



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CEILÂNDIA
CURSO DE FARMÁCIA**

FELIPE MOURTHÉ FÉLIX

**ELABORAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA EMPREGANDO EXTRATO
DE *Pelargonium sidoides*: SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.**

BRASÍLIA, 2019

FELIPE MOURTHÉ FÉLIX

**ELABORAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA EMPREGANDO EXTRATO
DE *Pelargonium sidoides*: SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.**

Monografia de Conclusão de Curso
apresentada como requisito parcial para
obtenção do grau de Farmacêutico,
Faculdade de Ceilândia, Universidade de
Brasília,

Orientadora: Profº. Drº. Marcelo Henrique Sousa
Co-orientadora: Me. Renata Pascoal Illanes Tormena

BRASÍLIA, 2019

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

FF316e Félix, Felipe Mourthé
Elaboração de nanopartículas de prata empregando extrato de Pelargonium sidoides: síntese, caracterização e avaliação da atividade antimicrobiana. / Felipe Mourthé Félix; orientador Marcelo Henrique Sousa; co-orientador Renata Pascoal Illanes Tormena. -- Brasília, 2019.
37 p.

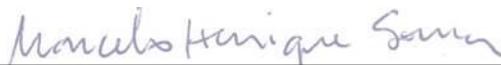
Monografia (Graduação - Farmácia) -- Universidade de Brasília, 2019.

1. Nanopartículas de Prata. 2. Síntese Verde. 3. Pelargonium sidoides. 4. Atividade Antimicrobiana. 5. Micro ondas. I. Sousa, Marcelo Henrique, orient. II. Tormena, Renata Pascoal Illanes , co-orient. III. Título.

FELIPE MOURTHÉ FÉLIX

**ELABORAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA EMPREGANDO EXTRATO
DE *Pelargonium sidoides*: SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.**

BANCA EXAMINADORA



Orientador: Profº. Drº. Marcelo Henrique Sousa
(Universidade de Brasília - FCE)



Mac-Kedson Medeiros Salviano Santos
(Centro Universitário Unieuro)



Daniel Oliveira Freire
(Faculdade LS)

BRASÍLIA, 2019

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos
não é senão uma gota de água no mar. Mas
o mar seria menor se lhe faltasse uma gota ”.*

Madre Teresa de Caucutá

Sumário

RESUMO	6
ABSTRACT	7
LISTA DE TABELAS	8
LISTA FIGURAS	9
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	10
1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
3. JUSTIFICATIVA	19
4. OBJETIVOS	19
4.1. Objetivo geral	19
4.2. Objetivos específicos	19
5. METODOLOGIA	19
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
7. CONCLUSÃO	30
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
9. ANEXO.....	37

RESUMO

Os nanomateriais estão em evidência devido a sua aplicação em diversas áreas dadas as características particulares conferidas por suas pequenas dimensões. No campo da saúde, destacam-se as nanopartículas de prata (AgNP), que normalmente são sintetizadas empregando reagentes químicos tóxicos. Neste trabalho é descrita uma rota de síntese econômica e sustentável: um método de síntese verde de AgNP assistido por micro-ondas realizado em apenas uma etapa, a partir de uma solução de nitrato de prata (AgNO_3) utilizando como agente redutor e estabilizante o extrato de *Pelargonium sidoides*. As AgNP foram caracterizadas utilizando como técnicas espectrofotometria no ultravioleta visível (UV-Vis), microscopia eletrônica de transmissão (MET), Difração de raios X (DRX) e determinação da carga de superfície (potencial Zeta). Os resultados indicam a formação de nanopartículas de prata aproximadamente esféricas com diâmetros variando entre 10 a 20nm. Em seguida, as AgNP foram avaliadas quanto a atividade antimicrobiana. Para tal, foram realizados ensaios da determinação da concentração inibitória mínima com bactérias Gram-positivas e Gram-negativas pelo método de microdiluição. O melhor resultado de CIM para *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase, com o valor de 0,85mg/mL. Esse resultado é de suma importância, visto que a resistência bacteriana é um crescente problema e necessita de novas medidas para solucionar, logo, a pesquisa de novas substâncias, neste caso, AgNP é uma ótima alternativa para o futuro dos tratamentos de infecções por microrganismos resistentes.

Palavras-Chave: Nanopartículas de Prata, Síntese Verde, Micro-ondas, *Pelargonium sidoides*, Atividade Antimicrobiana.

ABSTRACT

Nanomaterials are in evidence due to their application in several areas given the particular characteristics conferred by their small dimensions. In the field of health, the silver nanoparticles (AgNP), which are usually synthesized using toxic chemical reagents, stand out. In this work, an economical and sustainable synthesis route is described: a monowave-assisted AgNP green synthesis method was performed in a single step using a silver nitrate solution (AgNO_3) and, the extract of *Pelargonium sidoides* as reducing agent and stabilizer. The AgNP were characterized using visible ultraviolet spectrophotometry (UV-Vis), transmission electron microscopy (TEM), X-ray diffraction (XRD) and surface charge determination (Zeta potential). The results indicate the formation of spherical silver nanoparticles with diameters ranging from 10 to 20 nm. Then, the AgNP were evaluated for their antimicrobial activity. For this purpose, trials were carried out to determine the minimum inhibitory concentration of gram-positive and gram-negative bacteria by the microdilution method. The best MIC result was obtained for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase, with a value of 0,85mg/mL. This result is of great importance, since bacterial resistance is a growing problem and requires new measures to solve the research of new substances, in this case AgNP is a great alternative for the future of the treatment of infections by resistant microorganisms.

Keywords: Silver Nanoparticles, Green Synthesis, Monowave, *Pelargonium sidoides*, Antimicrobial Activity.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentração inibitória mínima obtida após o método de microdiluição em caldo.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema do processo de síntese e caracterização das AgNP.	20
Figura 2 - Determinação da Concentração Inibitória Mínima pelo método de microdiluição.	21
Figura 3 - Curva de calibração do padrão de ácido gálico.	22
Figura 4 - Espectro de UV-Vis da AgNP.	23
Figura 5 - Difratoograma da AgNP.	24
Figura 6 - Ficha cristalográfica N°. 00-004-0783.	24
Figura 7 - Imagens de MET. As barras de escala são fornecidas no canto inferior esquerdo de cada imagem.	25
Figura 8 - Histograma da distribuição do tamanho das AgNP.	26

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Ag - Prata

AgCl - cloreto de prata

AgNP - Nanopartículas de Prata

AgNO₃ - Nitrato de Prata

CIM - Concentração inibitória mínima

CFC - Cúbica de Face Centrada

CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CO₂ - Dióxido de Carbono

D.O - Densidade Óptica

DRX - Difração de Raios X

EPs 7630 - Extrato de *Pelargonium sidoids*

IC - Concentração de Inibição

ICDD - Centro Internacional para Dados de Difração

KPC - *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase

MET - Microscopia Eletrônica de Transmissão

MBC - Concentração Bactericida Mínima

UFC/mL - Unidade Formadora de Colônia por Mililitro

UV-Vis - Espectrofotometria no Ultravioleta Visível

1. Introdução

Devido possuírem características específicas de alta relevância para aplicações no setor da saúde, as nanopartículas de prata (AgNP) estão entre os materiais, em escala nanométrica, mais utilizados. Estas características podem ser: propriedades antibacterianas, antivirais, antifúngicas e atividade anti-inflamatória. Tais características tornam seu uso viável tanto para diagnóstico quanto para tratamento, na distribuição de fármacos, em revestimento de dispositivos médicos, além de outros usos (SINGH et al., 2015; GE et al., 2014).

As AgNP possuem maior superfície de contato, devido suas pequenas dimensões, o que acarreta em uma maior efetividade do poder antimicrobiano. Segundo alguns estudos o mecanismo de ação das AgNP é por meio de uma adesão à membrana celular dos microrganismos, o que acarreta na perturbação da permeabilidade e respiração celular. (SHARMA et al., 2009).

No presente momento, existem várias rotas de síntese de AgNP visando à obtenção de tamanhos e formas variadas ou revestimentos. Para aplicação na área biomédica os métodos de obtenção com a utilização de solventes orgânicos têm sido preteridos em relação aos métodos de síntese em meios aquosos (ou com solventes mais brandos) ou por síntese verde, pois as AgNP obtidas nestes processos são mais biocompatíveis. Neste cenário, a síntese verde vem se destacando como uma alternativa ecologicamente vantajosa em relação à síntese tradicional pela redução na toxicidade e por possibilitar o estabelecimento de metodologias simples e eficientes para obtenção de dispersões estáveis de nanobastões e nanoesferas de prata a partir de biomassa (GARCÍA-BARRASA et al., 2011; MOHAPATRA et al., 2015; GHAFARI-MOGHADDAM et al., 2014).

Tentando melhor parametrizar as condições de elaboração das nanopartículas, o uso do micro-ondas tem se mostrado uma técnica de grande valia na produção de nanoestruturas de prata devido a possibilidade de reduzir o tempo de síntese e por permitir maior controle da morfologia, no preparo rápido de nanopartículas esféricas, assim como na formação de estruturas individuais poligonais, folhas, hastes, fios, bastões e dendritos, de elevados graus de cristalinidade (KAHRILAS et al., 2013; MELÉNDREZ et al., 2015; NADAGOUDA et al., 2011).

