium* and its antibacterial and antileishmanial activity. *J Ind Eng Chem.* 2016;37:224-36. doi: 10.1016/j.jiec.2016.03.032.
24. Kumar V, Gundampati R, Singh D, Bano D, Jagannadham M, Hasan S. Photoinduced green synthesis of silver nanoparticles with highly effective antibacterial and hydrogen peroxide sensing properties. *J Photochem Photobiol B Biol.* 2016;162:374-385. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2016.06.037.
25. Kumar V, Bano D, Mohan S, Singh DK, Hasan SH. Sunlight-induced green synthesis of silver nanoparticles using aqueous leaf extract of *Polyalthia longifolia* and its antioxidant activity. *Mater Lett.* 2016;181:371-7. doi: 10.1016/j.matlet.2016.05.097.
26. Sahu N, Soni D, Chandrashekar B, Sarangi BK, Satpute D, Pandey RA. Synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Cynodon dactylon* leaves and assessment of their antibacterial activity. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2013;36(7):999-1004. doi: 10.1007/s00449-012-0841-y.
27. Kim M, Osone S, Kim T, Higashi H, Seto T. Synthesis of nanoparticles by laser ablation: a review. *KONA Powder Particle J.* 2016;34:80-90. doi: 10.14356/kona.2017009.
28. Nhien LTA, Luong ND, Tien LTT, Luan LQ. Radiation synthesis of silver nanoparticles/chitosan for controlling leaf fall disease on rubber trees causing by *Corynespora cassiicola*. *J Nanomater.* 2018;9(Article ID 7121549):1-9. doi: 10.1155/2018/7121549.
29. Oluwafemi OS, Mochochoko T, Leo AJ, Mohan S, Denis J, Songca SP. Microwave irradiation synthesis of silver nanoparticles using cellulose from *Eichhornia crassipes* plant shoot. *Mater Letters.* 2016;15:576-9. doi:10.1016/j.matlet.2016.08.116.
30. Naik RR, Stringer SJ, Agarwal G, Jones SE, Stone MO. Biomimetic synthesis and patterning of silver nanoparticles. *Nat Mater.* 2002;1:169-72. doi: 10.1038/nmat758.
31. Usman AI, Aziz AA, Noqta OA. Bio-synthesis of triangular and hexagonal gold nanoparticles using palm oil fronds' extracts at room temperature. *Mater Res Express.* 2018;5(015042):1-9. doi: 10.1088/2053-1591/aaa562.
32. Bento WAS, Paim APS. Waste treatment of copper, silver, lead, chromium and potassium permanganate generated in the Chemistry lab of UFPE. *Ambiência Guarapuava.* 2015;2(1):237-46. doi: 10.5935/ambiencia.2015.01.14nt.
33. Sá EMF. Síntese de nanopartículas de prata para obtenção de nanocompósito e avaliação da atividade bactericida em poliestileno expansível [tese]. Florianópolis: Universidade Federal de

Santa Catarina; 2015.

34. Duarte M, Figueira G, Sartoratto A, Rehder V, Delarmelina C. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. *J Ethnopharmacol.* 2005;97(2):305-11. doi: 10.1016/j.jep.2004.11.016.

35. Betoni J, Mantovani R, Barbosa L, Di Stasi L, Fernandes Junior A. Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006;101(4):387-90. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762006000400007>.

36. Holetz FB, Pessini GL, Sanches N, Cortez DAG, Nakamura CV, Dias Filho BP. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002;97(7):1027-31. doi: 10.1590/S0074-02762002000700017.

37. Verma VC, Khanwar RN, Gange AC. Biosynthesis of antimicrobial silver nanoparticles by the

endophytic fungus *Aspergillus clavatus*. *Future Medicine.* 2009;5(1):33-40. doi: 10.2217/nm.09.77.

38. Safaepour M, Shahverdi AR, Shahverdi HR, Khorramizadeh MR, Gohari AR. Green synthesis of small silver nanoparticles using geraniol and its cytotoxicity against Fibrosarcoma-Wehi 164. *Avicenna J Med Biotechnol.* 2009;1(2):111-5.

39. Raman S, Priyanka KM, Jacob JA, Kamalakkannan S, Thangam R, Gunasekaran P. Cytotoxic effect of green synthesized silver nanoparticles using *Melia azedarach* against in vitro HeLa cell lines and lymphoma mice model. *Process Biochem.* 2012;47(2):273-9. doi:10.1016/j.procbio.2011.11.003.

40. Miura N, Shinohara Y. Cytotoxic effect and apoptosis induction by silver nanoparticles in HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;390(3):733-7. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.10.039.