O extrato da planta *Pelargonium sidoides*, conhecido comercialmente como Kaloba, tem uma longa tradição no tratamento de doenças, começando com os

registros dos etnobotânicos de meados do século XIX. Além disso, estudos recentes realizados com o extrato comercial destas raízes confirmaram seus efeitos antioxidantes e anticancerígenos. De fato, as raízes de *Pelargonium sidoides* são conhecidas por conter uma riqueza de cumarinas altamente oxigenadas e numerosos outros compostos fenólicos e polifenólicos (BRENDLER; VAN WYK, 2008; PEREIRA et al., 2015).

De acordo com Kolodziej (2008), tais características antioxidantes potencializam esse extrato como promissor agente redutor de íons Prata (Ag^+) para formar AgNP. Além disso, devido ao poder complexante desses compostos, as moléculas componentes do extrato podem agir como agentes de recobrimento das AgNP, aumentando a estabilidade coloidal e diminuindo a toxicidade, para formar um sistema que apresenta as propriedades farmacológicas tanto das AgNP quanto do fitoterápico Kaloba.

2. Referencial bibliográfica

A aplicação de materiais e estruturas em nanoescala, geralmente variando de 1 a 100 nanômetros (nm), é uma área emergente da nanociência e nanotecnologia (SHARMA et al., 2009). As utilizações variadas de substâncias nanométricas são devidas as suas específicas características químicas e físicas, que conferem grande importância a esses materiais (RAI, 2013). Inúmeras são as áreas em que estão inseridas a nanobiotecnologia, e esta favorece em diversos aspectos a qualidade de vida. Dentre as variadas aplicações das nanopartículas pode-se citar o uso desses nanomateriais na indústria alimentícia, na área de terapia medicamentosa, medicina diagnóstica, além do uso no campo terapêutico, e diversas outros exemplos (ALBRECHT; EVANS; RASTON, 2006).

Devido à alta aplicação na área da saúde, as AgNP são consideradas os nanomateriais mais utilizados neste meio. Esta alta aplicação de AgNP na área da saúde é conferida por diversas peculiaridades específicas e próprias, tais como propriedades antimicrobianas (antibacterianas, antivirais e antifúngicas) e atividades anti-inflamatórias (ALBRECHT; EVANS; RASTON, 2006; GE et al., 2014).

As propriedades antimicrobianas da prata já são bem conhecidas, por isso esse metal é usado a anos como um bom agente antimicrobiano, até mesmo por demonstrar que interfere na ligação do vírus da imunodeficiência humana (HIV)

(NINO-MARTINEZ et al., 2008). Uma outra aplicação da prata tem sido na filtração de água e ar para eliminação de microrganismos (CHEN et al., 2008).

De modo geral, entre as nanopartículas metálicas, as AgNP apresentam atividade antimicrobiana significativa. Ainda que o mecanismo de ação dessas nanopartículas, para tal atividade não tenha sido esclarecido, elas são comumente usadas como agentes antimicrobianos mais eficazes e universais (KARATOPRAK et al, 2017).

Ainda há a necessidade de maior entendimento do mecanismo bactericida das AgNP. Vários estudos têm proposto que esse modo de ação se deve a ligação que esses nanomateriais podem realizar com a superfície da parede celular, deste modo interfere com a permeabilidade e com a respiração celular (KVITEK et al., 2008). Devido à grande área de superfície disponível para interação, as nanopartículas menores teriam um efeito bactericida melhor em relação as maiores. Um outro efeito possível das AgNP é que elas não apenas interajam com superfície da membrana, mas que possam invadir o interior da célula bacteriana (SHARMA et al., 2009).

Tendo em vista que as infecções hospitalares são uma das complicações mais comuns e uma das principais causas de mortes, a incorporação de AgNP em materiais de uso hospitalar já vem sendo realizada. Por exemplo, o uso de AgNP em cateteres de plástico, impedindo que haja a formação de biofilme de *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* (ROE et al., 2008).

A atividade antimicrobiana das AgNP tem influência de vários fatores, dentre eles se tem: o tamanho, a morfologia, a carga de superfície, o revestimento superficial e até mesmo o procedimento de síntese dessas nanopartículas (KARATOPRAK et al, 2017).

O meio mais comum para a obtenção das AgNP é a síntese tradicional, porém há também o método por síntese verde (GAN; LI, 2012).

A síntese química (tradicional) de nanoestruturas de prata é feita usando o princípio da redução química da prata, gerando uma solução coloidal que é estável em água e solventes orgânicos. São exemplos de agentes redutores o borohidreto, citrato e ascorbato. Quando a solução dessas partículas possui coloração amarelada, significa que são menores do que o comprimento de onda da luz no visível, tendo uma

banda intensa de absorvência em aproximadamente 400 nanômetros, além de possuir outros picos menos intensos (SHARMA et al., 2009).

Diante da elevada toxicidade, tanto do produto desejado quanto dos resíduos gerados, proporcionada pelos solventes químicos utilizados na síntese tradicional, além da necessidade de ampliar o uso das nanopartículas, tem sido proposto a síntese verde (INGALE; CHAUDHARI, 2013). Onde visa diminuir a toxicidade, substituindo os solventes pelo extrato de uma planta. A técnica consiste em adicionar o extrato vegetal à solução aquosa de AgNO_3 , ocorrendo a redução química de Ag^+ a Ag^0 e, por conseguinte, a formação de AgNP coloidal estável em solução. Como consequência se tem uma rota de síntese sustentável, o que resulta em um baixo impacto ambiental (MITTAL; CHISTI; BANERJEE, 2013).

Para que ocorra a reação de redução com eficácia, é necessário um potente agente redutor. Os principais constituintes com tal característica, em extratos vegetais são: aminoácidos, flavonoides, compostos fenólicos, terpenoides, ácido cítrico, grupos funcionais (álcoois, aldeídos, amins), compostos heterocíclicos, desidrogenases, CO_2 intracelular, proteínas de membrana, peptídeos, polissacarídeos, saponinas e ácido tânico (MITTAL; KALER; BANERJEE, 2012). A natureza e concentração do extrato, assim como, concentração de nitrato de prata, o pH e a temperatura da reação são fatores que alteram a velocidade da reação, a quantidade, estabilidade e formato das nanopartículas (AKHTAR; PANWAR; YUN, 2013).

A síntese verde tem como maior dificuldade o tempo de reação, devido ocorrer mais lentamente se comparado com a síntese tradicional das AgNP (NADAGOUDA et al., 2011). O micro-ondas vem sendo utilizado para otimizar o tempo de reação. O emprego desta técnica é muito promissor, devido a obtenção de altas temperaturas em condições controladas, o que resulta no aumento da nucleação, processo pelo qual as nanopartículas são criadas. Além disso o uso de micro-ondas, em relação ao aquecimento tradicional, cria partículas monométricas de grau de cristalinidade mais elevados e permite maior controle da morfologia (KAHRILAS et al., 2013; MELÉNDREZ et al., 2015). O micro-ondas se caracteriza como um ótimo recurso nas sínteses, também por evitar a perda de amostra por ebulição e degradação, pelo fato da reação ocorrer dentro de um ambiente fechado com temperatura, pressão, rotação e potência monitorados (JIN; FAN; AN, 2011).

O uso de extratos de plantas vem sido descritos em diversos estudos de atividade antimicrobianas, sobretudo plantas medicinais. Essas plantas medicinais são fontes excelentes de moléculas antimicrobianas. Um exemplo são os óleos essenciais, obtidos a partir de plantas medicinais, que tem tido respostas muito eficazes contra um grande espectro de microrganismos, até mesmo resistentes. Essas atividades são bem descritas nos estudos realizados por Fadli et al. (2012), que utilizou óleos essenciais das plantas medicinais *Thymus maroccanus* e *Thymus broussonetii*, e Tohidpour et al. (2010) que usou os óleos das plantas *Thymus vulgaris* e *Eucalyptus globulus*, contra várias bactérias Gram-negativas e Gram-positivas.

Vários tipos de extratos são utilizados como agentes antimicrobianos. O trabalho de Kang et al. (2008) descreve o efeito que o ácido gálico tem de inibir diferentes cepas de bacilos. Além disso, Borges et al. (2013) confirmaram a eficácia que o ácido gálico possui como agente antimicrobiano contra diversas cepas bacterianas patogênicas. Utilizando métodos parecidos Janaki et al. (2016) estudaram a atividade antibacteriana de apocinina e quercetina contra diferentes cepas.

Um estudo conduzido por Mun et al. (2013) relatou o efeito antibacteriano da curcumina, um dos flavonoides naturais isolado da planta *Curcuma longa*, contra *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA).

As espécies de *Pelargonium*, *Pelargonium reniforme* e *Pelargonium sidoides*, estão em evidência por suas diversas propriedades, dentre elas as atividades antimicrobianas têm sido investigadas contra um amplo espectro de bactérias tanto Gram-positivas quanto Gram-negativas (KARATOPRAK et al., 2017).

O extrato de uma raiz nativa da África do Sul e comercialmente conhecido como Kaloba, está entre os produtos fitoterápicos mais consumidos para o tratamento das infecções das vias áreas superiores. Seu princípio ativo, *Pelargonium sidoides*, da família Geraniaceae, tem uma longa tradição no tratamento de doenças. Além disso, estudos recentes realizados com a tintura comercial destas raízes confirmaram seus efeitos antioxidantes e anticancerígenos. De fato, as raízes de *Pelargonium sidoides* são conhecidas por conter uma riqueza de cumarinas altamente oxigenadas e numerosos outros compostos fenólicos e polifenólicos (BRENDLER; VAN WYK, 2008; PEREIRA et al., 2015).

O *Pelargonium sidoides* possui diversos constituintes, como ácido gálico, taninos, flavonoides, ácidos graxos insaturados. Contudo, os principais constituintes

encontrados são compostos fenólicos e derivados cumarínicos, dentre eles o umckalin, que é uma cumarina típica do *Pelargonium sidoides* (PEREIRA et al., 2015). Essas características levaram à produção de um extrato conhecido como EPs 7630. Atualmente, o medicamento fitoterápico a base de EPs 7630, das raízes de *Pelargonium sidoides*, foi aprovada para o tratamento de infecções agudas do trato respiratório em vários países da Europa, Ásia, América Central e do Sul (CAREDDU; PETTENAZZO, 2018).

Estudos apontam que as cumarinas, os taninos e os compostos fenólicos são os principais responsáveis pela característica redutora desta planta, tais características antioxidantes potencializam esse extrato como promissor agente redutor de íons Prata (Ag^+) para formar AgNP (KOLODZIEJ, 2008).

As ações antivirais, antibacterianas assim como as capacidades imunomoduladoras são exemplos de algumas das atividades farmacológicas que vem sido documentadas sobre o EPs 7630 (MICHAELIS; DOERR; CINATL, 2011; KOLODZIEJ, 2008; KOLODZIEJ et al., 2007). Diversos estudos *in vitro* realizados com esse extrato demonstraram um efeito inibitório contra várias cepas bacterianas, tais como *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* e *Staphylococcus aureus* (MOYO et al., 2013; USLU et al., 2009; JANECKI et al., 2011).

O efeito antibacteriano do extrato de *Pelargonium sidoides* é ocasionado por um mecanismo de modulação imune mediado pela ativação de macrófagos, envolvendo citocinas, como o interferon-gama, o que leva a um aumento na produção de óxido nítrico (THÄLE; KIDERLEN; KOLODZIEJ, 2011; THÄLE; KIDERLEN; KOLODZIEJ, 2008).

Theisen e Muller (2012), assim como Brown (2009) publicaram estudos comprovando um efeito inibitório de infecção do EPs 7630. Já o mecanismo de ação é melhor elucidado por Conrad et al (2007) e Janecki et al. (2011), descrevem essa ação como um efeito antagônico contra proteínas de adesão específicas da superfície bacteriana, deste modo impede a adesão às células do hospedeiro e sua penetração subsequente. De modo específico esta atividade antibacteriana está associada a presença de proantocianidinas no extrato de *Pelargonium sidoides*.

Um mecanismo que possivelmente pode estar associado com a atividade de proteção, é o aumento da motilidade dos cílios do tecido epitelial do aparelho

respiratório, esse mecanismo é estudado e descrito em estudos preliminares *in vitro*, no qual avaliam a ação do EPs 7630 em células cultivadas da mucosa do trato respiratório humano (NEUGEBAUER et al., 2005).

Existem vários tipos de infecções do trato respiratório, elas podem ser divididas em superior, como sinusite e rinite; e inferior, como bronquite e pneumonia. Podem ocorrer também formas mistas, de modo que duas ou mais partes do trato respiratório são infectadas concomitantemente. Apesar de que as diretrizes de tratamento recomendem que não ocorra o tratamento com o uso de antibióticos para infecções do trato respiratório agudas não complicadas, a grande maioria das prescrições de antibióticos nos Estados Unidos da América (EUA) são para esses quadros clínicos (KAVANAGH, 2014).

As infecções mais comuns em crianças são as do trato respiratório, o uso do extrato de *Pelargonium sidoides* tem demonstrado ser um tratamento não apenas efetivo, mas também seguro, essas características podem ser atribuídas tanto a atividade antimicrobiana do extrato quanto a capacidades imunomoduladoras que ele possui (MATTHYS et al., 2016). De acordo com um ensaio clínico que analisou o quadro de bronquite aguda, o uso do EPs 7630 foi eficaz, demonstrando ser uma alternativa segura para o tratamento dessa patologia (KAMIN et al., 2010).

Neste trabalho foi desenvolvida uma síntese verde de AgNP assistida por micro-ondas utilizando como agente redutor o extrato da raiz de *Pelargonium sidoides* (EPs 7630).

Para a caracterização das AgNP foram necessárias diversas análises, dentre elas: espectrofotometria no ultravioleta visível (UV-Vis), microscopia eletrônica de transmissão (MET), difração de raios X (DRX) e determinação da carga de superfície (potencial Zeta).

O UV-vis é um método simples e amplamente usado na determinação da formação de AgNP em uma dispersão, devido à ressonância plasmônica de superfície (SPR) das nanopartículas. O pico máximo de absorção é dependente do diâmetro médio das nanopartículas (GHOSH CHAUDHURI; PARIA, 2011; GEORGIEV et al., 2013).

A AgNP particularmente, possuem um pico de absorbância eletromagnética muito intenso, nos comprimentos de onda entre 400nm e 500nm graças ao efeito da SPR, que ocorre envolvendo a excitação coletiva de elétrons em um metal. Tal pico

está presente no momento em que a frequência do campo magnético está em ressonância com o movimento desses elétrons. Graças a esse ocorrido, pode-se perceber uma variação de cor característica em uma dispersão de AgNP, em conformidade com o tamanho das nanopartículas produzidas, além da composição do meio em que estão dispersas (SHARMA et al., 2009).

O grande avanço da nanotecnologia se deu a partir do advento do microscópio eletrônico de transmissão (MET), visto que os relatos na literatura empregam esta técnica na caracterização das nanopartículas sintetizadas, em especial a AgNP. Fundamentado com esta análise, observa-se que os diâmetros das nanopartículas obtidas podem ser variáveis, pois esse fator é dependente das condições da reação e do extrato da planta empregado (MURDOCK et al., 2008).

Por meio da técnica de difração de raios X (DRX), pode-se obter informações a respeito da estrutura cristalina do material analisado. Os raios X são radiações eletromagnéticas com comprimento de onda menor que aproximadamente 1Å. Utilizando essa técnica é possível determinar o diâmetro médio dos cristais. Quando são menores que 0,1 µm, o diâmetro médio é calculado a partir da equação de Scherrer, sendo determinado pela fórmula descrita abaixo (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2017).

$$d_c = \frac{k\lambda}{\beta \cos\theta}$$

Onde:

d_c : diâmetro médio das partículas

k : constante que depende da forma das partículas

λ : comprimento de onda da radiação eletromagnética

β : largura na metade da altura do pico de difração

θ : ângulo de difração

O potencial zeta de superfície é um dos parâmetros essenciais para a caracterização da estabilidade da nanopartícula. Esse valor é referente a carga elétrica que recobre a partícula, deste modo, é um indicativo da estabilidade coloidal, pois quanto maior o valor das cargas em módulo, maior a repulsão eletrostática entre as partículas e menor o estado de agregação e a probabilidade de floculação ou sedimentação (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2017).

3. Justificativa

A hipótese do presente trabalho foi verificar a capacidade do extrato de *Pelargonium sidoides* em sintetizar AgNP por uma rota sustentável e, se tais partículas teriam atividade antimicrobiana relevante, devido ao efeito sinérgico que possa ocorrer com a combinação das propriedades antimicrobianas do extrato de *Pelargonium sidoides* e das AgNP.

4. Objetivos (Objetivo geral e objetivos específicos)

4.1. Objetivo geral

O presente trabalho visa estudar o potencial antimicrobiano de AgNP elaboradas a partir de síntese verde assistida por micro-ondas, empregando extrato de *Pelargonium sidoides* como agente redutor e estabilizante.

4.2. Objetivos específicos

Otimizar uma metodologia para a produção de AgNP;

Caracterizar as nanopartículas formadas quanto ao tamanho, morfologia, estrutura cristalina e estabilidade;

Analisar o potencial antimicrobiano das AgNP sintetizadas.

5. Metodologia

Este trabalho está incluído no projeto de doutorado da acadêmica Renata Pascoal Illanes Tormena, do programa de pós-graduação em Ciências e Tecnologias em Saúde (PPGCTS) desta instituição.

Os estudos utilizando o extrato de *Pelargonium sidoides* foram cadastrados no SisGen, sob o número A484B78 (anexo 1), em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Foi utilizado extrato fluido de *Pelargonium sidoides* obtido através do fornecedor Grupo Centroflora, sendo realizados os ensaios de resíduo seco (secagem em banho Maria modelo SL-154, marca SOLAB e estufa da marca Lucadema) (ANVISA, 2010) e densidade (densímetro eletrônico, modelo DMA 4500M da marca Anton Paar) (ANVISA, 2010). Além do ensaio de determinação de polifenóis totais utilizando a curva de calibração com ácido gálico, e feito a leitura através do

espectrofotômetro (espectrofotômetro UV-Vis, modelo U-3900H da marca Hitachi) (SINGLETON e ROSSI, 1965).

O método de síntese das AgNP utilizado foi adaptado do trabalho de Shankar *et al.* (2003). De acordo com o artigo a síntese verde foi realizada convencionalmente com *Pelargonium graveolens*, planta da mesma família do *Pelargonium sidoides*, Geraniaceae. Neste, adicionou-se 5mL do extrato a 100mL de nitrato de prata (AgNO_3) aquoso 10^{-3} mol/L durante 9 horas, em temperatura de 25°C.

Para realizar a síntese de AgNPs com o extrato fluido de *Pelargonium sidoides* foi utilizado um reator de micro-ondas de alta performance modelo Monowave 300 da marca Anton Paar o modo de aquecimento foi *Heat to Temperature in Time* (HTTT) conforme sínteses de AgNP já testado. A partir de um planejamento realizado em trabalhos anteriores, foi possível determinar os parâmetros reacionais empregados neste estudo.

A síntese foi realizada em um frasco de reação de 20mL. Foi utilizado uma proporção de extrato de planta/ AgNO_3 de 10%, portanto, foram adicionados ao tubo de reação 18mL de AgNO_3 aquoso com a concentração de 10^{-3} mol/L, e 2mL de extrato de *Pelargonium sidoides*. A síntese de AgNP foi realizada a uma temperatura de 200°C durante 5 minutos.

Foi possível monitorar se houve a formação da AgNP através da técnica de espectrofotometria utilizando um espectrofotômetro UV-Vis; modelo U-3900H da marca Hitachi. Foram utilizadas cubetas de quartzo, realizando-se diluição prévia nas amostras.

Com o intuito de obter informações a respeito da estrutura cristalina das AgNP sintetizadas optou-se por realizar a técnica de difração de raios X (DRX) com um difratômetro modelo Miniflex 600, da marca Rigaku.

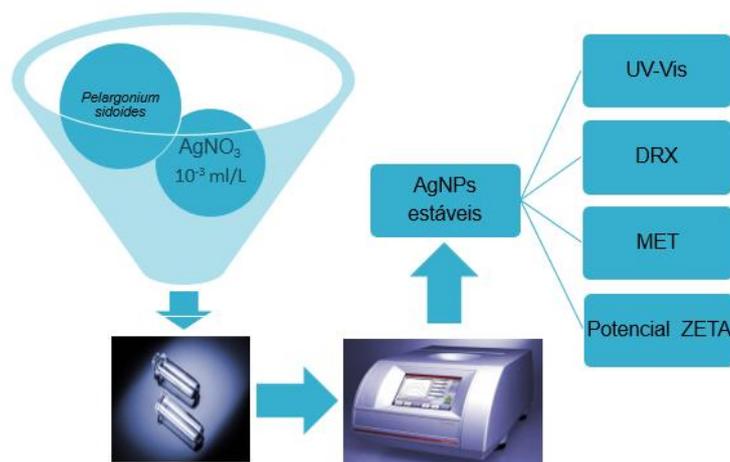
Por meio da Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) as características morfológicas das AgNP sintetizadas foram analisadas, visto que esta técnica tem grande eficácia para determinação da morfologia e tamanho. O microscópio eletrônico de transmissão utilizado foi do modelo JEOL JEM-2100, equipado com EDS, da Thermo scientific.

A determinação da carga de superfície (potencial Zeta) foi realizada tendo em vista que, este é um parâmetro essencial para a caracterização da estabilidade das

nanopartículas. Foi feito usando o equipamento de espalhamento de luz dinâmico Nano-Zetasizer – ZS, do modelo ZEN3600, da Malvern Instruments.

Um resumo dos processos supracitados está apresentado na Figura 1.

Figura 1 – Esquema do processo de síntese e caracterização das AgNP.



Fonte: Autoria Própria.

Para a análise da atividade antimicrobiana foram realizados ensaios de determinação da concentração inibitória mínima pelo método de microdiluição.

De acordo com a *Clinical and Laboratory Standards Institute* CLSI (2015) a Concentração inibitória mínima (CIM) é definida como a menor concentração (expressa em mg/L, $\mu\text{g/mL}$ ou UI/mL) de um agente antimicrobiano capaz de inibir o crescimento microbiano. O Método de Microdiluição em Caldo para determinação da CIM da AgNP foi realizado de acordo com a descrição da CLSI (2015). Os inóculos foram preparados com o crescimento das cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase ATCC BAA-1706 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 incubadas em caldo Muller Hinton. A concentração foi ajustada pela turbidez de 0,5 na escala de Mc Farland, apresentando aproximadamente 1×10^8 UFC/mL, sendo ajustada entre 0,08 – 0,10 de densidade óptica (D.O) a 625 nm em espectrofotômetro. Foram realizadas diluições das culturas em caldo Mueller Hinton resultando em uma concentração final de 1×10^6 UFC/mL.

A concentração inicial da AgNP foi de 1mg/mL e a partir dessa concentração foram realizadas diluições sucessivas com o auxílio de uma pipeta multicanal. Os ensaios foram realizados em microplacas de ELISA, de fundo chato, em triplicata, as placas são compostas de 96 orifícios, cada um identificado por números (colunas) e letras (fileiras). Cada poço recebeu 80 μL de caldo Mueller Hinton, 100 μL de solução de AgNP e 20 μL do inóculo ajustado para a concentração de 1×10^6 UFC/mL,

resultando em uma concentração final de 1×10^5 UFC/mL, por poço. Cada poço apresentou um volume final de 200 μ L.

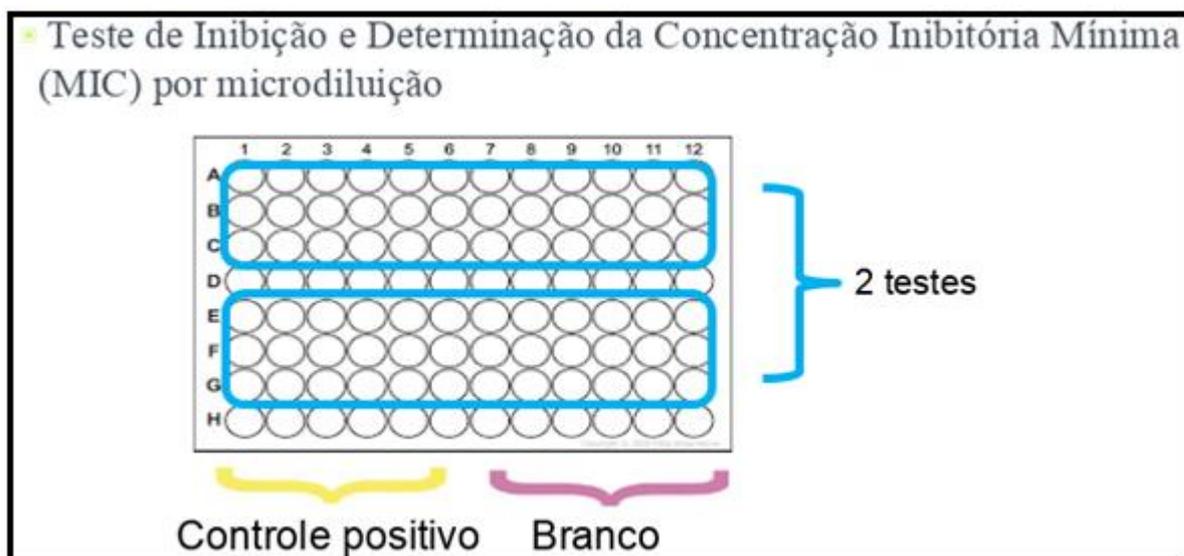
No controle positivo, cada poço recebeu 180 μ L de caldo Mueller Hinton e 20 μ L do inóculo na concentração de 1×10^6 UFC/mL. No controle negativo, foi utilizado como branco 100 μ L de caldo Mueller Hinton e 100 μ L da AgNP.

As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37° C por 24 horas e o procedimento foi feito em triplicata. A leitura das placas foi realizada em leitora de microplaca Multiskan®, com comprimento de onda de 630nm. A Figura 2 apresenta um esquema do teste de CIM em microplaca.

Os dados da leitura de absorbância obtidos, foram calculados através da fórmula seguinte, indicando a porcentagem e inibição alcançada:

$$\% \text{ de inibição} = \frac{(DO \text{ obtida} - DO \text{ contr. Negativo})}{(DO \text{ contr. positivo} - DO \text{ contr. negativo})} \times 100$$

Figura 2 - Determinação da Concentração Inibitória Mínima pelo método de microdiluição



Fonte: Autoria Própria.

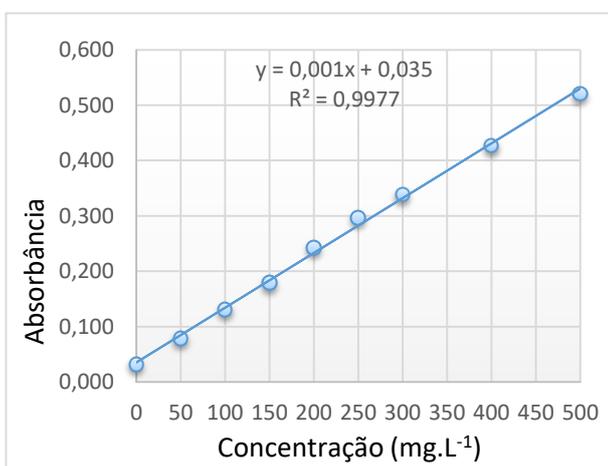
Foram executadas a análise da repetibilidade dos dados pelo cálculo do Intervalo de Correlação Intraclasse a 95% e cálculos de IC 50 foram executados pela metodologia do ajuste à curva de dose resposta-sigmoidal. Os programas estatísticos utilizados foram o SPSS versão 22.0 e o GraphPadprism versão 7.0. O nível de significância adotado foi de 5%.

6. Resultados e Discussões

A análise da matéria seca a partir do extrato fluido de *Pelargonium sidoides* empregado nas sínteses, realizada em quadruplicada, foi de $0,60 \pm 0,02\%$ e a densidade foi de $0,9798\text{g/cm}^3$ à 20°C .

Com base na equação obtida a partir da curva de calibração do padrão de ácido gálico (Figura 3), o valor médio de absorbância do extrato (diluído 5x) foi $0,371\text{nm}$ que corresponde a uma concentração de $339,53\text{mg.L}^{-1}$, sendo a concentração corrigida no valor de $1697,68\text{mg.L}^{-1}$ de polifenóis totais em termos de ácido gálico.

Figura 3 - Curva de calibração do padrão de ácido gálico.

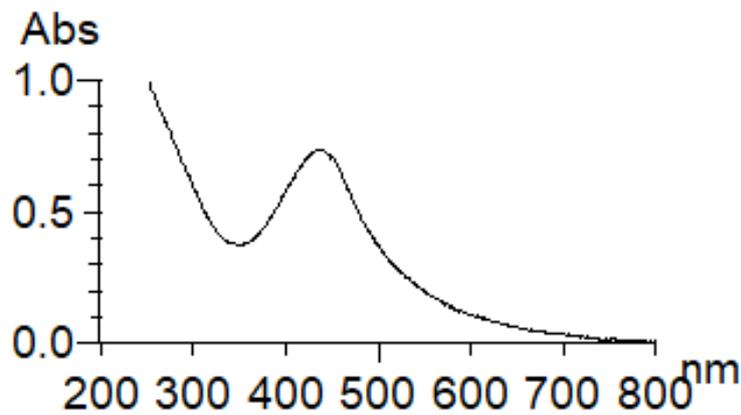


Fonte: Autoria Própria.

A AgNP foi sintetizada com sucesso com auxílio do micro-ondas e utilizando o extrato de *Pelargonium sidoides* como agente redutor, o que é confirmado com os resultados dos testes de caracterização. As características redutoras dessa planta são conferidas pelas cumarinas, os taninos e compostos fenólicos, que são os principais constituintes antioxidantes e conferem o poder para reduzir os íons de prata (KOLODZIEJ, 2008).

Para verificar a redução dos íons de prata, a solução retirada do micro-ondas foi monitorada na faixa de 200 à 800nm em um espectrofotômetro ultravioleta-visível (UV-Vis). No espectro de absorção de UV-Vis, foi observado um pico forte entre 400 e 450nm (Figura 4), isto é atribuído à banda de ressonância plasmônica de superfície das nanopartículas de prata.

Figura 4 - Espectro de UV-Vis da AgNP.



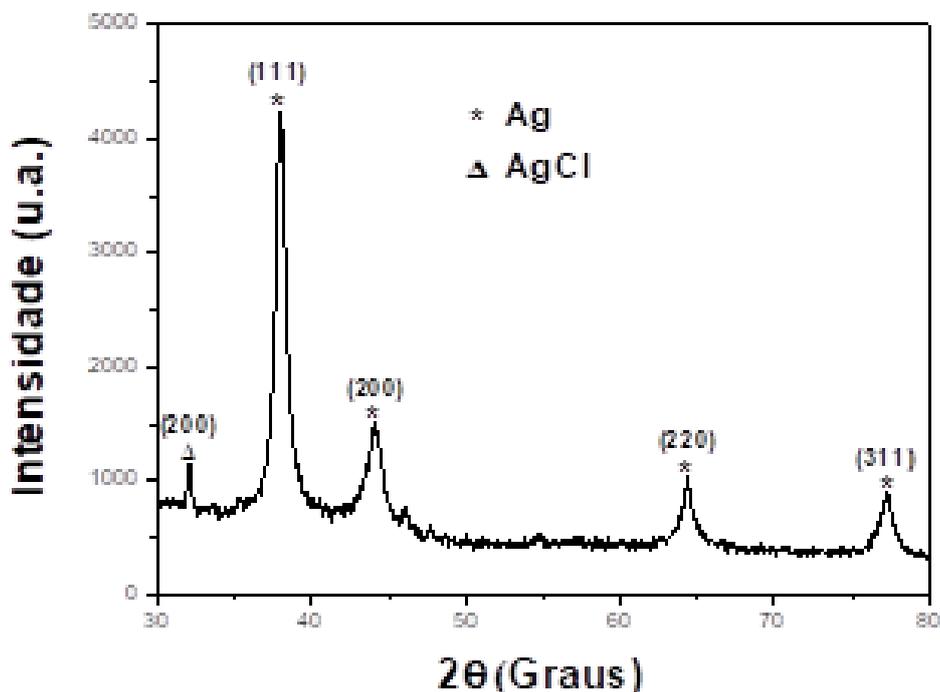
Fonte: Autoria Própria.

A curva de absorção de radiação eletromagnética no comprimento de onda característico da AgNP está em torno de 400 à 500nm, que se dá por conta da sua ressonância plasmônica de superfície. Esse é um fenômeno que envolve a excitação coletiva de elétrons em um metal. Uma variação de cor acontece neste pico, indo do marrom avermelhado até marrom escuro, a depender do tamanho das nanopartículas formadas (ALBERNAZ, 2014).

De acordo com Loo et al., (2012), utilizando *Camellia sinensis* como redutor, obtiveram absorção no comprimento de onda de 436nm. Já Vilchis-Nestor et al., (2008) relatam uma absorção em torno de 430nm utilizando a mesma planta.

Para confirmar a presença de prata cristalina na AgNP sintetizada, utilizando como agente redutor o extrato de *Pelargonium sidoides*, foram conduzidos estudos de difração de raios X (DRX), obtendo-se difratogramas, como o apresentado na figura 5.

Figura 5 - Difratoograma da AgNP.

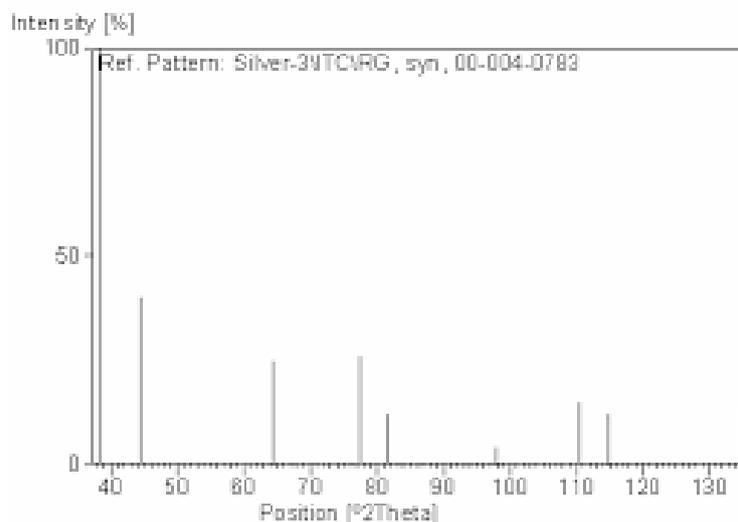


Fonte: Autoria Própria.

Ratificou-se a formação da AgNP no difratograma obtido, pela formação de picos de intensidade característicos da prata (Ag), de valores 2θ de aproximadamente $38,1^\circ$; $44,2^\circ$; $64,4^\circ$ e $77,4^\circ$; correspondendo aos planos de (111), (200), (220) e (311) respectivamente.

Os picos do DRX foram comparados com a ficha cristalográfica N°. 00-004-0783 (figura 6) do Centro Internacional para Dados de Difração (ICDD), confirmando que a estrutura cristalina da prata é cúbica de face centrada (CFC) (Shameli et al., 2010).

Figura 6 - Ficha cristalográfica N°. 00-004-0783.



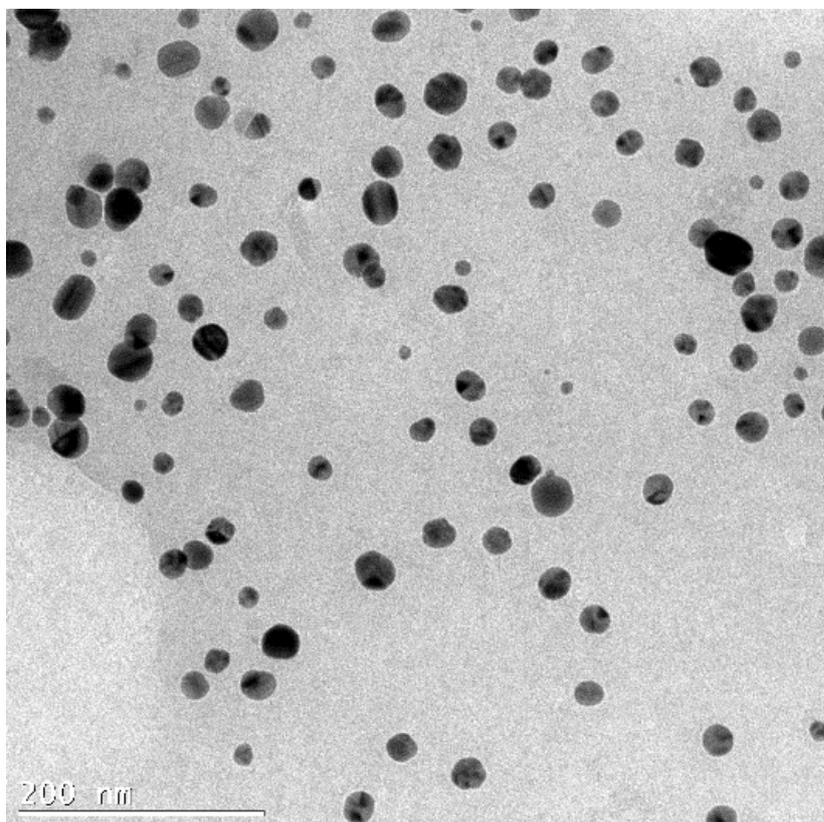
O tamanho da AgNP, estimado a partir da largura à meia altura (FWHM) do pico (111) de prata, usando a fórmula de Scherrer, é de 11,4nm.

O estudo de Singh et al., (2010), utilizando o extrato das folhas de *Argemone mexicana* como redutor da reação, obteve a partir da equação de Scherrer um tamanho médio de 20nm. Já o trabalho de Khalil et al., (2014), usando o extrato da folha de oliveira, relatou a formação de AgNP com tamanho médio de 51nm, também por meio da formula de Scherrer.

Ao observar o difratograma das AgNPs obtidas e comparando com a ficha cristalográfica N°. 00-004-0783 (figura 6), pode-se observar a presença de picos que não são característicos da prata cristalina. De acordo com o trabalho de Yao et al., (2015) os picos que diferem aos da prata são característicos do cloreto de prata (AgCl).

Diversos trabalhos utilizam a técnica de microscopia eletrônica de transmissão (MET) para caracterizar a morfologia e o tamanho das nanopartículas. De acordo com a figura 7, pode-se perceber que as nanopartículas sintetizadas são aproximadamente esféricas e não tendem a se agregar.

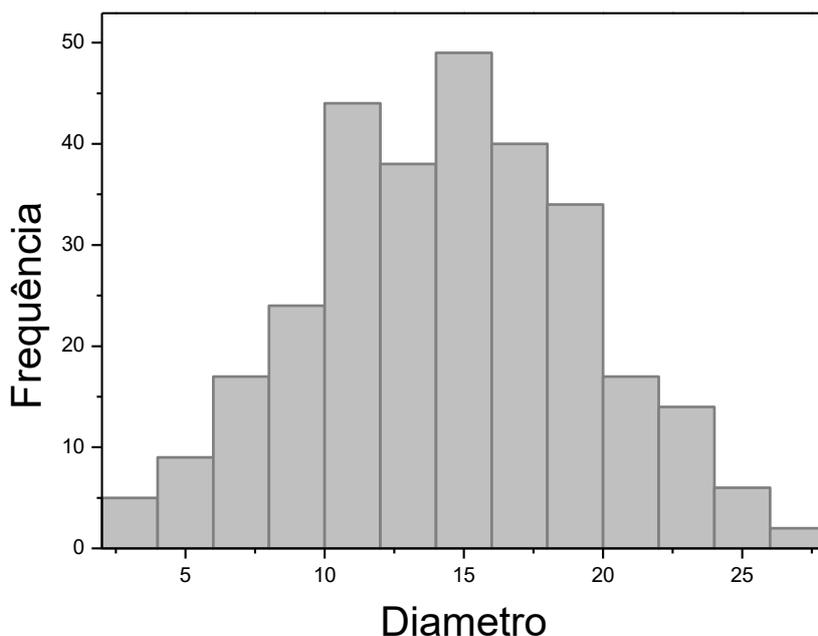
Figura 7 - Imagens de MET. As barras de escala são fornecidas no canto inferior esquerdo de cada imagem.



Fonte: Autoria Própria.

As imagens obtidas por MET foram analisadas utilizando o programa Image J e, através destes dados, pode-se obter um histograma de distribuição do diâmetro das AgNP, utilizando o programa Origin PRO 8.01, sendo o eixo das ordenadas referente a frequência, e o eixo das abscissas referente ao diâmetro (figura 8). Observou-se que a maior frequência de diâmetro dessas nanopartículas está entre 10nm à 20nm.

Figura 8 - Histograma da distribuição do tamanho das partículas.



Fonte: Autoria Própria.

O trabalho realizado por Murdock et al. (2008), ao analisar o MET observaram que o diâmetro médio das AgNP estavam entre 25 a 30nm. Já o trabalho conduzido por Sharma et al., (2009), que trabalhou com a síntese verde utilizando polissacarídeos, obteve diâmetro variável entre 25 a 50nm.

O pH da solução de AgNP influencia diretamente no valor da determinação do potencial Zeta. Um pH neutro ou alcalino tende a aumentar o valor do potencial Zeta, de modo a ficar mais negativo (Salem et al., 2011).

Na síntese verde um meio com pH ácido favorece a agregação das nanopartículas, já um meio alcalino proporciona a nucleação, e tende a gerar partículas com diâmetros menores (Akhtar et al.; 2013).

A determinação do potencial Zeta a pH 5, pH das AgNP assim que foram sintetizadas, foi de aproximadamente -28 mV, o que demonstra que a AgNP possui à sua superfície cargas negativas em meio aquoso. Pode-se entender que o alto valor em módulo do potencial Zeta das nanopartículas indica que estão estáveis, com baixa tendência de se agregarem.

Os valores de inibição do crescimento bacteriano foram obtidos por leitura em leitora de microplaca Multiskan®, com comprimento de onda de 630nm. Passadas as 24 horas de crescimento bacteriano, as placas foram coradas com corante Resazurina 0,01%, para melhor visualização da inibição gerada pela AgNP.

Normalmente, os mecanismos de ação dos agentes antimicrobianos dependem da ligação com a superfície e do metabolismo dos microrganismos. As AgNP, por serem partículas muito pequenas proporcionam melhor contato com os microrganismos, o que facilita a ligação à membrana celular e a penetrar a células bacterianas. AgNP possuem boas propriedades antimicrobianas (RAI et al., 2009). Além do tamanho das AgNP, a forma das nanopartículas também influencia na eficácia da atividade antimicrobiana. Isso é confirmado pelo estudo de Pal et al. (2007), onde descreve os diferentes níveis de inibição bacteriana por nanopartículas de diversos formatos.

Ademais, as plantas tem sido uma alternativa viável para pesquisa de novos compostos, dadas as mais diversas estruturas, propriedades físico-químicas e biológicas. Isso justifica o crescente uso para síntese verde de novos compostos pela indústria farmacêutica (ROZATTO, 2012).

A atividade antimicrobiana da AgNP testada é mostrada na Tabela 1. Com esses resultados foi assim determinada a CIM, frente aos microrganismos testados com as nanopartículas.

Conforme indicado na Tabela 1, percebeu-se que a CIM para inibição do microrganismo *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase foi menor quando comparado as outras bactérias testadas.

Tabela 1 - Concentração inibitória mínima obtida após o método de microdiluição.

Estatísticas (mg/mL)	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213		<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922		<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase ATCC BAA-1706		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	
	Puro	Ag	Puro	Ag	Puro	Ag	Puro	Ag
CIM (IC50)	84,98	12,04	267,01	71,37	21,11	0,85	10000	17,06
IC (IC 50)	67,25 a	5,88 a	192,3 a	69,03 a	12,57 a	0,01 a	muito	16,24 a
	107,4	24,65	372,6	98,87	35,39	7,23	amplo	23,75
IC 99,9 (MBC)	8413,02	1191,96	26433,01	7065,63	2088,9	84,15	990000	1688,94

Fonte: Autoria Própria

Na Tabela 1, existem três parâmetros importantes para serem analisados, o primeiro parâmetro (CIM) trata-se de concentrações exatas de inibição das cepas bacterianas. O segundo parâmetro (IC) é referente ao intervalo de concentração de inibição, que pode variar de 5,88 a 24,65mg/mL para a bactéria Gram positiva (*S. aureus*) e de 0,01 a 7,23mg/mL para a Gram negativa (*K. pneumoniae* carbapenemase). E o último parâmetro (MBC) que se trata da concentração que resulta na morte bacteriana, foram obtidos resultados equivalentes à 1191,96 e 84,15mg/mL para *S.aureus* e *K. pneumoniae* carbapenemase, respectivamente.

Os resultados da CIM das atividades antibacterianas mostram que a AgNP é capaz de inibir o crescimento dos microrganismos testados, apresentando CIM de 12,04mg/mL para *Staphylococcus aureus*, porém foi visto melhor resultado para *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase, com a CIM de 0,85mg/mL. Para *P. aeruginosa* o CIM foi de 17,06mg/mL Já para o teste em cepas de *E. coli*, os valores da CIM foram de 71,37mg/mL, isso demonstra que a inibição não foi tão boa.

Com isto foi possível identificar que o mesmo composto pode resultar em diferentes ações sobre as diferentes bactérias Gram positivas e negativas.

Para comparação dos resultados da determinação da concentração inibitória mínima pelo método de microdiluição das AgNP foram realizados os mesmos testes utilizando o EPs 7630.

Ainda não há na literatura um consenso a respeito dos valores de CIM. Diversos são os estudos que propõem diferentes classificações. Aligiannis et al. (2001) apresentaram a seguinte classificação: CIM até 0,5 mg/mL são inibidores potentes; CIM entre 0,6 e 1,5mg/mL são inibidores moderados; CIM acima de 1,6mg/mL são inibidores fracos. As AgNP apresentadas são classificadas, segundo essa proposta, como um inibidor moderado para *K. pneumoniae* carbapenemase uma vez que apresentou CIM=0,85mg/mL. Tal resultado mostra-se extremamente relevante diante da complexidade e dificuldade de tratamento da infecção por tal bactéria.

A resistência bacteriana é um crescente problema e necessita de novas medidas para solucionar, logo, a pesquisa de novos fármacos é de suma importância para tratar infecções por microrganismos resistentes.

7. Conclusão

A síntese de AgNP empregando extrato de *Pelargonium sidoides* e assistida por micro-ondas, a partir do AgNO₃, foi aperfeiçoada e otimizada por meio de uma síntese simples rápida e sustentável, tendo em vista que o dano ao meio ambiente é pouco ou nulo.

Os compostos presentes no EPs 7630 podem ser considerados responsáveis pela biorredução e estabilização das AgNP. Além de diminuir o tempo de reação, o uso do reator de micro-ondas de alto desempenho assegura a confiabilidade e reprodutibilidade do processo.

As AgNP sintetizadas foram caracterizadas mediante o uso das técnicas de Espectrofotometria UV-Vis, Difração de raios-X, Microscopia Eletrônica de Transmissão e a determinação da carga de superfície (potencial Zeta), indicando a formação de AgNP estáveis, aproximadamente esféricas e com diâmetro entre 10 nm à 20 nm.

Os ensaios da determinação da concentração inibitória mínima pelo método de microdiluição confirmaram que a AgNP sintetizada possui diferentes ações sobre as cepas ATCC. Tendo o melhor resultado de CIM para *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase, com o valor de 0,85mg/mL.

Esse resultado é de suma importância, visto que a resistência bacteriana é um crescente problema e necessita de novas medidas para solucionar, logo, a pesquisa de novas substâncias, neste caso, AgNP é de suma importância para o futuro dos tratamentos de infecções por microrganismos resistentes.

Os resultados do presente estudo esclarecem a necessidade de realizar mais testes e investir na pesquisa das AgNP utilizando o extrato de *Pelargonium sidoides*, dada sua promissora atividade em microrganismos.

8. Referências Bibliográficas

- AKHTAR, Mohd Sayeed; PANWAR, Jitendra; YUN, Yeung-Sang. Biogenic synthesis of metallic nanoparticles by plant-extracts. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 1, n. 6, p. 591-602, 2013.
- ALBERNAZ, V. L. Síntese verde de nanopartículas de prata com extrato aquoso de folhas de *Brosimum gaudichaudii*, caracterização físicoquímica, morfológica e suas aplicações no desenvolvimento de um nanobiossensor eletroquímico. Dissertação (Mestrado). Pós-graduação em nanociência e nanotecnologia. Instituto de Ciências Biológicas. Universidade de Brasília. Brasília, 2014.
- ALBRECHT, Matthew A.; EVANS, Cameron W.; RASTON, Colin L. Green chemistry and the health implications of nanoparticles. **Green chemistry**, v. 8, n. 5, p. 417-432, 2006.
- ALIGIANNIS N, et al. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal of agricultural and food chemistry**. 2001 Sep 17;49(9):4168-70.
- BORGES, Anabela et al. Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria. **Microbial Drug Resistance**, v. 19, n. 4, p. 256-265, 2013.
- BRASIL, M. S. Farmacopéia brasileira. **Diário Oficial da União**, v. 1, p. 546, 2010.
- BRENDLER, T.; VAN WYK, B.-E. A historical, scientific and commercial perspective on the medicinal use of *Pelargonium sidoides* (Geraniaceae). **Journal of ethnopharmacology**, v. 119, n. 3, p. 420-433, 2008.
- BROWN, D. *Pelargonium sidoides* extract (EPs 7630): alternative treatment of acute upper respiratory tract infections. **Natural Medicine Journal**, v. 1, n. 4, p. 1-6, 2009.
- CAREDDU, Domenico; PETTENAZZO, Andrea. *Pelargonium sidoides* extract EPs 7630: a review of its clinical efficacy and safety for treating acute respiratory tract infections in children. **International journal of general medicine**, v. 11, p. 91, 2018.
- CONRAD, Andreas et al. Extract of *Pelargonium sidoides* (EPs® 7630) inhibits the interactions of group A-streptococci and host epithelia in vitro. **Phytomedicine**, v. 14, p. 52-59, 2007.
- FADLI, Mariam et al. Antibacterial activity of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* essential oils against nosocomial infection–bacteria and their synergistic potential with antibiotics. **Phytomedicine**, v. 19, n. 5, p. 464-471, 2012.

GAN, Pei Pei; LI, Sam Fong Yau. Potential of plant as a biological factory to synthesize gold and silver nanoparticles and their applications. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 11, n. 2, p. 169-206, 2012.

GARCÍA-BARRASA, Jorge; LÓPEZ-DE-LUZURIAGA, José M.; MONGE, Miguel. Silver nanoparticles: synthesis through chemical methods in solution and biomedical applications. **Central European journal of chemistry**, v. 9, n. 1, p. 7-19, 2011.

GE, Liangpeng et al. Nanosilver particles in medical applications: synthesis, performance, and toxicity. **International journal of nanomedicine**, v. 9, p. 2399, 2014.

GEORGIEV, Peter et al. Implementing atomic force microscopy (AFM) for studying kinetics of gold nanoparticle's growth. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 434, p. 154-163, 2013.

GHAFFARI-MOGHADDAM, Mansour et al. Green synthesis of silver nanoparticles using plant extracts. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 31, n. 4, p. 548-557, 2014.

GHOSH CHAUDHURI, Rajib; PARIJA, Santanu. Core/shell nanoparticles: classes, properties, synthesis mechanisms, characterization, and applications. **Chemical reviews**, v. 112, n. 4, p. 2373-2433, 2011.

INGALE, Arun G.; CHAUDHARI, A. N. Biogenic synthesis of nanoparticles and potential applications: an eco-friendly approach. **J Nanomed Nanotechnol**, v. 4, n. 165, p. 1-7, 2013.

JANAKI, P. et al. Synthesis and antibacterial activity of novel chalcone derivatives of apocynin. **Letters in Drug Design & Discovery**, v. 10, n. 10, p. 923-927, 2013.

JANECKI, Aneta et al. Evaluation of an aqueous-ethanolic extract from *Pelargonium sidoides* (EPs® 7630) for its activity against group A-streptococci adhesion to human HEp-2 epithelial cells. **Journal of ethnopharmacology**, v. 133, n. 1, p. 147-152, 2011.

JIN, Ronghua; FAN, Ling; AN, Xiaoning. Microwave assisted ionic liquid pretreatment of medicinal plants for fast solvent extraction of active ingredients. **Separation and purification technology**, v. 83, p. 45-49, 2011.

KAHRILAS, Genevieve A. et al. Microwave-assisted green synthesis of silver nanoparticles using orange peel extract. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 2, n. 3, p. 367-376, 2013.

KAMIN, W. et al. Efficacy and tolerability of EPs 7630 in patients (aged 6–18 years old) with acute bronchitis: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical dose-finding study. **Acta Paediatrica**, v. 99, n. 4, p. 537-543, 2010.

KANG, Mi-Sun et al. Inhibitory effect of methyl gallate and gallic acid on oral bacteria. **The Journal of Microbiology**, v. 46, n. 6, p. 744-750, 2008.

KARATOPRAK, Gökçe Şeker et al. The Effect of *Pelargonium endlicherianum* Fenzl. root extracts on formation of nanoparticles and their antimicrobial activities. **Enzyme and microbial technology**, v. 97, p. 21-26, 2017.

KAVANAGH, Kevin T. How I was prescribed an unnecessary antibiotic while traveling to a conference on antibiotic resistance. **JAMA internal medicine**, v. 174, n. 9, p. 1433-1434, 2014.

KHALIL, MM et al. Green synthesis of silver nanoparticles using olive leaf extract and its antibacterial activity. **Arabian Journal of Chemistry**. 2014 Dec 1;7(6):1131-9.

KOŁODZIEJ, Herbert. Aqueous Ethanolic Extract of the Roots of *Pelargonium sidoides* - New Scientific Evidence for an Old Anti-Infective Phytopharmaceutical. **Planta Medica**, [s.l.], v. 74, n. 6, p.661-666, maio 2008. Georg Thieme Verlag KG. <http://dx.doi.org/10.1055/s-2007-993778>.

KOŁODZIEJ, Herbert; KIDERLEN, Albrecht F. In vitro evaluation of antibacterial and immunomodulatory activities of *Pelargonium reniforme*, *Pelargonium sidoides* and the related herbal drug preparation EPs® 7630. **Phytomedicine**, v. 14, p. 18-26, 2007.

LOO, Y. Y.; CHIENG, B. W.; NISHIBUCHI, M.i; RADU, S. Synthesis of silver nanoparticles by using tea leaf extract from *Camellia Sinensis*. **International Journal of Medicine**. Vol. 2. P 4263-4267, 2012.

MATTHYS, H. et al. EPs 7630 in acute respiratory tract infections—a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. **J Lung Pulm Respir Res**, v. 3, n. 1, p. 00068, 2016.

MATTHYS, H.; KÖHLER, S.; KAMIN, W. Safety and tolerability of EPs 7630 in clinical trials. **Adv Pharmacoepidemiol Drug Saf**, v. 2, n. 142, p. 2167-1052.1000142, 2013.

MELÉNDREZ, Manuel F. et al. Quality and high yield synthesis of Ag nanowires by microwave-assisted hydrothermal method. **Nanoscale research letters**, v. 10, n. 1, p. 48, 2015.

MICHAELIS, Martin; DOERR, Hans Wilhelm; CINATL JR, Jindrich. Investigation of the influence of EPs® 7630, a herbal drug preparation from *Pelargonium sidoides*, on

replication of a broad panel of respiratory viruses. **Phytomedicine**, v. 18, n. 5, p. 384-386, 2011.

MITTAL, Amit Kumar; CHISTI, Yusuf; BANERJEE, Uttam Chand. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. **Biotechnology advances**, v. 31, n. 2, p. 346-356, 2013.

MITTAL, Amit Kumar; KALER, Abhishek; BANERJEE, Uttam Chand. Free Radical Scavenging and Antioxidant Activity of Silver Nanoparticles Synthesized from Flower Extract of *Rhododendron dauricum*. **Nano Biomedicine & Engineering**, v. 4, n. 3, 2012.

MOHAPATRA, Bandita; KURIAKOSE, Sini; MOHAPATRA, Satyabrata. Rapid green synthesis of silver nanoparticles and nanorods using *Piper nigrum* extract. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 637, p. 119-126, 2015.

MOYO, Mack et al. Conservation strategy for *Pelargonium sidoides* DC: phenolic profile and pharmacological activity of acclimatized plants derived from tissue culture. **Journal of ethnopharmacology**, v. 149, n. 2, p. 557-561, 2013.

MUN, Su-Hyun et al. Synergistic antibacterial effect of curcumin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Phytomedicine**, v. 20, n. 8-9, p. 714-718, 2013.

MURDOCK, Richard C. et al. Characterization of nanomaterial dispersion in solution prior to in vitro exposure using dynamic light scattering technique. **Toxicological sciences**, v. 101, n.2, p. 239-253, 2008.

NADAGOUDA, Mallikarjuna N.; SPETH, Thomas F.; VARMA, Rajender S. Microwave-assisted green synthesis of silver nanostructures. **Accounts of Chemical Research**, v. 44, n. 7, p. 469-478, 2011.

NEUGEBAUER, P. et al. A new approach to pharmacological effects on ciliary beat frequency in cell cultures—exemplary measurements under *Pelargonium sidoides* extract (EPs 7630). **Phytomedicine**, v. 12, n. 1-2, p. 46-51, 2005.

PEREIRA, Andreia et al. Activity-guided isolation and identification of the major antioxidant and anticancer compounds from a commercial *Pelargonium sidoides* tincture. **Medicinal Chemistry Research**, v. 24, n. 11, p. 3838-3852, 2015.

RAI M, et al. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. **Biotechnology advances**. 2009 Jan 1;27(1):76-83.

RAI, Mahendra. Nanobiotechnology verde: biossínteses de nanopartículas metálicas e suas aplicações como nanoantimicrobianos. **Ciência e Cultura**, v. 65, n. 3, p. 44-48, 2013

ROE, David et al. Antimicrobial surface functionalization of plastic catheters by silver nanoparticles. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 61, n. 4, p. 869-876, 2008.

ROZATTO, Mariana Rodrigues. **Determinação da atividade antimicrobiana in vitro de extratos, frações e compostos isolados de Arrabidaea brachypoda**. 2012. 100 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2012.

SALEM, H. F.; EID, K. A. M.; SHARAF, M. A. Formulation and evaluation of silver nanoparticles as antibacterial and antifungal agents with a minimal cytotoxic effect. **International Journal of Drug Delivery**, v. 3, p. 293-304, 2011.

SHAMELI, K et al. Synthesis and characterization of silver/talc nanocomposites using the wet chemical reduction method. **International journal of nanomedicine**. 2010;5:743.

SHANKAR, S. Shiv; AHMAD, Absar; SASTRY, Murali. Geranium leaf assisted biosynthesis of silver nanoparticles. **Biotechnology progress**, v. 19, n. 6, p. 1627-1631, 2003.

SHARMA, Virender K.; YNGARD, Ria A.; LIN, Yekaterina. Silver nanoparticles: green synthesis and their antimicrobial activities. **Advances in colloid and interface science**, v. 145, n. 1-2, p. 83-96, 2009.

SINGH, Priyanka et al. Biosynthesis, characterization, and antimicrobial applications of silver nanoparticles. **International journal of nanomedicine**, v. 10, p. 2567, 2015.

SINGH, A et al. Green synthesis of silver nanoparticles using Argemone mexicana leaf extract and evaluation of their antimicrobial activities. **Dig J Nanomater Bios**. 2010 Jul;5(2):483-9.

SINGLETON, Vernon L.; ROSSI, Joseph A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.

SKOOG, Douglas A.; HOLLER, F. James; CROUCH, Stanley R. **Principles of instrumental analysis**. Cengage learning, 2017.

THÄLE, Carsten; KIDERLEN, Albrecht Ferdinand; KOLODZIEJ, Herbert. Anti-infective activities of *Pelargonium sidoides* (EPs® 7630): Effects of induced NO production on *Leishmania major* in infected macrophages and antiviral effects as assessed in a Fibroblast-virus protection assay. **Planta medica**, v. 77, n. 07, p. 718-725, 2011.

THALE, Carsten; KIDERLEN, Albrecht; KOLODZIEJ, Herbert. Anti-Infective Mode of Action of EPs (R) 7630 at the Molecular Level. **Planta medica**, v. 74, n. 6, p. 675, 2008.

THEISEN, Linda L.; MULLER, Claude P. EPs® 7630 (Umckaloabo®), an extract from *Pelargonium sidoides* roots, exerts anti-influenza virus activity in vitro and in vivo. **Antiviral research**, v. 94, n. 2, p. 147-156, 2012.

TOHIDPOUR, A. et al. Antibacterial effect of essential oils from two medicinal plants against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Phytomedicine**, v. 17, n. 2, p. 142-145, 2010.

USLU, Hakan et al. Antibacterial spectrum of Umckaloabo (*Pelargonium sidoides*) on upper airway infection agents. **Eur. J. Gen. Med**, v. 6, p. 245-248, 2009.

VILCHIS-NESTOR, A. R. et al. Solventless synthesis and optical properties of Au and Ag nanoparticles using *Camellia sinensis* extract. *Materials Letters*. Vol. 62. P 3103-3105, 2008.

YAO, X et al. Synthesis of cube-like Ag/AgCl plasmonic photocatalyst with enhanced visible light photocatalytic activity. *Catalysis Communications*. 2015 Jan 10;59:151-5.

9. Anexos

Anexo 1:



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº A484B78

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: A484B78
Usuário: Marcelo Henrique Sousa
CPF/CNPJ: 605.717.211-68
Objeto do Acesso: Patrimônio Genético
Finalidade do Acesso: Pesquisa

Espécie

Pelargonium sidoides

Título da Atividade: **Uso de extrato de Pelargonium Sidoides para síntese de nanopartículas de prata**

Equipe

Marcelo Henrique Sousa	Universidade de Brasília
Felipe Mourthé Félix	Universidade de Brasília
Renata Pascoal Illanes Tormena	Universidade de Brasília

Data do Cadastro: 09/10/2018 15:00:04
Situação do Cadastro: Concluído



Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em 11:52 de 22/11/2018.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - **SISGEN**